

骨格筋を利用した補助循環システム
に関する実験的検討

1989

東京大学大学院博士課程
医学研究科
土屋 敏樹



①

筑波大学

医学博士学位論文

骨格筋を利用した補助循環システム
に関する実験的検討

1989

筑波大学大学院博士課程医学研究科

土肥敏樹

目次

第1章	本研究の動機	1
1.1.	心不全患者の増加とその治療の必要性	1
1.2.	心不全に対する治療	2
1.2.1.	人工心臓の現状	2
1.2.2.	心臓移植の現状	3
1.2.3.	簡便な補助循環の必要性	5
1.3.	骨格筋の心補助への応用	5
1.3.1.	補助循環における骨格筋利用の利点	6
1.3.2.	補助循環に対する骨格筋応用の問題点	7
1.4.	本研究の目的	8
第2章	骨格筋の特性に関する現在までの知見	9
2.1.	骨格筋筋線維の分類とその特性	9
2.2.	骨格筋細胞の可変性	11
2.2.1.	個体発生過程における変化	11
2.2.2.	力学的環境による変化	12
2.2.3.	神経支配による変化	13
2.2.4.	内分泌環境による変化	14
2.2.5.	薬物投与による変化	15
2.2.6.	電気刺激による変化	17
2.3.	心筋と骨格筋の違いについて	18
2.4.	骨格筋を利用した補助循環における 遅筋化骨格筋の優位性	19
第3章	心血管系に関する骨格筋応用の歴史	21
3.1.	虚血心筋への血行再建	21
3.2.	骨格筋を利用した心大血管系の修復	22
3.3.	Cardiomyoplasty	23

3.4.	Biomechanical Cardiac Assist Device	24
3.4.1.	Hydraulic Pouch	25
3.4.2.	Counterpulsation	26
3.5.	臨床応用に向けての今後の課題	26
第4章	骨格筋線維タイプ変換の評価法としての 複屈折法の検討	28
4.1.	複屈折法の原理と生物学における応用	28
4.1.1.	光学活性	28
4.1.2.	骨格筋と複屈折	30
4.1.3.	複屈折法の原理	31
4.1.4.	複屈折法の測定方法	33
4.1.5.	複屈折法の臨床応用	34
4.2.	実験の目的	35
4.3.	対象と方法	35
4.4.	結果	37
4.5.	考察	37
第5章	骨格筋を遅筋化する方法としての 電気刺激法の検討	41
5.1.	実験の目的	41
5.2.	対象と方法	41
5.3.	結果	44
5.3.1.	複屈折法による検討	44
5.3.2.	ATPase 染色による検討	44
5.3.3.	電子顕微鏡による検討	44
5.4.	考察	58
第6章	骨格筋を遅筋化する方法としての 水泳トレーニング法の検討	71
6.1.	実験の目的	71
6.2.	対象と方法	71

6.3.	結果	72
6.4.	考察	73
第7章	ヒトにおける骨格筋長期電気刺激の1例	79
第8章	遅筋化骨格筋を用いた右心補助装置 の有効性の検討	84
8.1.	補助循環システムの一つとしての右心補助	84
8.2.	実験の目的	85
8.3.	対象と方法	85
8.4.	結果	89
8.4.1.	血行動態の変化	89
8.4.2.	肺動脈拡張期圧の変化	89
8.5.	考察	90
第9章	結論	99
文献		100
国内の文献		100
外国の文献		102
謝辞		124
付記		125

第1章 本研究の動機

薬剤による治療のみでは救命し得ない重症心不全患者に対する治療法として、いろいろな機械的補助循環法が研究されてきた。そのなかで、患者自身の骨格筋を利用した補助循環システムの研究が近年行われるようになってきている。このシステムは Chiu らにより biomechanical cardiac assist device と命名された [Walsh, G., et al., 1986]。患者自身の骨格筋を利用する biomechanical cardiac assist device は、人工心臓や心臓移植などと比較するとエネルギー源を必要とせず、装置をすべて体内に植え込み、複雑な免疫反応の影響を受けず、しかも、臓器提供者の確保も必要としない理想的なシステムであるといえる。しかし、この biomechanical cardiac assist device の臨床応用にはいまだ解決すべき問題が山積している。それらのうち最大の課題は骨格筋の疲労現象であり、この問題の解決なくして本システムの完成はありえないと考えられる。

1.1. 心不全患者の増加とその治療の必要性

内科的心不全の管理と薬物療法の進歩にしたがって、急性心不全患者の救命率は飛躍的に向上した。また IABP (intra aortic balloon pumping) [Kantrowitz, A., et al., 1968] などの機械的心補助の臨床における普及も急性心不全患者の救命率の向上に深く寄与している。慢性の心不全について見ても、弁膜症、複雑心奇形など、形態的な異常のため引き起こされる心不全は、外科的手術で形態学的異常をなおすことで回復可能である。しかし、心筋の収縮力自体が低下するような病態、すなわち心筋症および末期の虚血性心疾患などでは、収縮力を回復させる以外に根本的な治療法はない。同様に心室の發育の悪い一部の複雑心奇形についても、薬物を使用して心室の成長をはかることはもちろんのこと、手術的に心室筋の収縮力増加をはかることも不可能である。

1.2. 心不全に対する治療

1.2.1. 人工心臓の現状

1969年 Cooley らが心臓移植患者に対して、提供心臓が得られるまでの bridge として初めて TAH (total artificial heart) を臨床応用して以来、現在までに数多くの臨床例が報告されている [Cooley, D., et al., 1969]。TAH の第一の目的は、心臓移植の適応にならない患者に対する永久使用であり、第二の目的は心臓移植患者に対する bridge としての短期使用である。永久使用の目的での TAH の植え込みは 1982 年に DeVries らによって初めて行われた [DeVries, W., et al., 1984]。bridge としての TAH の成績は比較的良好であるが、永久使用を目的として TAH を移植した患者は全員死亡している。主な死亡原因は出血と感染である。ここに現在の TAH が乗り越えなくてはならない大きな課題が存在している。一つは血液適合性の問題であり、もう一つはエネルギー源の問題である。ちなみに、能勢らは、臨床使用に耐える TAH の条件として次の 4 つをあげている [能勢之彦 1987]。

- (1) 血液適合性が良好で溶血が少なく、耐久性のあるシステム。
- (2) 単純で信頼性のある情報に基づく簡便な操作方法。
- (3) 小さな容積で解剖学的に適合するシステム。
- (4) 充実した生活を約束する完全植え込み型システム。

TAH 装着者の全員に脳血管障害の発生を見たということからわかるように、抗血栓性は非常に重要な問題である。ポンプの構成要素のうち、血液との接触面は血液適合性の高い Biomer あるいは、Cardiothane などの素材を用いており、ポンプ内面はいずれもシームレス加工を施して血栓形成の予

防をはかっている。また、TAH を装着した患者には抗凝固療法を行い血栓の防止につとめている。しかし、いずれの対策もいまだ十分とはいえ今後の研究の発展が期待される。

体外にエネルギー源を持つ限り感染の問題から解放されることはない。また体外に大きなエネルギー源を抱えているようでは、TAH を装着された患者の quality of life の低下は著しい。現在、完全植え込み型 TAH の開発が進んでいる [Fujimoto, L., et al., 1984]。しかし、これもエネルギー源は体外におき、コイルで経皮的に電力を体内に伝送 (transcutaneous energy transmission system, TES) し、その電力を体内の蓄電池に蓄電して、これを動力源としてポンプを駆動するものである [Scherman, C., et al., 1984]。体内と体外は完全に分離されるため、感染の危険は回避されるものの、患者は一定時間ごとに蓄電池を充電しなければ正常なポンプの駆動は期待できず、quality of life の向上には限界がある。エネルギー源まで体内に植え込む TAH は、そのエネルギー源として原子力を用いねばならず、環境汚染、熱発生などの問題を解決できず、現在はその研究は中断している。

TAH は工学的に非常に精密な機械であるので、その維持管理には高度に専門的な知識が必要である。その上に、全身の循環を維持している心臓の機能を代行しているのであるから、TAH が故障して停止することは、TAH を装着している患者の死を意味する。また、TAH は常に血栓形成の危険があるため、投与量決定の難しい抗凝固薬を常に多量に投与しなければならない点も、TAH 装着患者の管理を複雑にする原因の一つである。

TAH は精密な機械であり、絶対故障しない耐久性が要求される。このような製品を開発するには莫大に開発研究費がかかり、その上、大量生産できないため製造コストも巨額である。現在の制御方法では TAH の運動対応能には疑問が残り、患者の社会復帰も困難である。したがって現時点では TAH には医療経済学的に問題が多いといわざるを得ない。

1.2.2. 心臓移植の現状

実験的心臓移植は1905年に行われたCarrelらの研究に端を発している[松野直徒 1985]。その後の心臓外科学、移植免疫学の研究の進歩にともない、心臓移植は難治性の重症心疾患に対する根本的な治療法として、急速に臨床応用が進んできた。特にスタンフォード大学チームの地道な努力と[Reitz, B.A., et al., 1982]、1980年以降に実用化されたサイクロスポリンA[Borel, J.F., et al., 1976]は、心臓移植の臨床成績向上の基礎を作ったといえる。現在はサイクロスポリンAを使用した症例において、5年生存率は78.3%に達している[Kaye, M.P., 1987]。しかし、現在行われている心臓移植がまったく問題がないわけではない。以下に心臓移植の抱える問題点について簡単にまとめてみたい。

複雑な免疫系を有する人体に、組織適合性のない他人の臓器を移植するのであるから、移植後の拒絶反応の抑制には細心の注意が必要である。そのため、心臓移植後の患者の管理は複雑で、拒絶反応の早期発見のためには、定期的な心筋生検が必要欠くべからざるものになっている[Caves, P.K., et al., 1973]。心筋生検法は移植患者にかなりの侵襲を加える検査である。また免疫抑制剤はその薬効から考えても、非常に副作用の多い薬剤である。そのため、その投与量の決定には高度の専門的知識が必要である。急性期拒絶反応の阻止にサイクロスポリンAが重要な働きをしていることは間違いない。しかし、慢性期拒絶反応に対するサイクロスポリンAの効果はまだ明らかではない。心臓移植における慢性期拒絶反応は冠動脈狭窄を主徴とするため、抗凝固剤、血小板凝集抑制剤などの対症療法、高脂血症に対する食事指導などが行われているが必ずしも有効ではなく、現在のところ決め手となる治療法はない[Oyer, P.E., et al., 1981]。他の臓器移植における免疫抑制剤副作用と同様に、心臓移植後のサイクロスポリンAの投与合併症も報告されている。たとえば、術後1-2ヵ月で発症する高血圧[Oyer, P.E., et al., 1983]、大量投与群における悪性リンパ腫の発生[Penno-

J.L., et al., 1982]なども、今後の解決を要する課題である。

心臓移植を成功させるにはその受容者の選択は重要な問題である。Pennockらはスタンフォード大学での受容者の選択基準を示している[Pennock, J.L., et al., 1982]。それによると、年齢50歳以上、糖尿病患者、脳血管障害患者、肺高血圧症患者、精神病患者、周囲に精神的および社会的に支援者がいない、などの条件を有する患者は心臓移植の対象からはずされている。これらはたいへん厳しい基準であり、心臓移植の適応基準からはずれる心不全患者は相当数にのぼると考えられる。

脳死状態で心臓を取り出さねばならない心臓移植において、供与者の不足は深刻な問題である。すでに、広い範囲から供与者を集めるための移植コーディネーター制度の発達している米国においてさえも、供与者は常に不足している。とくに宗教、社会習慣的に、心停止をもって死亡と判定するわが国において、供与者を得ることは現在でも、また将来にわたっても困難であるといえる。

1.2.3. 簡便な補助循環の必要性

心不全患者のなかには、心拍出量の一部でも補助してやれば、運動耐容能も上がり、予後も改善し得ると考えられる患者が少なからず存在する。それらの患者において、エネルギー源まで体内に植え込め、抗血栓性に優れた補助循環装置を長期にわたって使用できれば、患者のquality of lifeの向上には非常に有用であると考えられる。つまり、患者の心機能をすべては代行することはできないが、その一部を代行し、エネルギー源まで含めて完全に体内に植え込み可能であり、なおかつ、術後の管理が容易であるような補助循環の必要性は非常に大きいといえる。

1.3. 骨格筋の心補助への応用

患者の体内にあるエネルギー源として、骨格筋を補助循環に利用することが考えられている。現在その具体的な例として、大きく分けて以下の二つの方法が挙げられている。一つは、病的な心筋の一部を、有茎で移動させた骨格筋で置換するか、または、心室の周りに有茎で移動させた骨格筋を巻き付けるというもので、cardiomyoplasty と呼ばれている [Walsh, G., et al., 1986, Carpentier, A., et al., 1985]。もう一つは、機械的補助循環装置のエネルギー源として、骨格筋を利用するものであり、biomechanical cardiac assist device と呼ばれている [Walsh, G., et al., 1986]。

以下に、骨格筋を心補助に使用する際の、他の機械的補助循環法に比べてみた利点、欠点について簡単にまとめてみたい。

1.3.1. 補助循環における骨格筋利用の利点

まず、エネルギー源が骨格筋の収縮力であり、外部からのエネルギーの補給の必要がないことが大きな利点である。このため、エネルギー源まで含めて完全に体内に植え込み可能である。患者の quality of life の向上に非常に有利であり、感染の危険も少なくなる。

さらに、自己の組織を使用するので、移植と違い複雑な免疫反応の影響を受けない。したがって、術後の患者管理はより容易であり、慢性の拒絶反応の問題とも無縁である。また、供与者の確保も必要ではない。補助循環が必要になれば計画的に、いつでも開始できる。このことは、特に供与者の確保が難しいと考えられるわが国において重要であると考えられる。

免疫抑制剤を使用せず、しかもグラフト自体には血流があるため、感染に抵抗性がある。

使用するグラフトそのものが生きており、成長する能力を有する。このことは小児に対する適応において、極めて有利

である。

骨格筋表面の抗血栓性についてはまだ未知の問題である。抗血栓性を付与するための一方法として、内皮細胞の seeding が考えられている。血流のある生きた組織である骨格筋は、血管内皮の生着には有利に働くと考えられ、今後の研究の発展が期待される。

biomechanical cardiac assist device は既存の技術の上に成り立っており、新たに開発が必要なものは専用の神経刺激装置と電極だけである。その神経刺激装置も、現在広く臨床に應用されている心臓ペースメーカーの技術がそのまま應用可能である。そのため、TAH に比較して開発費は非常に少なくすむと考えられる。

1.3.2. 補助循環に対する骨格筋応用の問題点

以上のように、biomechanical cardiac assist device は既存の補助循環システムの様々な欠点を補い得るシステムであるといえる。しかし、この biomechanical cardiac assist device にも克服しなければならない問題がいくつか存在する。以下にそれらの問題について簡単に触れてみたい。

骨格筋は短時間の運動後の休止期に、その酸素負債を回復している。したがって、心筋の代用物として持続的運動を行った場合の負荷は大きい。そのため、骨格筋を単純に連続使用した場合、すぐに疲労現象が表われ、運動を停止してしまう。このことは、biomechanical cardiac assist device にとって最大の問題であり、その解決のための研究の進展が必要である。

また、血液を駆出するために最適に分化して複雑な形状をとっている心臓に比較して、骨格筋は形状が単純であり、心臓と同じ形状を作製することは非常に難しい。神経、および血管走行の関係もあり、骨格筋は本来存在している位置から大幅には移動できない。そのため biomechanical cardiac assist device を作製する上で何らかの解剖学的制約がつきまとう。

biomechanical cardiac assist device に低圧系から血液を流入させる場合、本 device は基本的には陰圧を発生できないため、骨格筋に十分な前負荷をかけられるように血液を急速に流入させ得る機構を付加する必要がある。また、その収縮力を有効に血液の駆出力に結び付けるといった点においても検討を要すると考えられる。

1.4. 本研究の目的

心臓外科の臨床に携わる中で、薬物治療や外科的手段を用いても救命することができない多くの患者に遭遇してきた。現在のところ、TAH や補助循環は心機能の一時的代行の域を出ていない。心臓移植については社会的問題も含め、種々の観点から、広く用いられる治療法としては限界が感じられる。このような現況に立つとき、自己の骨格筋をエネルギー源とした biomechanical cardiac assist device は極めて魅力的なテーマであると思われ、臨床応用への道程は遠いが、補助循環システムへの骨格筋の応用に関する研究をテーマとした。

骨格筋の耐疲労性を向上させるための骨格筋の遅筋化は必須であると考えられる。しかし、効果的に骨格筋を遅筋化する方法に関しての詳細な検討は少なく、特に4週間以内の短期的な検討はない。また、臨床応用に際して、骨格筋遅筋化の簡便な評価法の確立が切望されている。また、遅筋化した骨格筋が補助循環装置の動力源として有効か否かに関しては、左心系に関する検討はあるものの、骨格筋の易疲労性から考えて、臨床応用上有利であると考えられる、右心系に関する応用の報告は少ない。さらに、循環補助装置への血液の急速流入時に陰圧の発生できないこの種の装置において、血液の流入に関して有利である、大血管における counter-pulsation 法に関しては、右心系において、いまだ報告がない。そこで、われわれは、[1] 骨格筋の筋線維タイプ変換の評価法として、複屈折法の有用性を検討すること、[2] 骨格筋を速やかに遅筋化する方法として、電気刺激による方

法を検討すること、[3] 骨格筋を遅筋化する方法として、水泳トレーニング法（生理的運動負荷法）を検討すること、[4] 電気刺激により遅筋化した骨格筋を用いて、右心補助装置を作成し、その動力源としての有効性を検討すること、の4点を本実験の目的とした。

第2章 骨格筋の特性に関する現在までの知見

2.1. 骨格筋筋線維の分類とその特性

1678年 Lorenzini は、動物の骨格筋は単一でなく、異なったタイプがあることを指摘した。その外観的な色の差より、赤筋と白筋とに分類されるようになり、19世紀後半には、その生理学的な差も明らかにされた。赤筋は生理学的特性により遅筋(slow twitch muscle)とも呼ばれ、主として姿勢保持に関与している(tonic)。一方、白筋は速筋(fast twitch muscle)と呼ばれ運動に関与する(phasic)とされている。動物では、ある特定の筋は完全に赤筋のみ、あるいは白筋のみよりなる。たとえば、ラットでは前脛骨筋や長指伸筋は白筋、ヒラメ筋は赤筋、また、鶏では浅胸筋は白筋、前広背筋は赤筋よりなっている。ヒト骨格筋では、赤筋優位、白筋優位という差異はあっても、大部分両者がモザイク状に共存する[埜中征哉、1987]。

赤筋と白筋を染め分ける方法は数多くあるが、現在、ヒト骨格筋では、actomyosin ATPase 染色が広く行われてきている[Brooke, M.H., et al., 1970]。その理由は、このATPase 染色が最も分別性が良く、生理的特性と良く相関し、また筋線維の分化の過程についても多くの情報を与えてくれるからである。赤筋に含まれる筋線維をtype I fiber、白筋に含まれる筋線維をtype II fiber と呼ぶ。type I fiber のATPase はアルカリ側の前処理で活性を失い、type II fiber のATPase は活性が保たれるので、routine ATPase 染色では、type I fiber は白く、type II fiber は黒く染まる。また、酸性側で前処理をすると、逆にtype I fiber のATPase 活性は保たれ、type II fiber のATPase 活性が消失するのでtype I fiber は黒く、type II fiber は白く染まる。type II fiber はpH 4.6 以下で酵素活性が消失するtype IIA fiber と、pH 4.2 以下で酵素活性が消

失するtype IIB fiber と、いずれのpHでも淡染されるtype IIC fiber に細分される。type I, II fiber の分別は、NADH-TR 染色、SDH 染色、PAS 染色などでも行い得る。

筋細胞を構成する膜構造には、細胞を完全に覆う筋形質膜(sarcolemma)と細胞内部の各種膜オルガネラがある。膜オルガネラのうち、筋原線維間に発達し、筋収縮に調節的役割を演ずる成分は、筋小胞体(sarcoplasmic reticulum, SR)と横細管系(transverse tubular system, T-system)で、この両者は筋内膜系として注目されている。T-system やSRはその形態や発達程度が筋線維の種類によってきわめて多様である。これは筋細胞の機能的差異を反映していると考えられている。

T-system は筋線維表面から内部へ深く陥入する細管(T-tubules)であり、形質膜と連続しており、その内腔は細胞外腔とつながっている。つまり、T-tubules は筋形質膜の一部ということができる。T-system の発達程度や配列の規則性は、動物の種類により、筋により、筋線維のタイプによって多くの相違を示す[Veratti, E., 1961]。遅筋線維は速筋線維に比べてT-tubules の発達が著しく悪く、配列も不規則である。速筋線維のなかでも、より速い線維(fast twitch fiber)と遅い線維(slow twitch fiber)との間で差があり、哺乳類の速筋についての定量的観察では、速い線維は遅い線維の約2倍も発達がよいという[Page, S.G., 1965]。

筋小胞体(SR)は滑面小胞体の形をとる特殊小胞体である。SRの発達程度や局所的形態分化は、動物の種類や筋線維型によって大きく異なる[Tomanek, R.J., 1976]。定量的電子顕微鏡分析例では、速い速筋線維は遅い速筋線維より有意にSR量が多いとされる。とくにこの量は筋線維の弛緩速度と関係が深いと考えられている。

ミトコンドリアは筋肉の好氣的エネルギー生産を行っている。したがって、持続的な活動を行う遅筋線維には、常に大量のATPを供給するために速筋線維に比べてより多くのミトコンドリアが存在する。

遅筋は速筋に比べて、最大発生張力に達するまでの時間が長く、最大収縮速度は小さいことが報告されている

[Maxwell, L. C., et al., 1982]。典型的遅筋であるラットヒラメ筋において、type I fiber の割合は 80 % 以上であるが、TPT (time to peak tension) は 36 msec であり、Vmax (maximum shortening velocity) は 7.3 contractile element length / sec であった。一方、典型的速筋であるラット長指伸筋では、type II fiber の割合が 96 % であり、TPT は 12.5 msec、Vmax は 17.1 contractile element length / sec であった。

また、最大収縮速度と type II fiber の割合、およびミオシンATPase 活性の間には正の相関関係があることも知られている [Maxwell, L. C., et al., 1982]。遅筋は絶え間なく持続的に活動するように分化しているので、基本的にエネルギー生産速度はエネルギー利用速度を下回ってはならない。したがって、遅筋では、ATP は効率の良い酸化的代謝経路により大量に生産される。一方、速筋は瞬間的に激しく運動するように分化していて、休止期が十分あるために、運動時に一時的にエネルギー消費がエネルギー生産を上回ってもさしつかえない。したがって、速筋は遅筋のような効率の高い酸化的代謝機構によるエネルギー供給は必要としない。つまり、遅筋は代謝が好氣的であり、基質には脂肪を利用し、ミトコンドリアを大量に含み、酸化的磷酸化酵素の活性が高く、解糖系酵素の活性が低い。一方、速筋は代謝が嫌氣的であり、基質には糖質を利用し、ミトコンドリアの含有量が少なく、酸化的磷酸化酵素の活性が低く、解糖系酵素の活性が高い [Peter, J. B., et al., 1972]。

2.2. 骨格筋細胞の可変性

2.2.1. 個体発生過程における変化

ラットのヒラメ筋(SOL:soleus)と長指伸筋(EDL: extensor digitorum longus)の筋線維のタイプの変化をATPase 染色で生後 24 時間から 90 日まで追跡した結果によると、生後

3 日までは EDL も SOL も type IIC fiber のみで構成されているが、以後 EDL においては type IIB fiber が、SOL においては type I fiber が急速に増加し、生後30 日には、ほぼ成人の値となる [岡田理美 1981]。

骨格筋や酵素の構造蛋白は、細胞の分化に伴ってアミノ酸構造の異なった他の型(isoform)に転換されることが知られている。この現象は乳酸脱水素酵素(LDH)で初めて認められたが、その後、ミオシンの重鎖、軽鎖、トロポミオシン、トロポニンの各サブユニットなどにおいても広くみいだされた。ここでは、骨格筋の収縮に最も直接的な役割を担っているミオシンについて簡単に触れる。

鶏の胚と成鶏の胸筋についてのピロリン酸電気泳動によるミオシンアイソザイムの検討によると、受精後 10 日目の胚では EM3 と名付けられた 1 本のバンドしか観察されないが、13 日目には EM3 とともに EM2 のバンドが現われ、15 日目には EM2, EM3 に加えて EM1 のバンドが現われる。それぞれのバンドは成鶏で観察される FM1, FM2, FM3 のバンドとは一致せず、移動度の違いなどにより識別される。各々のバンドを切り出して、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にて L 鎖の解析を行うと、EM3 には Lf1, Lf2, Ls1, Ls2, Lc1, Lc2 と、速筋型、遅筋型、心筋型すべてのミオシン軽鎖の isoform が発現している。EM2 も同様であるが、EM1 には Lf2, Lf3 の 2 種類の速筋型ミオシン L 鎖 isoform しか発現していない。同様に成鶏のミオシン L 鎖 isoform についてみると、FM3 には Lf1, Lf2、FM2 には Lf1, Lf2, Lf3、FM3 には Lf2, Lf3 のみが発現している。このように、骨格筋ミオシンアイソザイムは決して固定的なものではなく、その分化の方向に沿ったものに柔軟に変化していくことが示された [Takano-Ohmuro, H., et al., 1982]。

2.2.2. 力学的環境による変化

ヒトにおける生検による組織化学的検討では、長距離走の選手は訓練していない成人より type I fiber の比率が多い

ことが知られている[Saltin, B., et al., 1977]。一方、運動負荷量の変化によって骨格筋の筋線維タイプを後天的に変化させられ得るかの検討においては、type II fiber から type I fiber への変換は起こらないことが示されている[Gollnick, P.D., et al., 1973]。しかし、intermediate fiber に限っていえば、8週間のクロスカントリースキーで4%増加することが報告されている[Schantz, P., et al., 1982]。これらの事実から推測するに、生理的な運動では骨格筋の筋線維タイプを変換させることはできず、スポーツ選手の運動能力を効果的に増強するには、事前に骨格筋生検を行って個人別の筋線維タイプの分布を良く把握しておき、その個人に適した運動のタイプを選択することが重要であると考えられる。また、intermediate fiber の割合が先天的に多い選手は持久的な運動にも、瞬発的な運動にも適し、総合的な運動能力を必要とするスポーツに適すと考えられる。

Schantz らは毎日 30 km のクロスカントリースキーを 50 日続けた場合の、ヒトの骨格筋における酵素活性の変化を報告している[Schantz, P., et al., 1983]。その結果によると、CS (citrate synthetase) と MDH (malate dehydro-genase) の上昇を見たとしている。また、その後 33 週間トレーニングをしないで経過観察すると、トレーニングを始める前の段階まで酵素活性が低下することを報告している。Schantz らはヒトのミトコンドリア内の NADH shuttle system についても、1週間に 82 km のランニングを続けているグループにおいて、mMDH (mitochondrial malate dhydrogenase) と mASAT (mitochondrial aspartate amino-transferase) の酵素活性は優位に上昇するが、cMDH (cytoplasmic malate dhydrogenase) と cASAT (cytoplasmic aspartate aminotransferase) の酵素活性は上昇しないと報告している[Schantz, P.G., et al., 1987]。Green らはラットのランニングトレーニングにおいて CS (citrate synthetase)、HAD (3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase)、KCT (3-ketoacid CoA transferase) の上昇がとくに速筋繊維で強く観察されたことを報告している[Green, H.J., et al., 1983]。

ラットの足関節をキルシュナー鋼線を利用して伸展位で固定すると、soleus (SOL) に急速な筋萎縮が出現する。その結果、soleus (SOL) に多い type I fiber の比率が減少し、type IIA、type IIC fiber の比率が増加する。萎縮筋において、単位面積あたりの最大収縮力の低下も報告されているが、その理由についてははっきりしない [助川卓行 1983]。

2.2.3. 神経支配による変化

除神経の骨格筋に対する効果については一致した意見をみていない。それは除神経することにより、神経支配の一次的な影響だけでなく、当然その結果として、運動しないための二次的影響も考慮しなければならないからである。Carraro らはネズミの横隔膜を 6 カ月間除神経しておく、最初には存在していた遅筋型ミオシン L 鎖が消失し、 α -トロポミオシンに対する β -トロポミオシンの量比が相対的に減少することを報告している[Carraro, U., et al., 1981]。

速筋への神経と遅筋への神経を外科的につなぎ変えることによっても、骨格筋構造蛋白が変化することが知られている。Weeds らは猫のヒラメ筋(遅筋)を支配している神経を長指伸筋(速筋)へ、逆に長指伸筋を支配している神経をヒラメ筋に接続した[Weeds, A.G., et al., 1974]。その結果、ヒラメ筋では速筋型ミオシンL鎖の発現と、ミオシンATPase 活性の上昇がみられ、一方、長指伸筋では遅筋型ミオシンL鎖の発現と、ミオシンATPase 活性の低下が認められた。

2.2.4. 内分泌環境による変化

内分泌環境を変化させることによっても横紋筋の構造蛋白の発現を変化させられることが観察されている。Thyroxine が心筋のミオシンアイゾザイムを変化させることは良く知ら

れている [Martin, A.F., et al., 1982, Dillmann, W.H., et al., 1983]。骨格筋における thyroxine のミオシン H 鎖に及ぼす影響については Izumo らが報告している [Izumo, S., et al., 1986]。骨格筋のミオシン H 鎖の発現に対する thyroxine の影響は複雑で骨格筋の部位により一定していない。甲状腺ホルモンが過剰になると速筋型のミオシン H 鎖が遅筋繊維においても発現し、不足すると embryonic または neonatal のミオシン H 鎖が発現することが Soleus (SOL) と Masseter (MAS) において確認されている。甲状腺ホルモン投与による、骨格筋筋線維タイプ、毛細血管密度、ミトコンドリア酵素活性の変化については Capo らが報告している [Capo, L.A., et al., 1982]。4 週間わたる thyroxine の投与によって、速筋である gastrocnemius の筋線維タイプに変化は起こらなかったが、遅筋である soleus では type I fiber の密度が低下し、type IIc fiber の密度が増加した。毛細血管密度は gastrocnemius においても soleus においても、thyroxine の投与により増加した。ミトコンドリアの酵素活性として cytochrome C oxidase と citrate synthase の酵素活性をを計測したところ、thyroxine の投与により soleus では著明に亢進したのに対し、gastrocnemius では変化がなかった。

2.2.5. 薬物投与による変化

骨格筋にも、血管壁と同じように β -receptor が存在していることが知られている。 β -receptor の分布は骨格筋の筋線維タイプによって異なる。type I fiber の多い soleus では、type II fiber の多い superficial white vastus に比較して、 β -receptor の数が約 3 倍であることが報告されている [Martin III, H., et al., 1989]。また、骨格筋における β -receptor の密度は、その骨格筋の酸化能力に密接に関係していると言われる [Williams, R.S., et al., 1984]。

β -receptor agonist と β -receptor antagonist の骨格

筋の運動に対する、また、耐疲労性に関する影響については興味のあるところである。Svedenhag らは、 β -receptor antagonist を投与したヒトを運動させた場合の骨格筋の代謝に関する研究を行っている [Svedenhag, J., et al., 1984]。propranolol を 60 mg /day 投与して、cycle ergometer で 8 週間運動を行わせ、その結果 β -receptor antagonist の投与の有無にかかわらず、ミトコンドリアの酵素である citrate synthase (CS)、succinate dehydrogenase (SDH)、cytochrome c oxidase (Cyt-c-ox)、3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (HAD) などの酵素活性の上昇が観察された。しかし、 β -receptor antagonist を投与した群においては、cytochrome c oxidase (Cyt-c-ox)、3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD) の酵素活性の上昇が有意に低下した。解糖系の酵素、6-phosphofructokinase (PFK)、glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、lactate dehydrogenase (LDH) については運動により低下したが、 β -receptor antagonist 投与の有無について差がなかった。またこの運動によって骨格筋筋線維タイプは変化せず、毛細血管密度は上昇した。しかし、 β -receptor antagonist の投与の有無によっては毛細血管密度の増加に有意な差は存在しなかった。Doris らはラットで同様な実験を行っている [Doris, L.L.J., et al., 1986]。ヒトの場合と同様に、 β -receptor antagonist は運動によるミトコンドリア内の酵素活性の上昇を阻害した。また、その阻害の程度は $\beta_{1,2}$ -receptor antagonist である propranolol の方が β_1 -receptor antagonist である atenolol より強力であった。ゆえに、運動による骨格筋の oxidative enzyme の変化には、 β_2 -receptor が重要な役割を果たしていると考えられる。Zeman らは α , β_2 -receptor agonist 投与による骨格筋筋線維の形態学的変化と、収縮特性の変化を報告している [Zeman, R., et al., 1988]。 α , β_2 -receptor agonist である clenbuterol を 12 週間投与すると、Soleus (SOL) においても、extensor digitorum longus (EDL) においても type II fiber の面積が増加し、type I fiber の面積が減少する。 β_2 -receptor antagonist である butoxamine を 12

週間投与すると、Soleus (SOL) においても、extensor digitorum longus (EDL) においても type II fiber の面積が減少し、type I fiber の面積が増加する。同様に収縮特性の変化についてみると、同様に 12 週間の clenbuterol の投与により、soleus (SOL) では twitch contraction time は短縮し、peak twitch tension は増加する。extensor digitorum longus (EDL) では twitch contraction time は増加し、peak twitch tension も増加する。このように β_2 -receptor の刺激により骨格筋の特性が変化することが示された。しかし、その変化は一様ではなく、さらに詳細な研究が必要であると考えられる。

2.2.6. 電気刺激による変化

電気刺激によるコンディショニングが骨格筋の生理学的、生化学的、形態学的特徴を変化させることが知られている。刺激し始めて約 1 週間で骨格筋内の毛細血管の密度が増加する [Pette, D., 1984, Salmons, S., et al., 1981]。3 週間でミオシン ATPase 活性が低下し、筋小胞体が増加し、筋小胞体へのカルシウム取り込みが低下する。また、細胞内のミトコンドリアの容積が増加し、それに伴って細胞内の解糖系酵素の活性が低下し、ミトコンドリア内の酸化酵素の活性が増加してくる [Pette, D., 1984, Salmons, S., et al., 1981]。6 週間のコンディショニングで、ATPase 染色により識別される筋線維タイプが完全に遅筋型に変換される [Mannion, J.D., et al., 1986a]。骨格筋構造蛋白であるミオシンの H 鎖、および L 鎖についても、ほぼ同じ時期に遅筋型のものが多く発現してくる [Brown, W.E., et al., 1983, Hoffman, B.K., et al., 1985]。蛋白合成も正常の 3 倍程度増加し、total RNA の量も増加する。細胞内微細構造についてみれば、T-system の量が遅筋のレベルまで低下する。

これらの変化は骨格筋の収縮特性にも影響を与える。電氣的にコンディショニングした骨格筋の収縮速度の低下はミオ

シンアイソザイムの変換によるミオシン ATPase 活性の低下や、T-system の量の低下とカルシウム輸送能力の低下に起因していると考えられる。また、毛細血管密度の上昇とミトコンドリア内の酸化酵素の活性の増加は骨格筋への酸素の供給とエネルギー源である ATP の生産を増加させ、骨格筋の耐疲労性を向上させると考えられる [Stepenson, L.W., et al., 1987]。

2.3. 心筋と骨格筋の違いについて

心筋は特殊な横紋筋であるが、その基本的な筋線維の構造は骨格筋とあまり差がない [Adams, R.J., et al., 1980]。心筋線維の直径は 15 μm 以下で、骨格筋線維のそれ (20-150 μm) に比べて細く、その著しい特徴は線維に枝別れがあり、それらが隣接する心筋線維と吻合して網目状になっている (syncytium) という点である。また、骨格筋線維は細胞が融合してできた一つの巨大な多核細胞であるが、心筋線維を作っている心筋細胞は境界膜ではっきり仕切られた単核細胞の集合体である。しかし、境界膜の部分の電気抵抗は小さいので、一つの細胞が興奮すると、その電氣的興奮は次から次へと伝達され、心筋線維全体が収縮する。しかし、骨格筋は一回の刺激では一回の単収縮しか起こさない。また、単収縮では強い収縮力は得られない。biomechanical cardiac assist device に必要な収縮力を得るためには、burst 刺激による筋収縮の mechanical summation が必要であると考えられる。

骨格筋と心筋はミトコンドリアの含量も違う。心筋ではミトコンドリアの総量は心筋細胞の 30 % にもなる。しかし、骨格筋ではわずか 2 から 5 % を占めるに過ぎない [Adams, R.J., et al., 1980]。心筋細胞内には骨格筋と比べて多数のミトコンドリア、少数の小胞体が存在し、筋原線維はほとんどすき間なく細胞質を埋めている。T-system は骨格筋と比べて太く、明瞭である。小胞体系の発達が悪いこともあり、その内部構造は骨格筋のものと大きく異なっている [野

々村禎昭 1982]。

心筋の最大の特徴は活動電位の持続時間が著しく長いことである [杉晴夫 1985]。活動電位の不応期は長く、数 100 msec にも及ぶ。このため心筋標本を繰り返して刺激しても単収縮の加重は起こらない。また、心筋細胞は互いに電氣的に連絡しているので、心室は全体として全か無かの法則に従う単収縮を行う。これらは心臓のポンプ機能に適した特性である。心臓は全身の臓器に血液を送り込むポンプとして、1秒間に約1回の割合で収縮と弛緩を繰り返しており、そのために大量のエネルギーを必要とする。心筋は、きわめて好氣的な組織であるため、エネルギー需要の増加は全て冠血流量増加によってまかなわれており、動脈血よりの酸素取り込み率増加は、はなはだ少ないという特徴を有する [伊藤良雄 1972]。しかも、そのエネルギー需要は運動などの各種ストレスによって数倍にも増加する。そこでこのようなエネルギー需要の変動に対応するために、冠血流量の増加とともに、エネルギー代謝の基礎物質として、脂肪酸、乳酸、ブドウ糖といった多様な物質が利用される。これは、脳がブドウ糖をほとんど唯一のエネルギー代謝の基礎物質として利用しているのと対照的である。

心筋と骨格筋では異なった種類の構造蛋白が発現していることが知られている。ミオシン L 鎖についていえば、骨格筋では Lf1, Lf2, Lf3, Ls1, Ls2 の 5 つのアイソザイムの存在が知られている。心筋には Lc1, Lc2 の二つのアイソザイムが存在し、これらは SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS PAGE) により、骨格筋のアイソザイムと区別される。ミオシン H 鎖についていえば、骨格筋では embryonic, neonatal, slow type I, fast type IIA, fast type IIB, extraocular specific の 6 種類が知られている。同様に心筋では α 、 β の 2 種類のミオシン H 鎖が知られている [Mahdavi, V., et al., 1987]。

2.4. 骨格筋を利用した補助循環における遅筋化骨格筋の優位性

骨格筋を利用した補助循環システムを構築する上で、耐疲労性に優れた筋肉を得ることは、重要な課題である。上記のように遅筋は速筋に比較して、耐疲労性に優れ、形態的にも、代謝の面においても、連続した運動を行うように分化している。この性質は心筋の収縮特性に近いものである。骨格筋を利用した補助循環システムのエネルギー源としては、この遅筋の性質は非常に好ましいものである。しかし、ヒトにおいて体表にある骨格筋は、むしろ速筋優位の筋線維分布を持っている。そのため、耐疲労性の高い骨格筋を得ようとするためには、事前の骨格筋の遅筋化が必須になると考えられる。

第3章 心血管系に関する骨格筋応用の歴史

骨格筋を、補助循環や心筋の一部と置き換えるために使用しようという考えは決して新しいものではない。1931年に Jesus らがヒトの外傷性の左心室損傷の修復に、骨格筋を用いたのが最初であると考えられる [Walsh, G., et al., 1986]。以下に、骨格筋の心血管系に関する応用の歴史を振り返ってみたい。

3.1. 虚血心筋への血行再建

CABG (大動脈-冠状動脈バイパス術) が一般的に行われるようになる以前に、冠状動脈硬化症による心筋の血流障害を改善するために、数々の外科的治療が試みられてきた。それらは以下の二つのグループに大別される。一つは、正常でも存在している心膜と心筋の側副血行を無菌的心膜炎を起こすことによって増強しようとするものである。もう一つは、血流の豊富な他の組織を、血流を保ったまま心臓の近傍まで移動し、心筋と癒着させることで、正常とは異なる側副血行路を発達させようとするものである。前者の例としては、機械的に心外膜を損傷する方法や、化学物質で刺激する方法 (Dakin's solution、asbestos powder、talc) などが挙げられる。後者の例としては、縦隔の組織を利用するもの、心表面の脂肪組織を利用するもの、皮膚ならびに皮下組織を利用するもの、大網を利用するもの、肺を利用するもの、小腸を利用するもの、骨格筋を利用するものなどが報告されている [Walsh, G., et al., 1986]。以下に、心筋への血液供給に関する骨格筋の利用の歴史について簡単にまとめてみたい。

Beck らは 1923 年から 1935 年にかけて、精力的に動物実験を行い、骨格筋フラップによる心筋への血液供給につい

て研究を行い、骨格筋フラップと心筋の吻合部において、豊富な側副血行路の発達を観察した。そして、それらの側副血行は冠状動脈結紮により作成した心筋梗塞による心室細動の発生を予防し、梗塞領域を縮小させ得たとしている。新たに形成された側副血行は、心筋に冠状動脈以外からの血流を供給するだけでなく、冠状動脈そのものの血流の再分配を促し、他の部位での心筋虚血を防止すると考えられた。また、側副血行の発達はその部位の心筋の酸素需要に応じて調整されるとしている。Beck らは 1935 年に初めて臨床応用を行い、労作性狭心症の患者 20 人の心筋にフラップ状にした大胸筋を自家移植し、狭心症症状の改善を見たと報告している [Walsh, G., et al., 1986]。

3.2. 骨格筋を利用した心大血管系の修復

優秀な代用弁や人工血管の開発される以前、骨格筋はいろいろな方法で弁や血管の修復に用いられてきた。以下にその歴史を簡単に述べる。

1959 年 Absolon らは理想的な弁置換材料は成長できる潜在能力を持った生体組織であると指摘している [Absolon, K.B., et al., 1959]。実際に、彼らは横隔膜を用いて 400 mmHg の圧がかかっても逆流のない弁を試作している。

1961 年 Petrovsky らは臨床において、胸部大動脈損傷の修復に横隔膜グラフトを用いた [Petrovsky, B.V., 1961]。

1985 年 Yee らは幼犬における実験において、腹直筋を有茎で移植し肺動脈再建を行った。彼らは、動脈瘤様の肺動脈拡張も血栓形成も発生しなかったと報告している [Walsh, G., et al., 1986]。

Gaines らは内胸動静脈と血管吻合を行った Gracilis muscle のフリーグラフトを用いた右室流出路形成に関する実験を行っている [Gaines, W.E., et al., 1985]。彼らは 10 週間後、骨格筋の血液と接触する面に内膜形成を観察している。

3.3. Cardiomyoplasty

骨格筋を直接心筋に自家移植する方法は、発想的には単純であるので、現在までに数多くの研究者によって研究が進められてきた。Carpentier らはこの術式を cardiomyoplasty と呼び、1985 年に初めて臨床応用を行った。以後、各地で臨床報告が相次ぎ、1989 年までにおおよそ 50 例の症例に対して同様の手術が行われ、良好な術後経過が報告されている [Mihaileum, S., et al., 1989]。以下に cardiomyoplasty の歴史について簡単に触れてみたい。

Petrovsky は心筋梗塞後の左室瘤の補強と虚血部位への血液の供給の目的で、横隔膜を使用することを提唱した。1966 年、彼は左室瘤の修復に横隔膜を用いた 100 例の臨床経験を報告し [Petrovsky, 1966]、そのなかで手術死亡率は 19%、晩期死亡率は 12% であり、生存している患者の 42% は著明な症状の改善をみた述べている。

Kantrowitz らは横隔膜を有茎で心室を取り巻くように取り付け、横隔神経を心収縮に同期して刺激し、頸動脈に圧を発生したと報告している [Kantrowitz, A., et al., 1959]。

1964 年 Nakamura ら [Nakamura, K., et al., 1964] は雑種成犬を使い、横隔膜を有茎で右心房に移植した。移植した横隔膜を 7 から 8 ヶ月にわたり長期的に電気刺激することにより右心房圧を上昇させ得た、と報告している。また、彼らは横隔膜を右心室壁として用い、筋疲労の始まるまでの 8 分間右心室圧を 20 mmHg 以上増加させ得ることも報告している。これが骨格筋を用いて、血行動態を変化させた最初の報告である。

Shepard らは除神経した有茎の横隔膜グラフトをペースメーカーで連続電気刺激を行い、右心室外側に縫着する実験を行った [Shepard, M.P., et al., 1968]。彼らはその方法を用いて先天性右心室低形成症候群の治療を行うことを意図としたが、横隔膜グラフトは時間の経過とともに伸展性が悪化し、単なる補綴物としての役目しか果たせなくなると報告している。

1973 年 Kusaba ら [Kusaba, E., et al., 1973] は骨格筋の張力発生能力と刺激方法について、より詳細な報告を行っている。60 から 70 Hz の burst 刺激で、心筋の収縮能力の 57% の収縮力を発生できることを示した。しかし、骨格筋の疲労現象のため、その持続時間は 3 時間であった。

Schaff らはテフロンフェルトを用いた心室瘤切除術後に発生した infected false aneurysm の治療に、骨格筋を用いた症例を報告している [Schaff, H.V., et al., 1982]。骨格筋は血流のある生きた組織であるため、感染に抵抗性のあることが証明された。

1985 年 Sola ら [Sola, O.M., et al., 1985] は、雑種成犬において、除神経した甲状舌骨筋と胸鎖乳突筋を、有茎で右心室と左心室に移植した。彼らは骨格筋が血液と接触する際の血栓形成について、右心室では血栓形成が見られなかったが、左心室では血栓形成が見られたと報告している。

1985 年 Carpentier ら [Carpentier, A., et al., 1985] は、広背筋を心補助に使用した臨床例を報告している。彼らは心筋腫瘍患者の腫瘍摘出術後に、広背筋をロール状に残存心筋に巻つけた。事前のコンディショニングは行っていなかったため、術後 5 日目から 2:1 で心拍に同期して刺激し、術後 10 日目から 1:1 で刺激した。Tc99m による RI アンギオグラフィーで、左室駆出分画は広背筋の刺激の前後で 56% から 69% へ増加し、また 1 年後の再検査においても、同様に 53% から 62% へ増加したとしている。

1987 年 Magovern ら [Magovern, G.J., et al., 1987] は 2 名の心筋梗塞後の左室瘤の患者に、梗塞部位を広背筋に置換した手術例を報告している。広背筋に対する術前の電氣的コンディショニングは行っていない。術後の Tc99m RI シンチグラフィーでは、1 例目は約 10% の駆出分画の上昇をみたものの、2 例目では有意な上昇を認めなかった。

3.4. Biomechanical Cardiac Assist Device

骨格筋を用いて心機能補助を行おうとする biomechanical

cardiac assist device は機能的にも複雑であるので、cardiomyoplasty より少し遅れて研究が始まり、現在においてもまだ臨床応用はなされていない。しかし、設計の自由度が高く、応用の範囲も広いと考えられるので、今後の発展が期待される分野である。以下に、biomechanical cardiac assist device の歴史について略述する。

3.4.1. Hydraulic Pouch

biomechanical cardiac assist device として、最初に考えられたのが骨格筋を用いて pouch 状の、まったく新しい心室を形成しようとする試みである。以下に、mock circulation を使用したものも含めてその歴史を簡単に紹介する。

1964 年 Kusserow ら[Kusserow, B.K., et al., 1964]は大腿四頭筋を使用してポンプを駆動し、1 回拍出量 10 ml、拍出回数 60 回/分で 8 時間以上持続可能であったことを報告している。

1974 年 Spontnitz ら[Spontnitz, H.M., et al., 1974]は腹直筋を使用して pouch を作製し 600 mmHg の圧を発生させた。しかし、そのために必要な拡張末期圧は 50-160 mmHg も必要であり、かつ、筋疲労現象がわずか 10 分後に発生したと報告している。彼らは骨格筋の疲労現象を軽減するためには、骨格筋の側副血行を温存することが不可欠であると結論している。

1975 年に、Vachon ら[Vachon, B.R., et al., 1975]は横隔膜を使用した pouch において、骨格筋疲労と前負荷の関係を詳細に検討し、いろいろな刺激条件における拍出量を計算した。

Acker らはイヌの広背筋を利用して、新しい心室を作製し、mock circulation に接続し、体循環系の圧を 2 週間にわたって発生可能であったことを報告している[Acker, M.A., et al., 1987d]。

Anderson ら[Anderson, W.A., et al., 1988]は bio-

mechanical cardiac assist device の右心系に対する応用例を報告している。広背筋で作製した心室を mock circulation に接続し、その拍出特性を長期にわたり観察した。心拍数 95/min と 54/min で 1 ヶ月駆動し続けたところ、正常右心室の 64% の stroke work と 42% の power output を得たとしている。

3.4.2. Counterpulsation

骨格筋を利用して大動脈に counterpulsation 効果を得る方法は、biomechanical cardiac assist device の有望な臨床応用の一つであると考えられる。以下にその研究の歴史について簡単に触れる。

1959 年、Kantrowitz ら[Kantrowitz, A., et al., 1959]はイヌを用いた実験で、横隔膜を有茎で遊離し、それを下行大動脈の周囲に巻き付けた。拡張期に横隔神経を刺激して収縮させる方法で、大動脈の拡張期圧を上昇させ得ることを報告している。おそらくこれが骨格筋を用いた counterpulsation 法における最初の報告であると考えられる。

Neilson らは大動脈を拡張期に外側から圧迫することにより counterpulsation 効果を得る目的で、骨格筋を利用する device を報告している[Neilson, I.R., et al., 1985]。この方法であれば、骨格筋は直接血液に触れず、血栓形成などの問題はない。しかし、十分な counterpulsation 効果を得るには広範に大動脈を剥離せねばならず、また、大動脈に及ぼす機械的なストレスの影響も未知の課題である。

3.5. 臨床応用に向けての今後の課題

現在骨格筋を利用した循環補助として臨床応用がなされているものは、拡張型心筋症と虚血性心疾患に対する cardiomyoplasty のみである。しかし、cardiomyoplasty に関しては 50 例以上の臨床例があるにもかかわらず、術後長

期の心機能にかかわる報告はほとんどない。また動物における実験においても、短期生存実験のみであり、長期間その有効性を観察したものはない。最近 Anderson らは cardiomyoplasty の効果に批判的な動物実験を行った [Anderson, W.A., et al., 1988]。彼らはイヌに cardiomyoplasty を行い、その駆動による血行動態の変化を検討した。それによると、心拍に同期した広背筋の収縮は心拍出量をまったく増加させず、大動脈圧を 10 mmHg 増加させたに過ぎなかった。この結果から考えて、cardiomyoplasty が有効に作用するのは、非常に拡張して収縮がほとんど行われない心室に対してのみであり、その適応については十分論議されるべきであると考えられる。一方、大動脈における counterpulsation 法は、動物における実験研究が進んでおり、implantable extra-aortic balloon assist として将来臨床応用される可能性が高いと考えられる [Chiu, R.C.J., et al., 1987]。

第4章 骨格筋筋線維タイプ変換の評価法としての複屈折法の検討

4.1. 複屈折法の原理と生物学における応用

骨格筋を用いた補助循環システムを構築する上での骨格筋の遅筋化の重要性については、前述したとおりである。骨格筋の遅筋化は、現時点においては骨格筋の慢性的電気刺激によりなされているが、そのプロトコールに確定的なものはない。そこで、われわれは骨格筋の遅筋化の過程を簡便に定量的に評価する方法として、複屈折法を導入した。複屈折法は Braimbridge らにより、心筋保護の分野で、心筋の viability を評価する目的で用いられたものである [Cankovic-Daracott, S., et al., 1977]。従来、骨格筋の筋線維タイプを視覚的に判定する方法として、ATPase 染色法が広く用いられてきた [Brooke, M.H., et al., 1970]。これはミオシン ATPase 活性の pH 依存性に着目したものであり、骨格筋筋線維の収縮特性を直接的に表現したものではない。複屈折法はミオシン ATPase が ATP と Ca^{2+} の添加に対してにどのように反応するかを直接光学的に観察するものであり、より骨格筋筋線維の収縮特性に関連が深いといえる。また施行が容易であり、結果が定量的に得られる点も、骨格筋遅筋化を評価する手法として有利な点であると考えられた。

以下に複屈折法の原理について簡単に述べる。

4.1.1. 光学活性

気体、液体、ガラスなどは、通常、光学的には等方性を示す。すなわち、光はどの方向から物質に入射しても同じ屈折率を持ち、等速度で伝播する。このような物質を等方体と呼ぶ。ところが、方解石 $CaCO_3$ のような結晶は、 CO_3 の O_2 -

結合平面が主軸に対して垂直になるために、一つの定まった結晶軸を持つようになった光学異方体であって、結晶軸に対して最大速度で振動する速い光学軸 (fast axis) と、最小速度で振動する遅い光学軸 (slow axis) を持つ。このことは結晶への入射光が、結晶内で Snell の法則に従う正常光 (ordinary ray) と、従わない異常光 (extraordinary ray) の二つのベクトル成分に分けられることを意味する。いずれも直線偏光であって、振動面は互いに直交する。結晶には光軸が一つの場合と二つの場合があるが、方解石のような単軸結晶が示す光の屈折現象の異方性は、二重像の形成、すなわち、複屈折性 (birefringence) として古くから知られていた。

方解石の場合、異常光の速い軸の屈折率 n_e は最小、正常光の遅い軸の屈折率 n_o は最大となる。複屈折の強さは $(n_e - n_o)$ で、これを複屈折係数とよぶが、方解石のように $n_e < n_o$ の場合には負の結晶、石英のように $n_e > n_o$ の場合正の結晶と定義している。

方解石の場合のように、分子内の原子配列自体に異方性があるために起こる複屈折を、固有複屈折 (intrinsic birefringence) という。これに対して、もともと複屈折性を持たないミセル (micell) が分子配向して規則性を持つ超微細構造をつくったとき、ミセルの配列、分子相互間の距離、ミセルと媒体との屈折率の差などの関係から生ずる複屈折性を、構造複屈折 (form birefringence) として定義する。原子や分子のオーダーよりはるかに大きく、観察に用いている光の波長よりも小さな等方性物質の配置や形に、異方性があるために起こる複屈折といわれている。

一般に生体内微細構造では、構造複屈折のほかに、構造の素材となる分子自身の光学的異方性、すなわち、固有複屈折が加算される場合が多い。配向ミセル群と媒体の屈折率の差がなくなると、構造複屈折は失われるが、固有複屈折は媒体の屈折率の変動とは無関係である [Sato, H., et al., 1975]。前者の例は分裂細胞の紡錘体構造であり、後者の例は DNA や コラーゲンである。

もともと複屈折性を持たない同種のミセルが、拡散するこ

となく集団として定方向へ流れるときに、流動にともなう内部の力の作用に束ねられ、規則的配列をとることがある。このとき起こる光学的異方性を流動複屈折 (flow birefringence) とよぶ。流動が止まれば複屈折も解消する。原形質流動がその例であり、生物界に広く認められる現象である。

このほかに、複屈折性を示さない構造物が外部から力を加えられたときに、力の大きさと対応した歪みを起こし、ミセルの構造内部配向を誘発するために生ずる異方性をひずみ複屈折 (stress birefringence) という。この複屈折は一過性のことが多い。

以上四つの複屈折のほかに、異方体と等方体、あるいは異なった複屈折性を持つ二つの異方体の境界に生じる境界複屈折 (edge birefringence) を加えた五つが通常認められる複屈折性である。

4.1.2. 骨格筋と複屈折

骨格筋の基本構造として横紋構造が挙げられる。横紋構造は明るい帯と暗い帯が交互に繰り返す特徴的なパターンを示す。偏光板を通すと、暗い方の帯は明るく輝いて見える。これは偏光板を通った光が旋光して複屈折を起こしたことに由来し、したがって異方性 (anisotropic) であることから、A 帯と呼ばれる。偏光が旋光することは、A 帯が規則正しい高分子配列からなることを示す。筋線維の横紋構造のうち、明るい方は複屈折を示さず等方性 (isotropic) で、これを I 帯と呼ぶ [Huxley, H.E., et al., 1957, Maeda, Y., 1978]。I 帯は狭い濃染性の Z 膜によって二分され、また、A 帯の中心には電子密度の高い M 帯が認められる。隣り合う Z 膜で挟まれた領域 (sarcomere) は、横紋筋の形態学的、機能的な基本単位と考えられる。一つの sarcomere は、A 帯と隣接する I 帯の半分を二つ有することになる [Taylor, D.L., 1976]。A 帯の複屈折は骨格筋構造蛋白の配列の規則性から生じる構造複屈折であると考えられている。したがって、ミ

オシン ATPase 活性の残っている組織切片に Ca^{2+} と ATP を加えると、A 帯の複屈折率に変化が起こるはずであり [Eberstein, A., et al., 1963]、それらは筋の収縮性に関連するものと考えられる [Chayen, J., et al., 1985]。

4.1.3. 複屈折法の原理

偏光顕微鏡は、偏光板（偏光子 ; polarizer）を置いて自然光より常偏光だけを集光器に入れて標本を照射し、再び偏光板（検光子 ; analyzer）を置いて、標本による複屈折を検査する装置である。以下に偏光顕微鏡の原理を簡単に述べる（図 1 参照）。（1）偏光子を介して入ってきた光（W-E）はこの面でのみ振動することにより、検光子（N-S）を直交するように置くと（直交ニコル）、光は遮断され画面は暗色となる。（2）ここに光学的等方性の検体を直交ニコルに対して 45 度に置くと、光は偏光されることなく検光子を介し A'-A' の明るさとして観察される。（3）同様に異方性の検体を置くと、射入した光は常偏光と異常偏光に別れ、おのにおに複屈折率が違うためその合成波 A-A は、W-E に対し θ の角度を持ち、A'-A' の明るさとして観察される。この明るさは二つの偏光の行差（retardation; R）に依存する。行差は射入する光の波長に反比例し、薄片の厚さと二つの偏光の複屈折率の差に反比例する。実際の観察では前二者は一定であることから検体間の差は二つの偏光の複屈折率の差（複屈折）になる。複屈折は行差（単位 ; nm）で表わされ、 θ より算出される。（4） θ を求めるため、compensator を用いて光学的に検光子の位置を A-A に対し直交させる（C-C）。このとき画面は暗色となる。移動した角度 θ を計測し、次式により行差（R）が算出される。

$$R = R_c \sin 2\theta$$

R_c は各 compensator に固有の定数である。

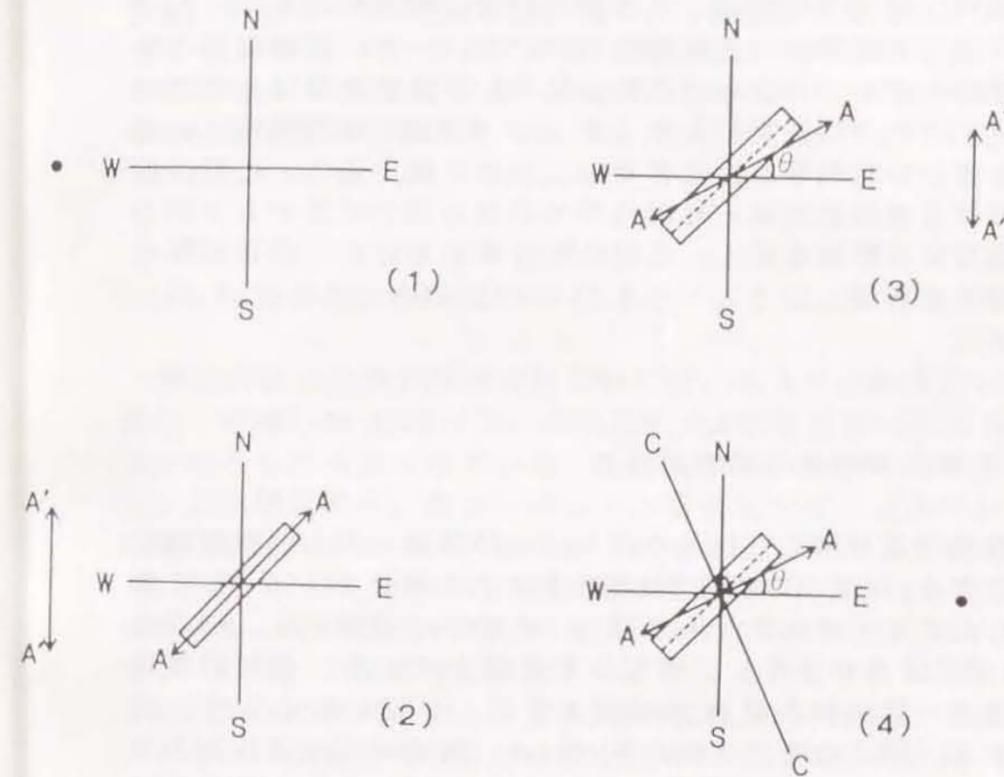


図 1 偏光顕微鏡の原理

（詳細は本文参照のこと）

心筋細胞の複屈折性は形態複屈折であり、横紋筋構造蛋白の配列、相互間の距離、その間を埋める物質の屈折率の関係から生じる複屈折性と説明されている。一方、組織化学の分野ではミオシン ATPase 活性を利用した染色法が行われているが、この方法を応用してミオシン ATPase を活性化し心筋構造蛋白の配列等を変化させることが可能である。心筋保護における複屈折法は、組織化学の手法を用いてミオシン等の構造蛋白の配置を替え、心筋の複屈折を測定し、心筋細胞の収縮性を評価しようというものである[Chayen, J., et al., 1985]。

4.1.4. 複屈折法の測定方法

生検で取り出した検体を直ちに液体窒素に入れ、瞬間的に凍結する。-70 °C 以下で凍結保存された検体を -30 °C に保たれたクライオスタットで 8 μ の厚さに薄切する。切片は -30 °C 以下で保存し、空气中で乾燥させた後、偏光顕微鏡の鏡台に筋線維の縦軸方向が W-E に 45 度になるように固定する。切片の周辺に焦点を合わせ、最も暗くなる位置まで compensator を回転させ、その角度 (θ_1) を読み取る。このとき検光子は直交ニコルの位置になり、ついで筋線維に焦点をあわせ、観察部位が一様に暗くなるまで compensator を回転させ、その角度 (θ_2) を読み取る。これは検光子が検体の合成波 A-A に直交した位置である。回転角度 θ は $\theta_2 - \theta_1$ であり、この検体の行差が算出される(空気値; air value)。ついで、下記の反応液を滴下し、カバーガラスで覆う。

0.1 Mol sodium barbiturate solution;	10 ml
10 % calcium chloride solution;	5 ml
distilled water;	35 ml
ATP;	76 mg

これらを良く攪拌し、pH 9.4 に調整したものを反応液とする。前回と同様の操作を行い、行差を算出する(ATP 値; ATP value)。ATP 値は空気値に対し常に高い値を示す。この反応液に対する変化を range で表わしている。最近はこの range を空気値で標準化した ratio も多く用いられている[Chayen, J., et al., 1985]。

4.1.5. 複屈折法の臨床応用

複屈折法は心臓外科領域においては、おもに心筋保護の評価と、移植心の viability の判定または拒絶反応の早期発見を目的として応用されている。大動脈弁置換術後の臨床成績と、大動脈遮断中、遮断直後における複屈折法による検討の結果とを比較すると、術後経過のおもわしくなかった症例ほど、 Ca^{2+} と ATP 添加による心筋の複屈折率の変化の差が少なかったことが報告されている[Cankovic-Daracott, S., et al., 1977]。小児複雑心奇形手術においても、同様に術後経過の悪かった症例は、人工心肺離脱時に、 Ca^{2+} と ATP 添加による心筋の複屈折率の変化の差が少なかったことが認められた[Cooper, J., et al., 1982]。山中らは、心臓移植における摘出心臓の保存に関する実験的な検討を行っている[山中定二 1988]。ラット摘出心で単純浸漬保存を行うと、4 °C の保存では複屈折率の変化の差の減少は少なかったが、37 °C では著明に減少した。イヌの異所性心臓移植における検討では、ドナー心の長期保存を行い、移植後心拍再開が不良だった群で複屈折率の変化の差が減少し、移植後も回復しなかったと報告している。ヒトにおける心臓移植の検討によると、移植直前のドナー心の複屈折法による行差の変化が少なかった症例においては、移植後の心機能が悪く、カテコールアミンの使用が必要であったという報告がなされている[Darracott-Cankovic, S., et al., 1987]。以上のように、複屈折法は、臨床的にも心筋の viability を評価する上で、有用な指標であると考えられている。

4.2. 実験の目的

骨格筋筋線維タイプの評価には ATPase 染色法が一般に用いられているが、前述の複屈折法は、心筋保護心臓移植などの心臓外科領域で、すでに実際の臨床に用いられ、ほぼ確立した評価法であるので、本方法を骨格筋の筋線維タイプ変換の評価法としても用いることができれば、有用であると考えた。Wistar 系ラットの骨格筋は現在までの組織化学的検討により、骨格筋筋線維タイプの分布がはっきりしていることが知られている。つまり下肢の骨格筋である EDL (extensor digitorum longus) はほとんど純粋に速筋線維のみで構成されており、同じく下肢の骨格筋である SOL (soleus) は、ほとんど純粋に遅筋線維のみで構成されている。また、それらの骨格筋の収縮特性もよく知られている。本実験の目的は上述の骨格筋を用いて、複屈折法による骨格筋筋線維タイプの判別が可能であるか否かを検討することにある。

4.3. 対象と方法

実験には10週齢の Wistar 系ラット (体重約 300 g) 4 匹を使用した。麻酔は、diethyl-ether による導入後、pentobarbital sodium (ダイナボット社製 ネンプタール) を 35 mg/kg および diazepam (武田薬品工業社製 セルシン) を 2.5 mg/kg 腹腔内投与した。

そのラットの下肢より代表的速筋である EDL (extensor digitorum longus) と代表的遅筋である SOL (soleus) を剥離し、筋肉を採取、検体を得た。検体を液体窒素中で急速に凍結し、-70 °C のディープフリーザー中で保存した。

これらの検体を、クライオスタット (サクラ精機社製 コールドトームCM-41) を使用して 8 μ の厚さに筋線維の走行に沿って薄切し、スライドガラスにマウントし、複屈折法による行差の測定を行った。測定は1検体につき5回行い、最大値と最小値以外のデータを記録した。

また、冷蔵保存した検体をクライオスタット (サクラ精機社製 コールドトームCM-41) を使用して、10 μ の厚さに筋線維の走行と直角に薄切し、筋線維の横断面を得た。切片をスライドガラスにマウントし、Brook らの方法にしたがって routine ATPase 染色を行った [Brooke, M.H., et al., 1970]。ATPase 染色では、アルカリ側の前処理で type I fiber はその活性を失うので、type I fiber は白く、活性のある type II fiber は黒く染まる。酸性側で切片を前処理すると、type II fiber には pH 4.6 以下で酵素活性の消失するもの (type IIA fiber) と、pH 4.3-4.2 以下で失活するもの (type IIB fiber) に分けられる。今回は pH 10.4 で前処理を行う routine ATPase 染色を行った。まず、切片を良く空气中で乾燥した後、以下に示す preincubation solution の中で 15 分間前処置を行う。反応液の分量はすべてスライド 5 枚用の coplin jar を使用したときの量で示す。

preincubation solution

0.1 M sodium barbiturate	4 ml
0.18 M CaCl ₂	4 ml
distilled water	12 ml

pH10.4

pH はコーニング社製ガラス電極式 pH メーター (pH meter M-125) を使用し、正確に測定した。スライドガラスを蒸留水で 5 回洗浄した後、次に示す incubation solution で 45 分間反応させる。

incubation solution

0.1 M sodium barbiturate	4 ml
0.18 M CaCl ₂	2 ml
distilled water	12 ml
ATP	50 mg

pH 9.4

蒸留水で十分洗浄した後、まず1% CaCl₂ で3回洗浄する。つぎに2% CoCl₂ で3分間反応させる。反応終了後、0.01 M sodium barbiturate で8回洗浄する。蒸留水で水洗後、1%の黄色硫化アンモニウム溶液中で1分間反応させる。十分な水洗後、アルコールにて脱水、乾燥後、封入剤 (permount fisher : SO-P-15) を使用してカバーガラスをかけ、切片を封入する。試薬として ATP は SIGMA 社製、黄色硫化アンモニウムは関東化学社製を用い、その他のものはすべて和光純薬社製のものを用いた。

有意差検定は unpaired student t-test により行い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4.4. 結果

ラット骨格筋の複屈折法による検討の結果を図2に示す。速筋群 (EDL) の反応液に対する変化は 11 ± 1.4 nm であり、遅筋群 (SOL) の 6.3 ± 0.8 nm に比べて有意に高い値を示した ($p < 0.001$)。このことから複屈折法が骨格筋筋線維タイプの分布差の有意性を評価するのに有用な方法であると考えられた。routine ATPase 染色による type II fiber の面積比は、EDLで 94 ± 3.7 % に対し、SOLで 18 ± 6.3 % であり、複屈折法による検討の結果を裏付けた (図3)。

4.5. 考察

複屈折法による、心筋の viability の評価に関しては数多くの研究がなされている [Cankovic-Daracott, S., et al., 1977, Cooper, J., et al., 1982, Bull, C., et al., 1984, Daracott-Cankovic, S., et al., 1987] が、本法を用いて骨格筋の収縮特性評価の可能性を検討した報告はない。しかし、筋線維タイプの分布がはっきりしているラッ

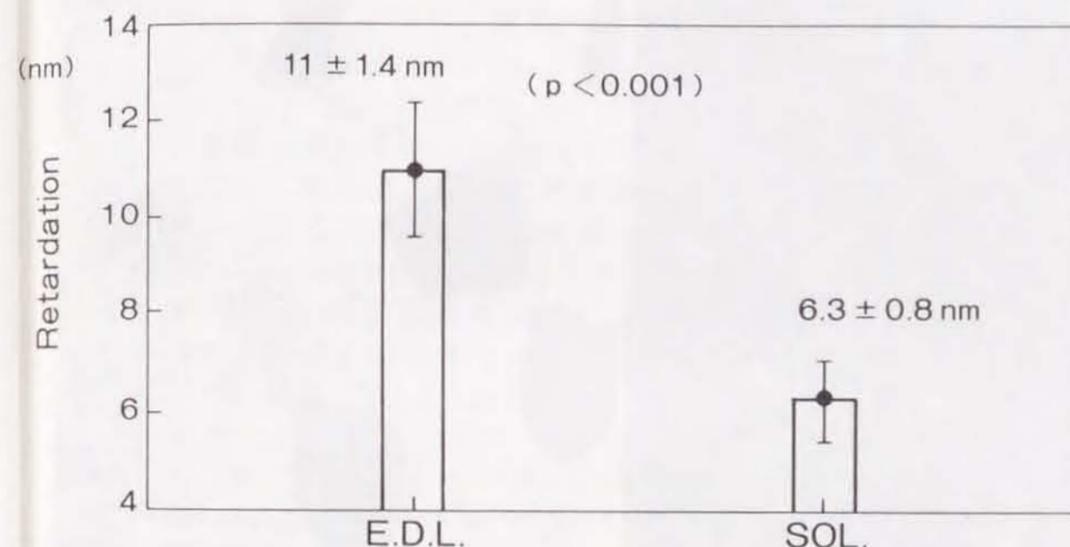


図2 Wistar 系ラットにおける速筋と遅筋の複屈折法による検討

骨格筋筋線維タイプの分布のはっきりしているWistar 系ラットにおいて、速筋と遅筋の複屈折法による差を検討した。筋線維の大部分が type II fiber で構成される EDL (extensor digitorum longus) では Ca²⁺ と ATP の添加による行差の差の変化は 11 ± 1.4 nm であり、type I fiber 優位の SOL (soleus) では 6.3 ± 0.8 nm である。両者のあいだには危険率 $p < 0.001$ で有意差が存在する。

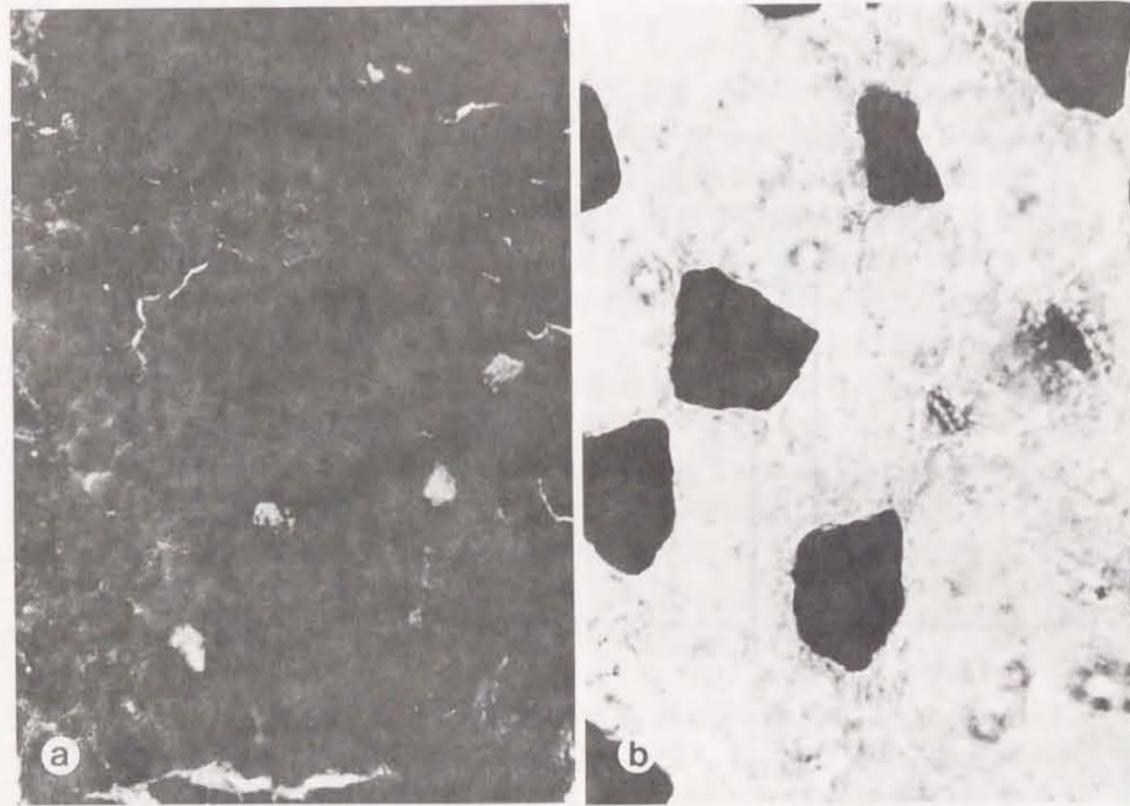


図3 Wistar系ラットにおける速筋と遅筋のATPase染色

Wistar系ラットにおける速筋と遅筋の routine ATPase 染色の結果を示す。pH 10.4 にて行われる routine ATPase 染色において type II fiber は黒く濃染し、type I fiber は白く淡染する。a: 速筋である EDL (extensor digitorum longus) は大部分黒く濃染する type II fiber によって構成されている。b: 遅筋である SOL (soleus) は白く淡染する type I fiber が優位である。

トにおける検討の結果、速筋線維が大部分を占める EDL (extensor digitorum longus) において、行差の変化の差は大きく、遅筋線維が大部分を占める SOL (soleus) においては、行差の変化の差は小さかった。速筋線維はミオシン ATPase 活性が高く、遅筋線維はミオシン ATPase 活性が低い [Peter, J.B., et al., 1972, Maxwell, L.C., et al., 1982]。つまり、複屈折法による評価は骨格筋筋線維タイプの構成の違いによる全体的なミオシン ATPase 活性を表現していると考えられる。前述のように、骨格筋筋線維タイプの構成比率がその骨格筋の収縮弛緩特性を決定する [Maxwell, L.C., et al., 1982]。ゆえに、複屈折法による評価は、ミオシン ATPase 活性を通して、その骨格筋の収縮弛緩特性を直接反映すると考えられる。現在骨格筋筋線維タイプの視覚的判別法として広く行われている ATPase 染色は、各筋線維タイプにおけるミオシン ATPase の pH 依存性を利用したものであり、ミオシン ATPase 活性とは直接的には関係がない [Brooke, M.H., et al., 1970]。この点において、複屈折法は骨格筋筋線維タイプ分別、ひいては、骨格筋コンディショニングの程度判定に有用な方法であると考えられる。また、複屈折法は組織切片を染色固定する必要がなく、短時間で容易に定量的結果を得ることができる [Chayen, J., et al., 1985]。骨格筋を利用した補助循環システムの臨床応用に際しては、骨格筋の筋線維タイプの分布を評価することは重要な課題になる [Mannion, J.D., et al., 1986a] と考えられ、本法の有効性は極めて大きいといえる。

第5章 骨格筋を遅筋化する方法としての電気刺激法の検討

5.1. 実験の目的

長期間の電気刺激により、骨格筋線維タイプは速筋タイプから遅筋タイプへ変化する[Pette, D., et al., 1973, Hudlicka, O., et al., 1977, Salmons, S., et al., 1976]。骨格筋を用いた補助循環システムを臨床応用する場合、事前のコンディショニングの期間を決定することは極めて重要である[Mannion, J.D., et al., 1986a,b]。臨床応用の対象を慢性の心不全に限れば、コンディショニングを行うための時間的余裕は存在する。しかし、術前のコンディショニング期間は、できるだけ短いほうがよい。現在までに、主に家ウサギを使用して行われた実験ではバースト刺激を用い、期間も4週間以上と長期にわたるものが多く、評価もATPase染色法のみによっている[Pette, D., et al., 1973, Hudlicka, O., et al., 1977, Rubinstein, N., et al., 1978]。われわれは術前のコンディショニング期間短縮の可能性を検討するために、2週間と8週間のコンディショニングの結果を、複屈折法、ATPase染色法と電子顕微鏡を用いて評価した。

5.2. 対象と方法

雑種成犬 13 頭を用いて実験を行った。

pentobarbital sodium (30 mg/kg) を静注し麻酔を行った後、気管内挿管して Harvard 人工呼吸器に接続し、room air による調節呼吸（一回換気量 20 ml/kg、換気回数 15 回/min）とした。前肢の皮静脈を 21G テフロン針にて穿刺確保し、乳酸リンゲル液（大塚製薬社製、ラクテック）の点滴（10 ml/kg/hr）を行った。実験犬を左側臥位にし、広背筋

の腹側の下縁の走行に沿って約 5 cm の皮切を作製した。広背筋の下面に沿って剥離を進め、胸背神経を動静脈と一塊にして露出した。胸背神経が広背筋内に入り込む部位に、動静脈を損傷しないように、テンポラリー心室ペースメーカーリード（Medtronic 6500、medtronic 社製）を装着した。そのリードに心臓用ペースメーカーを接続した。皮下にポケットを作製し、抗生物質（エポセリン筋注用 4 mg/kg、藤沢薬品工業社製）を筋注後閉創し、麻酔から覚醒後、長期飼育した。胸背神経に対する刺激は電圧 5 V、パルス幅 0.5 msec の単刺激で、2 Hz の頻度で、24 時間連続して行った。以下 2 週間コンディショニングを行ったものを Group-1（6 頭）、8 週間コンディショニングを行ったものを Group-2（7 頭）とした。

pentobarbital sodium (30 mg/kg) を静注し麻酔を行った後、気管内挿管して Harvard 人工呼吸器に接続し、room air による調節呼吸（一回換気量 20 ml/kg、換気回数 15 回/min）とした。前肢の皮静脈を 21G テフロン針にて穿刺確保し、乳酸リンゲル液（大塚製薬社製、ラクテック）の点滴（10 ml/kg/hr）を行った。

両側の広背筋を剥離し、筋肉を採取、検体を得た。検体を液体窒素中で急速に凍結し、-70 °C のディープフリーザー中で保存した。検体は広背筋の部位による差が出ないように無作為に取りだし、Group-1 では一つの広背筋につき 2 検体、Group-2 では 3 検体について検討を行った。その後左開胸し、心膜を切開、左室心筋を露出し、左室自由壁の心室筋の一部を切除し検体を得た。検体は広背筋と同様に液体窒素中で急速凍結し、-70 °C のディープフリーザー中で保存した。検体採取後、実験犬に大量の麻酔薬と KCl を静注し、安楽死させた。検体はコンディショニングした広背筋から得たものを conditioned muscle（以下 CM 群と略す）、対側のコンディショニングしていない広背筋から得たものを unconditioned muscle（以下 UCM 群と略す）、心筋から得たものを myocardium（以下 MY 群と略す）とした。

これらの検体を、クライオスタット（サクラ精機社製 コールドトーム CM-41）を使用して 8 μ の厚さに筋線維の走行

に沿って薄切し、スライドグラスにマウントし、複屈折法による行差の測定を行った。測定は1検体につき5回行い、最大値と最小値を切り捨て、残りをデータとして記録した。

また、複屈折法による検討にて使用した検体の一部を、クライオスタット（サクラ精機社製 コールドトーム CM-41）を使用して10 μ の厚さに筋線維の走行と直角に薄切し、筋線維の横断面を得た。切片をスライドグラスにマウントし、Brookらの方法にしたがって routine ATPase 染色を行った。でき上がったスライドの拡大写真を用い、デジタイザー（面積太郎、WACOM社製）を使用して黒く濃染している type II fiber の面積比を算出した。Group-1 では一つの広背筋につき1検体、Group-2 では一つの広背筋につき2検体に対し ATPase 染色法による検討を加えた。

電顕的検討を行うために、検体の一部を直ちに固定液（2% paraformaldehyde、2.5% glutaraldehyde、0.2 mol phosphate buffer）中で固定した。次に、2% aqueous osmium tetroxide 中に90分間浸漬させ、段階的にアルコールで脱水した後、Epon樹脂に包埋した。包埋した検体を ultramicrotome で薄切し、toluidine blue で染色した。光学顕微鏡で観察した後、diamond knife を使用してさらに薄い切片を得た。その切片を200 meshのgridの上にマウントし、さらに uranyl acetate と lead citrate を使用して染色した。その切片を倍率5000倍で電子顕微鏡（Nippon-Denshi 100CX、日本電子社製）で観察し、写真を撮影した。筋線維の方向に沿った切片で得られた写真を拡大して印画紙に焼き付け、最終倍率が15000倍となるようにした。Group-1 では一つの広背筋につき2検体、Group-2 では一つの広背筋につき3検体に対し検討を加えた。デジタイザー（Model-1、武藤工業社製）と BX-1 computer（Cannon社製）を使用し、ミトコンドリアの面積を計測した。ミトコンドリアの面積は単位面積あたりの占める面積比で表わした。また、ミトコンドリアの数は228 μm^2 （写真1枚あたりの実写面積に相当する）の矩形内の計数值とした。

有意差検定は unpaired student t-test により行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

5.3. 結果

5.3.1. 複屈折法による検討

2週間コンディショニングした広背筋（Group-1）の複屈折法による検討の結果を図4に示す。7.7 \pm 0.8 nm から 5.7 \pm 0.9 nm と、コンディショニングによる行差の変化の著明な低下が認められた（ $p < 0.001$ ）。また心筋の行差の変化は3者中最も低値をとり、コンディショニングされた骨格筋との間には、危険率 $p < 0.001$ で有意差を認めた。8週間コンディショニングした広背筋（Group-2）の複屈折法による検討の結果を図5に示す。8.0 \pm 0.6 nm から 5.3 \pm 0.5 nm と、2週間のコンディショニングと同様に、行差の変化の著明な低下が認められた（ $p < 0.001$ ）。しかし、2週間のコンディショニングと8週間のコンディショニングの間には、有意な差は認められなかった。

5.3.2. ATPase 染色法による検討

Group-1 における routine ATPase 染色で黒く染まる type II fiber の面積比は2週間のコンディショニングの結果、64 \pm 8.5% から 30 \pm 5.8% へ著明に減少した（ $p < 0.001$ ）（図6）。同様に Group-2 においても routine ATPase 染色で黒く染まる type II fiber の面積比は、8週間のコンディショニングの結果、73 \pm 10% から 35 \pm 18% へ著明に減少した（ $p < 0.001$ ）（図7）。しかし、2週間のコンディショニングと8週間のコンディショニングの間には、有意な差は認められなかった。実際の ATPase 染色の写真を図8、9に示す。

5.3.3. 電子顕微鏡による検討

2週間コンディショニングしたイヌ広背筋におけるミトコンドリアの面積比の検討の結果を図10に示す。コンディショニングしていない骨格筋のミトコンドリアの面積比は3%程度であり、コンディショニングによってミトコンドリアは、その面積比を $3.3 \pm 1.1\%$ から $6.6 \pm 2.7\%$ に有意に増加させた($p < 0.05$)。8週間コンディショニングしたイヌ広背筋におけるミトコンドリアの面積比の検討の結果を図11に示す。8週間のコンディショニングにおいても、2週間のコンディショニングと同様に、コンディショニングによってミトコンドリアはその面積比を $2.8 \pm 1.0\%$ から $7.8 \pm 2.0\%$ に有意に増加させた($p < 0.001$)。2週間のコンディショニングと8週間のコンディショニングの間には、有意な差は認められなかった。しかし、心筋のミトコンドリアの面積比は $20 \pm 2.5\%$ であり、コンディショニングした広背筋のミトコンドリアの面積比と比較してもはるかに大きい($p < 0.001$)。心筋の耐疲労性の高さを示唆していると考えられた。

2週間コンディショニングしたイヌ広背筋におけるミトコンドリアの数の検討の結果を図12に示す。2週間のコンディショニングによっては、ミトコンドリアの数は 39 ± 30 から 41 ± 17 と有意に増加しなかった。8週間コンディショニングしたイヌ広背筋におけるミトコンドリアの数の検討の結果を図13に示す。8週間のコンディショニングによってミトコンドリアはその数を 41 ± 21 から 68 ± 23 に有意に増加させた($p < 0.05$)。心筋のミトコンドリアの数は 69 ± 14 であり、コンディショニングした広背筋のミトコンドリアの数と有意な差は存在しなかった。

2週間コンディショニング群の電子顕微鏡写真を図14に示す。左側がコンディショニングしていない広背筋、中央が2週間コンディショニングした広背筋、右側が心筋である。2週間のコンディショニングにより、ミトコンドリアの面積が著明に増加していることが観察される。しかし、心筋と比較すると、面積比はなお小さいと考えられる。

8週間のコンディショニングを行った群の電子顕微鏡写真を図15に示す。左側がコンディショニングしていない広背

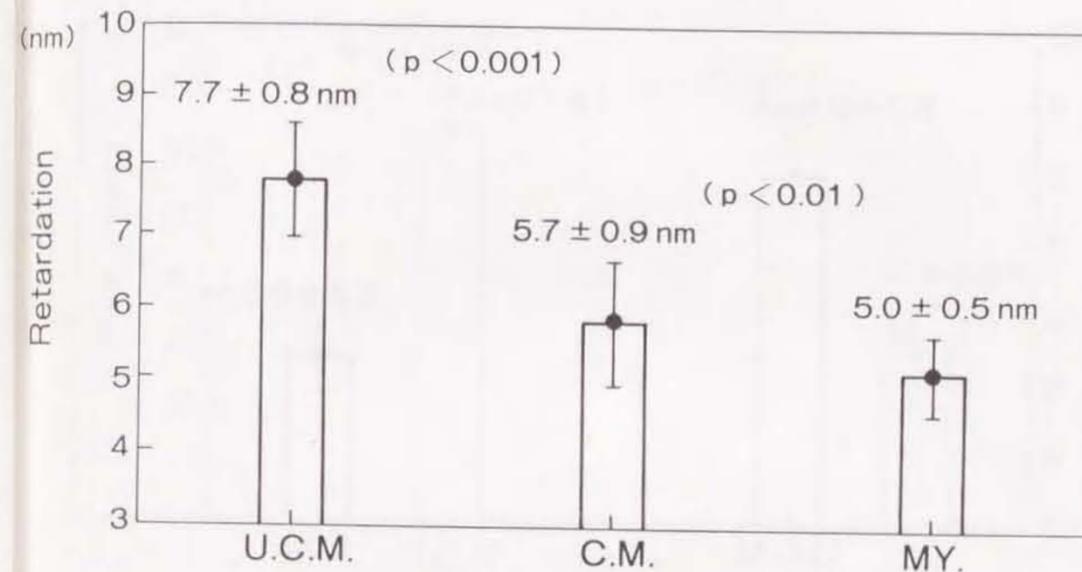


図4 イヌ広背筋における複屈折法による検討 (Group-1)

電気刺激によるコンディショニングのイヌ広背筋における効果の検討の結果を示す。2週間の電気刺激によりイヌ広背筋の反応液添加前後の行差の差の変化は 7.7 ± 0.8 nmから 5.7 ± 0.9 nmに有意に低下した($p < 0.001$)。しかし、心筋の値は 5.0 ± 0.5 nmとより低値であり、コンディショニングした骨格筋との間には危険率1%で有意差が存在した。

Group-1 : 2 weeks conditioning.

U.C.M. : unconditioned muscle, C.M. : conditioned muscle, MY. : myocardium.

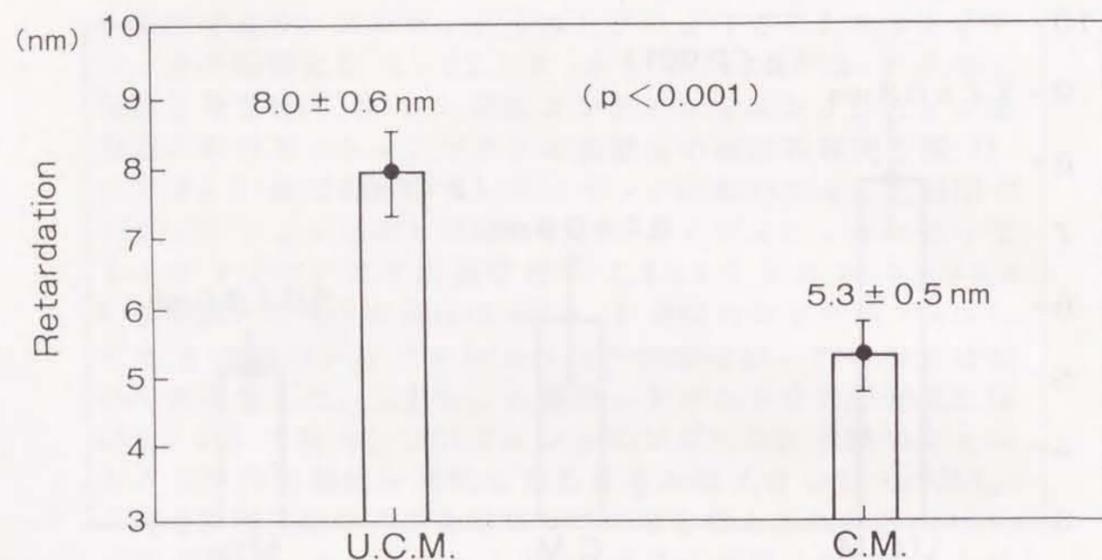


図5 イヌ広背筋における複屈折法による検討 (Group-2)

電気刺激によるコンディショニングのイヌ広背筋における効果の検討の結果を示す。8週間の電気刺激によりイヌ広背筋の反応液添加前後の行差の差の変化は 8.0 ± 0.6 nm から 5.3 ± 0.5 nm に有意に低下した。

Group-2 : 8 weeks conditioning.

U.C.M. : unconditioned muscle, C.M. : conditioned muscle.

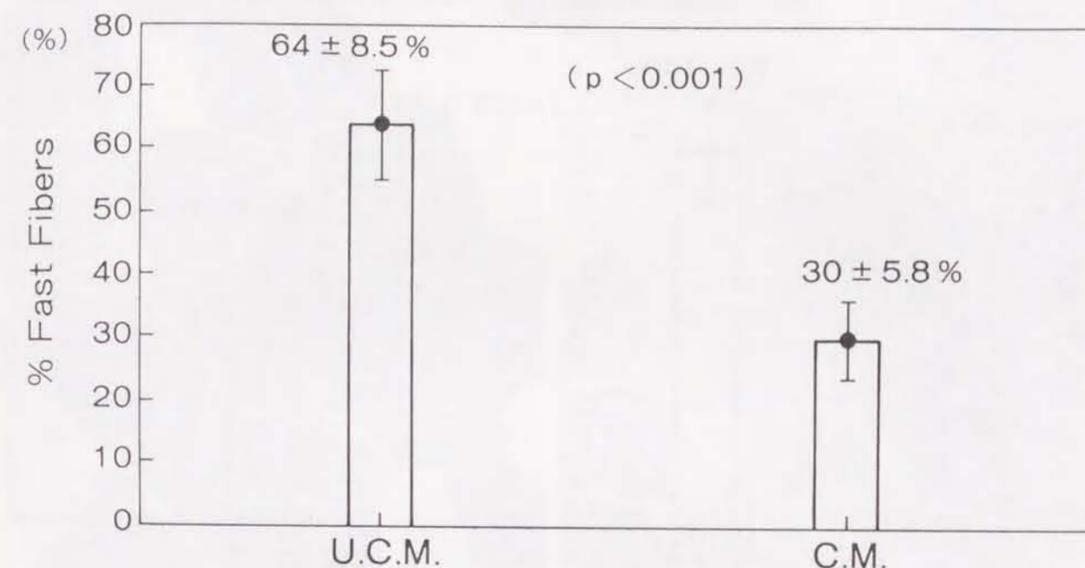


図6 イヌ広背筋の type II fiber の面積比 (Group-1)

pH 10.4 で行う routine ATPase 染色で黒く濃染する type II fiber の面積比を示す。2週間の電氣的コンディショニングにより、面積比は $64 \pm 8.5\%$ から $30 \pm 5.8\%$ に有意に低下した ($p < 0.001$)。

Group-1 : 2 weeks conditioning.

U.C.M. : unconditioned muscle, C.M. : conditioned muscle.

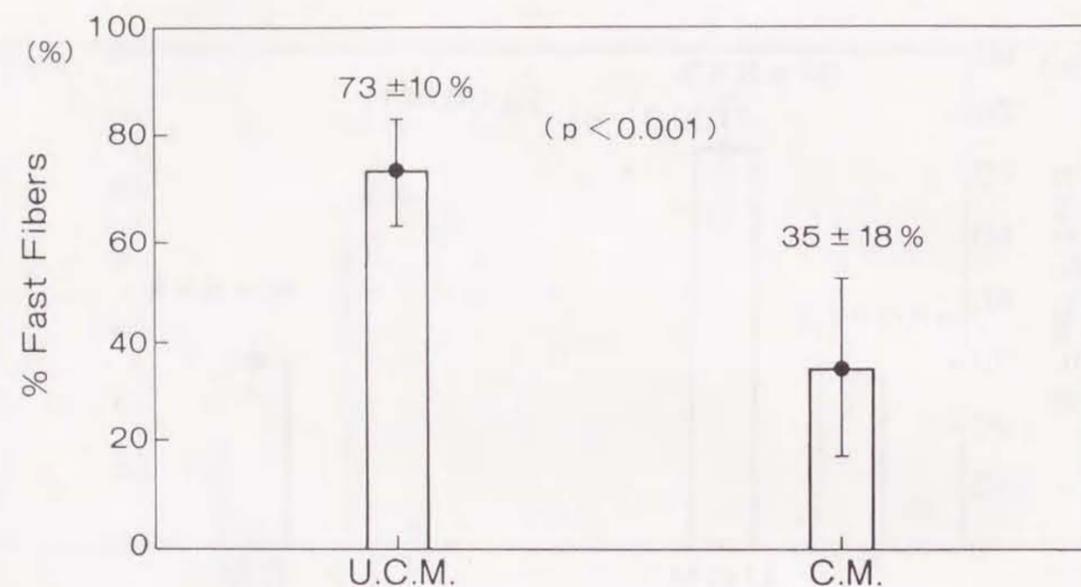


図7 イヌ広背筋の type II fiber の面積比(Group-2)

pH 10.4 で行う routine ATPase 染色で黒く濃染する type II fiber の面積比を示す。8週間の電氣的コンディショニングにより、面積比は $73 \pm 10\%$ から $35 \pm 18\%$ に有意に低下した ($p < 0.001$)。

Group-2 : 8 weeks conditioning.

U.C.M. : unconditioned muscle, C.M. : conditioned muscle.

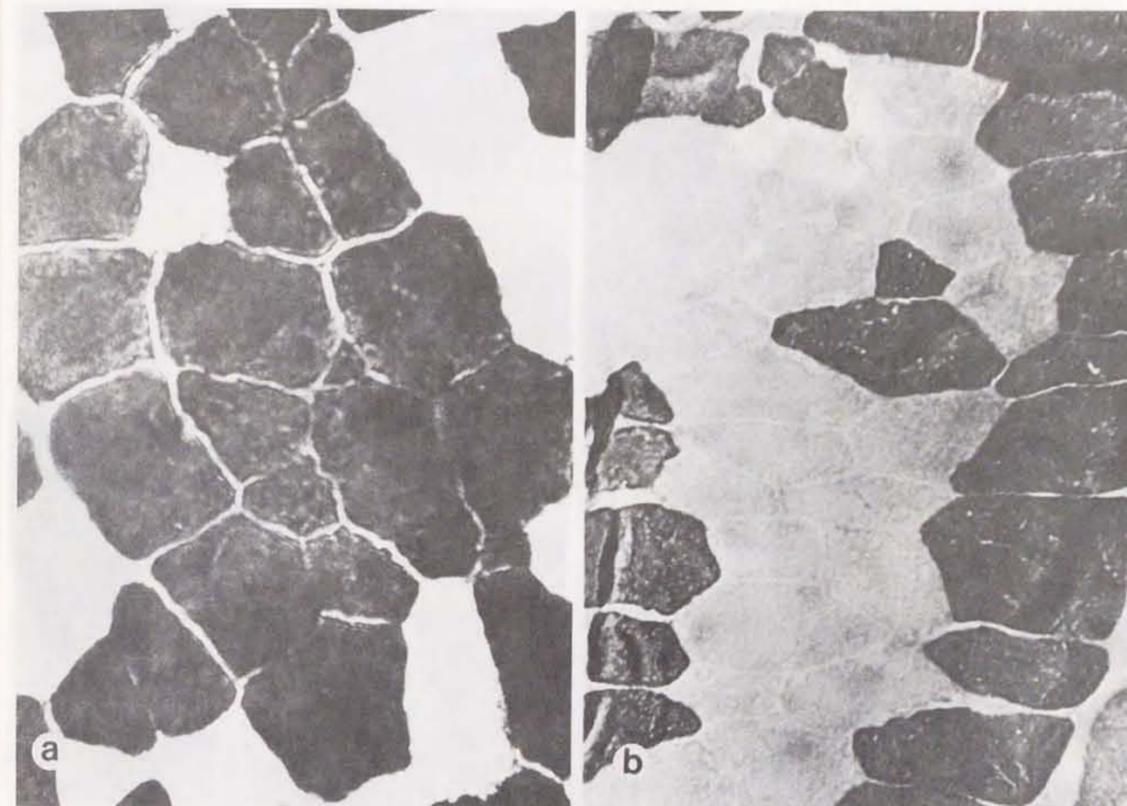


図8 イヌ広背筋 ATPase 染色 (Group-1)

ATPase 染色の結果を提示する。pH 10.4 で行う routine ATPase 染色で黒く濃染する type II fiber の面積比が、2週間の電氣的コンディショニングにより著明に低下している。

Group-1 : 2 weeks conditioning.

a. : unconditioned muscle, b. : conditioned muscle

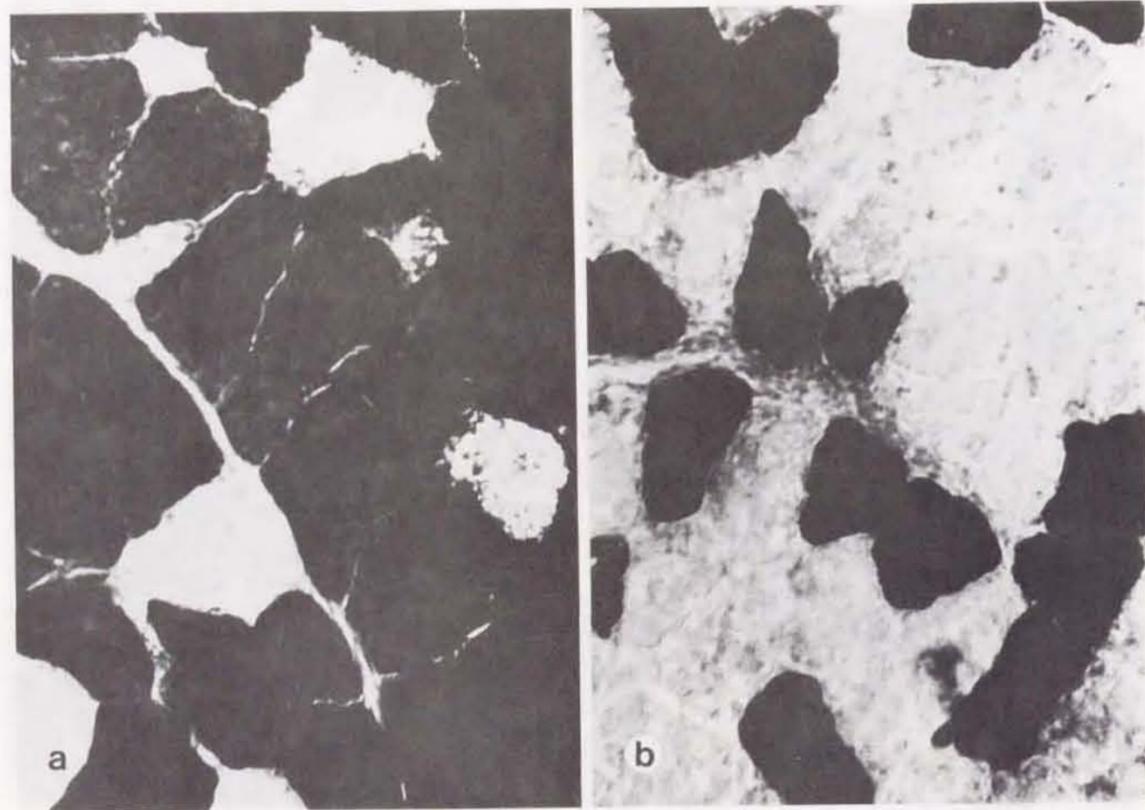


図9 イヌ広背筋 ATPase 染色 (Group-2)

ATPase 染色の結果を提示する。pH 10.4 で行う routine ATPase 染色で黒く濃染する type II fiber の面積比が、8 週間の電氣的コンディショニングにより著明に低下している。

Group-2 : 8 weeks conditioning.

a. : unconditioned muscle, b. : conditioned muscle

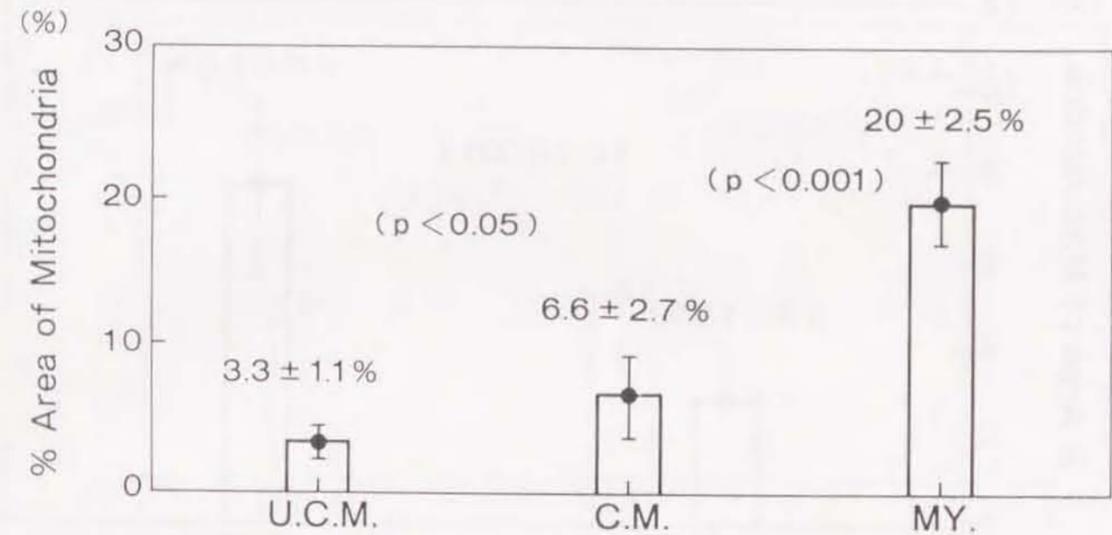


図10 イヌ広背筋の電氣的コンディショニングによるミトコンドリア面積比の変化 (Group-1)

2 週間の電氣的コンディショニングによるミトコンドリアの面積比は $3.3 \pm 1.1\%$ から $6.6 \pm 2.7\%$ に増加した ($p < 0.001$)。心筋のミトコンドリアの面積比は $20 \pm 2.5\%$ であり、コンディショニングした骨格筋よりも大きい。

Group-1 : 2 weeks conditioning.

U.C.M. : unconditioned muscle, C.M. : conditioned muscle, MY. : myocardium.

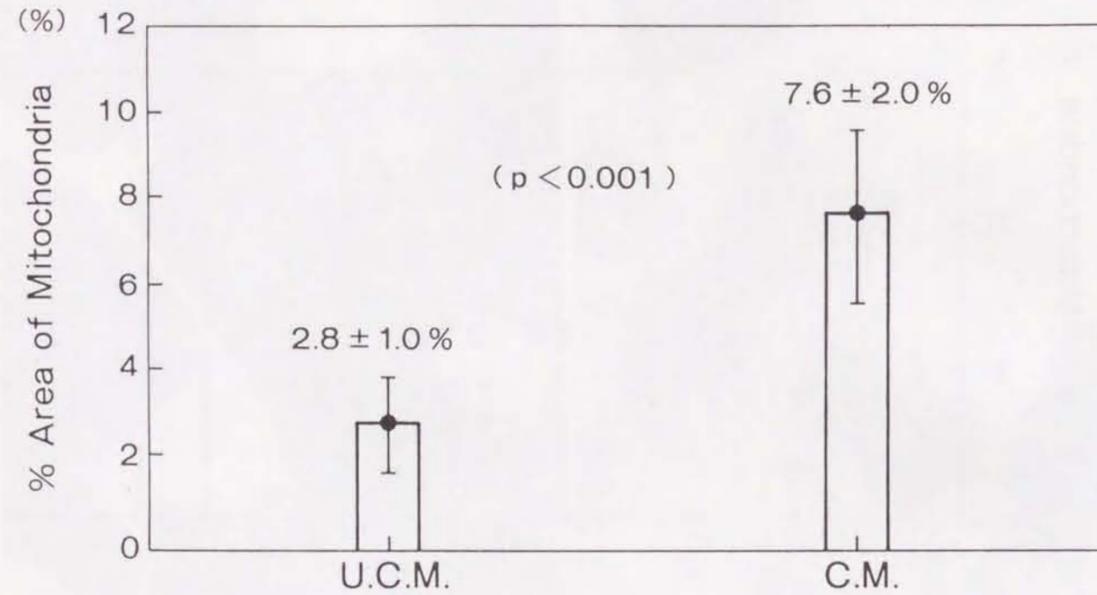


図 11 イヌ広背筋の電氣的コンディショニングによるミトコンドリア面積比の変化 (Group-2)

8 週間の電氣的コンディショニングによるミトコンドリアの面積比は 2.8 ± 1.0 % から 7.6 ± 2.0 % に増加した ($p < 0.001$)。

Group-2 : 8 weeks conditioning.

U.C.M. : unconditioned muscle, C.M. : conditioned muscle.

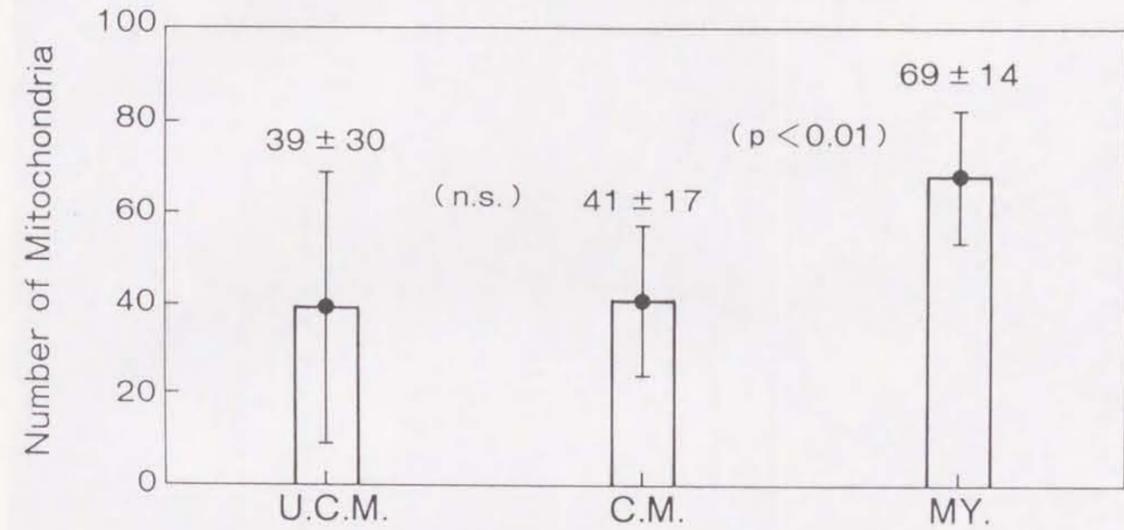


図 12 イヌ広背筋の電氣的コンディショニングによるミトコンドリア数の変化 (Group-1)

2 週間の電氣的コンディショニングによってミトコンドリアの数は有意な増加を示さなかった。心筋のミトコンドリアの数はコンディショニングした骨格筋と比較して有意に多量であった ($p < 0.01$)。

Group-1 : 2 weeks conditioning.

U.C.M. : unconditioned muscle, C.M. : conditioned muscle, MY. : myocardium.

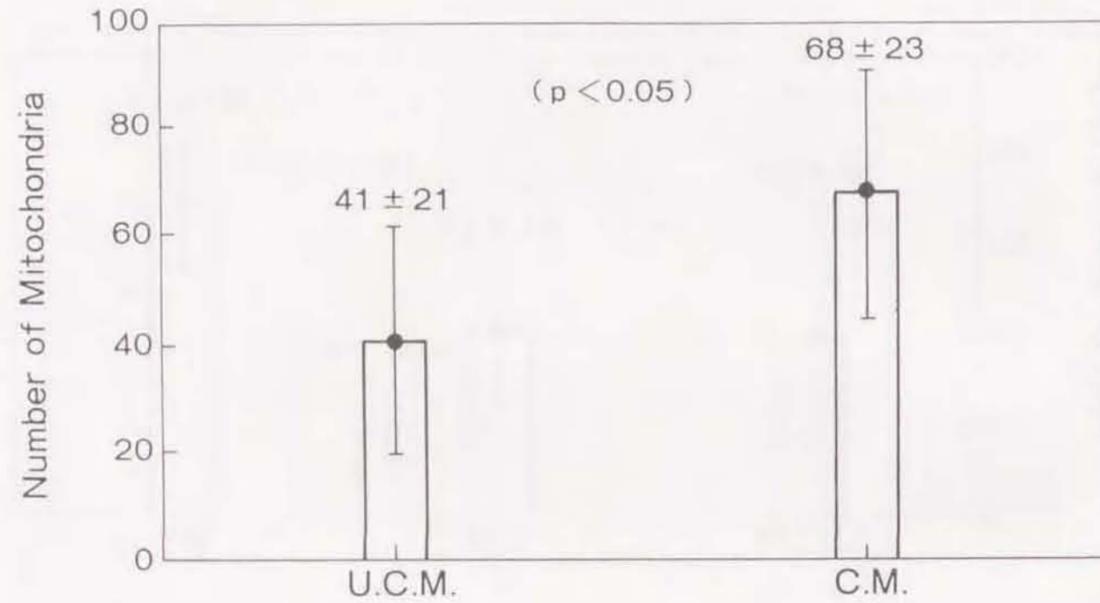


図 13 イヌ広背筋の電氣的コンディショニングによるミトコンドリア数の変化 (Group-2)

8 週間の電氣的コンディショニングによってミトコンドリアの数は有意な増加を示した ($p < 0.05$)。

Group-2 : 8 weeks conditioning.

U.C.M. : unconditioned muscle, C.M. : conditioned muscle.

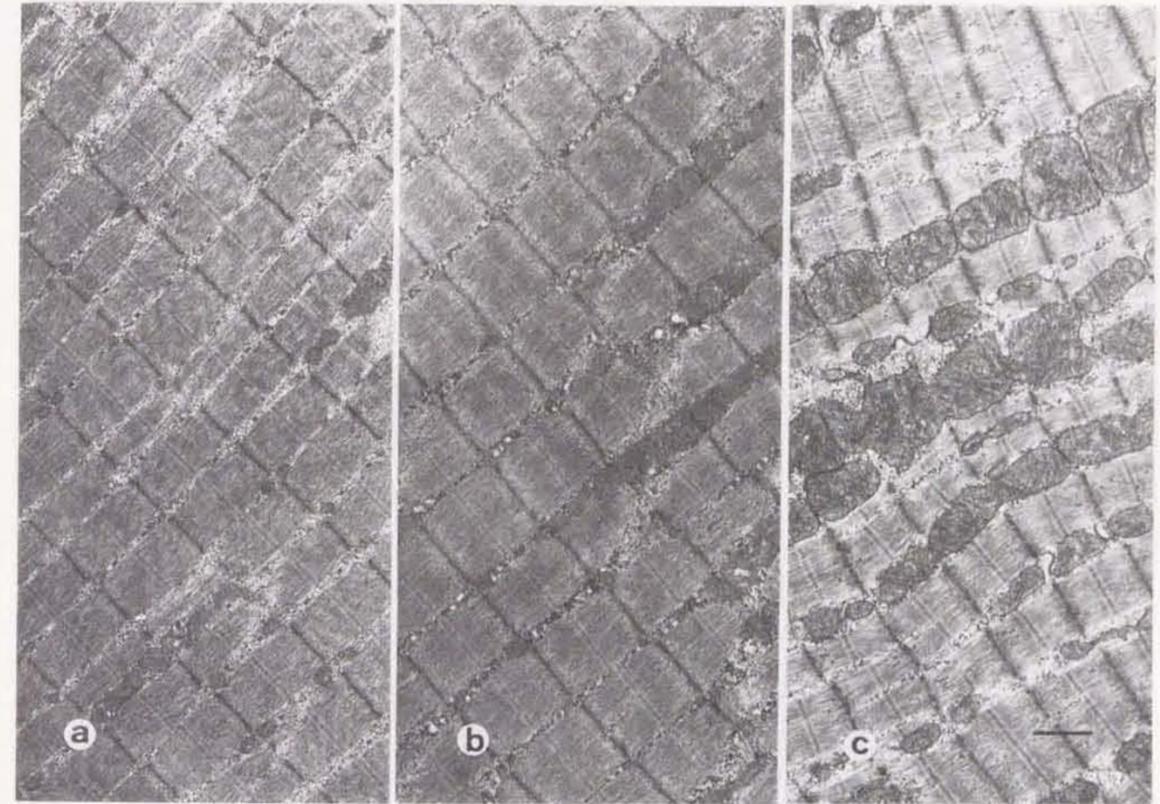


図 14 イヌ広背筋電顕写真 (Group-1)

a. コンディショニングしていない対側の広背筋 b. 2 週間電氣的コンディショニングを行った広背筋 c. 心筋
2 週間の電氣的コンディショニングによりミトコンドリアの面積比がが著明に増加しているのが観察される。しかし、心筋のミトコンドリアの面積比も数もコンディショニング後の広背筋よりも多い。

Group-1 : 2 weeks conditioning.

右下の黒線は 1 μm を示す。

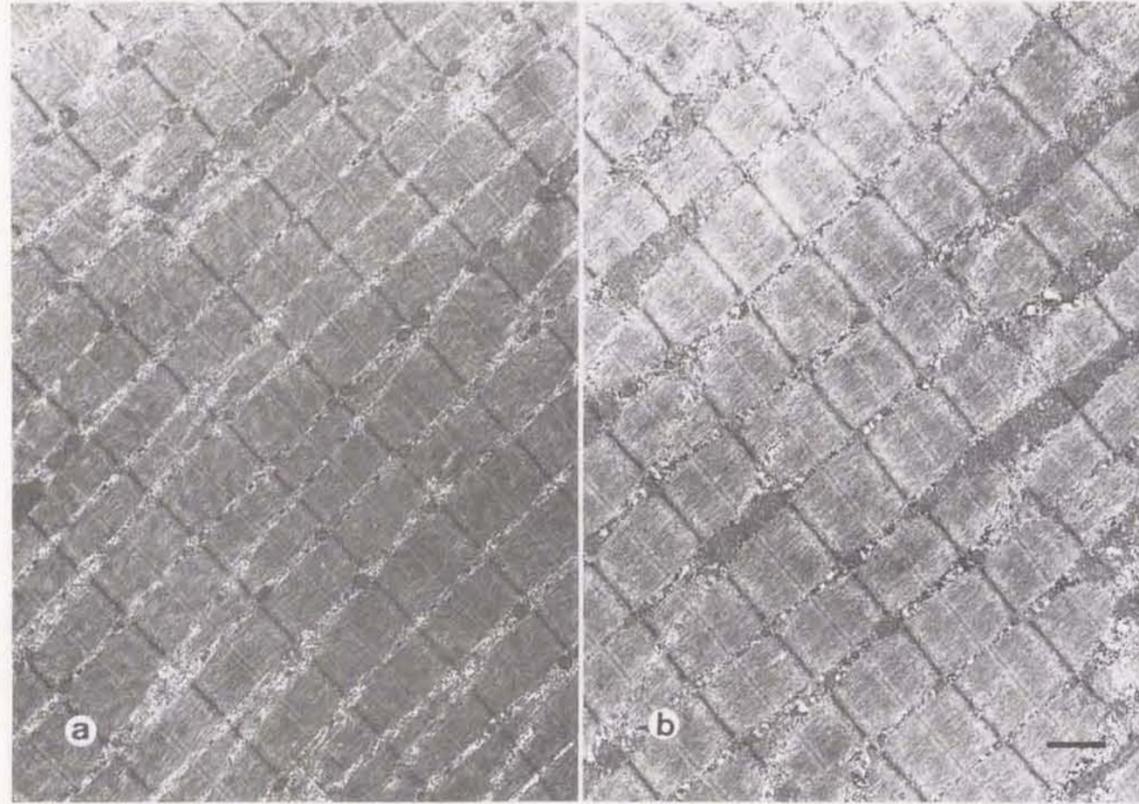


図 15 イヌ広背筋電顕写真 (Group-2)

a. コンディショニングしていない対側の広背筋 b. 8 週間電氣的コンディショニングを行った広背筋
8 週間の電氣的コンディショニングによりミトコンドリアの面積比と数が著明に増加したのが観察される。

Group-2 : 8 weeks conditioning.
右下の黒線は 1 μm を示す。

筋、右側が 8 週間コンディショニングした広背筋である。2 週間のコンディショニングと同様に、8 週間のコンディショニングにおいても、ミトコンドリアの面積が著明に増加していることが観察される。

5.4. 考察

遅筋化された骨格筋を短時間で得るためには、効率的な変換方法の開発とその正確な評価法が必要不可欠であると考えられる。そこで、われわれは複屈折法を用い、骨格筋ミオシン ATPase 活性を直接反映する指標と考えられる行差の変化による評価を行った。基本的には骨格筋の筋線維タイプはその神経運動単位を支配している神経の電氣的なスパイクの発射頻度によって決定される [Salmons, S., et al., 1976]。骨格筋の電氣刺激によるコンディショニングはこの考えにもとづいている [Mannion, J.D., et al., 1986b]。電氣的コンディショニングによる骨格筋の収縮特性、形態、発現蛋白、代謝特性の変化などについては種々の報告がある。われわれは骨格筋の筋タイプ変換の程度は複屈折法を用いて定量的に判定できること、および電氣刺激による骨格筋筋線維タイプの変換は 2 Hz という低い刺激頻度においても、2 週間という従来報告されているより早期に変換されることを見出した。電氣的コンディショニングの期間短縮は、骨格筋を使用した補助循環システムを臨床応用するに当り、患者の負担を軽減する上において極めて重要な意味を持つと考えられる。

骨格筋を利用した補助循環システムの臨床応用に対する最大の問題は骨格筋の易疲労性である。遅筋は収縮力が小さく収縮速度は遅いが、エネルギー利用効率が高く好氣的な代謝を行うという特性を有している。この特性は、瞬発的な仕事はしなくてもよいが、持続的に長時間仕事をしなければならない循環補助のエネルギー源として適していると考えられる。しかし、人体において骨格筋のほとんどは type II fiber が主体を占める速筋であり、遅筋といわれる筋肉においても、そのなかに含まれる type I fiber の割合は 100 %

ではない。そのため補助循環に利用する骨格筋は効率的に遅筋化される必要がある。

非生理的な条件下では、骨格筋の筋線維タイプを変換する種々の方法が報告されている。Weedsらはネコのヒラメ筋（遅筋）への神経を長指伸筋（速筋）へ、逆に長指伸筋（速筋）への神経をヒラメ筋（遅筋）に接続した[Weeds, A.G., et al., 1974]。その結果、ヒラメ筋では、速筋型ミオシンL鎖の出現と、ミオシンATPase活性、特にアクチンにより活性化されるミオシンATPase活性の上昇が見られ、一方、長指伸筋では、遅筋型ミオシンL鎖の出現と、アクチンによる活性化の少ないミオシンATPaseが認められたことを報告している。Carraroらはネズミの横隔膜を6カ月間除神経しておく、最初には存在していた遅筋型ミオシンL鎖が消失し、 α -トロポミオシンに対する β -トロポミオシンの量比が相対的に減少することを報告している[Carraro, U., et al., 1981]。Srihariらは骨格筋の培養細胞を35日間、3Hzで連続的に刺激したところ、遅筋型ミオシンL鎖の出現を見たことを報告している[Srihari, T., et al., 1981]。培養細胞を電気刺激しても発現してくる蛋白質の種類が変化したということは、何らかの物質が支配神経から分泌され、それが骨格筋の分化を誘導しているのではなく、基本的には骨格筋の筋線維タイプは、その神経運動単位を支配している神経の電氣的なスパイクの発射頻度によって、決定されると考えられる[Salmons, S., et al., 1976]。臨床的には下肢をギブス固定すると下肢の骨格筋が萎縮することが知られている（廃用性萎縮）。この萎縮は非常に短期間（1週間）に起こり、とくに弛緩位で固定した場合変化が大きいとされる。このとき、骨格筋の重量の減少のみならず、type 1 fiberの減少が観察される。

現在まで最もよく研究されている骨格筋の筋線維タイプ変換の方法は、骨格筋への長期電気刺激である。また、骨格筋筋線維タイプを速筋型から遅筋型に変換できるのも、現在のところ長期連続電気刺激のみである。Stephensonらはこの過程を骨格筋コンディショニングと名付け、骨格筋を利用した補助循環システムを構築する上での重要なステップであると

している。電氣的コンディショニングによる骨格筋の収縮特性、形態、発現蛋白、代謝特性の変化などについては種々の報告がある。

RubinsteinらはウサギのEDL (extensor digitorum longus) を10 Hzの頻度で連続的に電気刺激を行い、4.5週間でほぼ完全に遅筋型筋線維へ転換したことを観察している[Rubinstein, N., et al., 1978]。また彼らは同時に免疫組織化学的手法を用い、3週間の電気刺激でfluoresceinでラベルした速筋型の抗ミオシン抗体で染まっていたウサギのEDL (extensor digitorum longus) が、遅筋型の抗ミオシン抗体で染まることも報告している。Mannionらはビーグル犬による検討の結果を報告している[Mannion, J.D., et al., 1986a]。それによると10 Hz、30日の電気刺激では、L.D. (latissimus dorsi) における速筋線維の割合を $5 \pm 8.1\%$ まで減少させることができるのに、2 Hz、40日の電気刺激では、 $24 \pm 14.1\%$ までしか減少させられないと報告している。

局所の血流の状態は骨格筋の易疲労性の軽減に重要な働きをする。その理由としては、血流量の増加による組織への酸素供給量の増大のみならず、血流そのものの増加による効果も考えられている。Barclayらは動脈血中の O_2 tensionを増減することによって、組織への酸素供給量を変化させず、組織血流量をコントロールできる骨格筋灌流モデルを作製した[Barclay, J., 1986]。そのシステムを使用して酸素供給量と関係なく、純粋に組織血流量と骨格筋の疲労性の関係を検討している。発生張力の時間推移を観察すると、低酸素分圧で高流量灌流したほうが、高酸素分圧で低流量灌流したものより、発生張力の低下が少ないと報告している。その理由として、彼らは血流の増加により、代謝産物の排泄が容易になったことを上げている。実際に耐疲労性に優れているといわれている遅筋において、capillary densityが高く[Gray, S.D., et al., 1983]、等張性収縮運動時の血流増加も大きい[Petrofsky, J.S., et al., 1981, Mackie, B.G., et al., 1983a]。長期にわたる電気刺激によっても骨格筋のcapillary densityが増加する[Hudlicka, O., et al.,

1984]。この事実も、電氣的コンディショニングが骨格筋の耐疲労性を高める一因となっていると考えられる。生理的な運動トレーニングを行ったラットにおいて、安静時の血流は変化しないが、運動時の遅筋の血流は、トレーニングをしない群と比較して、速く増加し、かつ、増加量が多いことも報告されている[Mackie, B.G., et al., 1983b, Armstrong, R.B., et al., 1984]。

Hudlicka らは 4 Hz で 4 から 28 日連続的に電気刺激したウサギの T.A. (tibialis anterior) と EDL (extensor digitorum longus) において、安静時と、10 分間連続して 4 Hz で刺激し続けたときの骨格筋の血流量、酸素消費量、glucose consumption、lactate output の変化を報告している[Hudlicka, O., et al., 1977]。彼らは長期の電気刺激によって、骨格筋の酸素消費及び局所血流は運動に応じて著明に増加することを見出ししている。また、glucose consumption と lactate output についてみると、同じ運動量では長期に電気刺激した骨格筋の方が明らかに少ないとしている。つまり長期の骨格筋電気刺激は骨格筋の局所血流量を増加させることにより、骨格筋へのエネルギー供給を増やし、骨格筋のエネルギー効率を上げることで、酸素負債を軽減しているといえる。実際の biomechanical cardiac assist device を想定した実験において、Acker らは刺激に対する酸素消費と実際に行った仕事に対する酸素消費の効率について、まったく同様の結果を報告している[Acker, M.A., et al., 1987c]。また、彼らは、生体内の高エネルギーリン酸の代謝を ^{31}P -NMR spectroscopy を使用して観察した[Clark III, B. J., et al., 1988]。それによると、電気刺激によりコンディショニングした広背筋は、TTI (tension time index) を増加させても Pi (inorganic phosphate) と PCr (creatine phosphate) の比は増加しない。このことから生体内においても、電氣的にコンディショニングした骨格筋は、エネルギー利用効率が高まり、持久的な仕事を行っても疲労しにくくなっていることが確かめられた。さらに酵素レベルでの検討では、Salmons らはウサギの T.A. (tibialis anterior) を 10 Hz で 4-12 週間刺激し続けたところ、ミオ

シン ATPase 活性の低下を認めたと報告している[Salmons, S., et al., 1976]。また、Henrikson らはネコの GC. (gastrocnemius) と SOL (soleus) に 2 Hz で、1 日に 4 時間、1 週間に 3 日間、の割合で 4 週間電気刺激を行った。彼らは酸化能力を示す指標として SDH (succinate dehydrogenase) 活性と解糖系酵素の代表として PFK (6-phosphofructokinase) 活性を、正常な骨格筋と除神経した骨格筋において測定した[Henriksson, J., et al., 1982]。それによると、GC. (gastrocnemius) においては正常な骨格筋でも、除神経された骨格筋においても電気刺激により SDH (succinate dehydrogenase) 活性は上昇した。しかし、SOL (soleus) においては SDH (succinate dehydrogenase) 活性は 4 週間の電気刺激によりあまり変化をしなかった。PFK (6-phosphofructokinase) 活性は GC. (gastrocnemius) において除神経により著明に減少し、電気刺激を行ってもその傾向に大きな変化はなかった。しかし、SOL (soleus) において電気刺激後の PFK (6-phosphofructokinase) 活性は、除神経を行っても 25 % 低下するのみであった。つまり、電氣的刺激を骨格筋に加えると、除神経の有無にかかわらず酸化能力は上昇し、骨格筋のエネルギー使用効率は上がる。しかし、解糖系の酵素活性については一定の結果が得られなかった。さらに Maggie らの詳細な報告によると、ウサギの T.A. (tibialis anterior) における 8 週間の電気刺激により、LDH (lactate dehydrogenase)、FBPase (fructose biphosphatase) の酵素活性の低下と MDH (malate dehydrogenase)、citrate synthase、GPT (alanine transaminase) の酵素活性の上昇が観察された。LDH (lactate dehydrogenase) と FBPase (fructose biphosphatase) はコントロールの SOL (soleus) と同程度まで低下するが、MDH (malate dehydrogenase) と citrate synthase はコントロールの SOL (soleus) の 4 倍まで上昇する。また、GPT (glutamate pyruvate transaminase) の酵素活性は、コントロールの SOL (soleus) とほぼ同程度までしか上昇しないとも報告している。ミトコンドリアにおける酸化的磷酸化能力は、長期の電気刺激により、遅筋のそれをはるかに上回

るまでに強化された。一方、GPT (glutamate pyruvate transaminase) の酵素活性の上昇は、グルコース-アラニン回路を經由して、解糖系の代謝産物である乳酸の排出を促すといわれている [Katz, A., et al., 1986, Snell, K., et al., 1985]。つまり、乳酸の排出を促すことにより、組織内での pH の低下を防止し、酸素の供給が十分でないときでも骨格筋の疲労減少を改善する方向に働くと考えられる [Mole, P.A., et al., 1973]。

骨格筋に長期の連続的電気刺激を行うと、その骨格筋に発現してくる蛋白質そのものが変化することが知られている。Pette らはウサギの速筋である T.A. (tibialis anterior) を 10 Hz で連続的に刺激し、ミオシン L 鎖と収縮特性の変化を報告している [Pette, D., et al., 1976]。彼らの報告によると、62 日間の連続的電気刺激で、もともと速筋線維のみで構成されている T.A. (tibialis anterior) 中に発現していた速筋型ミオシン L 鎖 Lf3 が消失し、遅筋型ミオシン L 鎖である Ls1 と Ls2 が出現し、また、収縮特性については、最大発生張力に達するまでの時間が 2 倍に延長した。Seedorf らのより詳細な検討によると、電気刺激によるミオシン L 鎖の変換は、10 Hz の連続的刺激においては、60 から 100 日の間に起こることが示された [Seedorf, K., et al., 1983]。Brown らによる同様な報告によると、遅筋型ミオシン L 鎖の発現はもう少し早く、約 4 週間後には出現し始めている [Brown, W.E., et al., 1983]。その他の骨格筋構造蛋白については、Roy らが、トロポミオシンサブユニットについて報告している [Roy, R.K., et al., 1979]。彼らの報告によるとトロポミオシンは α 、 β 、二つのサブユニットから構成されている。10 Hz、3 週間の連続的電気刺激で、 α 、 β 、二つのサブユニットの比が 80:20 から 55:45 に変化した。しかし、骨格筋筋線維のミオシン ATPase 活性は、おもにミオシン H 鎖のアイソフォームと相関し、ミオシン L 鎖のアイソフォームとはあまり関係がないとされている [Starton, R.S., et al., 1986]。また、Billeter らは人間の遅筋線維に特異的に発現しているのは遅筋型ミオシン H 鎖であり、ミオシン L 鎖についてみるとあらゆるアイソフ

ォームが発現していることを報告している [Billeter, R., et al., 1981]。また、Obinata らの鶏を使用した報告では、速筋では速筋型ミオシン L 鎖のみ発現し、遅筋では遅筋型ミオシン L 鎖のみ発現しているとしている [Obinata, T., et al., 1979]。このようにミオシンアイソフォームと骨格筋筋線維タイプ、ひいては骨格筋の収縮特性との関係はいまだはっきりしないが、遅筋型ミオシンアイソフォームが発現するという事は、骨格筋の耐疲労性を高める可能性があることには間違いなく、今後この分野でのより詳細な研究の発展が待たれる。

応用的な研究では、Acker らが 1 年間連続的に横隔膜を刺激した場合の変化を報告している [Acker, M.A., et al., 1987a]。彼らは組織化学的検討、ミオシン L 鎖アイソフォームについての検討、解糖系ならびに酸化的磷酸化酵素についての検討、いずれについても短期間の電気刺激による検討と同様な結果を得ている。さらに、長期電気刺激による骨格筋の損傷については、組織学的に検討してまったく認められなかったとしている。骨格筋を利用した補助循環システムは長期の使用を目的に開発されてきており、装置装着後も、心拍に同期して骨格筋は刺激され続ける。したがって長期の電気刺激による骨格筋の損傷が認められなかったということは、本システムの臨床応用を考える上で非常に重要な意味を持つと考えられる。

速筋と遅筋はその役割分担からおのずと異なった収縮弛緩特性を備えている。長期電気刺激が骨格筋の収縮弛緩特性に与える影響についての検討はあまり行われていない。とくに骨格筋の耐疲労性にどのような影響を与えているかについての検討は少ない。Pette らは 10 Hz、28 日間ウサギの T.A. (tibialis anterior) を電気的に刺激し、time to peak tension、time to 1/2 relax、twitch tension、tetanic tension を計測している [Pette, D., et al., 1973]。彼らの報告によると、28 日間の連続的電気刺激により、time to peak tension は約 1.7 倍に増加し、time to 1/2 relax、twitch tension も約 1.6 倍に増加した。twitch tension と tetanic tension も、やはり増加する傾向を見せた。耐

疲労性については、Kwong らが報告している [Kwong, W. H., et al., 1981]。彼らの報告によると、ラットの EDL (extensor digitorum longus) を 10 Hz の頻度で 16 から 41 日連続的に刺激した後、EDL (extensor digitorum longus) を 40 Hz の頻度でテタヌス刺激し、その発生張力を記録したところ、電気刺激した EDL (extensor digitorum longus) は速筋であるにもかかわらず、その発生張力はあまり低下しなかった。しかも電気刺激の期間が長いほどその効果は著明であった。しかし、わずか 2 分間の検討であり、長期にわたる耐疲労性については言及していない。Mannion らはビーグル犬による同様な検討を報告している [Mannion, J. D., et al., 1986a]。術前に 30 から 40 日電気刺激された広背筋は、30 分の連続刺激後も、初期発生張力の 80 % 以上の力を持続したが、電気刺激を行っていない広背筋は、50 % 程度の力しか発揮できなかった。したがって、30 分という短時間の連続刺激ではあるが、電気的コンディショニングは、骨格筋の耐疲労性を向上させることが実際に証明された。骨格筋を利用した補助循環システムを想定して、Leiner らは電気刺激を行った骨格筋の疲労現象について、より詳細な検討を加えている [Leiner, A. A., et al., 1988]。彼らは、骨格筋コンディショニングに専用の刺激装置を使用し、50 Hz で 125 msec パースト刺激を発生し、それを 1 分間に 60 から 120 回繰り返すという方法を取った。コンディショニングは 6 週間続けられた。コンディショニングした広背筋を 50 Hz、200 msec の電気刺激をいろいろな CPM (contractions per minute) で刺激し、発生張力を経時的に 48 時間記録した。75 CPM で刺激したときの発生張力と時間から計算した TTI (tension time index) は、コンディショニングした骨格筋においては、48 時間ほとんど低下しなかったが、コンディショニングしていない広背筋では初期値の半分以下に低下したと報告している。コンディショニングした広背筋においても、刺激頻度が上昇するほど発生張力の低下が著しく、120 CPM の刺激では、75 CPM の時と比較して 48 時間後の発生張力は、初期値の約半分であった。骨格筋を使用した補助循環システムの臨床応用に際し、

その駆動頻度は重要で、心拍数 75 以上の時は、2:1 もしくは 3:1 の駆動を考える必要がある。Nix らは、除神経した骨格筋に、長期電気刺激を行った場合の収縮特性の変化について検討を行っている [Nix, W. A., et al., 1985]。それによると、除神経された骨格筋においても、除神経されていない骨格筋と同様に、28 日間の連続的電気刺激により、収縮力は低下し耐疲労性が高まると報告されている。除神経と電気刺激の効果の検討は cardiomyoplasty においても重要である。広背筋を心筋に移植し、収縮力を得る cardiomyoplasty においては、広背筋が心臓より遠い位置に存在するので、フラップ状にしてその付着部を支点として広背筋を移動させるとき、どうしてもその取り回しに制限が生ずる。その上、細長いフラップでは末梢への血流の供給が十分ではない。そこでフリーフラップとして動静脈を切断して移植し、あとでその広背筋を栄養する動静脈を大動脈と右心房に縫合することが考えられてきた。この方法により、骨格筋のうち血流の良いところだけを、心臓の収縮力を高めるのに使用できる。しかし、このとき問題となるのは、フリーグラフトを作製するためには、支配神経を切断せねばならない。除神経された骨格筋が萎縮するという事は、以前よりよく知られた事実であり、それがフリーグラフト移植の最大の問題である。除神経された骨格筋の萎縮を連続的な電気刺激が防ぐことができるならば、フリーグラフトによる骨格筋の移植が可能となり、cardiomyoplasty の術式の自由度が飛躍的に増大する。今後この方面の精力的な研究が期待される。

電気刺激による骨格筋遅筋化の過程は、いったん決定された細胞の分化を、電気刺激という単純な後天的刺激で変化させうる系として注目され、細胞生物学的に種々の方法で検討されてきた。しかし、biomechanical cardiac assist device を構築する上で、その動力源として利用するための骨格筋コンディショニングとしてこの現象を考えた場合、その刺激頻度、刺激方法等には、まだ検討を要する課題は多い。以下にその問題点について検討する。

骨格筋コンディショニングの実施において、その期間の設定は重要な問題である。人間が対象である限り、準備期間は

短ければ短いほどよい。しかし、十分な耐疲労性を得るためには、骨格筋の遅筋化は完全に行わなければならない。そのためには、種々の刺激方法における骨格筋コンディショニングの経過を経時的に観察するとともに、骨格筋コンディショニングの経過を定量的に追える簡便な指標を得ることが重要であると考えられる。われわれの低頻度単発刺激 (2 Hz) による骨格筋コンディショニングの結果、イヌ広背筋は 2 週間で約 70 % 近くが遅筋化し、8 週間のコンディショニングにおいても結果に大きな変化がなかった。Mannion らも 40 日の骨格筋コンディショニングによる同様の結果を報告している [Mannion, J.D., et al., 1986a]。低頻度単発刺激では、骨格筋の遅筋化は以前に報告されているより早期に限界に達し、遅筋化の程度は完全ではないといえる。この結果は、骨格筋構造蛋白の一つであるミオシン L 鎖のアイソフォームの変換が 40 日以上かかることと矛盾する [Seedorf, K., et al., 1983, Brown, W.E., et al., 1983]。しかし、骨格筋の収縮特性を決定するミオシン ATPase はミオシン H 鎖上にある。しかもミオシン分子は H 鎖と L 鎖とでは代謝回転速度が違い、L 鎖の方が遅いことが知られている。この理由として、L 鎖の細胞内プールが存在し、ミオシンを構成しない L 鎖との交換が起こるために、見かけ上半減期が長くなるものと考えられている [Clark, W.A., et al., 1981]。ところが一方、代謝面について考えると、エネルギー生産に重要な働きを示すミトコンドリア内の酵素活性は、骨格筋コンディショニングで著明に増強されるが、その時間的経過を追うと、酵素活性の上昇は約 3 週間で完了する [Maggie, M.Y.C., et al., 1986]。骨格筋の易疲労性の改善に、重要な要素であるエネルギー生産系の発達、ATPase 染色による従来の検討の結果より早期に変化するという事実は、われわれの今回の検討の結果を支持するものであり、骨格筋を利用した補助循環システムを構築する上で、事前の骨格筋コンディショニングの期間を短縮できる可能性を示している。

今回われわれは入手できる心臓用ペースメーカーの性能上の制約のため、2 Hz の低頻度単発刺激を用いて電氣的コン

ディショニングを行った。一方、遅筋を支配している神経のスパイク発射様式から考えると、50 Hz 程度の高頻度神経刺激が必要であると考えられる [Salmons, S., et al., 1976]。実際、Mannion らも 10 Hz の高頻度刺激では 100 % の広背筋の遅筋化を報告している [Mannion, J.D., et al., 1986a]。現在、長期にわたって慢性的神経刺激を行える埋め込み型の装置はない。この分野の研究発展のためには専用装置の開発が切望される。

Biomechanical cardiac assist device を構成する場合、骨格筋の広範囲な剥離が必要である。その操作は骨格筋の側副血行路を大部分遮断し、骨格筋は強い阻血状態に置かれる。その骨格筋をすぐに使用すると、血液供給が十分でないため、耐疲労性が乏しく、末梢部に阻血性壊死を生じる。この現象を防ぐために、Stephenson らは筋肉ポンプを作製してから実際に使用するまで一定の期間骨格筋を放置し、血流の改善を待つことを提唱している [Acker, M.A., et al., 1986, Mannion, J.D., et al., 1986b, Acker, M.A., et al., 1987b]。彼らはこの方法を vascular delay と呼んでいる。しかし、骨格筋を刺激せず、一定の期間放置することはコンディショニングの概念と対局に位置し、この vascular delay とコンディショニングを同時に行うことは矛盾している。遅筋線維であっても除神経を行ったり、ギプス固定をして運動を制限すると速筋線維に変化する [Carraro, U., et al., 1981]。つまり、骨格筋筋線維タイプは基本的にその支配神経の刺激頻度に依存するため [Salmons, et al., 1976]、骨格筋を電気刺激でコンディショニングして、骨格筋筋線維タイプを速筋型から遅筋型へ変換しておいても、筋肉ポンプを作製してから使用し始めるまで時間を置くと、遅筋型に変換されたはずの骨格筋筋線維タイプが放置されている期間中に、速筋型に戻ってしまう可能性がある。Acker らも vascular delay 後の骨格筋筋線維タイプの変化は確認していない。しかし、骨格筋に対する血液の供給の問題は、骨格筋を利用した補助循環システムを作製する上で非常に重要な問題であり、今後の検討を要すると考えられる。

ミトコンドリアは真核生物の細胞内において、代謝産物の

最終酸化を行い、ATP を合成する膜性の細胞小器官である。それはすべての動物細胞のみならず、酵母以上の高等な植物細胞にも、広く存在するエネルギー転換装置の典型である。細胞質内の分解産物であるピルビン酸をはじめ、アミノ酸や脂肪酸の代謝産物は、いずれもミトコンドリアのなかに入って、クエン酸回路 (TCA 回路) の酸化酵素群と、ミトコンドリア内膜に組み込まれた電子伝達系との共同的触媒作用により、最終的に炭酸ガスと水に分解される。その酸化過程、すなわち呼吸によって遊離するエネルギーは、ADP への無機リン酸の結合のエネルギーに転換され ATP が合成される (酸化的リン酸化、oxidative phosphorylation)。この ATP に蓄えられた化学的エネルギー、すなわち ATP が ADP と無機リン酸に分解するとき遊離する自由エネルギーが、ほとんど全ての生命現象の原動力となるのである。骨格筋は ATP の化学エネルギーを使用して、機械的仕事を行っている。骨格筋が機械的仕事を続けるには、ミトコンドリアによるエネルギー供給が常に十分維持されていることが必要不可欠である。

以上のようにミトコンドリアは筋肉の好氣的エネルギー生産を行っている。したがって、持続的な活動を行う遅筋繊維には、常に大量の ATP を供給する必要があり、速筋繊維に比べて、より多くのミトコンドリアが存在する [埜中征哉、1987]。

骨格筋と心筋はミトコンドリアの含量が異なっている。骨格筋においてはミトコンドリアの総量は細胞の 2 から 5 % を占めるに過ぎないが、心筋細胞においてはその値は 30 % にも及ぶ [Adams, R.J., et al., 1980]。この大量のミトコンドリアが、心筋の持続的な収縮に要するエネルギー生産を支えていると考えられる。

Gollnick らは、生理的な運動によるミトコンドリア面積比の増加を報告している [Gollnick, P.D., et al., 1969]。彼らはウサギを使用して、間欠的な運動を 10 週間行わせたところ、単位面積あたりのミトコンドリアの数が増えたことを認めた。スポーツ選手における観察でも、運動によるミトコンドリアの面積比の増加が報告されている [Bylund, A.C.,

et al., 1977]。

骨格筋を電気刺激することによるミトコンドリアの数の増加は、Salmons らによって報告されている [Salmons, S., et al., 1978]。しかし、ミトコンドリアは形態的に複雑な形をしており、2 次元的な観察ではその正確な数を判定するのは困難であると考えられる。そこで Eisenberg らは組織の連続切片を使用して、ミトコンドリアを 3 次元的に解析し、その電気刺激による変化を観察した [Eisenberg, B.R., et al., 1981]。彼らはウサギの T.A. (tibialis anterior) を、10 Hz の頻度で連続的に 1 から 24 週間電気刺激した。その結果、単位体積あたりのミトコンドリアの volume は 7 週間までは増加し続け、遅筋である SOL (soleus) の値の 5 倍以上になると報告している。しかしそれ以後は、また減少し、24 週間後には、T.A. (tibialis anterior) のコントロール値の 2 倍程度に落ち着く。この現象はわれわれの実験結果をも説明すると考えられる。すなわち、電気刺激により早期にはミトコンドリアの体積のみが増加し、2 週間目以降には体積は減少するが、数量が増加していくと考えられる。

Eisenberg らは、電気刺激による T-system と Z-band の変化についても報告している [Eisenberg, B.R., et al., 1981]。それによると、速筋である T.A. (tibialis anterior) に電気刺激によるコンディショニングを行うと、

2 週間で T-system の密度が低下し、遅筋である SOL (soleus) のレベルに至った。また、T.A. (tibialis anterior) の Z-band の幅は、同様な電氣的コンディショニングで増加し、やはり 2 週間で SOL (soleus) のレベルに至ったという。これらの変化は、おもに収縮速度や弛緩速度の変化に影響を与えていると考えられる [Page, S.G., 1965]。

第6章 骨格筋を遅筋化する方法としての水泳トレーニング法の検討

6.1. 実験の目的

現在骨格筋の遅筋化は、おもに骨格筋に対する慢性的電気刺激により行われているが、骨格筋を遅筋化する方法はそれのみではない。理論的には、神経が骨格筋を刺激するスパイクパターンが遅筋タイプであればよく、持続的な運動でも、骨格筋の筋線維タイプは変化するはずである。しかし、スポーツ選手における検討においては、1日3時間程度のトレーニングでは骨格筋筋線維タイプは変化しないことが知られている[Gollnick, P.D., et al., 1973]。ヒトにおける検討で、これ以上運動負荷量を増加させることは事実上不可能であり、したがって、運動の種類と強度が筋線維タイプに及ぼす影響については不明な点が多い。今回、非常に運動負荷量が大きいと考えられる水泳トレーニングをラットで行い、骨格筋の筋線維タイプが変換されるか否かを複屈折法を用いて評価した。

6.2. 対象と方法

Wistar系ラット12匹を用いて実験を行った。25週齢のWistar系ラット6匹を運動群(conditioned muscle)として、17週間、35℃の温水中で、水泳トレーニングを行った。水泳トレーニングの頻度は1日1時間、1週6日間とした。17週間の水泳トレーニング終了後屠殺解剖し、代表的速筋である長指伸筋(EDL)と代表的遅筋であるヒラメ筋(SOL)より検体を採取した。また、同じ週齢から水泳トレーニングを行わずに飼育した6匹を安静対象群とし、同様に屠殺解剖し、長指伸筋(EDL)とヒラメ筋(SOL)より検体を採取した。

検体は水泳トレーニングした骨格筋から得たものを conditioned muscle (以下 CM 群と略す)、水泳トレーニングしていない骨格筋から得たものを unconditioned muscle (以下 UCM 群と略す)とした。

循環系に強い負荷のかかる水泳トレーニングにおいて、その効果の指標として、心拍数、血圧、心室重量を測定した。心拍数、血圧は非観血的にラットの尾動脈よりテールカフ法を用いて測定した(理研開発、PS-100)。心室重量は、検体採取時に同時に心臓を摘出し、右室、左室ならびに心房の湿重量を計測し、それを体重1000gあたりに換算して表わした。

電気的コンディショニングの実験と同様の方法で複屈折法による検討を行った。

6.3. 結果

長期水泳トレーニングによる血行動態の変化を表1に示す。血圧は水泳トレーニングを行った群は 110 ± 5.6 mmHgであり、水泳トレーニングを行わなかった群は 117 ± 5.6 mmHgであった。ラットの血圧は17週にわたる水泳トレーニングにより低下しなかった。心拍数は水泳トレーニングを行った群は 335 ± 40 beats/minであり、水泳トレーニングを行わなかった群は 394 ± 43 beats/minであった。ラットの心拍数は17週にわたる水泳トレーニングにより有意に低下した($p < 0.05$)。

長期水泳トレーニングによる心筋重量の変化を表2に示す。各心室の重量は、体重あたりに標準化した数値で表わした。右心室の重量は長期水泳トレーニングを行った群においては 0.48 ± 0.03 1000・g/BWであり、長期水泳トレーニングを行わなかった群では 0.47 ± 0.05 1000・g/BWであった。17週にわたる長期水泳トレーニングは右心室の重量を変化させなかった。左心室の重量は長期水泳トレーニングを行った群においては 2.01 ± 0.13 1000・g/BWであり、長期水泳トレーニングを行わなかった群では 1.75 ± 0.16 1000・g/BWで

あった。17 週にわたる長期水泳トレーニングは左心室の重量を有意に増加させた($p < 0.05$)。

長期水泳トレーニングにおける複屈折法による検討の結果を図 16、17 に示す。速筋群 (EDL) では、長期水泳トレーニングを行った群において行差の差は 10 ± 3.0 nm であり、長期水泳トレーニングを行わなかった群では 11 ± 1.7 nm であった。遅筋群 (SOL) では、長期水泳トレーニングを行った群において行差の差は 6.3 ± 1.2 nm であり、長期水泳トレーニングを行わなかった群では 5.7 ± 0.6 nm であった。速筋群においても、遅筋群 (SOL) においても長期水泳トレーニングにより ATP と Ca^{2+} 添加前後における行差の差の変化に有意な差は生じなかった。

6.4. 考察

遅筋化された骨格筋を短期間で得るためには、効率的な変換方法とその正確な評価法が必要不可欠であると考えられる。われわれは、全身的な運動である長期水泳トレーニングの骨格筋遅筋化に及ぼす効果を複屈折法を使用して評価した。心筋重量と血行動態のデータから、17 週にわたる長期水泳トレーニングは、全身的に十分な負荷がかかることが証明された。しかし、速筋群においても遅筋群においても、複屈折法による計測値の変化は起こらず、水泳トレーニングは骨格筋筋タイプ変換に関しては有効な刺激ではないことが判明した。Henriksson らの同様な水泳トレーニングに関する報告においても、12 週間の水泳トレーニングでミトコンドリア内の酵素活性の上昇を観察したが、ATPase 染色による骨格筋筋線維タイプの変化はなかったとしている [Henriksson, J., et al., 1985]。ヒトの骨格筋生検による組織化学的検討では、長距離走の選手は訓練していない成人より type I fiber の比率が多いことが知られている [Saltin, B., et al., 1977]。しかし、運動負荷量の変化によって、骨格筋の筋線維タイプを後天的に変化させられうるかの検討においては、type II fiber から type I fiber

	BP (mmHg)	HR (beats/min.)
Swim-trained Rats (n=6)	110 ± 5.6 ↓	335 ± 40 ↓
Control Rats (n=6)	117 ± 5.6 ↓	394 ± 43 ↓

n.s. P < 0.05

表1 ラット水泳トレーニングの効果 (血行動態)

17 週間の水泳トレーニングにより、ラットの血圧は変化しなかったが、心拍数は有意に低下した($p < 0.05$)。

	Ventricular Muscle Weight (1000•g/B.W.)		
	RV	LV	RV+LV
Swim-trained Rats (n=6)	0.48±0.03 _↑	2.01±0.13 _↑	2.48±0.13 _↑
Control Rats (n=6)	0.47±0.05 _↓	1.75±0.16 _↓	2.22±0.02 _↓
	n.s.	P<0.05	P<0.05

表2 ラット水泳トレーニングの効果 (心室重量)

17 週間の水泳トレーニングにより、ラットの体重あたりの右心室湿重量は変化しなかったが、左心室湿重量は有意に増加した(p<0.05)。また、ラットの体重あたりの両心室湿重量に関しても 17 週間の水泳トレーニングにより有意に増加した。

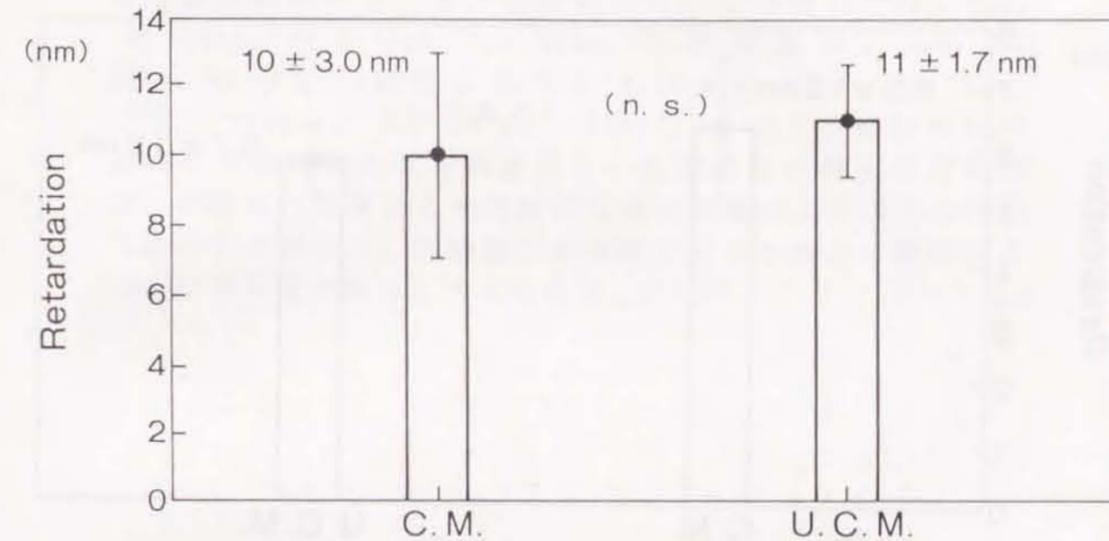


図 16 ラット水泳トレーニングにおける複屈折法による検討 (EDL)

長期水泳トレーニングによるコンディショニングの、ラット長指伸筋 (EDL) における効果の、複屈折法による検討の結果を示す。14 週間の長期水泳トレーニングによりラット長指伸筋 (EDL) の反応液添加前後の行差の差に有意な変化は存在しなかった。

U.C.M. : unconditioned muscle, C.M. : conditioned muscle.

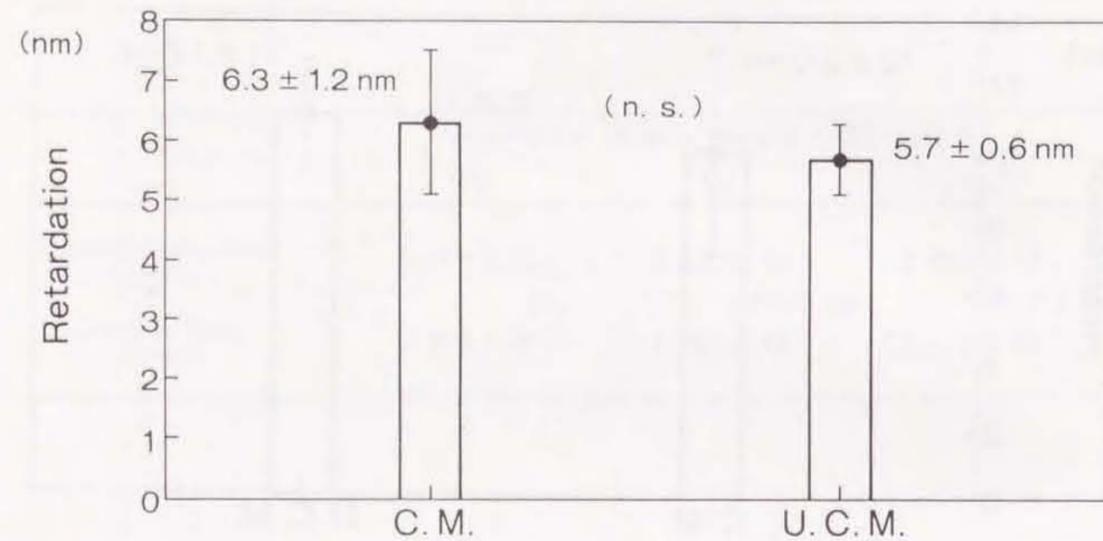


図 17 ラット水泳トレーニングにおける複屈折法による検討 (SOL)

長期水泳トレーニングによるコンディショニングの、ラット長指伸筋 (SOL) における効果の、複屈折法による検討の結果を示す。14 週間の長期水泳トレーニングによりラット長指伸筋 (SOL) の反応液添加前後の行差の差に有意な変化は存在しなかった。

U. C. M. : unconditioned muscle, C. M. : conditioned muscle.

への変換は起こらないことが示されている [Gollnick, P. D., et al., 1973]。一卵性双生児において、骨格筋の筋線維タイプの比率が似通っていることも、上記の仮説を支持するものと考えられていた [Komi, P. V., et al., 1977]。しかし、骨格筋筋線維サブタイプの変化についての検討では、type IIB fiber から type IIA fiber への変換や、type IIC fiber の増加が観察されている [Green, H. J., et al., 1979, Schantz, P., et al., 1982]。これらの報告やわれわれの実験結果から考察すると、生理的な条件下の運動では、神経のつなぎ替えや連続的な電気刺激のような非生理的な条件下と異なり、骨格筋の筋線維タイプを大きく変換することは不可能であると考えられる。

第7章 ヒトにおける骨格筋長期電気刺激の1例

ヒトにおいて電氣的刺激がミトコンドリアの数と大きさに及ぼす影響に関し興味ある臨床例を経験した。患者は79歳男性で、心臓ペースメーカー植え込み術後、植え込み側の大胸筋がペースメーカー本体のシールドの破損により、心拍数と同頻度の収縮を繰り返すようになったが、約5年間放置していた。ジェネレーター交換術を行った際、本人と家族の承諾のもとに、被刺激側およびその対側の大胸筋生検を行った。検体は複屈折法による検討を行うため、直ちに液体窒素で凍結、また、一部は電子顕微鏡による観察のため、glutaraldehydeで固定した。複屈折法による検討の結果、5年間の電気刺激により、ATPとCa²⁺添加による行差の差の変化は、7.2±0.6 nmから4.4±0.3 nmへ低下した。電子顕微鏡による観察では、ミトコンドリアの面積比は非刺激側において0.5±0.03%、刺激側において3.5±1.3%であり、数量は非刺激側において29±4、刺激側において131±50であった(図18、19、20、21)。電子顕微鏡写真による検討において、5年間刺激された骨格筋はとくに障害は受けていなかった。実験結果とあわせ考えると、単発パルス電気刺激による骨格筋コンディショニングでは、心筋と同程度のミトコンドリアの数量の増加には長時間を要すると考えられる。

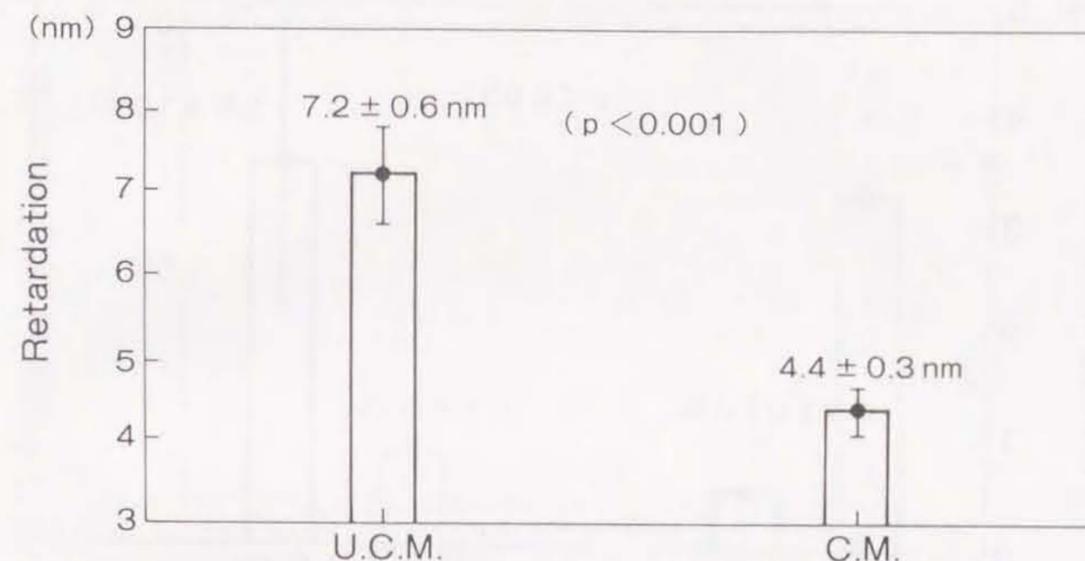


図18 長期電気刺激のヒト大胸筋に与える影響についての複屈折法による検討

5年間の電気刺激によって、反応液添加による行差の差の変化は7.2±0.6 nmから4.4±0.3 nmに低下した(p<0.001)。U.C.M. : unconditioned muscle, C.M. : conditioned muscle.

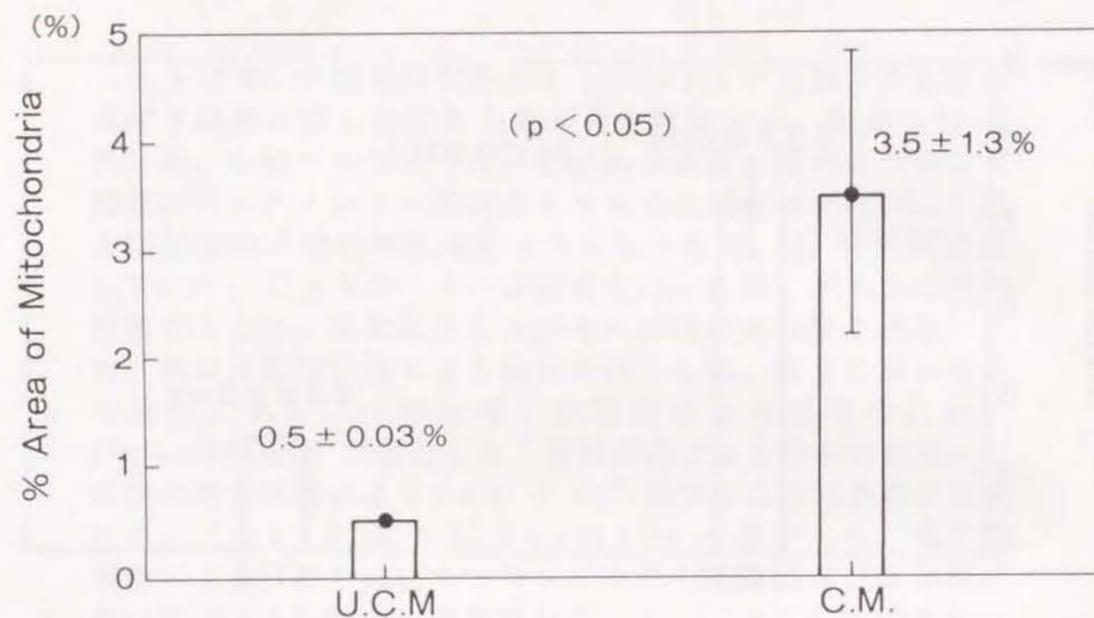


図 19 長期電気刺激のヒト大胸筋に与える影響についての電子顕微鏡による検討 (ミトコンドリア面積比)

5年間の電気刺激によって、ヒト大胸筋のミトコンドリアの面積比は $0.5 \pm 0.03\%$ から $3.5 \pm 1.3\%$ に増加した ($p < 0.05$)。

U.C.M. : unconditioned muscle, C.M. : conditioned muscle.

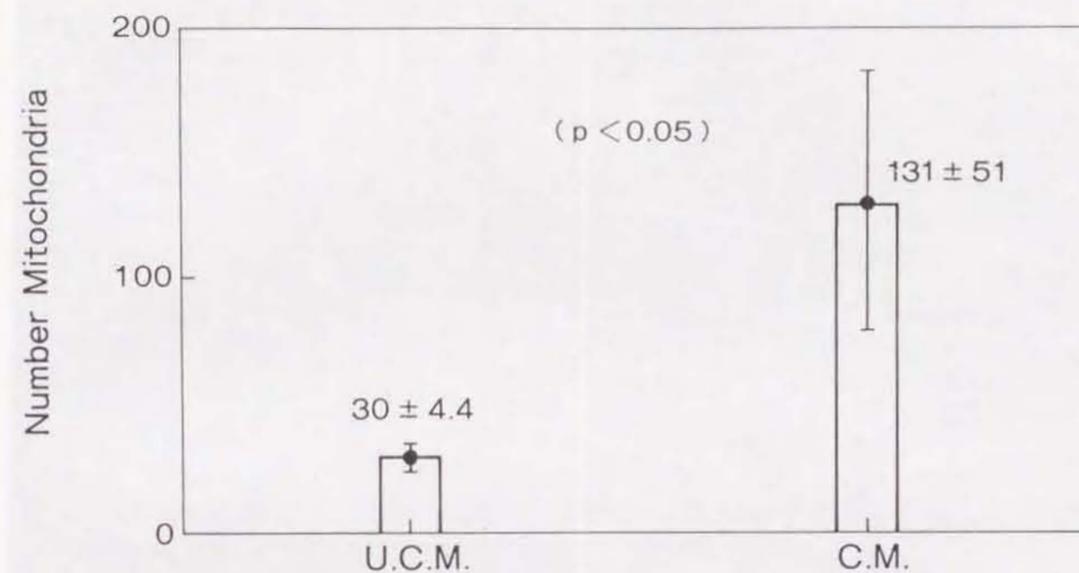


図 20 長期電気刺激のヒト大胸筋に与える影響についての電子顕微鏡による検討 (ミトコンドリア数)

5年間の電気刺激によって、ヒト大胸筋のミトコンドリアの数は 30 ± 4.4 から 131 ± 51 に増加した ($p < 0.05$)。

U.C.M. : unconditioned muscle, C.M. : conditioned muscle.

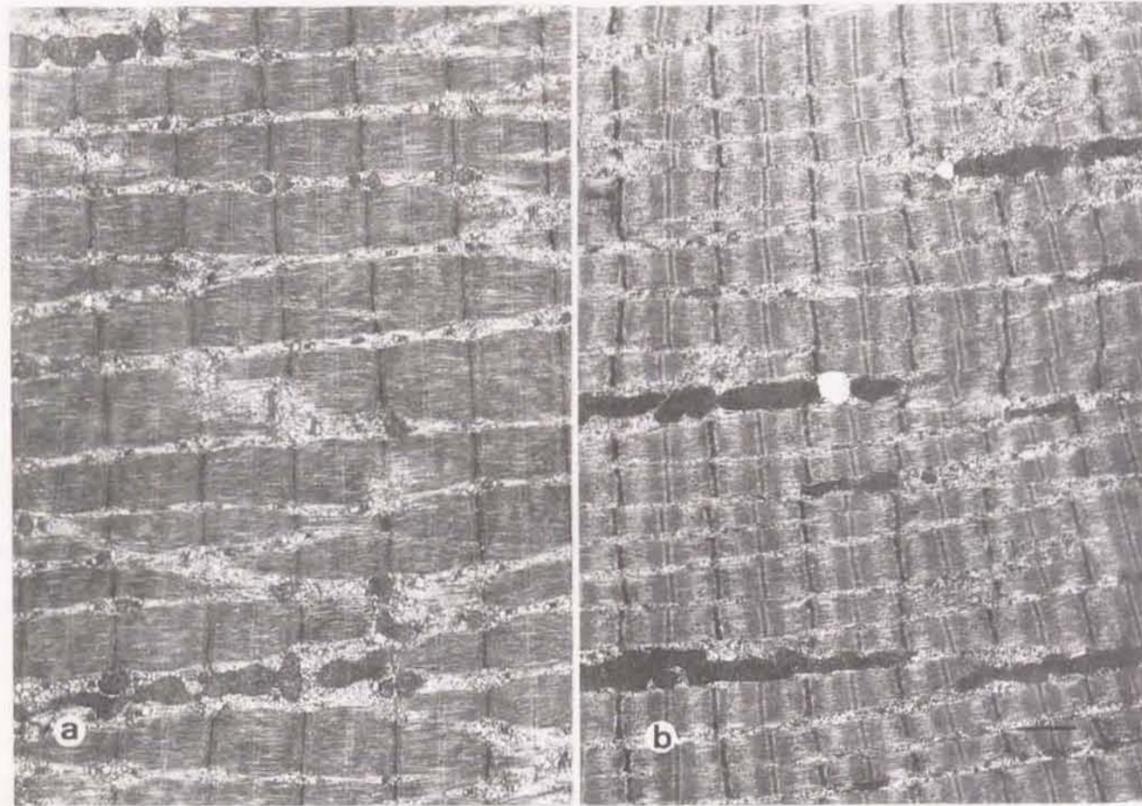


図 21 ヒト大胸筋電顕写真

5 年間電気刺激されたヒト大胸筋の電子顕微鏡写真を示す。
a. 電気刺激していない対側の大胸筋 b. 5 年間電気刺激された大胸筋
5 年間の電気刺激によりミトコンドリア数が著明に増加している。
右下の黒線は 1 μm を示す。

第 8 章 遅筋化骨格筋を用いた右心補助装置の有効性の検討

8.1. 補助循環システムとしての右心補助

骨格筋を利用した補助循環システムを作製するにあたり、骨格筋の易疲労性を考慮し、少ない負荷で大きな補助循環効果を得られる補助循環法の選択が重要となってくる。

左心系の補助循環に骨格筋を利用しようとする試みは、Kantrowitzらの実験以来、多数報告されている [Kantrowitz, A., et al., 1959, Neilson, I.R., et al., 1985, Mannion, J.D., et al., 1986, Chiu, R.C.J., et al., 1987, Acker, M.A., et al., 1987b, Mannion, J.D., et al., 1987]。一方、より少ない負荷で、より有効な補助循環効果が得られる、と考えられる右心系に関する研究は少ない [Macoviak, J.A., et al., 1981a, Macoviak, J.A., et al., 1981b, Macoviak, J.A., et al., 1987, 渡辺剛, 1989, Anderson, W.A., et al., 1988]。右心室も左心室もほぼ同量の血液を駆出している。しかし、肺血管抵抗は $205 \pm 51 \text{ dyne sec cm}^{-5}$ であり、全身血管抵抗 $1130 \pm 178 \text{ dyne sec cm}^{-5}$ に比べて格段に小さい [Yang, S.S., et al., 1988]。つまり同じ補助循環効果を出すにしても、右心系補助は左心系補助に比べて非常に少ない仕事量ですむということになる。疲労し易い骨格筋を動力源として利用する biomechanical cardiac assist device を臨床応用する場合、仕事量が少ないということは、極めて有利に働くと考えられる。したがって biomechanical cardiac assist device は現時点ではまず右心補助システムとして適応されるべきであると考えられる。

右心系の機能不全のため心拍出量が得られないと考えられる病態は少なからず存在する。一つは、肺動脈血管抵抗が高いために起こる病態で、P.P.H. (pure pulmonary hypertension)、Eisenmenger's complex、chronic pulmonary

embolism などが考えられる。もう一つは、右心室の収縮能力そのものが低下する場合で、右室梗塞、A.R.V.D. (arrhythmogenic right ventricular dysplasia)、右室形成不全をともなう複雑心奇形などが考えられる。上記のいずれの疾患も現在のところ根本的な治療法はない。病気の進行は比較的遅いため、末期の患者の苦悩は大きい。本システムを初めとした長期的右心補助法の開発が急務である。biomechanical cardiac assist device は右心室の収縮能力そのものが低下する場合のみならず、肺血管抵抗が軽度上昇する場合においても補助循環効果を発揮できる可能性がある。

8.2. 実験の目的

従来より肺動脈における counterpulsation は、IABP (Intra-aortic balloon pumping) に類似した方法で行われ、IPBP (Intra-pulmonary balloon pumping) として実験的に検討が行われてきた[Kralios, A. C., et al., 1970]。これらは、肺動脈に経皮的にバルーンを挿入し、拡張期にバルーンを膨らませることにより、肺血流を増加させる方法で、バルーンは体外の装置により空気駆動される。これら IPBP は体外駆動で、短期使用にしか耐えないため、臨床成績は不良であった。この欠点を改良する方法として、完全に体内に埋め込め、長期の使用が可能な右心補助循環装置が開発されれば、臨床上の意義は非常に大きいと考えられる。そこで、本実験の目的は、肺動脈における counterpulsation を骨格筋を利用して行う装置を試作し、これを BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) と名付け、その有効性を検討することにある(図 22)。

8.3. 対象と方法

雑種成犬 14 頭を用いて実験を行った。そのうち 6 頭に

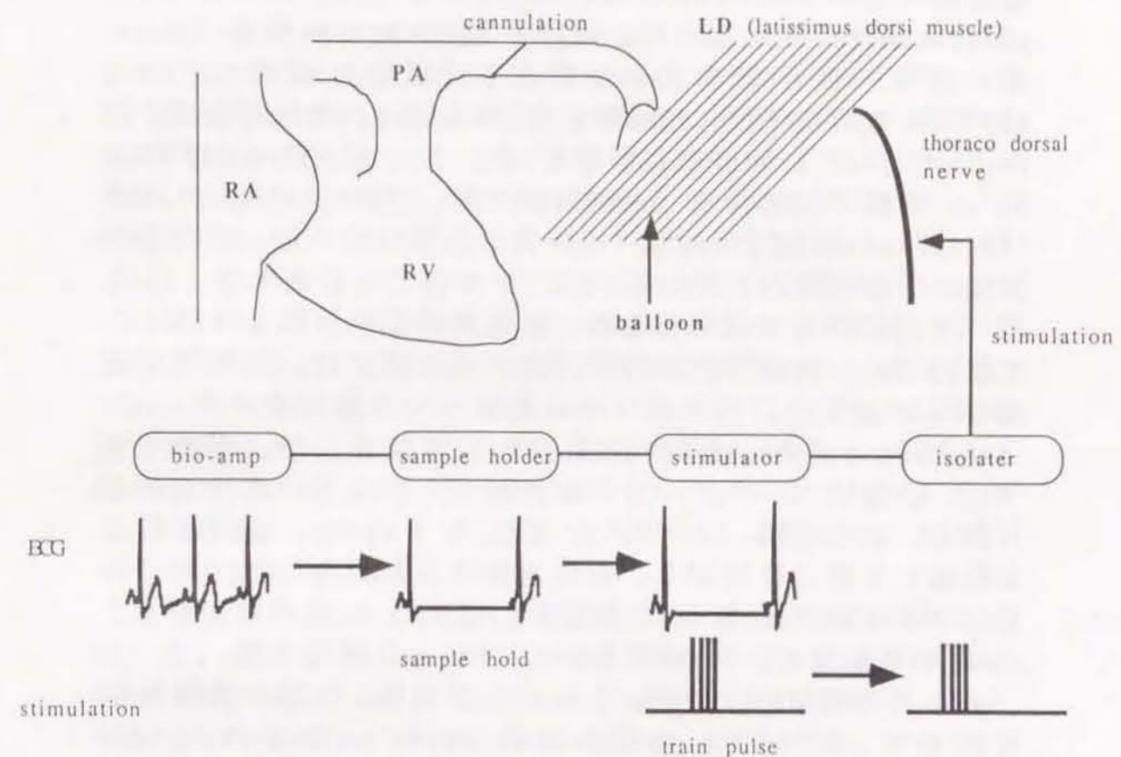


図 22 BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) 模式図

左開胸下に左肺動脈を結紮、その中枢側にポンプの流入出部をカニューレションした。ポンプ本体である balloon は広背筋(LD)と胸郭の間に設置した。血液は広背筋の収縮弛緩により、左肺動脈より流入、流出を繰り返すことになる。bio-amp を使用して十分増幅した肢誘導心電図は sample holder を通し QRS 部分だけを抽出したあと、count 回路を通し 2:1 の信号に変換した。その信号をトリガーとし、神経刺激装置で拡張期に当たる時期にトレインパルスが発生した。isolater を通したあとに、そのパルスで胸背神経(thoraco dorsal nerve)を直接刺激し、広背筋の収縮を得た。

電氣的コンディショニングを行った。

pentobarbital sodium (30 mg/kg) を静注し麻酔を行った後、気管内挿管して Harvard 人工呼吸器に接続し、room air による調節呼吸（一回換気量 20 ml/kg、換気回数 15 回/min）とした。前肢の皮静脈を 21G テフロン針にて穿刺確保し、乳酸リンゲル液（大塚製薬社製、ラクテック）の点滴（10 ml/kg/hr）を行った。実験犬を左側臥位にし、広背筋の腹側の下縁の走行に沿って約 5 cm の皮切を作製した。広背筋の下面に沿って剥離を進め、胸背神経を動静脈と一塊にして露出した。胸背神経が広背筋内に入る部位に、動静脈を損傷しないように、テンポラリー心室ペースメーカーリード（Medtronic 6500、medtronic 社製）を装着した。そのリードに、心臓用ペースメーカーを接続した。皮下にポケットを作製し、抗生物質（エポセリン筋注用 4 mg/kg、藤沢薬品工業社製）を筋注後閉創し、麻酔覚醒後長期飼育した。胸背神経に対する刺激は 2 Hz の頻度で、電圧 5 V、パルス幅 0.5 msec の単刺激で、24 時間連続して 4 ヶ月間行った。

4 ヶ月の電氣的コンディショニングの後、6 頭の実験犬を使用して、BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) を施行し、その血行動態を観察した。同様に 8 頭の電氣的にコンディショニングしていない実験犬において、BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) を施行し、同様に血行動態を観察した。

BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) の作製は以下のように行った。まず、pentobarbital sodium (30 mg/kg) を静注し麻酔を行った後、気管内挿管して Harvard 人工呼吸器に接続し、room air による調節呼吸（一回換気量 20 ml/kg、換気回数 15 回/min）とした。前肢の皮静脈を 21G テフロン針にて穿刺確保し、乳酸リンゲル液（大塚製薬社製、ラクテック）の点滴（10 ml/kg/hr）を行った。

左側臥位に体位をとった後、広背筋の腹側外縁に沿って約 10 cm の皮膚切開を行った。広背筋の一部を胸壁から剥離し、ポンプの挿入可能な空間を作成した。同じ広背筋の背側の胸椎付着部の一部を剥離し、腹側から剥離した空間とつ

なげ、ポンプを挿入する空間をトンネル状のものとした。このとき、側副血行路を損傷しないように広背筋の剥離はできるだけ最小限にとどめた。剥離した広背筋の下面で第 4 肋間で開胸し、心膜を露出切開し、胸壁に固定した。左肺動脈を肺門部まで剥離した。ヘパリンを 300 unit / kg 静注した後、左肺動脈を結紮し、その中枢より主肺動脈に向かって送脱血兼用のカニューラ（サーンズ社製静脈脱血カニューラ 36 F）を挿入した。ポンプには塩化ビニール製の balloon（容量 100 ml）を用いた。ポンプをカニューラに接続し、それを血液で満たした。ポンプを広背筋と胸郭の間に挿入し、カニューラが屈曲しないように注意し固定した。また、肺動脈主幹部に 5-0 ネスピレン（日本商事社製）を用いてタバコ縫合を行い、14 G のアーガイルメディカットカテーテルセット（日本シャーウッド社製）を用いて、圧測定用のカテーテルを肺動脈内に挿入した。

血行動態指標として、大動脈圧、肺動脈圧、を連続的に測定した。圧測定トランスデューサーは東洋ボールドウイン社製 MPU-0、5-290-0-III を用いた。各パラメーターは、日本電気三栄社製ポリグラフ 142-8 を用い、25 cm/sec の速度で感熱紙に 15 分毎に記録した。波形をデータレコーダー

（TEAC 社製 MR-30）にも同時に記録した。実験は骨格筋の収縮停止時まで、または 360 分継続して行い、途中で血行動態に大きな変化を起こしたものは除外した。

骨格筋を収縮させるための電気刺激は以下のように行った。まず、肢誘導心電図のうち最も QRS complex の電位が高い誘導を選び、モニターした。その信号を biophysical amplifier（日本光電社製 S-0470）で、十分増幅した後、その信号を sample holder（自作）に取り込み、QRS complex をトリガーとし、QRS complex の終から次の QRS complex の始まりの間の電気信号を cancel した。これは、ノイズとして混入する刺激パルスによるトリガーのエンドレスループ形成を防止するためである。cancel のタイミングは、各実験犬の心拍数、QRS complex の幅などにより適宜調整した。sample holder 内に count 回路を作製し、QRS complex のみになった心電図信号を 2 : 1 の頻度で electronic stimu-

lator (日本光電社製 SEN-3201) に転送した。electronic stimulator では sample holder より得られた信号をトリガーとして、肺動脈圧の拡張期に一致して発生させたパルス出力を isolater (日本光電社製 SS-201J) に送り、広背筋に電気刺激を与えた。刺激は電圧 10 V、pulse 幅 5 msec、interval 5 msec、の矩形波で 10 回の連続刺激を行った。刺激のタイミングの調整は実際の肺動脈圧を見ながら適宜行った。

感熱紙に記録されている肺動脈圧波形から、収縮期肺動脈圧 (PAP-s)、拡張期肺動脈圧 (PAP-d)、diastolic augmentation pressure (DAP) を読み取り記録した。時間経過による循環補助効果の変化を検討するため、diastolic augmentation の減衰比率を以下の式によって計算した。

$$PIDA (\%) = [DAP/PAP-s] / [DAP(0)/PAP-s(0)]$$

PIDA (percent initial diastolic augmentation)
DAP(0) diastolic augmentation pressure の初期値
PAP-s(0) 収縮期肺動脈圧の初期値

有意差検定には血行動態の変化に関しては paired student t-test により行い、diastolic augmentation の減衰に関しては unpaired student t-test により行った。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。

8.4. 結果

8.4.1. 血行動態の変化

実験の前後において、心拍数、大動脈圧、肺動脈圧に有意の変化は認められなかった (図 23)。

8.4.2. counterpulsation 圧 (肺動脈拡張期圧の変化)

diastolic augmentation の減衰率を PIDA (percent initial diastolic augmentation) として表わした。コンディショニングしていない骨格筋を使用した BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) においては、刺激開始後 15 分以内に、まったく骨格筋が収縮しなくなるものが存在した。さらに、PIDA (percent initial diastolic augmentation) も時間の経過とともに低下し、180 分後には初期値の $17 \pm 33\%$ と低値を示した。一方、コンディショニングした骨格筋を用いた BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) においては、6 頭全例 180 分後まで広背筋の収縮が維持され、360 分まで収縮を続けたものも存在した。PIDA (percent initial diastolic augmentation) も良く保たれ、180 分後においても初期値の $91 \pm 25\%$ を維持した。コンディショニング施行群と非施行群の間には、初期の 15 分値を除いて、いずれの時間においても統計的な有意差を認めなかった (図 24)。PA 圧の時間経過を図 25、26 に示す。

8.5. 考察

左心補助を目的とした counterpulsation である IABP (intra aortic balloon pumping) は、1968 年 Kantrowitz らにより臨床に導入され、現在では心筋梗塞や開心術後の心原性ショックに対する左室の有力な循環補助手段として、すでに確立された方法になった [Kantrowitz, A., et al., 1968]。しかし、開心術後の急性右心不全や、右室梗塞、さらには重症の両心不全における IABP の効果には限界がある。つまり、IABP は左室の収縮を補助することにより、間接的に右心機能を改善するが、その効果には限界があるということである。そこで右心系の直接的な機械補助である肺動脈における counterpulsation 法が実験的に検討されるよう

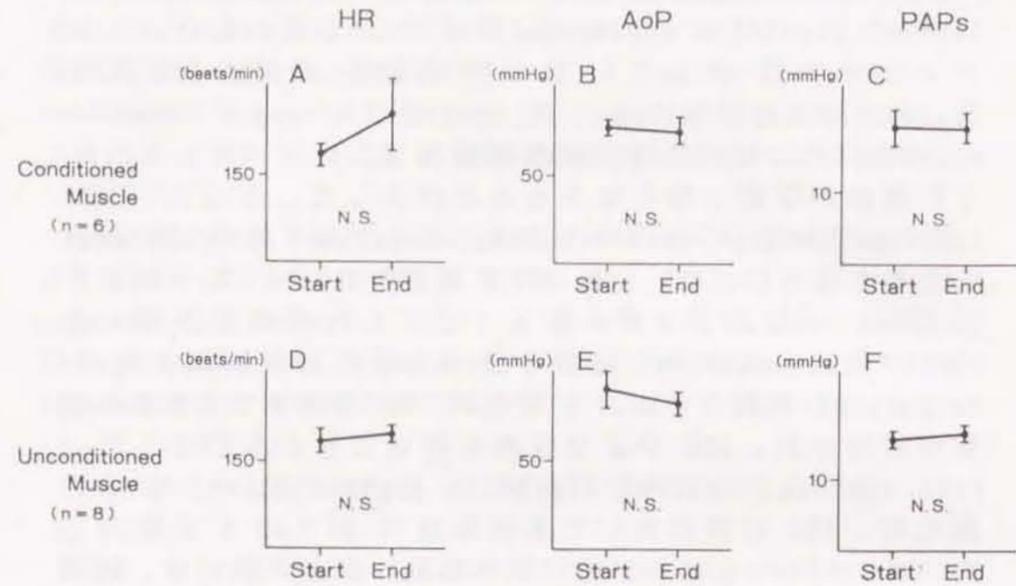


図 23 BEPAC 施行による血行動態の変化

BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) 施行開始直後と実験終了時における血行動態を示す。いずれのパラメーターについても BEPAC 施行開始直後と実験終了時には有意な差は存在しない。A. conditioned muscle を用いた BEPAC における心拍数の変化 B. conditioned muscle を用いた BEPAC における大動脈平均圧の変化 C. conditioned muscle を用いた BEPAC の肺動脈収縮期圧の変化 D. unconditioned muscle を用いた BEPAC における心拍数の変化 E. unconditioned muscle を用いた BEPAC における平均大動脈圧の変化 F. unconditioned muscle を用いた BEPAC における肺動脈収縮期圧の変化
HR: 心拍数 AoP: 平均大動脈圧 PAs: 肺動脈収縮期圧

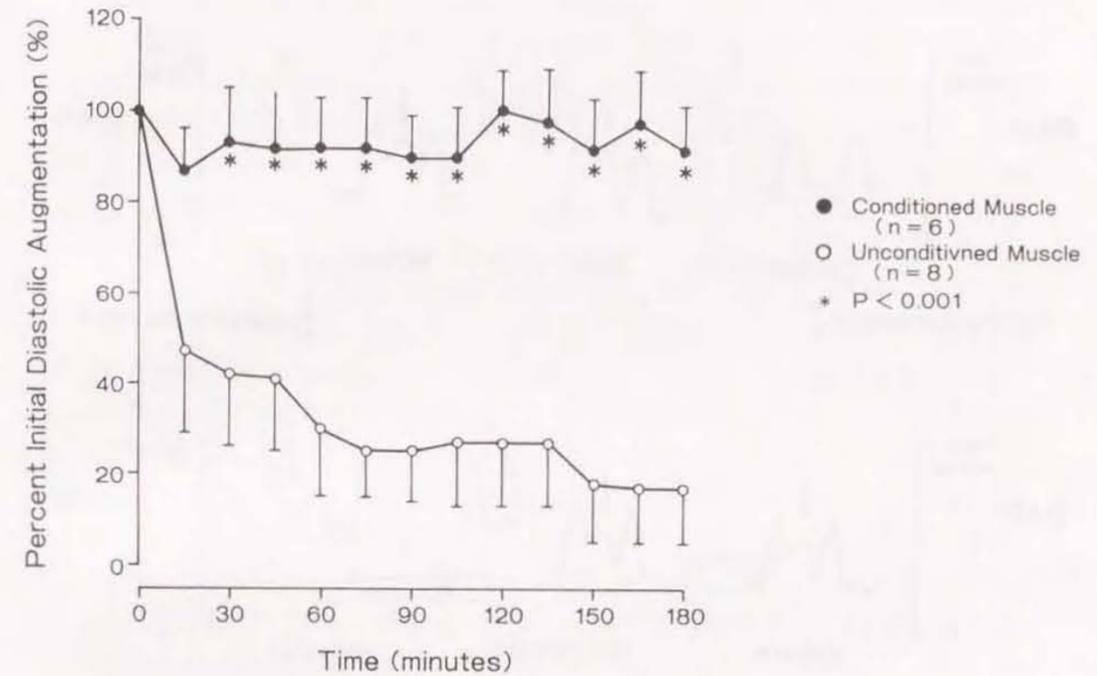


図 24 BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) 施行中の PIDA (percent initial diastolic augmentation) の変化

BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) 施行における肺動脈拡張期 counterpulsation 圧の初期値に対する減衰率 (PIDA: percent initial diastolic augmentation) の曲線を示す。12 週間の電氣的コンディショニングを行った群においては、3 時間後も初期値の $91 \pm 25\%$ 以上を維持できたが、電氣的コンディショニングを行っていない群は $17 \pm 33\%$ 以下の低値を示した。初期の 15 分値を除き両群間に有意差を認めた ($p < 0.001$)。

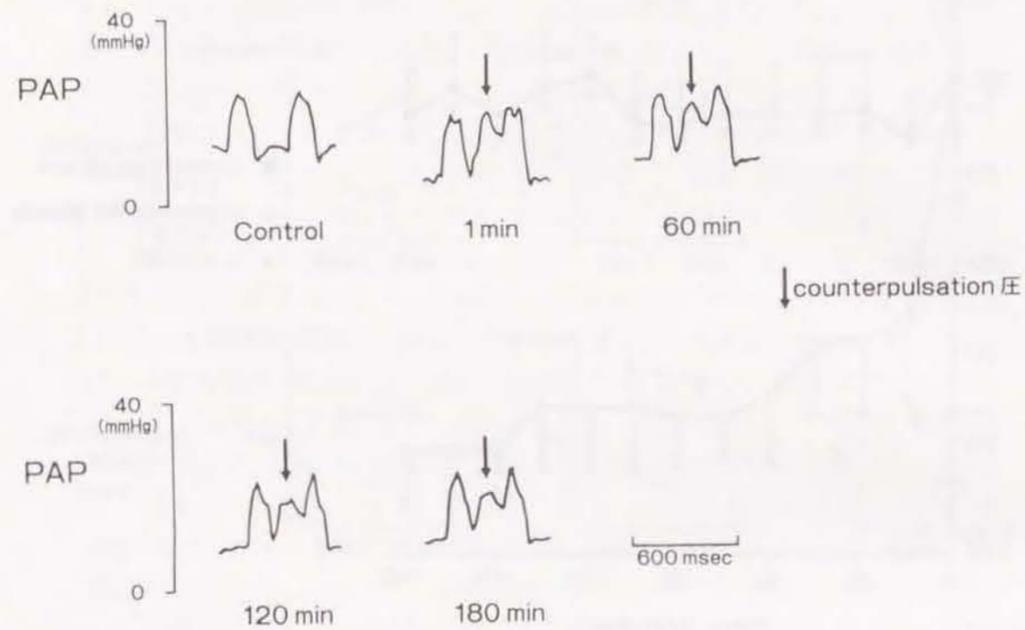


図 25 BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) 施行中の肺動脈圧変化 (conditioned muscle)

電氣的コンディショニングを行った広背筋で作製したBEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) 施行時の実際の PA 圧の変化を示す。血液ポンプは 2:1 で駆動している。BEPAC 施行により拡張期に counterpulsation 圧の発生を認める。counterpulsation 圧の減衰は BEPAC 施行開始 180 分後も軽度であった。

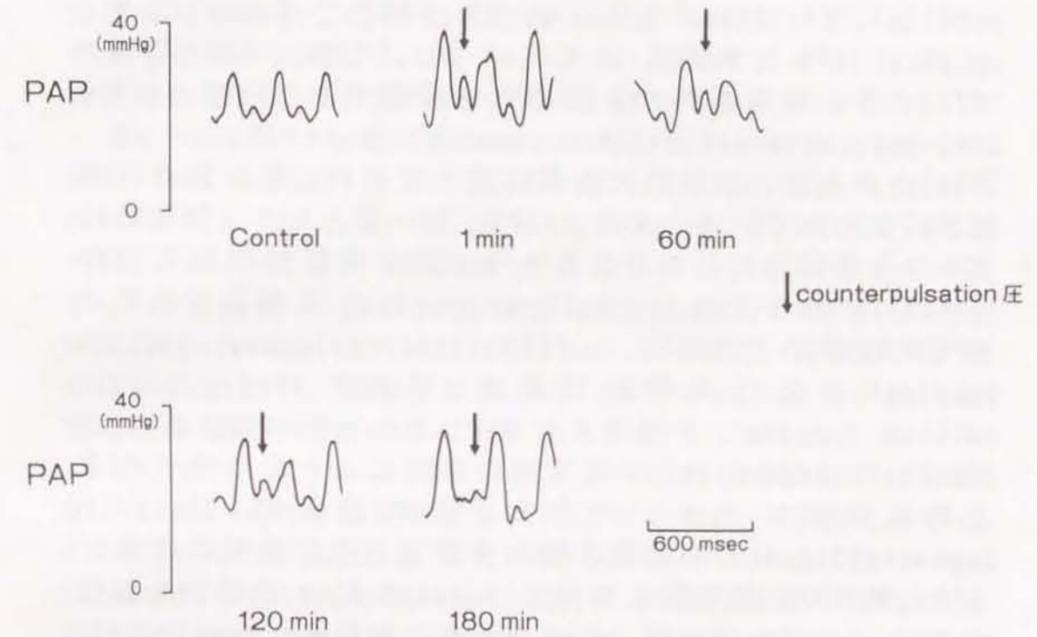


図 26 BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) 施行中の肺動脈圧変化 (unconditioned muscle)

電氣的コンディショニングを行わなかった広背筋を用いた BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) 施行時の PA 圧の変化を示す。血液ポンプは 2:1 で施行している。BEPAC 駆動により拡張期に counterpulsation 圧の発生を認める。しかし、counterpulsation 圧は時間の経過とともに減衰し、180 分後にはほとんど消失している。

になってきた。counterpulsation を作り出す方法としては血液ポンプによる以外に IABP と同じ発想で肺動脈内に balloon を設置する IPBP (intra pulmonary balloon pumping) [Kralios, A.C., et al., 1970, Opravil, M., et al., 1984, Moran, J.M., et al., 1984, 山口明満 1987] と、肺動脈外から肺動脈を圧迫する EPABP (extra pulmonary arterial balloon pumping) [Miya, J., et al., 1986]とがあり、実験的に各種病態下での右心補助効果の検討が行なわれている。また、IPBP の一種として、肺動脈にグラフトを縫着し、そのなかで balloon を駆動する G-IPBP (graft-intra pulmonary balloon pumping) も報告されている [田村栄稔 1987]。IPBP (intra pulmonary balloon pumping) の血行力学的効果は、IABP (intra aortic balloon pumping) と同じく、systolic unloading および diastolic augmentation の二つの作用によりもたらされると考えられている。ただし、この場合の diastolic augmentation は、冠循環の増加を介する左心系補助の場合と少し異なり、拡張期における forward flow の増加を意味する。G-IPBP (graft-intra aortic balloon pumping) に関する実験的検討によれば、肺動脈における counterpulsation は急性右心圧負荷 [Spotnitz, H.M., et al., 1971, Jett, G.K., et al., 1983]、右室梗塞 [塩野元美 1983, 山内茂生 1984]、三尖弁閉鎖不全 [田村栄稔 1981] などによる急性右心不全に対して有効であるとされている。また宮らは EPABP (extra pulmonary arterial balloon pumping) の急性および慢性肺高血圧症に対する効果を検討している [Miya, J., et al., 1986]。それによると、40 μ m の polymethylmethacrylate (PMMA) を使用して作成した実験的急性、慢性肺高血圧モデルに対し、EPABP (extra pulmonary arterial balloon pumping) を駆動し、急性肺高血圧において 22.4 ± 15.5 % の心拍出量の増加を、慢性肺高血圧において 31.6 ± 4.2 % の心拍出量の増加を認めたとしている。臨床応用については Moran らが初めて 1984 年に報告している [Moran, J.M., et al., 1984]。彼らは心筋梗塞患者と肺塞栓患者の 2 名に IPBP (intra pulmonary

balloon pumping) を適応した。2 名とも IABP (intra aortic balloon pumping) 単独では大動脈圧、心拍出量に低下をきたし、IPBP (intra pulmonary balloon pumping) との併用により人工心肺からの weaning に成功している。2 例とも最終的に死亡したものの、64 時間における IPBP 施行後も肉眼的には肺動脈内に損傷を認めなかったと報告している。G-IPBP (graft-intra aortic balloon pumping) に関しては外国で 5 例 [Miller, D.C., et al., 1980, Flege, J.B. Jr., et al., 1984, Symbas, P.N., et al., 1985]、本邦で 1 例の報告がある [北村信夫, 1984]。全例、人工心肺からの weaning には成功しており、IPBP (intra pulmonary balloon pumping) の有効性が実証されている。以上より、肺動脈における counterpulsation 法は有効な右心補助手段であることが明らかになってきた。

右心補助システムの開発の歴史と現状は以上の如くであるが、これらは補助循環装置を体外においての一時的使用を目的とした方法である。BEPAC (biomechanical extra pulmonary counterpulsation) は、これらの装置を体内に埋め込み、エネルギー源に骨格筋を用いることにより、長期の右心補助を目的としたものであるが、本実験の結果はその可能性を示唆するものと考えられた。しかし、より長期の耐疲労性を得るためには、今後の詳細な検討が必要である。

biomechanical cardiac assist device のエネルギー源は骨格筋の収縮力のみであるため、基本的には陰圧を発生できない。しかし、assist device は本来の循環系に付加する形で取り付けるため、血液が流入出する部分が存在する。粘度の高い液体である血液を比較的狭い流入出路を一定速度で移動させるにはそれなりの圧較差が必要となる。そこで、脱血部位が低圧系の心房である場合には必然的に device 内を陰圧にせざるえない。このことは、陰圧を発生できない biomechanical cardiac assist device を適応する上で、重要な問題となる。したがって、device への流入部分の血圧のより高い肺動脈を脱血部位とする設定が有利であると考えられる。

肺動脈は、大動脈と比べて前胸壁に近く位置し、長さも短

い。広背筋は背側の筋肉であり、肺動脈に直接縫着するために、胸郭の前方に移動させることは技術的に難しい。また肺動脈にグラフトを縫着し血液ポンプに接続する場合、肺動脈と胸郭のあいだに device をおくスペースを得ることは難しい。したがって臨床応用に際してはポンプを設置する場所は、胸郭内とせざるえない。その場合にはポンプと肺動脈までの距離が長くなり、流入出抵抗が増加すると考えられる。このことは効率的な循環補助を行うためには解決を要する問題であるといえる。

本実験では、開胸下に全身ヘパリン投与を行った。補助循環装置の血液接触面における抗血栓性は必須の条件である。BEPAC (biomechanical extra pulmonary artery counterpulsation) で用いられる様な単純な構造のポンプの場合には抗血栓性材料の使用が極めて有用である。骨格筋表面をそのまま血液接触面とする場合には、筋表面に血管内皮細胞を生着させ得る可能性がある。しかしながら、骨格筋グラフトの抗血栓性に関する問題についての詳しい検討は少なく、今後に残された課題であると考えられる。

biomechanical cardiac assist device の長期連続使用のためには、安定した骨格筋電気刺激の行える電極の開発は重要な問題である。筋肉刺激用の電極の開発は、主に心臓ペースメーカーの分野で精力的に行われてきた。現在のところ、心外膜電極においても、心内膜電極においても、ほぼ長期使用に問題のない電極が開発されている。しかし、骨格筋は一回の刺激では一回の単収縮しか起こさない。つまり、骨格筋を同期させて収縮させるにはその支配神経を刺激するか、または骨格筋そのものに広い接触面積を持つ電極を埋め込まなくてはならない。この点において、骨格筋刺激用の電極開発のためには、心臓ペースティング用の電極と異なった観点での研究が必要となると考えられる。

筋収縮を行わせるために神経刺激を行う場合、必要とする電気的エネルギーは筋直接刺激の場合より少ないことが知られている。神経刺激用電極が備えるべき電気的特性としては、神経走行方向に沿った電極間の electrical field gradient が十分高いことが必要とされる。これは、

electrical field gradient が高ければ必要とされる刺激電力が少なくすみ、神経組織に与えるダメージが小さいためである [Grandjean, P.A., et al., 1986]。また、神経刺激用電極の備えるべき機械的特性としては、神経への機械的損傷を最小限に抑えるために、小型軽量で、しかも素材が柔軟である必要がある。さらに、電極の固定も良好でなければならない。胸背神経は広背筋の下面を胸背動静脈伴走している。周囲には固定用の組織も少なく、外科的に縫着に際しては動静脈を損傷する危険性を常にはらんでいる。また確実に固定できなければ、長期の安定した電気刺激はおぼつかない。Mannion らは、神経の外周に巻つける形状の電極を開発して、この問題を解決している [Mannion, J.D., et al., 1986b]。しかし、この方法でも、神経の損傷を完全に防止できるわけではない。biomechanical cardiac assist device の臨床応用にあたっては、更に柔軟な素材の小型の電極の開発が重要であると考えられる。

神経刺激電極に比較して、骨格筋を直接刺激する電極の固定ははるかに容易である。しかし、大きな広背筋全体を刺激するためには、非常に大きな接触面積が必要となる。筋線維間の双極刺激では、慢性期において急激な刺激閾値の上昇を呈することが Glenn らによって報告されている [Glenn, W.W., et al., 1984]。臨床応用にあたっては、Grandjean らの報告しているように関電極としては screw-in タイプのものを胸背神経が広背筋に入る部位に固定し、wire タイプのものを不関電極として広背筋そのものに植え込むのが最も効果的であると考えられる [Grandjean, P.A., et al., 1986]。一方、心拍に同期させるために心臓に装着する sensing lead は、心臓ペースティング用の心外膜電極を用いることが可能である。

第9章 結論

機械的補助循環法におけるエネルギー源としての骨格筋の利用について検討し、以下の結論を得た。

- (1) ラット骨格筋において、複屈折法は骨格筋の優位な筋線維タイプを判別するのに有用であった。
- (2) 電気刺激を2週間ないし8週間連続して行う方法により、イヌ広背筋の有意な遅筋化を認め、2週間群と8週間群との間には有意な差を認めなかった。
- (3) ラット骨格筋において生理的運動である長期水泳トレーニングは骨格筋筋線維タイプ転換に有用な方法ではなかった。
- (4) 遅筋化したイヌ広背筋は右心補助ポンプの動力源として有効であった。

文献

国内の文献

伊藤良雄：心筋代謝，心肺機能の基礎と臨床(村尾誠編)．
真興交易(株)医書出版部，東京．p267-295，1972．

岡田理美，埜中征哉，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．

北村信夫，田村栄稔，山口明満，大滝正巳，沢谷修，美濃地忠彦，跡部正明：IABPの適応限界の拡大を狙って-IPBP(肺動脈内バルーンポンピング)法の効果-．循環器科．
16:554-556，1984．

塩野元美：急性右室梗塞に対する機械的補助循環法の効果と限界に関する研究：特に肺動脈バルーンポンピング法(PABP)の実験的検討．日胸外会誌．
31:1527-1536，1983．

杉晴夫：筋肉の収縮，人体機能生理学(杉晴夫編)．南行堂．東京．pp59-82，1985．

助川卓行：廃用性筋萎縮の病態．日本整形外科学会誌．
57:779-787，1983．

田村栄稔，北村信夫，田原士郎，中田誠介，美濃地忠彦，跡部正明，松本学：急性右心不全に対する肺動脈内バルーンポンピング法(IPBP)の有効性に関する実験的研究．胸部外科．
34:867-870，1981．

田村栄稔：急性右心不全に対する肺動脈内バルーンポン

ピング法の実験的検討. 日胸外会誌. 35:1682-1691, 1987.

松野直徒: 移植の臨床応用, 移植学-分子レベルから臓器レベルまで- (辻公美編). 文光堂. 東京. p100-105, 1985.

能勢之彦, 石川幹夫, 原崎弘章, 村林俊, Jacobs, G. B., Kambic, H. E., ルイス藤本, 奥孝彦, 那須通寛, 内田直樹, 榎本秀斗: 完全人工心臓 (TAH) 開発の現況. 人工臓器. 16:1595-1605, 1987.

埜中征哉: 臨床のための筋病理入門. 日本医事新報社. 東京. p22-27, 1987.

野々村禎昭: 心筋の微細構造, 心臓力学 (阿部裕監修). 朝倉書店. 東京. p5-8, 1982.

山内茂生: 急性右心不全に対する肺動脈バルーンパンピング法の検討. 日胸外会誌. 32:1-9, 1984.

山口明満, 北村信夫, 田村栄稔, 入江利明, 大滝正巳, 美濃地忠彦: 直接肺動脈内バルーンパンピング法 (Direct-IPBP) の実験的検討. 日胸外会誌. 35:458-462, 1987.

山中定二: 保存心の生存能の評価に関する研究-偏光顕微鏡による複屈折試験 (birefringence test) の有用性について-. 日外会誌. 89:1105-1113, 1988.

渡辺剛, 岩喬, 三崎拓郎, 向歩, 坪田誠, 大竹裕志: 骨格筋ポンプによる右心バイパスの基礎的研究. 日本外科学会誌. 90:1065-1071, 1989.

外国の文献

Absolon, K.B., Hunter, S.W., Quattlebeum, F.W.: A new technique for cardiac valve construction from autologous diaphragm. *Surgery* 46:1078-1083, 1959.

Acker, M.A., Hammond, R.L., Mannion, J.D., Salmons, S. and Stephenson, L.W.: An autologous biologic pump motor. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 92:733-746, 1986.

Acker, M.A., Mannion, J.D., Brown, W.E., Salmons, S., Henriksson, J., Bitto, T., Gale, D.R., Hammond, R. and Stephenson, L.W.: Canine diaphragm muscle after 1 yr of continuous electrical stimulation: its potential as a myocardial substitute. *Appl. J. Physiol.* 62:1264-1270, 1987a.

Acker, M.A., Anderson, W.A., Hammond, R.L., Chin, A.J., Buchanan, J.W., Cynthia, D.V.M., Morse, C., Kelly, A.M. and Stephenson, L.W.: Skeletal muscle ventricles in circulation, one to eleven weeks' experience. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 94:163-174, 1987b.

Acker, M., Anderson, W.A., Hammond, R.L., DiMeo, F. Jr., McCullum, J., Staum, M., Velchik, M., Brown, W.E., Gale, D., Salmons, S. and Stephenson, L.W.: Oxygen consumption of chronically stimulated skeletal muscle. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 94:702-709, 1987c.

Acker, M.A., Hammond, R.L., Mannion, J.D.,

-Biomechanical Cardiac Assist Device-

Salmons, S. and Stephenson, L.W.: Skeletal muscle as the potential power source for a cardiovascular pump: Assessment in vivo. *Science* 236:324-327, 1987d.

Adams, R.J. and Schwartz, A.S.: Comparative mechanisms for contraction of cardiac and skeletal muscle. *Chest* 78:123-139(suppl), 1980.

Anderson, W.A., Andersen, J.S., Bridges, C.R., Hammond, R.L., DiMeo, F., Frisch, E.E., Salmons, S. and Stephenson, L.W.: Skeletal muscle as a potential right heart assist or substitute. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 34:241-247, 1988.

Anderson, W.A., Andersen, J.S., Acker, M.A., Hammond, R.L., Chin, A.J., Douglas, P.S., Khalafalla, A.S., Salmons, S. and Stephenson, L.W.: Skeletal muscle grafts applied to the heart. A word of caution. *Circulation* 78(suppl):III 180-190, 1988.

Armstrong, R.B. and Laughlin, M.H.: Exercise blood flow patterns within and among rat muscles after training. *Am. J. Physiol.* 246:H59-H68, 1984.

Barcaly, J.: A delivery-independent blood flow effect on skeletal muscle fatigue. *J. Appl. Physiol.* 61:1084-1090, 1986.

Billeter, R., Heizmann, C.W., Howald, 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.

-Biomechanical Cardiac Assist Device-

Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U., et al.: Biological effects of cyclosporin A: a new lymphocytic agent. *Agents Actions* 6:468-475, 1976.

Brooke, M.H. and Kaiser, K.K.: Muscle fiber types: How many and what kind? *Arch. Neurol.* 23:369-379, 1970.

Brown, W.E., Salmons, S. and Whalen, R.G.: The sequential replacement of myosin subunit isoforms during muscle type transformation induced by long term electrical stimulation. *J. Biol. Chem.* 258:14686-14692, 1983.

Bull, C., Cooper, J. and Stark, J.: Cardioplegic protection of the child's heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 88:287-293, 1984.

Bylund, A.C., Bjuro, T., Cederblad, G., Holm, J., Lundholm, K., Sjostrom, M., Aengquist, K.A. and Schersten, T.: Physical training in man. Skeletal muscle metabolism in relation to muscle morphology and running ability. *Eur. J. Appl. Physiol.* 36:151-169, 1977.

Cankovic-Daracott, S., Braimbridge, M.V., Williams, B.T., Bitensky, L. and Chayen, J.: Myocardial preservation during aortic valve surgery: Assessment of five techniques by cellular chemical and biophysical methods. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 73:699-706, 1977.

Capo, L.A. and Sillau, A.H.: The effect of

-Biomechanical Cardiac Assist Device-

hyperthyroidism on capillarity and oxidative capacity in rat soleus and gastrocnemius muscles. *J. Physiol.* 342:1-14, 1982.

Carpentier, A. and Chachques, J. C.: Myocardial substitution with a stimulated skeletal muscle: First successful clinical case. *Lancet* 8440:1267, 1985.

Carraro, U., Catani, C., Libera, L.S., Vascon, M. and Zanella, G.: Differential distribution of tropomyosin subunits in fast and slow rat muscle and its changes in long-term denervated hemidiaphragm. *FEBS. Lett.* 128:233-236, 1981.

Caves, P.K., Stinson, E.B., Griep, R.B., Rider, A.K., Dong, E. Jr. and Shumway, N.E.: Results of 54 cardiac transplants. *Surgery* 74:307-314, 1973.

Chayen, J., Bitensky, L., Braimbridge, M.V. and Daracott-Cankovic, S.: Increased myosin orientation during muscle contraction: A measure of cardiac contractility. *Cell Bio. Func.* 3:101-114, 1985.

Chiu, R.C.J., Walsh, G.L., Dewar, M.L., De Simon, J.H., Khalafalla, A.S. and Ianuzzo, D.: Implantable extra-aortic balloon assist powered by transformed fatigue-resistant skeletal muscle. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 94:694-701, 1987.

Clark, W.A. and Zak, R.: Assessment of fractional rate of protein synthesis in cardiac muscle cultures after equilibrium labeling. *J. Biol.*

-Biomechanical Cardiac Assist Device-

Chem. 256:4863-4870, 1981.

Clark III, B. J., Acker, M.A., McCully, H.V., Subramanian, H.V., Hammond, R.L., Salmons, S., Chance, B. and Stephenson, L.W.: In vivo ³¹P-NMR spectroscopy of chronically stimulated canine skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 254:C258-C266, 1988.

Cooley, D.: Discussion of first human implantation of cardiac prosthesis for staged total replacement of the heart. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 15:252, 1969.

Cooper, J., Bull, S., Cankovic-Darracott, S. and Stark, J.: Cellular chemical indices of right ventricular protection in children. *Histochem. J.* 14:739-746, 1982.

Darracott-Cankovic, S., Wheeldon, D., Biol, C., Cory-Pearce, R., Wallwork, J. and English, T.A.H.: Biopsy assessment of fifty hearts during transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 93:95-102, 1987.

DeVries, W., Anderson, J., Joyce, L., Anderson, F., Hammond, E., Jarvik, R. and Kolff, W.: Clinical use of the total artificial heart. *N. Engl. J. Med.* 310:273-278, 1984.

Dillmann, W.H., Barrioux, A., Neeley, W.E. and Contreras, P.: Influence of thyroid hormone on the in vitro translation activity of specific mRNAs in the rat heart. *J. Biol. Chem.* 258:7738-7745, 1983.

Doris, L.L.J., Lennon, L.F., Kochan, R.G., Nagle, F.J. and Lardy, H.A.: Enzymatic adaptation to physical training under β -blockade in the rat: Evidence of a β_2 -Adrenergic Mechanism in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 78:771-778, 1986.

Eberstein, A. and Rosenfalck, A.: Birefringence of isolated muscle fibers in twitch and tetanus. *Acta. Physiol. Scand.* 57:114-166, 1963.

Eisenberg, B.R. and Salmons, S.: The recognition of subcellular structure on muscle undergoing fast-to-slow type transformation: A stereological study. *Cell Tissue Res.* 220:449-471, 1981.

Flege, J.B. Jr., Wright C.B. and Reisinger, T.J.: Successful balloon counterpulsation for right ventricular failure. *Ann. Thorac. Surg.* 37:167-168, 1984.

Fujimoto, L., Smith, W., Butler, K., Kiraly, R., Morimoto, T., Harasaki, H., Moise, J. and Nose, Y.: An LVAS with practical clinical features. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 30:124-128, 1984.

Gaines, W.E., Goldberg, N.H., Mergner, W.J., et al: Reconstruction of the right ventricular outflow tract with a vascularized free flap of striated muscle. *Surg. Forum* 36:250-255, 1985.

Glenn, W.W., Hogan, J.F., Loke, J.O., Ciesielski, T.E., Phelps, M.L. and Rowedder, R.: Ventriatory support by pacing of the conditioned

diaphragm in quadriplegia. *N. Engl. J. Med.* 310:1150-1155, 1984.

Gollnick, P.D. and King, D.W.: Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 216:1502-1509, 1969.

Gollnick, P.D., Armstrong, R.B., Saltin, B., Saubert IV, C.W., Sembrowich, W.L. and Shepherd, R.E.: Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 34:107-111, 1973.

Grandjean, P.A., Herpers, L., Smits, K., Bourgeois, I., Chachques, J.C. and Carpentier, A.: Implantable electronics and leads for muscular cardiac assistance, in "Biomechanical Cardiac Assist-Cardiomyoplasty and muscle powered devices." by Chiu, R.C.J. (ed), Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, p103-114, 1986.

Gray, S.D., McDonagh, P.F. and Gore, R.W.: Comparison of functional and total capillary densities in fast and slow muscles of the chicken. *Pflugers Arch.* 397:209-213, 1983.

Green, H.J., Thompson, J.A., Daub, W.D., Houston, M.E. and Ranney, D.A.: Fiber composition, fiber size and enzyme activities in vastus lateralis of elite athletes involved in high intensity exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 41:109-117, 1979.

Green, H.J., Reichmann, H. and Pette, D.: Fibre type specific transformation in the enzyme

activity pattern of rat vastus lateralis muscle by prolonged endurance training. *Pflugers Arch.* 399:216-222, 1983.

Henriksson, A., Galbo, H. and Blomstrand, E.: Role of the motor nerve in activity-induced enzymatic adaptation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 242:C272-C277, 1982.

Henriksson, J., Svedenhag, J., Richter, E.A., Christensen, N.J. and Galbo, H.: Skeletal muscle and hormonal adaptation to physical training in the rat: role of the sympatho-adrenal system. *Acta. physiol. Scand.* 123:127-138, 1985.

Hoffman, R.K., Gambke, B., Stephenson, L.W. and Rubenstein, N.A.: Myosin transitions in chronic stimulation do not involve embryonic isozymes. *Muscle Nerve* 8:796-805, 1985.

Hudlicka, O., Brown, M., Cotter, M., Smith, M. and Vrbova, G.: The effect of long-term stimulation of fast muscles on their blood flow, metabolism and ability to withstand fatigue. *Pflugers Arch.* 369:141-149, 1977.

Hudlicka, O. and Tyler, K.R.: The effect of long-term high-frequency stimulation on capillary density and fibre types in rabbit fast muscles. *J. Physiol.* 353:435-445, 1984.

Huxley, H.E. and Hanson J.: Quantitative studies on the structure of cross-striated myofibrils. 1. Investigations by interference microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 23:229-249, 1957.

Izumo, S., Nadal-Ginard, B. and Mahdavi, V.: All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science* 231:597-600, 1986.

Jett, G.K., Siwek, L.G., Picone, A.L., Applebaum, R.E. and Jones, M.: Pulmonary artery balloon counterpulsation for right ventricular failure. An experimental evaluation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 86:364-372, 1983

Kantrowitz, A. and McKinnon, W.M.P.: The experimental use of the diaphragm as an auxiliary myocardium. *Surg. Forum* 9:266-268, 1959.

Kantrowitz, A., Tjonneland, S., Freed, P.S., Phillips, S.J., Butner, A.N. and Sherman, J.R. Jr.: Initial clinical experience with intraaortic balloon pumping in cardiogenic shock. *J.A.M.A.* 203:135-140, 1968.

Katz, A., Sahlin, K. and Henriksson, J.: Muscle ammonia metabolism during isometric contraction in humans. *Am. J. Physiol.* 250:C834-C840, 1986.

Kaye, M.P.: The registry of the international society of heart transplantation: Forth official report-1987. *J. Heart Transplant.* 6:63-67, 1987.

Komi, P.V., Vitasalo, J.H.T., Thorstensson, A., Sjodin, B. and Karlsson, J.: Skeletal muscle fibers and muscle enzyme activities in monozygous and dizygous twins of both sexes. *Acta. Physiol. Scand.* 100:358-392, 1977.

Kralios, A.C., Zwart, H.H.J., Mouloupoulos, S.D., Collan, R., Kwan-Gett, C.S. and Kolff, W.J.: Intrapulmonary artery ballon pumping. Assistance of the right ventricle. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 60:215-232, 1970.

Kusaba, E., Schraut, W. and Sawatani, S., Jaron, D., Fred, P. and Kantrowitz, A.: A diaphragmatic graft for augmenting left ventricular function: A feasibility study. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 19:251-257, 1973.

Kusserow, B.K. and Clipp, J.F.: A small ventricle-type pump for prolonged perfusions: Contruction and initial studies including attempts to power a pump biologically with skeletal muscles. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 8:74-78, 1964.

Kwong, W.H. and Vrbova, G.: Effects of low-frequency electrical stimulation on fast and slow muscles of the rat. *Pflugers Arch.* 391:200-207, 1981.

Leiner, A.A., Moreira, L.F.P., Chagas, A.C.P., Cestari, I.A., Oshiro, M.S., Nakayama, E., Luz, P.L., Stolf, N.A.G. and Jatene, A.D.: Biomechanical circulatory assistance: Importance of aerobic capacity of normal and conditioned skeletal muscles. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 34:716-720, 1988.

Mackie, B.G. and Terjung, R.L.: Blood flow to different skeletal muscle fiber types during

contraction. *Am. J. Physiol.* 245:H265-H275, 1983a.

Mackie, B.G. and Terjung, R.L.: Influence of training on blood flow to different skeletal muscle fiber types. *J. Appl. Physiol.* 55:1072-1078, 1983b.

Macoviak, J.A., Stephenson, L.W., Kelly, A.M., Likoff, M.J., Reichek, N. and Edmunds, L.H. Jr.: Partial replacement of the right ventricle with a synchronously contracting diaphragmatic skeletal muscle autograft. *Proceeding of the Third Meeting of ISA0* 5:550-555, 1981a.

Macoviak, J.A., Stephenson, J.A., Alavi, A., Kelly, A.M. and Edmund, L.H. Jr.: Effect of electrical stimulation on diaphragmatic muscle used to enlarge right ventricle. *Surgery* 90:271-277, 1981b.

Macoviak, J.A., Stinson, E.B., Starkey, T.D., Hansen, D.E., Cahill, P.D., Miller, D.C. and Shumway, N.E.: Myoventriculoplasty and neoventricle myograft cardiac augmentation to establish pulmonary blood flow: preliminary observations and feasibility studies. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 93:212-220, 1987.

Maeda, Y.: Birefringence of oriented thin filaments in the I-bands of crab striated muscle and comparison with the flow birefringence of reconstituted thin filaments. *Eur. J. Biochem.* 90:113-121, 1978.

-Biomechanical Cardiac Assist Device-

Maggie, M.Y.C., Hintz, C.S., Henriksson, J.,
Salmons, S., Hellendahl, R.P., Park, J.L.,
Nemeth, P.M. and Lowry, O.H.: Chronic stimulation
of mammalian muscle: enzyme changes in individual
fibers. *Am. J. Physiol.* 251:C633-C642, 1986.

Magovern, G.J., Heckler, F.R., Park, S.B.,
Christlieb, I.Y., Magovern, G.J.Jr., Kao, R.L.,
Benckart, D.H., Tullis, G., Rozar, E., Liebler,
G.A., Burkholder, J.A. and Maher, T.D.: Paced
latissimus dorsi used for dynamic cardiomyoplasty
of left ventricular aneurysms. *Ann. Thorac.
Surg.* 44:379-388, 1987.

Mahdavi, V., Izumo, S. and Nadal-Ginard, B.:
Developmental and hormonal regulation of
sarcometric myosin heavy chain gene family. *Circ.
Res.* 58:298-304, 1987.

Mannion, J.D., Bitto, T., Hammond, R.L.,
Rubinstein, N.A. and Stephenson, L.W.:
Histochemical and fatigue characteristics of
conditioned canine latissimus dorsi muscle. *Circ.
Res.* 58:298-304, 1986a.

Mannion, J.D., Hammond, R. and Stephenson, L.W.:
Hydraulic pouches of canine latissimus dorsi,
potential for left ventricular assistance. *J.
Thorac. Cardiovasc. Surg.* 91:534-544, 1986b.

Mannion, J.D., Acker, M.A., Hammond, B.S.,
Faltmeyer, W., Duckett, S. and Stephenson, L.W.:
Power output of skeletal muscle ventricles in
circulation: short term studies. *Circulation*
76:155-162, 1987.

-Biomechanical Cardiac Assist Device-

Martin, A.F., Pagani, E.D. and Solaro, R.J.:
Thyroxine-induced redistribution of isoenzymes of
rabbit ventricular myosin. *Circ. Res.* 50:117-124,
1982.

Martin III, W.H., Murphree, S.S. and Saffitz,
J.E.: β -Adrenergic receptor distribution among
muscle fiber types and resistance arterioles of
white, red, and intermediate skeletal muscle.
Circ. Res. 64:1096-1105, 1989.

Maxwell, L.C., Faulkner, J.A. and Murphy, R.A.:
Relationship among fibre type, myosin ATPase
activity and contractile properties. *Histochem.
J.* 14:981-997, 1982.

Mihaileum, S., Levy, M., Magovern, G.J.,
Moreira, L.F.P. and Molteni, L.: Clinical results
of cardiomyoplasty in first international workshop
on cardiomyoplasty, Paris, June 7, 1989.

Miller, D.C., Moreno-Cabral, R.J., Stinson, E.B.,
Shinn, J.A., Shumway, N.E.: Pulmonary artery
balloon counterpulsation for acute right
ventricular failure. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*
80:760-763, 1980.

Miya, J., Maeta, H., Asakura, T. and Hori, M.:
Experimental evaluation of extrapulmonary arterial
balloon pumping (EPABP) for right heart failure of
diverse etiologies. *Trans. Am. Soc. Artif.
Intern. Organs* 32:211-216, 1986.

Mole, P.A., Baldwin, K.M., Terjung, R.L. and

-Biomechanical Cardiac Assist Device-

Holloszy, J. O. : Enzymatic pathway of pyruvate metabolism in skeletal muscle: adaptation to exercise. *Am. J. Physiol.* 224:50-54, 1973.

Moran, J.M., Opravil, M., Gorman, A.J., Rastegar, H., Meyers, S.N. and Michaelis, L.L. : Pulmonary artery balloon counterpulsation for right ventricular failure : II. Clinical experience. *Ann. Thorac. Surg.* 38:254-259, 1984.

Nakamura, K. and Glenn, W.L. : Graft of diaphragm as a functioning substitute for myocardium. *J. Surg. Res.* 4:435-439, 1964.

Neilson, I.R., Brister, S.J., Chiu, R.C.J. : Left ventricular assist using skeletal muscle powered device for diastolic augmentation. *J. Heart. Transplant.* 4:343-347, 1985.

Nix, W.A., Reichmann, H. and Schroder, M.J. : Influence of direct low frequency stimulation on contractile properties of denervated fast-twitch rabbit muscle. *Pflugers Arch.* 405:141-147, 1985.

Obinata, T., Masaki, T. and Takano, H. : Immunochemical comparison of myosin light chains from chicken fast white, slow red, and cardiac muscle. *J. Biochem.* 86:131-137, 1979.

Opravil, M., Gorman A.J., Krejcie, T.C., Michaelis, L.L. and Moran, J.M. : Pulmonary artery balloon counterpulsation for right ventricular failure: I. Experimental results. *Ann. Thorac. Surg.* 38:242-253, 1984.

-Biomechanical Cardiac Assist Device-

Oyer, P.E., Stinson, E.B., Reilz, B.A., Bieber, C.P., Jamieson, S.W. and Shumway, N.E. : Cardiac transplantation: 1980. *Transplant. Proc.* 13:199-206, 1981.

Oyer, P.E., Stinson, E.B., Jamieson, S.W., Hunt, S.A., Ptrlroth, M., Billingham, M. and Shumway, N.E. : Cyclosporine in cardiac transplantation A2 1/2 year follow up. *Transplant. Proc.* 15: 2546-2552, 1983.

Page, S.G. : A comparison of fine structures frog slow and twitch muscle fibers. *J. Cell Biol.* 26:477-497, 1965.

Pennock, J.L., Oyer, P.E., Reiz, B.A., Jamieson, S.W., Bieber, C.P., Wallwork, J., Stinson, E.B. and Shumway, N.E. : Cardiac transplantation in perspective for the future ; survival complication, rehabilitation, and cost. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 83:168-177, 1982.

Peter, J.B., Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Gillespie, C.A. and Stempel, K.E. : Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11:2627-2633, 1972.

Petrovsky, B.V. : The use of diaphragm grafts for plastic operations in thoracic surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 41:348-355, 1961.

Petrovsky, B.V. : Surgical treatment of cardiac aneurysms. *J. Cardiovasc. Surg.* 7:87-91, 1966.

- Petrofsky, J.S., Phillips, C.A., Sawa, M.N., Hanpeter, D. and Stafford, D.: Blood flow and metabolism during isometric contractions in cat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 50:493-502, 1981.
- Pette, D., Smith, M.E., Staudte, H.W. and Vrbova, G.: Effects of long-term electrical stimulation on some contractile and metabolic characteristics of fast rabbit muscles. *Pflugers Arch.* 338:257-272, 1973.
- Pette, D., Muller, W., Leisner, E. and Vrbova, G.: Time dependent effects on contractile properties, fiber population, myosin light chains and enzymes of energy metabolism in intermittently and continuously stimulated fast twitch muscles of the rabbit. *Pflugers Arch.* 364:103-112, 1976.
- Pette, D.: Activity induced fast to slow-transitions in mammalian muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* 16:517-528, 1984.
- Reitz, B.A., Stinson E.B.: Cardiac transplantation-1982. *J.A.M.A.* 248:1225-1227, 1982.
- Ross, D.N. and Somerville, J.: Surgical correction of tricuspid atresia. *Lancet* i:845-849, 1973.
- Roy, R.K., Mabuchi, K., Sarkar, S., Mis, C. and Sreter, F.A.: Changes in tropomyosin subunit pattern in chronic electrically stimulated rabbit fast muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89:181-187, 1979.

- Rubinstein, N., Mabuchi, K., Pepe, F., Salmons, S., Gergely, J. and Sreter, 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.
- Salmons, S. and Sreter, F.A.: Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type. *Nature* 263:30-34, 1976.
- Salmons, S., Gale, D.R. and Sreter, F.A.: Ultrastructural aspects of the transformation of muscle fiber type by long term stimulation: changes in Z discs and mitochondria. *J. Anat.* 127:17-31, 1978.
- Salmons, S. and Henriksson, J.: The adaptive response of skeletal muscle to increased use. *Muscle Nerve* 4:94-105, 1981.
- Saltin, B., Henriksson, J., Nygaard, E. and Andersen, P.: Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. *Ann. NY. Acad. Sci.* 301:3-29, 1977.
- Sato, H., Ellis, G.W. and Inoue, S.: Microtubular origin of mitotic spindle form birefringence. *J. Cell Biol.* 67:501-517, 1975.
- Schaff, H.V., Arnold, P.G. and Reeder, G.S.: Late mediastinal infection and pseudoaneurysm following left ventricular aneurysmectomy repair utilizing pectoralis major muscle flap. *J. Thorac.*

-Biomechanical Cardiac Assist Device-

Cardiovasc. Surg. 84:912-916, 1982.

Schantz, P., Billeter, M.R., Henriksson, J. and Jansson, E.: Training-induced increase in myofibrillar ATPase intermediate fibers in human skeletal muscle. Muscle Nerve 5:628-636, 1982.

Schantz, P., Henriksson, J. and Jansson, E.: Adaptation of human skeletal muscle to endurance training of long duration. Clin. Physiol. 3:141-151, 1983.

Schantz, P.G. and Henriksson, J.: Enzyme levels of the NADH shuttle system: measurements in isolated muscle fibers from humans of differing physical activity. Acta. Physiol. Scand. 120:505-515, 1987.

Scherman, C., Daly, B.D.T., Clay, W., Dasse, K., Handrahan, J. and Haudenschild, C.: In vivo evaluation of transcutaneous energy transmission (TET) system. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 30:143-147, 1984.

Seedorf, K., Seedorf, U. and Pette, D.: Coordinate expression of alkali and DTNB myosin light chains during transformation of rabbit fast muscle by chronic stimulation. FEBS. Lett. 158:321-324, 1983.

Shepard, M.P., Tamaki, H. and Mustard, W.T.: Experimental study of the paced denervated diaphragmatic pedicle graft. Br. J. Surg. 55:91-92, 1968.

-Biomechanical Cardiac Assist Device-

Snell, K. and Duff, D.A.: Branched-chain amino acid metabolism and alanine formation in rat muscles in vitro: Mitochondrial-cytosolic interrelationships. Biochem. J. 225:737-743, 1985.

Sola, O.M., Dillard, D.H., Ivey, T.D., Haneda, K., Itoh, T. and Thomas, R.: Autotransplantation of skeletal muscle into myocardium. Circulation 71:341-348, 1985.

Spotnitz, H.M., Berman, M.A., Reis, R.L. and Epstein, S.E.: The effects of synchronized counterpulsation of the pulmonary artery on right ventricular hemodynamics. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 61:167-174, 1971.

Spotnitz, H.M., Merker, C. and Malm, J.R.: Applied physiology of the canine rectus abdominis. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 20:747-756, 1974.

Srihari, T. and Pette, D.: Myosin light chains in normal and electrostimulated cultures of embryonic chicken breast muscle. FEBS. Lett. 123:312-314, 1981.

Starton, R.S. and Pette, D.: Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. Histochemistry 86:19-23, 1986.

Stephenson, L.W., Anderson, W.A., Anderson, J.S., Hammond, R.L., Mannion, J.D. and Acker, M.A.: Construction of a skeletal muscle ventricle. in "Cardiac Colloquy", by Adams, A.S. and Roberts, A.J. (ed), Adams Publishing Group, Ltd., Boston

MA, p153-167, 1987.

Svedenhag, J., Henriksson, J. and Juhlin-Dannfelt, A.: β -Adrenergic blockade and training in human subjects: effects on muscle metabolic capacity. Am. J. Physiol. 247:E305-E311, 1984.

Symbas, P.N., McKeown, P.P., Santora, A.H. and Vlasis, S.E.: Pulmonary artery balloon counterpulsation for treatment of intraoperative right ventricular failure. Ann. Thorac. Surg. 39:437-440, 1985.

Taylor, D.L.: Quantitative studies of the polarization optical properties of striated muscle in the transition from rigor to relaxed state. J. Cell. Biol. 68:497-511, 1976.

Takano-Ohmuro, H., Obinata, T., Masaki, T. and Mikawa, T.: Changes in myosin isozymes during development of chicken breast muscle. J. Biochem. 91:1305-1311, 1982.

Tomanek, R.J.: Ultrastructural differentiation of skeletal muscle fibers and their diversity. J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. 55:212-227, 1976.

Vachon, B.R., Kunov, H. and Zingg, W.: Mechanical properties of diaphragm muscle in dogs. Med. Biol. Eng. 13:252-260, 1975.

Veratti, E.: Investigations on the fine structure of striated muscle fiber. J. Biophys. Biochem. Cytol. 10(Suppl):3-8, 1961.

Walsh, G. and Chiu, R.C.J.: Skeletal muscle for cardiac assist: A historical overview. in "Biomechanical Cardiac Assist-Cardiomyoplasty and Muscle Powered Devices", by Chiu, R.C.J. (ed), Futura Publish Co., Mt. Kisco NY, p1-18, 1986.

Weeds, A.G., Trentham, D.R., Kean, C.J.C. and Buller, A.J.: Myosin from cross-reinnervated cat muscle. Nature 247:135-139, 1974.

Williams, R.S., Caron, M.G. and Daniel, K.: Skeletal muscle β -adrenagic receptors: Variations due to fiber type and training. Am. J. Physiol. 246:E160-E167, 1984.

Yang, S.S., Bentivoglio, L.G., Maranhao, V. and Goldberg, H. F.A. Flow resistance. in "From catheterization data to hemodynamic parameters" by Yang, S.S., Bentivoglio, L.G., Maranhao, V. and Goldberg, H.F.A. (ed), Davis Company, Philadelphia, p.67-72, 1988.

Zeman, R.J., Ludemann, R., Easton, T.G. and Etlinger, J.D.: Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, $\alpha \beta_2$ -receptor agonist. Am. J. Physiol. 254:E726-E732, 1988.

謝辞

本論文を終えるにあたり、本研究の御指導、御校閲を賜りました筑波大学臨床医学系堀原一教授に甚大なる謝意を表するとともに、本研究に終始直接御指導をいただきました筑波大学臨床医学系外科三井利夫助教授に深謝いたします。本研究全般にわたり御指導御鞭撻をいただきました前筑波大学臨床医学系外科酒井章講師（現浜松聖隷病院心臓血管外科部長）、筑波大学臨床医学系外科筒井達夫講師に心からの感謝の意を表します。運動生理学全般にわたり終始御懇篤なる御指導を賜りました筑波大学体育科学系松田光生助教授、病理学全般にわたり御指導御鞭撻をいただきました野村生物科学研究所野村章修士及び、日常の実験、研究の多方面にわたり御援助御協力をいただきました筑波大学臨床医学系循環器外科グループ諸兄に感謝いたします。また、実験に協力いただきました筑波大学医学事務区研究協力小谷内技官に深謝いたします。

付記

学会発表

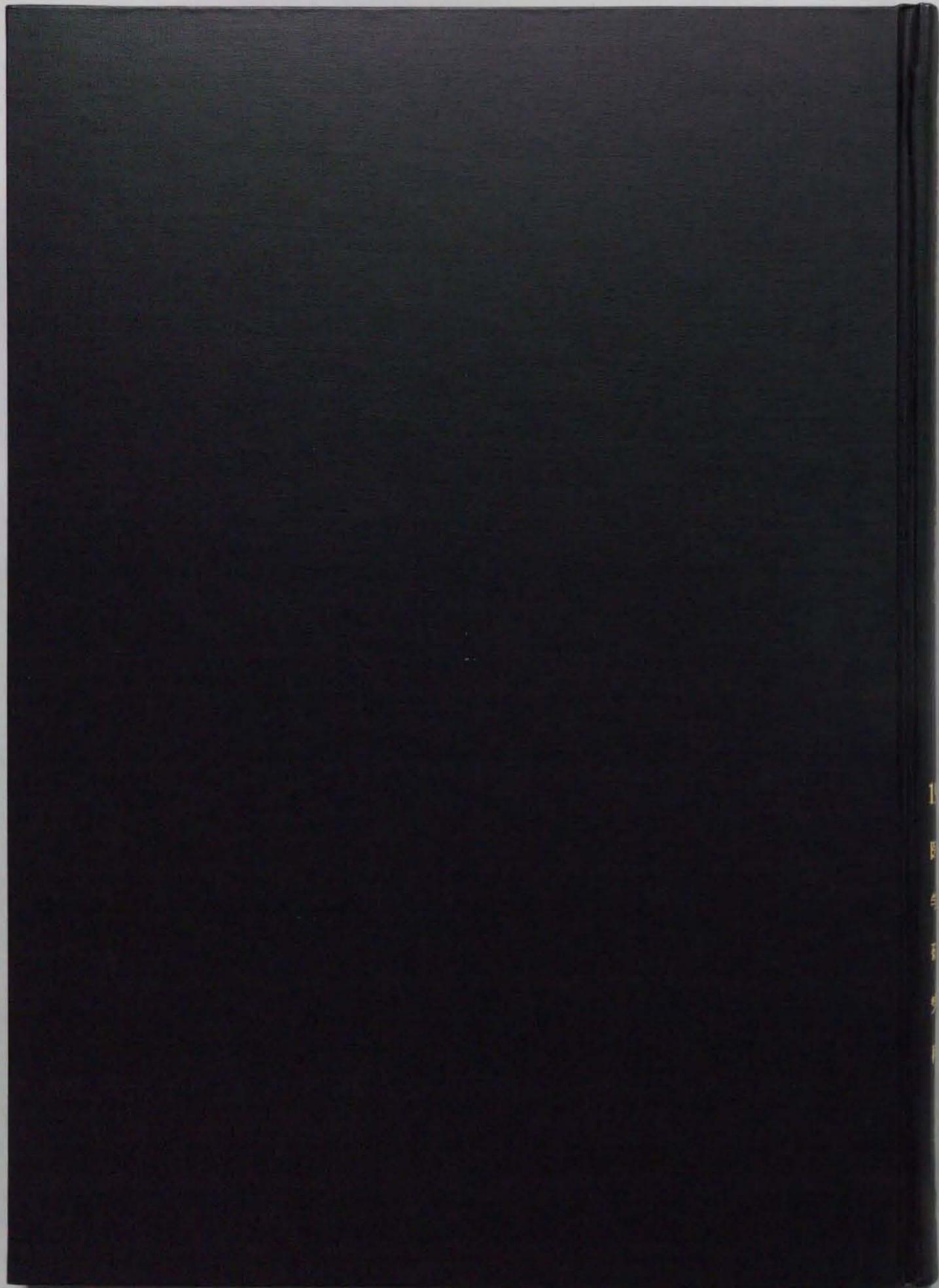
本研究は、著者が1986年4月から1989年10月にかけて筑波大学大学院医学研究科生理系にて行ったものである。内容の一部は第18回心臓血管外科学会学術大会（神戸、1988）、3rd International Symposium on Transformed Skeletal Muscle for Cardiac Assist and Repair (Banff, Canada, 1988)、第41回日本胸部外科学会総会（東京、1988）、第一回「骨格筋の心臓への応用」研究会（東京、1989）、第4回日本ペーシング学会学術大会（東京、1989）、第二回臨床胸部外科談話会シンポジウム「骨格筋移植による心機能補助」（大阪、1989）、4th Asian-Pacific on Cardiac Pacing and Electrophysiology (Singapore, 1989)、19th World Congress of the International Society for Cardiovascular Surgery (Toronto, 1989) において発表した。

論文発表

1. Doi T., Sakai A., Nomura A., Maeta H., Tsutsui T., Mitsui T., Hori H. : Evaluation of electrically conditioned canine latissimus dorsi muscle studied by histochemistry, birefringence assessment and electron microscopy. *Transformed Skeletal Muscle for Cardiac Assist and Repair* (ed by Chiu, R.C.J.) Futura Publishing Co. Mt. Kisco, NY. (印刷中)
2. 酒井章、土肥敏樹、野村章、堀原一 : 電気刺激による骨格筋トレーニングとバイオオートポンプへの応用 *BIOMedica* 3 (11) 56-60, 1988
3. 土肥敏樹、酒井章、前田肇、筒井達夫、三井利夫、堀原一 : 電気刺激による骨格筋トレーニングに関する細胞

生物学的研究 日本心臓血管外科学会雑誌 18 (5)
18-19, 1989

4. 土肥敏樹、三井利夫、筒井達夫、堀原一：電気刺激による骨格筋（速筋型）の遅筋型への変換とその心臓補助および心筋形成術への応用 人工臓器 18(4) 1490-1497, 1989
5. 土肥敏樹、三井利夫、松下昌之助、筒井達夫、堀原一、酒井章、松田光生：骨格筋筋線維変換のための電気刺激によるコンディショニングの有用性：長期水泳トレーニングとの比較 心臓ペースング（印刷中）



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10