



Title	オステオポンチン由来SVVYGLRペプチドが咀嚼筋損傷後の摂食機能回復に及ぼす影響
Author(s)	松下, 豊
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69486
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

オステオポンチン由来 SVVYGLR ペプチドが
咀嚼筋損傷後の摂食機能回復に及ぼす影響

2018 年 3 月

大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻

顎顔面口腔外科学講座

口腔外科学第一教室

松下 豊

緒言

顎口腔領域の骨格筋は摂食、嚥下、構音そして呼吸等の身体活動を担う重要な役割があるため、その機能障害は著しい QOL (quality of life) の低下につながる¹⁾。しかし顎口腔領域の骨格筋は、胚発生起源の違いから、四肢筋など体節由来の骨格筋より再生能力が低いことが知られており^{2,3)}、臨床の現場において口唇裂・口蓋裂等の先天的な筋形態・発育異常に対して形成術を行う場合や、口腔・咽頭癌切除に伴い広範囲に筋欠損を生じる場合など、構音障害や摂食嚥下障害などの骨格筋の重度な機能障害をきたすことも少なくない^{4,5)}。一般的に骨格筋は再生能力を有しており、骨格筋が傷害を受けると筋線維内に多数存在する幹細胞である筋衛星細胞が活性化され、分化・増殖することで筋の再生、修復が起こる^{6,7)}。しかし、外傷や手術等で骨格筋の再生能を超える侵襲が加わった場合は、損傷部に瘢痕組織が形成されることで十分な筋再生が得られず機能不全を認めることになる^{7,8)}。組織の広範囲欠損を伴う筋機能障害に対する治療法として、各種理学療法や欠損部を補填する目的でエピソードや顎補綴等の人工装置の使用、血管吻合術を用いた組織移植、再建手術等が適用されるが、損傷部位の完全な機能回復を得ることは困難である^{7,9)}。一方、筋損傷に伴う機能障害に対する機能再生治療の確立を目的として、これまでに種々の成長因子、増殖因子あるいは瘢痕形成抑制を目的とした阻害薬について様々な研究が行われてきたが、いずれも臨床応用には至っておらず、新たな治療法の開発が望まれている^{7,8)}。

オステオポンチン (OPN) は、骨組織や腎臓等で恒常的に発現を認め、組織に障害が加

わることで様々な種類の細胞で発現が亢進する¹⁰⁾ことから マトリセルラータンパク質の 1 種といわれている。OPN は分子内の Gly- Arg- Gly- Asp- Ser (GRGDS) 配列とトロンビンにより切断され表出される Ser- Val- Val- Tyr- Gly- Leu- Arg (SVVYGLR) 配列の少なくとも 2 つの異なる受容体結合部位を有しており、細胞接着分子であるインテグリンとの相互作用を介して組織修復、炎症や線維化を含む様々な病理学的・生理学的プロセスを調整する重要な役割を担っている^{10, 11)}。SVVYGLR の 7 つのアミノ酸より合成される低分子ペプチド (SV ペプチド) は *in vitro* の研究より、血管内皮細胞の細胞接着・増殖・遊走能を上昇させ¹²⁾、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を促進する¹³⁾ことや、*in vivo* において、心筋梗塞モデルラットの梗塞領域に適用すると血管新生を誘導、線維化を抑制し、心機能を有意に改善させることが明らかとなっている^{13, 14)}。一方、OPN は骨格筋損傷部位でも高い発現がみられ、マウス由来の筋芽細胞に作用させることで、細胞接着・増殖を活性化することが報告されており¹⁵⁾、¹⁶⁾、OPN 欠損マウス由来の筋移植は治癒が遷延することから、OPN が骨格筋の炎症、壊死および再生に対し重要な役割を担っていることが知られている¹⁷⁾。

本研究は、SV ペプチドが、骨格筋損傷後の再生修復過程において如何なる影響を及ぼすか、咀嚼筋である咬筋を被験対象として骨格筋損傷動物モデルを新たに作製して、組織形態学的検討を行うとともに、損傷後の筋活動、摂食行動特性変化に対する影響についても電気生理学的に検討を行った。

材料と方法

本研究における実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定（動物実験委員会承認番号:動歯- 28- 015- 0）と動物の愛護および管理に関する法律を順守して行った。

SV ペプチドの合成

ポリエチレングリコールとポリスチレンのグラフト共重合レジン TentaGel®（粒径 80 µm）を支持体として、多種品目同時固相法自動ペプチド合成機（PSMM- 8: 島津製作所）を用いて、Fmoc 法^{*}で合成した。得られたペプチドは高速液体クロマトグラフ質量分析計（LCMS: 島津製作所）で検定した。

実験で用いる SV ペプチド溶液は、Phosphate buffered saline (PBS) で混和し、濃度 20 ng / ml になるように調整した。

（Fmoc 法^{*}: 9- フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) を保護基に用いたペプチド固相合成法の 1 つ。）

筋損傷モデルの作製

実験には、Sprague- Dawley 系成獣ラット 10- 11 週齢（体重 350～ 400 g: 日本チャールス・リバー株式会社）37 匹を供した。実験動物は温度 20- 22 °C、湿度 40- 50 %、12 時間毎の明期・暗期に管理された環境で、個別のケージ内で飼育され、飼料および飲料水は十分に与えられた。

ラットを三種混合麻酔薬（ミダゾラム（ドルミカム 5 mg / ml: アステラス製薬）2 mg / kg、メ

テトミジン（ドミツール 1 mg / ml: 日本全薬工業）0.375 mg / kg、ブトルファノール（ベトルファノール 5 mg / ml: Meiji Seika ファルマ株式会社）2.5 mg / kg）の腹腔内投与による全身麻酔下で腹臥位にし、咬筋切断を以下の手順で行った。① 皮膚切開：頬部皮膚の外耳孔から口角をむすぶ直線上で、中央部半分で切開を行った。② 咬筋の明示：皮下組織まで切開を行った後、筋膜上で十分に皮膚を鈍的剥離し、咬筋筋膜を明示した。③ 筋切断：咬筋表面に横走する顔面神経（頬枝、下顎縁枝）を温存するように、外科用メス（# 15: フェザー安全剃刀株式会社）を使用して筋切断を行った。筋切断の再現性を担保するために、解剖学的ランドマークとして外眼角および下顎角を選択し、それらをむすぶ直線上で咬筋を切断した。切断は深部では下顎枝骨面に当たるまで行い、上方は頬骨弓まで、下方は下顎下縁まで行い、切断面より全層で切断を行えていることを確認した。④ 切断面の処理：切断後に筋切断面を電気メスにて焼灼止血した。⑤ 薬剤の投与：咬筋切断後の断端周囲（近位断端および遠位断端それぞれ 2 箇所）に SV ペプチドまたは PBS を 0.25 ml ずつ計 1 ml 注入した。⑥ 閉創：絹糸にて頬部皮膚、皮下組織、筋膜を含めて縫合閉創した（図 1 A- C）。

摂食行動の観察においては各ラットの両側咬筋に薬剤の注入を行い、その他の実験に関しては左側のみの注入とし、右側を非投与側として筋切断のみ行った。SV ペプチドを投与した群を SV 群、PBS を投与した群を PBS 群とし、片側投与の場合は左側の投与側をそれぞれ、SV 側・PBS 側とした。術後 7 日間の回復期間を設定し、摂食行動特性・筋活動特性について術後 1, 2, 4, 6, 8 週目で評価を行い、術後 1 週時点での測定値を基準と

して検討を行った。また術後 8 週時に組織形態回復の評価を行い、その際は同一個体内での非投与側を基準とした（図 1 D）。

また筋損傷モデルの筋機能低下を検討するために、手順通りに作製した筋損傷モデル (n= 6) で、後述の摂食効率に関して、術前、術後 1, 2, 4 週で測定し、同一週齢の未処置のラット (n= 4) でのデータと比較検討を行った。

研究 1. SV ペプチド局所投与が咬筋損傷後の組織形態回復に及ぼす影響

1- 1: CT 画像での評価

1, 撮影条件

成獣ラット 12 匹を供し、左側咬筋に SV ペプチドを注入した群（SV 群）(n= 6) と対照群として PBS を投与した群（PBS 群）(n= 6) の 2 群に分けた。

動物用 micro CT（R. mCT2: 株式会社リガク）を用いて筋損傷後 8 週時にラット頭部の撮影を行い、DICOM データを得た。撮影は全身麻酔下で腹臥位の閉口状態で行い、FOV は Φ 60 mm $\times$ H 60 mm で、管電流 160 μ A、管電圧 90 kV とし、ボクセルサイズは 118 $\times$ 118 $\times$ 118 μ m³ であった。得られた DICOM データをソフトウェア（TRI / 3D-BON: ラックシステムエンジニアリング株式会社）上で処理し、ラット頭蓋骨における前鼻棘先端・両側下顎頭上縁を通る平面を基準平面として MPR 像を作製した。基準平面は筋切断面とおおよそ直交しており、咬合平面と平行となっていた。咬合平面の位置での横断面を評価に用いた。なお CT 撮影時に水および空気による校正を行い、信号強度を CT 値 (Hounsfield

Unit; HU) で表現した。

2, 正常筋 CT 値の測定

対象とする計測領域 (Region of Interest; ROI) を咬合平面での下顎枝骨面の外側で頬部皮下組織までとし、前方は下顎枝前縁、後方は下顎枝後縁の位置までとした。10 週齢の未処置の成獣ラット (n= 14) で ROI に含まれる各ボクセルの CT 値を求め、その平均値および標準偏差 (SD) の値より正常筋 CT 値を設定した。正常筋 CT 値は各個体で求めた CT 値の平均値 $\pm$ 2SD とし、一般的に知られている骨格筋 CT 値¹⁸⁾ と大差がないことを確認した。

3, CT 画像の評価

筋損傷モデルにおいて、ROI に含まれる領域のボクセル数から ROI の面積を算出し、筋横断面積 (Cross sectional area; CSA) (μm^2) とし、各ボクセルの CT 値より平均 CT 値 (HU)、ROI における正常筋 CT 値を有する領域の面積割合を % CSA (%) とした¹⁸⁾。左右咬筋部での ROI でそれぞれを計測し、比較検討した。

1- 2: 組織学的評価

1, 切片の作製

筋切断 8 週後にイソフルラン (和光純薬工業株式会社) 吸入麻酔により安楽死させ、ラット両側咬筋を摘出した。摘出した咬筋は、10 % 中性緩衝ホルマリン溶液 (和光純薬工業株式会社) にて浸漬固定後、自動固定包埋装置 (ティッシュ・テック VIP- 5- Jr: 株式会社

池田理化) でパラフィン包埋した。作製したパラフィンブロックを用い筋中央部で筋線維走行に対して垂直に薄切を行い、2 μm の薄切切片を作製した。

2, 染色および評価

作製した薄切切片でヘマトキシリン- エオジン (HE) 染色およびピクロシリウスレッド染色¹⁹⁾を行い、光学顕微鏡 (DM2000: Leica Microsystems) 下で観察し、デジタルカメラ (DFC290 HD: Leica Microsystems) で撮影を行った。HE 染色により筋損傷部位の再生筋線維の組織学的性状を評価し、シリウスレッド染色により組織の線維化量および筋線維径を計測した。計測には画像処理ソフト (ImageJ: National Institutes of Health) を用いた。

HE 染色像にて瘢痕組織内に存在している筋線維を組織修復過程において伸長した再生筋線維と判断し、正常ラット咬筋の HE 横断像と比較し、成熟の程度を評価した。筋線維径は各サンプルあたり損傷領域周囲から無作為に抽出した 5 視野で全筋線維横断面の短径 (μm) を測定し、測定する線維数は 200 以上とした。それぞれ個体での筋線維径のヒストグラムを確認し、各群での筋線維径の平均値を求めた²⁰⁾。また瘢痕組織の形成量は各切片でのピクロシリウスレッド染色陽性 (赤色) 部位全範囲の面積を測定した。瘢痕組織全域を含むような弱拡大像を画像処理ソフトでグレースケールに変換し、すべてのサンプルで統一した閾値で 2 値化し、面積を求めた²¹⁾。

研究 2. SV ペプチド局所投与が咬筋損傷後の摂食行動特性に及ぼす影響

2-1: 咬筋筋電図での評価

1, 電極の埋め込み

導出電極 2 本と接地電極用導線をコネクタに接続し、頭部固定装置（慢性ラット咬筋電極 OA217- 006: 株式会社ユニークメディカル）を作製した。導出電極はテフロンで絶縁コートされた径 0.25 mm のステンレススチール撚り線導線を先端部 2 mm 露出させたもので、極間距離 1 mm の双極ワイヤー電極とした（図 2 A）。

全身麻酔下で腹臥位の状態で頭部固定を行い、露出させたラット頭頂部頭蓋骨面にアンカービス（AM1.4- 2: 株式会社ユニークメディカル）を 4 箇所埋入し、1 本は接地電極用とし、歯科用即時重合レジン（PROVISTA: サンメディカル株式会社）でコネクタとビスと骨面で接着・固定した（図 2 B）。コネクタから出る 2 本の導出用導線はそれぞれ両側側頭部皮下を走行させ、電極先端を咬筋実質内部に 5 mm 埋入させ、絹糸にて固定を行った（図 2 C）。埋入位置は顔面神経頬枝と下顎縁枝の間の中央部とし、電極先端部より近位にて咬筋を切断した。

2, 筋電図の測定

成獣ラット 11 匹を供し、左側咬筋に SV ペプチドを注入した群（SV 群）(n= 5) と対照群として PBS を投与した群（PBS 群）(n= 6) の 2 群に分けた。

記録前 12 時間の絶食の上、イソフルラン（和光純薬工業株式会社）吸入麻酔下でラット頭部に導出用コネクタをセットし、十分に覚醒した後に観察ケージ内で自由摂食行動時の筋活動を記録した。導出された筋信号は差動増幅器（同相弁別比 120 dB 以上、入力イン

ピーダンス 200 M Ω 、内部雑音 5 μ Vp-p 以下) (生体信号アンプ UA- 200: 株式会社ユニークメディカル) で 1 mV / div に増幅された後、A/D コンバーター (分解能 16 bit、サンプリング周波数 1 kHz) (データ収集・解析システム UAS- 308S: 株式会社ユニークメディカル) を通してコンピューターシステムに取り込まれ、ソフトウェア (Unique Acquisition: 株式会社ユニークメディカル) で処理された (図 2 C)。またモーションアーチファクトは安静時電位の周波数解析を行い、ソフトウェア上で 20 Hz のローカットフィルター (4 次バターワース型デジタルフィルタ) で除去した。得られた筋波形をソフトウェア上で全波整流化および 20 msec で平滑化 (Averaged Rectified Value; ARV) 処理を行い、ARV 筋電図として分析に用いた (図 3 A)。

ARV 筋電図は数式で書くと、以下のようになる。

$$\text{ARV}(t) = \frac{1}{2T} \int_{-T}^T |e(t + \tau)| d\tau \quad (e(t): \text{筋電位信号、} (-T, T): \text{計算区間})$$

3, 筋電図の評価

安静時の基線の平均振幅 $\pm 2\text{SD}$ を超えたところを筋活動の開始、基線の平均振幅 $\pm 2\text{SD}$ 以下に減少したところを筋活動の終了とし、その間を咬筋バーストとした。咬筋は閉口筋の一つであり、閉口相で筋活動が観察される。咀嚼期における裁断相では振幅の小さい波形、臼磨相では振幅の大きい等間隔の波形が得られることが知られている^{22, 23)}。計測開始より 100 秒以上経過し、摂食開始より 200 秒以内のデータで、無作為に連続したバーストを選出し、50 バースト以上の臼磨相の咬筋バーストを選んだ。各バーストで以下のパラメータを計測

し、筋活動特性の評価に用いた。

バースト持続時間：各バーストの開始から終了までに経過した時間 (msec)

バースト周期：一つのバーストの開始から、次のバーストの開始までの時間 (msec)

バースト最大振幅：各バーストに含まれる筋電位の最大値 (mV)

バースト積分値：各バーストに含まれる筋電位の累積値 (mV・msec)

4, リサージュ筋電図

それぞれの筋肉より得られた筋波形を観察することで、その筋の活動の強さやリズムは把握できるが、様々な筋肉の運動時の相互関係については理解しにくい。そこで、歩行など多数の筋肉の活動が複雑に関与するような運動動作を視覚的に直感的に理解するために、リサージュ図形が広く用いられる。咬筋筋活動は咀嚼時の作業側で大きくなり、平衡側で小さくなることが知られており²⁴⁾、咀嚼時に同時に記録した左右の咬筋 ARV 波形を X 軸、Y 軸にそれぞれプロットすることで、リサージュ図形（以下、リサージュ筋電図）として表現できる（図 3 B）。Kumai ら²⁵⁾ はリサージュ筋電図が個々の咀嚼ストロークに対応した多くのループ状の軌跡から成り、その咀嚼の特徴をよく表現していることを示した。本研究では上記方法で記録・処理をした術後 1 週および 8 週目の両側咬筋 ARV 波形を用い、左側咬筋の波形を X 軸、右側咬筋の波形を Y 軸にリサージュ合成し分析した。なおリサージュ合成する際の XY 軸の値は全バースト中の最大振幅に対する相対値とした。Deguchi らの方法²⁶⁾ に従い、得られたリサージュ筋電図を各咀嚼ストロークに分解し、それぞれのストロークで最小値二乗法に

より回帰直線を求め、その傾きおよび R^2 値で評価を行った。計測項目は回帰曲線の傾きの全バーストでの平均値（平均傾き）、 R^2 値の全バーストでの平均値（平均 R^2 値）とした。また傾き 1 以上の咀嚼ストロークを ”右側を作業側とした咀嚼”、1 未満を ”左側を作業側とした咀嚼” とし、全バーストでの作業側の内訳も計測した。

1-2: 摂食行動の観察

1, 観察条件

成獣ラット 14 匹を供し、両側咬筋に SV ペプチドを注入した群（SV 群）(n= 8) と対照群として PBS を投与した群（PBS 群）(n= 6) の 2 群に分けた。

行動観察は Tsuji らの報告²²⁾に従って行った。暗期 18 時から 22 時での摂食行動を $30 \times 30 \times 30 \text{ cm}^3$ の観察ケージ内でビデオカメラを用いて 2 方向から記録した。必要最低限の照明を使用し、ケージ内に 2 g の固形飼料（オリエンタル酵母）と十分量の飲料水を置き、1 時間毎にその減少量（摂食量）を測定した。2 g 摂食後はさらに飼料を追加し、引き続き観察を行った。

2, 摂食行動の評価

ビデオカメラにて撮影した映像より 1 時間毎の摂食時の飼料の裁断・臼磨に要した時間（摂食時間）を計測し、摂食量・摂食時間より摂食効率を算出した。摂食効率は単位摂食時間あたりの摂食量 (mg / sec) と定義し、4 時間での平均値を平均摂食効率とした。また 4 時間での摂食時間の総計を累積摂食時間 (sec)、摂食量の総計を累積摂食量 (mg) とした。

統計処理

データは平均 $\pm$ SD の形で表示した。すべての統計分析には R2.8.1 (CRAN) を用い、経時的データは Two-way repeated measures ANOVA (Type III SS) にて分散分析を行い、交互作用が有意であった場合は Shaffer 法で Post Hoc Test を行った。群内の有意差検定は Paired *t*-test、二群間の有意差検定は Student's *t*-test を用い、有意水準は 5 % とした。

結果

SV ペプチドの合成

Fmoc 化学による高効率固相法にて合成し、得られたペプチドは液体クロマトグラフにて計測したところ、単一成分であることが確認できた。この液体クロマトグラフでの単一ピーク成分を質量分析計で計測したところ、SV ペプチドの理論質量値と一致したことから、高純度のペプチドの合成が確認された。

筋損傷モデルにおける成長変化ならびに摂食機能変化

本研究で設定した手順に従い作製した筋損傷モデル（筋損傷群）で摂食効率を調べたところ、術後 4 週目には術前の値に近い値まで回復していたが、正常ラット（正常群）より有意に低い値を示していたため、正常な摂食機能は有していなかった（術後 1 週目： $p < 0.05$, 術後 2 週目： $p < 0.01$, 術後 4 週： $p < 0.05$ ）（図 4 A）。また正常群では経時的な摂食効率の増加が観察された（術前- 術後 2 週： $p < 0.05$, 術後 2 週- 4 週： $p < 0.05$ ）。体重は正常群で高い値を示したが、両群間に有意差はなかった（図 4 B）。

研究 1. SV ペプチド局所投与が咬筋損傷後の組織形態回復に及ぼす影響

1-1: CT 画像での評価

術後 8 週目に撮影した CT 画像にて、SV 群の SV 側では咬筋外側表面になだらかな膨隆があるのに対し、非投与側では陥凹がみられた。一方、PBS 群では両側で陥凹がみられた（図 5 A）。

CSA は SV 群では非投与側に比較し、SV 側でわずかに大きく、その値は 1.06 ± 0.04 倍であった。一方、PBS 群では非投与側に比較し、PBS 側では 0.98 ± 0.05 倍であった。両群で比較すると、SV 群は有意に高い値であった ($p < 0.05$) (図 5 B a)。また平均 CT 値に関しては両群とも両側に差がなく、非投与側と比較し、SV 側では 1.02 ± 0.04 倍、PBS 側では 0.98 ± 0.05 倍と両者に有意差はなかった (図 5 B b)。% CSA に関しては SV 群では SV 側で $97 \pm 1.4 \%$ と非投与側より有意に高い値を示し ($p < 0.05$)、PBS 群の両側や SV 群の非投与側では 94- 95 % 程度の低い値となっており、PBS 群では両側に有意差はなかった (図 5 C a, b)。

1- 2: 組織学的評価

1, 再生筋線維の成熟

HE 染色像にて正常ラット咬筋組織でみられるような横紋筋を有する筋線維や細胞辺縁に核を有する筋線維が (図 6 A a, b)、両群の癒痕組織内に伸長する筋線維においても観察され、両群とも再生筋線維には成熟したものが多くみられた (図 6 B a- d)。

2, 筋線維径

PBS 群の両側や、SV 群の非投与側では全体的に大小不同な筋線維横断面を示し、癒痕組織内に筋線維径の小さい筋線維が散見されるのに対し、SV 群の SV 側では筋線維径は比較的均一で、癒痕組織内の筋線維も径が大きくなっていた。ヒストグラムは両群で 1 峰性で右に歪んだヒストグラムを示し、SV 群の SV 側ではばらつきが少なく、最頻値が大きい

値を示した（図 7 A a-d）。

筋線維径の平均値は SV 群では SV 側で直径 $23 \pm 6.0 \mu\text{m}$ 、非投与側で $16 \pm 1.9 \mu\text{m}$ と、SV 側は非投与側と比較し、有意に高い値を示し ($p < 0.05$)、PBS 群では両側に有意差はなかった（図 7 B a, b）。

3, 癒痕組織形成量

シリウスレッド染色によりコラーゲン線維が赤色に染色され、筋表面にみられる筋上膜と筋切断部に形成されていた癒痕部分が染色されていた。PBS 群では両側で筋切断部相当部に広範囲に癒痕組織の形成がみられたが、SV 群では SV 側で癒痕組織は切断部の筋膜側の比較的小範囲に限局しており、非投与側と比較するとその染色範囲は 0.69 ± 0.05 倍程度と低い値を示した。一方 PBS 群では、両側に差がなく、PBS 側は非投与側の 1.0 ± 0.14 倍であり、SV 群は PBS 群に対し有意に低い値であった ($p < 0.01$)（図 8 A, B）。

研究 2. SV ペプチド局所投与が咬筋損傷後の摂食行動特性に及ぼす影響

2-1: 咬筋筋電図での評価

1, バースト特性

各群 2 秒間の経時的な咬筋バースト波形の変化を示す（図 9 A, B）。SV 群における筋活動は術後 1 週目から 6 週目まで増加していき、術後 8 週目では若干の低下を認めた。一方で PBS 群では、術後 2 週目以降は術後 1 週目より増加はあるものの、その増加量は SV 群より少なかった。また 2 秒間に 8-9 バーストが含まれ、経時的な変化および群間での

差はなかった。

咬筋バースト特性に関して、バースト周期は、経時的にわずかに増加傾向にあるものの有意差はなく、群間にも有意差はなかった（図 10 D）。バースト積分値は SV 群において術後 6 週目まで経時的な増加傾向がみられ、術後 1 週目から 2 週目は統計学的に有意な増加であった（術後 1 週目 - 2 週目： $p < 0.05$ ）。また SV 群は術後 4 週目、6 週目、8 週目において PBS 群より有意に高い増加を示し、術後 1 週目と比較すると最大 2.5 ± 0.4 倍まで増加していた（術後 4 週目： $p < 0.05$ ，術後 6 週目： $p < 0.05$ ，術後 8 週目： $p < 0.01$ ）。一方、PBS 群は経時的に有意な変化はなく、その増加は術後 1 週間目と比較し、 1.5 ± 0.2 倍と低値であった（図 10 A）。バースト持続時間は両群とも有意な経時的変化はなかったが、SV 群は術後 2 週目以降は 1 週目より高い値を示し、1.2 倍から 1.3 倍程度の値となった。一方、PBS 群は術後 1 週目より減少し、0.7 倍から 0.9 倍程度となった。また SV 群は PBS 群と比較し、術後 2, 6, 8 週で有意差に高い値を示した（術後 2 週目： $p < 0.05$ ，術後 6 週目： $p < 0.01$ ，術後 8 週目： $p < 0.01$ ）（図 10 C）。バースト最大振幅は、バースト積分値の経時的変化と類似しており、各群・各週における計測値もバースト積分値の値に近い値を示したが、有意差はみられなかった（図 10 B）。

2, リサーチ筋電図

リサーチ筋電図の典型例を示す（図 11 A a- d）。両群共に術後 1 週間の時点ではそれぞれの咀嚼サイクルごとの平均傾きは 1 に近い値を示していたが、SV 群においては術後 8

週目で SV 側（左側）に偏りの大きい咀嚼サイクルが増加しており、平均傾きは小さくなった。一方、PBS 群では術後 8 週目でも平均傾きに変化はなかった。

平均傾きは PBS 群が術後 1 週目と 8 週目で傾きに変化がないのに対し、SV 群では術後 1 週目の傾きと比べ、術後 8 週目で 0.76 ± 0.03 倍になっており、PBS 群と比較し有意に小さい値となった ($p < 0.05$) (図 11 B a)。平均 R^2 値は両群において術後 8 週目で術後 1 週目の計測値と変化なく、両群間で統計学的有意差はなかった (図 11 B b)。作業側の内訳は SV 群においては術後 8 週目で術後 1 週目と比べ SV 側（左側）を作業側とする割合は多くなっており、 $76 \pm 21\%$ 程度が SV 側を作業側としていた。一方、PBS 群においては術後 8 週目で術後 1 週目と変わらず、PBS 側を作業側とする割合は $45 \pm 11\%$ で、SV 群が PBS 群より有意に高い値となった ($p < 0.05$) (図 11 B c)。

2-2: 摂食行動の観察

ビデオ映像より、両群で術後 1 週目に前歯部での飼料裁断に時間を要し、何度も咬断して臼磨相に移行する様子が観察され、術後 8 週目では前歯部の裁断に要する時間が短くなっていた（データ示さず）。平均摂食効率は SV 群で術後 1 週目から摂食効率の経時的な増加傾向を認め、術後 1 から 4 週、6 から 8 週の間では統計学的に有意な増加であった（術後 1 週目-4 週目: $p < 0.05$, 術後 6 週目-8 週目: $p < 0.05$ ）。術後 8 週の時点で術後 1 週目の 1.4 ± 0.1 倍程度まで増加しており、PBS 群より有意に高い摂食効率の増加を示した（術後 8 週目: $p < 0.01$ ）。また PBS 群では術後 2 週目から 4 週目の間で摂食

効率の回復を認め、統計学的に有意な増加を示すものの、以降は変化がなく、術後 1 週目の 1.1 ± 0.2 倍程度の増加に留まった（術後 2-4 週目： $p < 0.05$ ）（図 12 A）。しかし、累積摂食量および累積摂食時間は、一定の傾向はみられず、群間の差および経時的変化は明らかではなかった（図 12 C, D）。また体重変化は群間で差がなく、両群とも同程度に経時的に増加していた（図 12 B）。

考察

咀嚼や嚥下、構音、呼吸など顎口腔領域における機能運動は、複数の神経系により支配された筋群が、運動の進行に合わせて各筋の収縮度を自在に調節しながら連動して活動し、様々な運動パターンを形成している。特に下顎の運動は両側に停止する同名骨格筋群の伸縮を独立して変化させることにより、さらに複雑に制御されている。骨格筋はもともと再生能力の高い組織であるため、運動や軽微な損傷に対しては運動機能を損なうことなく再生治癒するが、手術あるいは外傷に起因する重度の損傷が構成筋に加わると、筋組織の一部が線維化組織により置換されて治癒することで、運動強度の低下、協調性の失調等をきたし、運動機能が著しく損なわれることが少なくない⁷⁻⁹⁾。

損傷した骨格筋において再生筋による良好な修復を得るためには、平時は静止期にある筋衛生細胞が速やかに活性化され、筋芽細胞の増殖、筋管細胞への融合を経て組織修復に十分な成熟した筋線維を形成することに加えて、損傷部位に形成される瘢痕形成を抑制することが重要である。こうした観点から、これまでに骨格筋再生を促す成長因子として、NGF (Nerve growth factor) や IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) などが *in vitro* で筋芽細胞の増殖・分化を誘導したとする報告が多数あるが、生体内において効果発現に有効な濃度を維持する事が困難であり、投与方法および投与時期についても制約が多いとされる^{7, 27, 28)}。また組織の線維化は、TGF- β 1 (Transforming growth factor- β 1) の過剰産生により生じることから、瘢痕形成抑制を目的に TGF- β 1 阻害薬としてスラミン、ロサルタンの経口投与が効果

的とする報告がみられるが²⁹⁾、全身的な副作用の問題があり、ロサルタンを用いた 1 例の治療報告はあるものの、臨床応用には至っていないのが現状である³⁰⁾。

本研究で用いた SV ペプチドは、筋損傷部位に産生誘導されるオステオポンチンに由来する 7 アミノ酸残基からなる低分子ペプチドで、抗原性の点から副作用が少なく、血管新生能を有し¹²⁾、ラット虚血性心筋症モデルにおいて線維化組織に含まれる線維芽細胞を筋線維芽細胞に分化誘導して心機能を改善させること^{13, 14)} や、ヒト骨髓由来間葉系細胞の増殖能、接着能を促進することが明らかとされている³¹⁾。心筋と同じ横紋構造を有する骨格筋には恒常的に筋組織を再生するための幹細胞が存在していること、損傷部位に形成される瘢痕組織が運動機能を低下させる一因であることから、SV ペプチドによる上記作用は損傷骨格筋に対しても有益に作用する可能性が考えられた。

そこで研究では、Volumetric Muscle Loss (VML) モデル³²⁾を指標に、咀嚼筋（骨格筋）損傷モデルを新たに作製した。VML モデルは筋機能障害をきたす外傷や手術による筋組織の喪失を想定して作製される^{9, 32)}。すなわち筋が持つ自己再生能を超える侵襲を局所に加え、確実に運動機能障害を生じさせる必要がある。骨格筋損傷モデルの多くは、被験筋として前脛骨筋等の四肢筋が用いられているが^{33, 34)}、本研究は顎口腔領域の機能発現に関与している骨格筋の損傷モデルとして、アプローチが容易で再現性の高いモデル作製が可能であることや、左右に同名筋を有して運動時の筋の活動量と協調性の両者を評価できることを考慮して^{23, 24, 35)}、下顎運動において主たる閉口筋として作用する咬筋を被験筋に選択した。本研究

における筋の損傷条件として、損傷部位に瘢痕組織が一定量形成されること、損傷後早期（術後 1 週目）において筋欠損部を補填する修復組織がある程度形成され、筋切断端間の連続性が回復した状態で筋電図記録が行えること、筋損傷そのものが術後摂食機能を著しく損なうことで、個体の成長（体重変化）に大きく影響を及ぼさないようにすることが必要と考えられた。種々の筋切断条件を試行した結果、咬筋を完全離断したモデル動物が上記要件を満たすことを確認し、以後の研究に用いた。

SV ペプチドが損傷骨格筋の再生修復過程における組織形態変化に及ぼす影響

骨格筋の CT 画像は神経筋疾患の診断において有用で、障害の部位と程度を含めて形態情報を得ることが可能である¹⁸⁾。また CT 値により内部性状を比較する方法は既に臨床的に確立されており、デュシャンヌ型筋ジストロフィーのガイドライン（日本神経学会）³⁶⁾ 上でも、検査・診断において CT 検査が推奨されている。一般に、筋の線維化や脂肪置換が進行すると CT 値は変化するため³⁷⁾、CT 値の変化から咬筋損傷部の治癒後の内部性状を評価した。本研究結果より、咬筋切断部の横断面外形は対照側（切断のみの側、もしくは PBS 注入側）においては陥凹を認めたのに対して、SV 注入側ではやや膨隆を示し、断面積が増大していた。また筋の内部性状に関して、CT 値の平均値は有意差を認めなかったが、% CSA の値は SV 側で高く、正常な筋 CT 値を有する範囲は対照側より増大傾向を認めた。筋損傷部位では線維性結合組織などの非収縮性要素による修復と収縮性要素である筋線維の修

復が競合しながら行われる³⁸⁾が、CT 画像の分析から、SV ペプチドを投与することにより、咬筋切断部に収縮要素である筋線維の再生が多く起こり、対照側と比較し、その量・割合ともに大きくなることが示された。以上の結果はシリウスレッド染色、HE 染色を用いた組織学的検索においても同様に認められ、SV 側では対照側と比較して、筋切断部における瘢痕形成が少なく、再生筋を構成する筋線維径は有意に増大した。筋線維の大きさの変化は、一定の筋核ドメインが維持されるように筋線維核の数の変化を伴うとされている³⁹⁾。筋衛星細胞は筋基底膜上に存在する未分化幹細胞であり、刺激が加わると、筋芽細胞へ分化・増殖し、多数融合することで多核の再生筋線維となる²⁷⁾。すなわち、筋衛星細胞や筋芽細胞などの筋前駆細胞が筋線維核の供給源となり、筋核ドメインサイズが保持されていれば、太い筋線維はそれだけ多くの筋前駆細胞を必要とする。SV ペプチドは筋損傷に伴い発生するシグナルにより筋衛星細胞が活性化される際に、より多くの筋前駆細胞を誘導し、結果として収縮要素である筋線維の再生に有利に働いた可能性が考えられる。一方、再生筋線維の増加により非収縮要素である瘢痕の形成は抑制されることが示唆された。また筋組織の筋断端から瘢痕組織内でみられる再生筋線維⁴⁰⁾は筋損傷後 8 週目で一部は中心核を有していたが、成熟しているものが多くみられた。一般に再生筋線維は細胞のほぼ中央部に核を有した状態で 2 ヶ月程度持続するといわれており³³⁾、最終的に核の辺縁への移動や横紋構造がみられる成熟した筋線維となる⁴⁰⁾。本研究において筋損傷後 8 週目における再生筋線維の構造や成熟度は SV 側、

対照側ともに同程度であったことから、SV ペプチドが再生筋線維の成熟を促進するか確認するためには、今後 8 週以前における組織評価が必要と考えられる。

SV ペプチドが損傷骨格筋の再生修復過程において摂食行動特性に及ぼす影響

咀嚼運動を構成する裁断相・臼磨相のうち、咬筋は臼磨相において活動量が大きく観察されることが知られており^{22, 23)}、本研究における筋活動の解析対象とした。

本研究において、咬筋の平均バースト積分値は SV 群において筋損傷後 6 週目まで経時的に有意な増加を認め、増加率は PBS 群と比較して高く、有意差を認めた。また、バースト最大振幅値は群間で有意差はないものの、SV 群では経時的に増加し、PBS 群より高い傾向を示した。一方、バースト持続時間については、経時的变化はなかったものの、SV 群が PBS 群より有意に高い値を示し、いずれも筋活動量の増大を支持する結果となった。一般的な筋治癒の過程として、筋線維の再生は術後 1 週目以降から始まり、2 週目にピークを迎え、3-4 週目以降に急速に終息するといわれている^{7, 8)}。再生した筋が成熟し、伸縮能が得られるまでのタイムラグはあるものの、バースト積分値の変化は、ある程度、筋の再生修復過程に一致していた。また、電極を刺入している切断端付近の筋組織については、損傷後に生じる炎症反応により伸縮性の一時的な低下とその後の回復が予想されるが、経時的に観察された筋活動量の増大変化は、主に損傷部に形成された再生筋線維によるものと考えられる。バースト積分値は 1 個の運動ニューロンが支配する筋線維群を表す運動単位ごとの活動電位の総

和であり、運動単位の動員数・発火頻度に直接相関⁴¹⁾することから、SV 群ではより多くの再生筋線維の動員、もしくは運動単位あたりの発火頻度の上昇が起こっていることが示唆される。これらは、組織学的検索で SV 注入側において損傷部に占める再生筋の割合が多く、筋線維径も増大していた結果と一致するものである。さらに、リサーチ筋電図を用いた解析結果より、損傷直後の咀嚼運動はいずれの条件においてもほぼ両側に均等であったが、損傷後 8 週時点では、SV ペプチドによる顎運動量の増大を反映して、SV 側に偏りの大きい咀嚼ストロークがみられ、SV 側を作業側とする割合が多い結果となった。様々な生理的な変化に適応するために、咀嚼頻度に偏りが生じることが知られており⁴²⁾、それは外傷や歯牙欠損、神経筋疾患等様々な後天的要因によっても容易に変化する^{43, 44)}。本研究において PBS 群では術後 8 週時点においても明らかな咀嚼側性、顎運動の偏在性は観察されなかったことから、SV ペプチドにより損傷部の筋再生修復が促進されたことが、片側 (SV 側) の咀嚼頻度が増加した主な要因であったと推察される。

損傷筋 (咬筋) における SV ペプチドによる筋活動特性変化が、摂食行動特性に如何なる影響を与えるか、両側筋損傷部に同一の条件 (SV もしくは PBS 注入) を付与して、自由摂食運動下での行動解析実験を行ったところ、PBS 群では摂食効率が筋損傷後 2 週目から 4 週目の間で上昇し、4 週目以降は変化がみられなかった。一方、SV 群では筋損傷 1 週後から 8 週目まで経時的に上昇傾向を示したことから、SV ペプチドは損傷部における

筋再生を早期より開始させ、再生筋の形成、あるいは線維径の増大変化が 4 週目以降も持続して起こっていた可能性が推察される。

筋損傷後の筋機能は成長発育による筋量の増加や協働筋の代償性肥大によっても変動することが知られているが⁴⁵⁾、両群ともに損傷後 8 週までの体重増加率、飼料の摂取量には殆ど差を認めず、PBS 群において 4 週目以降明らかな変化が観察されなかったことから、今回、観察期間中において成長要因や周囲筋の代償性変化による要因は摂食機能の変化に大きく影響していないものと考えられる。

本研究より、SV ペプチドは、組織の線維化をきたす重度の骨格筋損傷に際して、再生筋の形成を早期より開始し、損傷部における瘢痕形成の抑制と再生される筋線維径の増大を促すことで、機能回復の観点からも優れた効果を有することが明らかとなった。顎口腔領域を含めて、機能障害を伴う重度骨格筋損傷や口蓋裂等、先天的に筋の形成、発育不全を認める疾病に対する形成手術等において、本ペプチドを用いた新たな筋機能再生治療の可能性を示すものと考えられる。SV ペプチドは、分子量が小さく代謝されやすく^{12, 46)}、これまでに報告されている NGF や IGF-1 などの成長因子と比較して²⁸⁾ 微量 (20 ng) で十分な薬効を示す利点から、本研究で用いた損傷モデルにおいても心筋モデル同様に単回の投与で一定の効果を得ることができた⁴⁷⁾。損傷の程度や適用部位によって、今後、複数回投与による上乗せ効果の有無やインジェクション法以外に生体吸収性ハイドロゲル等の媒体を用いた投与方法

の有効性等、適用方法についても検討を要するとともに、損傷部において SV ペプチドが骨格筋再生を促進した分子生物学的機序を明らかにする上で、幹細胞や筋芽細胞の細胞生物学的特性に対するペプチドの効果について精緻に検証を行っていく必要がある。

結語

本研究にて筋損傷モデルを作製し、SV ペプチドが骨格筋再生治癒過程に及ぼす影響を検討した。その結果、SV ペプチドの投与は骨格筋の持つ自己再生能力を賦活化し、再生筋線維を増生させ、瘢痕形成を抑制することで筋損傷後の機能回復に有利に働くことが明らかとなり、SV ペプチドが有効な筋機能再生治療の 1 つとなる可能性が示唆された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻顎顔面口腔外科学講座(口腔外科学第一教室)古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の立案ならびに進行にあたり、終始御教示、御指導頂きました大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻分子病理学講座 山本浩文教授、河口直正准教授、濱田吉之輔准教授、大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻顎顔面口腔外科学講座(口腔外科学第一教室)田中晋講師に深甚なる謝意を表します。最後に本研究の円滑な進展のため、特別な御配慮、御協力を頂きました大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻分子病理学講座、歯学研究科口腔科学専攻顎顔面口腔外科学講座(口腔外科学第一教室)の教室員諸兄に深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) Bjordal K, Ahlner-Elmqvist M, Hammerlid E, Boysen M, Evensen JF, Biörklund A, Jannert M, Westin T, Kaasa S. A prospective study of quality of life in head and neck cancer patients. Part II : Longitudinal data. *Laryngoscope*. 2001; 111: 1440-1452.
- 2) Pavlath GK, Thaloer D, Rando TA, Cheong M, English AW, Zheng B. Heterogeneity among muscle precursor cells in adult skeletal muscles with differing regenerative capacities. *Dev Dyn*. 1998; 212: 495-508.
- 3) Ono Y, Boldrin L, Knopp P, Morgan JE, Zammit PS. Muscle satellite cells are a functionally heterogeneous population in both somite-derived and branchiomeric muscles. *Dev Biol*. 2010; 337: 29-41.
- 4) Bicknell S, McFadden LR, Curran JB. Frequency of pharyngoplasty after primary repair of cleft palate. *J Can Dent Assoc*. 2002; 68: 688-692.
- 5) Suarez-Cunqueiro MM, Schramm A, Schoen R, Seoane-Lestón J, Otero-Cepeda XL, Bormann KH, Kokemueller H, Metzger M, Diz-Dios P, Gellrich NC. Speech and swallowing impairment after treatment for oral and oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008; 134: 1299-1304.
- 6) Hurme T, Kalimo H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med Sci Sports Exerc*. 1992; 24: 197-205.
- 7) Huard J, Li Y, Fu F. Muscle injury and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am*. 2002; 84: 822-832.
- 8) Li Y, Cummins J, Huard J. Muscle injury and repair. *Curr Opin Orthop*. 2001; 12: 409-415.
- 9) Wu X, Corona BT, Chen X, Walters TJ. A Standardized Rat Model of Volumetric Muscle Loss Injury for the Development of Tissue Engineering Therapies. *Biores Open Access*. 2012; 1: 280-290.

- 10) Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal*. 2009; 3: 311-322.
- 11) Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S, Saitoh Y, Yamakido M, Taoooka Y, Sheppard D. The Integrin $\alpha 9\beta 1$ Bind to a Novel Recognition Sequence (SVVYGLR) in the Thrombin-cleaved Amino-terminal Fragment of Osteopontin. *J Biol Chem*. 1999; 274: 36328-36334.
- 12) Hamada Y, Norihara Y, Okazaki M, Fujitani W, Matsumoto T, Matsuura N, Takahashi J. Angiogenic activity of osteopontin-derived peptide SVVYGLR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 310: 153-160.
- 13) Uchinaka A, Hamada Y, Mori S, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N, Yamamoto H, Kawaguchi N. SVVYGLR motif of the thrombin-cleaved N-terminal osteopontin fragment enhances the synthesis of collagen type III in myocardial fibrosis. *Mol Cell Biochem*. 2015; 408: 191-203.
- 14) Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, Mori S, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N. Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts. *Cardiovasc Res*. 2013; 99: 102-110.
- 15) Pagel CN, Wasgeewatte Wijesinghe DK, Taghavi Esfandouni N, Mackie EJ. Osteopontin, inflammation and myogenesis: influencing regeneration, fibrosis and size of skeletal muscle. *J Cell Commun Signal*. 2014; 8: 95-103.
- 16) Uaesoontrachoon K, Yoo HJ, Tudor EM, Pike RN, Mackie EJ, Pagel CN. Osteopontin and skeletal muscle myoblasts: association with muscle regeneration and regulation of myoblast function in vitro. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40: 2303-2314.
- 17) Uaesoontrachoon K, Wasgeewatte Wijesinghe DK, Mackie EJ, Pagel CN. Osteopontin deficiency delays inflammatory infiltration and the onset of muscle regeneration in a mouse model of muscle injury. *Dis Model Mech*. 2013; 6: 197-205.
- 18) Liu M, Chino N, Ishihara T. Muscle damage progression in Duchenne muscular dystrophy evaluated by a new quantitative computed tomography method. *Arch Phys Med Rehabil*. 1993; 74: 507-514.

- 19) Dolber PC, Spach MS. Picrosirius red staining of cardiac muscle following phosphomolybdic acid treatment. *Stain Technol.* 1987; 62: 23-26.
- 20) Shi M, Ishikawa M, Kamei N, Nakasa T, Adachi N, Deie M, Asahara T, Ochi M. Acceleration of skeletal muscle regeneration in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human peripheral blood-derived CD133-positive cells. *Stem Cells.* 2009; 27: 949-960.
- 21) Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, Usas A, Fu FH, Huard J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve.* 2003; 28: 365-372.
- 22) Tsuji T, Yamamoto T, Tanaka S, Bakhshishayan S, Kogo M. Analyses of the facilitatory effect of orexin on eating and masticatory muscle activity in rats. *J Neurophysiol.* 2011; 106: 3129-3135.
- 23) Thomas NR, Peyton SC. An electromyographic study of mastication in the freely-moving rat. *Arch Oral Biol.* 1983; 28: 939-945.
- 24) Perry HT, Harris SC. Role of the neuromuscular system in functional activity of the mandible. *J Am Dent Assoc.* 1954; 48: 665-673.
- 25) Kumai T, Masuda T, Sadoyama T, Nagamura N. Lissajous figure method for ascribing masticatory movements. *Jpn J Oral Biol.* 1986; 28: 383-387
- 26) Deguchi T, Kumai T, Garetto L. Statistics of differential Lissajous EMG for normal occlusion and Class II malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994; 105: 42-48.
- 27) Baoge L, Van Den Steen E, Rimbaut S, Philips N, Witvrouw E, Almqvist KF, Vanderstraeten G, Vanden Bossche LC. Treatment of skeletal muscle injury: a review. *ISRN Orthop.* 2012; 26: 1-7.
- 28) Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br.* 2000; 82: 131-137.

- 29) Garg K, Corona BT, Walters TJ. Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury. *Front Pharmacol*. 2015; 6: 1-9.
- 30) Gharaibeh B, Chun-Lansinger Y, Hagen T, Ingham SJ, Wright V, Fu F, Huard J. Biological Approaches to Improve Skeletal Muscle Healing after Injury and Disease. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2012; 96: 82-94.
- 31) Egusa H, Kaneda Y, Akashi Y, Hamada Y, Matsumoto T, Saeki M, Thakor DK, Tabata Y, Matsuura N, Yatani H. Enhanced bone regeneration via multimodal actions of synthetic peptide SVVYGLR on osteoprogenitors and osteoclasts. *Biomaterials*. 2009; 30: 4676-4686.
- 32) Grogan BF, Hsu JR. Volumetric muscle loss. *J Am Acad Orthop Surg*. 2011; 19: 35–37.
- 33) Akiyama C, Kobayashi S, Nonaka I. Comparison of behavior in muscle fiber regeneration after bupivacaine hydrochloride- and acid anhydride-induced myonecrosis. *Acta Neuropathol*. 1992; 83: 584-589.
- 34) Nozaki M, Li Y, Zhu J, Ambrosio F, Uehara K, Fu FH, Huard J. Improved Muscle Healing after Contusion Injury by the Inhibitory Effect of Suramin on Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth. *Am J Sports Med*. 2008; 36: 2354-2362.
- 35) Hidaka O, Morimoto T, Masuda Y, Kato T, Matsuo R, Inoue T, Kobayashi M, Takada K. Regulation of masticatory force during cortically induced rhythmic jaw movements in the anesthetized rabbit. *J Neurophysiol*. 1997; 77: 3168-3179.
- 36) 「デュシェンヌ型筋ジストロフィー診療ガイドライン」 作成委員会 (編) . デュシェンヌ型筋ジストロフィー診療ガイドライン 2014. 南江堂, 東京.
- 37) Jones DA, Round JM, Edwards RHT, Grindwood SR, Tofts PS. Size and composition of the calf and quadriceps muscles in Duchenne muscular dystrophy -A tomographic and histochemical study-. *J Neurol Sci*. 1983; 60: 307-322
- 38) Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 2005; 33: 745-764.

- 39) Allen DL, Roy RR, Edgerton VR. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve*. 1999; 22: 1350-1360.
- 40) Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Järvinen M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc*. 1991; 23: 801-810.
- 41) Milner-Brown HS, Stein RB, Yemm R. Changes in firing rate of human motor units during linearly changing voluntary contractions. *J Physiol*. 1973; 230: 371-390.
- 42) Wictorin L, Hedegard B, Lundberg M. Cineradiographic studies of bolus position during chewing. *J Prosthet Dent*. 1971; 26: 236-246.
- 43) Wilding RJ. The association between chewing efficiency and occlusal contact area in man. *Arch Oral Biol*. 1993; 38: 589-596.
- 44) Devlin H, Wastell DG, Duxbury AJ, Grant AA. Chewing side preference and muscle quality in complete denture-wearing subjects. *J Dent*. 1987; 15: 23-25.
- 45) Plyley MJ, Barbara JO, Noble EG. Time course of changes in capillarization in hypertrophied rat plantaris muscle. *J Appl Physiol*. 1998; 84: 902-907.
- 46) Kantlehner M, Schaffner P, Finsinger D, Meyer J, Jonczyk A, Diefenbach B, Nies B, Hölzemann G, Goodman SL, Kessler H. Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem*. 2000; 1: 107-114.
- 47) Uchinaka A, Hamada Y, Mori S, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N, Kawaguchi N. Cardioprotective effects on ischemic myocardium induced by SVVYGLR peptide via its angiogenic-promoting activity. *Tissue Eng Regen Med*. 2015; 12: 162-171

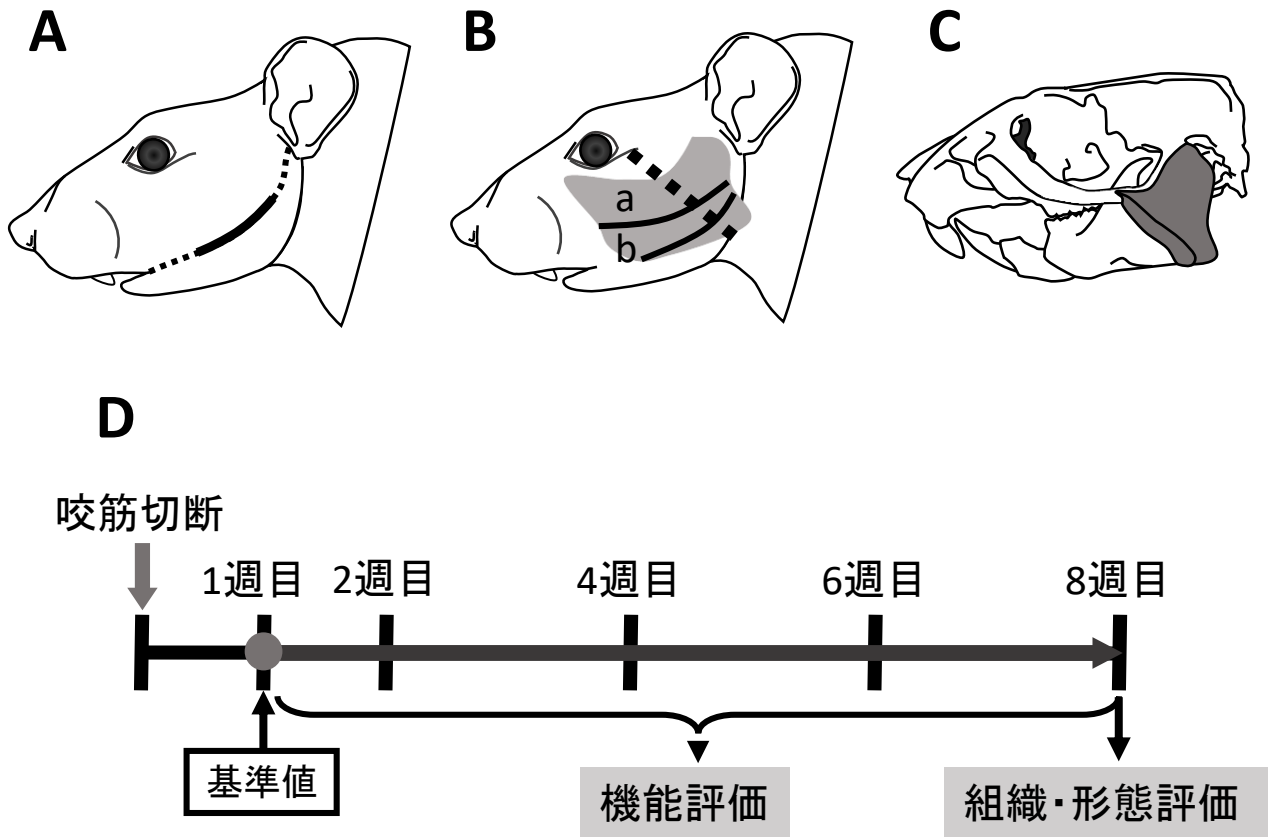


図 1 : 筋損傷モデルの作製、および評価方法

- A:** 頬部皮膚の外耳孔から口角を結ぶ直線上（点線）で、その中央部半分（実線）で皮膚切開を行った。
- B:** 咬筋（灰色）を明示し、表面に横走する顔面神経頬枝 (a) と下顎縁枝 (b)（実線）を温存し、外眼角から下顎角を結ぶ直線上（点線）で咬筋を切断した。
- C:** 咬筋の切断後の状態を示す（咬筋遠位断片のみ表示）。頬骨弓から下顎下縁まで下顎枝骨面まで切断し、断端より全層で切断できているのを確認した。
- D:** 術後 1 週目の測定値を基準値として、術後 1, 2, 4, 6, 8 週目で摂食行動および筋活動特性に関する機能評価を行い、術後 8 週目に組織形態回復の評価を行った。

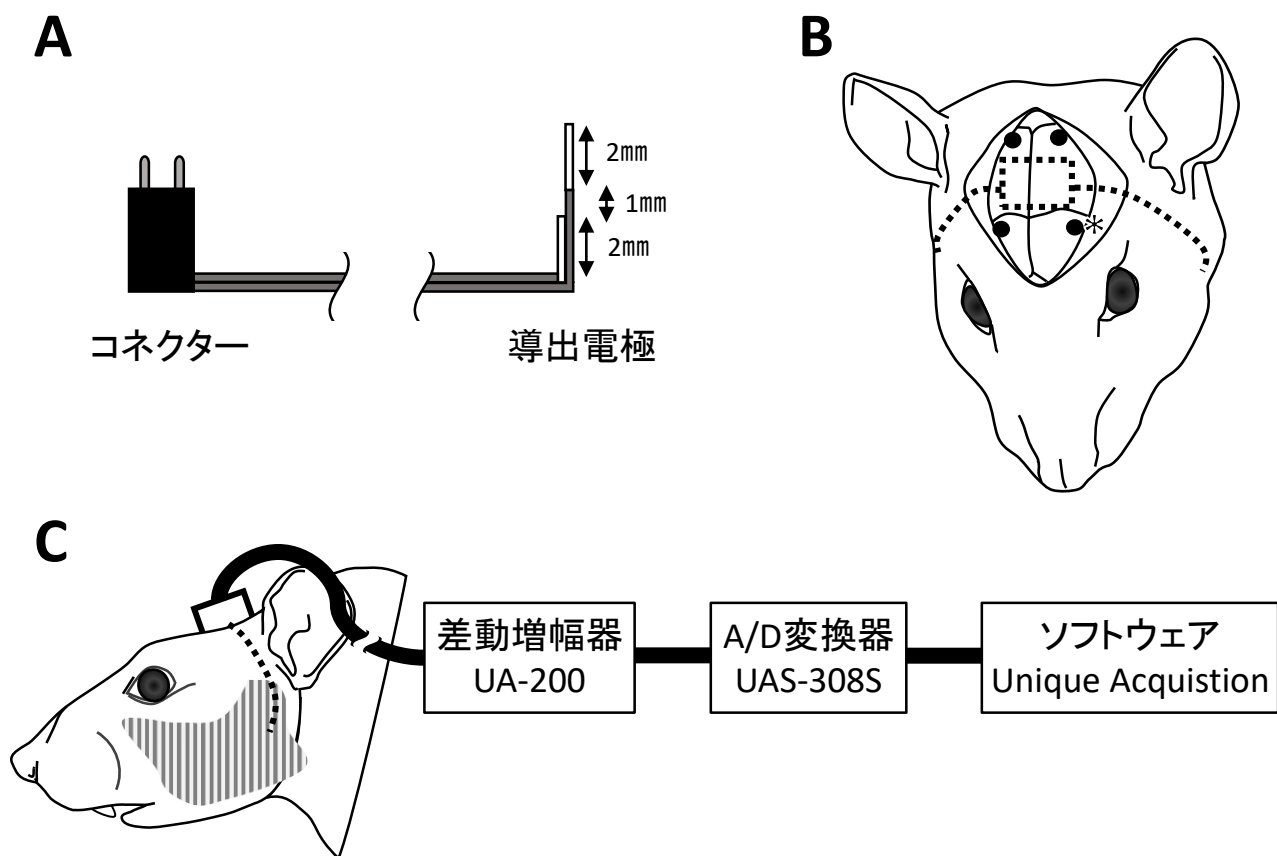


図 2 : 電極の埋め込み、および筋電図の測定

A: 導出電極 2 本と接地電極用導線をコネクターに接続し、頭部固定装置を作製した。

導出電極はテフロンで絶縁コートされた径 0.25 mm のステンレススチール撚り線導線を先端部 2 mm 露出させたもので、極間距離 1 mm の双極ワイヤー電極とした。

B: ラット頭頂部頭蓋骨を露出させ、ビス (●) を 4 ヶ所に埋入した。

左側前方部に埋入したビス (＊) は接地電極用とし、頭部固定装置 (点線) とビスで歯科用レジンをを用いて接着・固定を行った。

C: 導出用導線 (点線) を側頭部皮下に走行させ、電極先端を咬筋内部に埋入固定した。

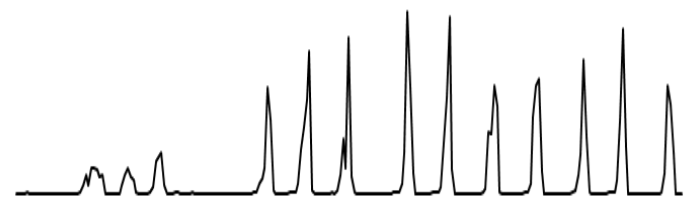
導出された筋信号は差動増幅器で増幅された後、A/D変換器を通してコンピューターに取りこまれ、ソフトウェアで処理された。

A

Raw EMG

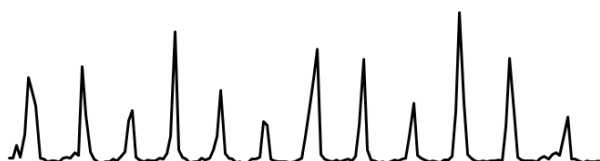


ARV EMG

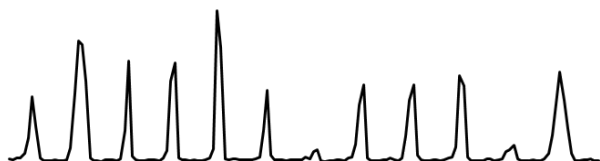


B

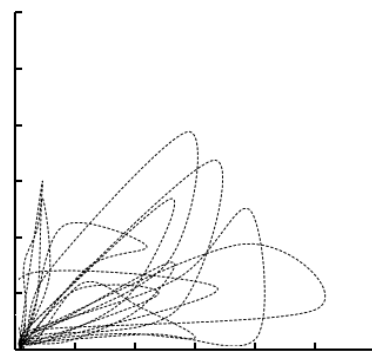
L-MM



R-MM



最大振幅に対する比率
(R-MM)



最大振幅に対する比率
(L-MM)

図 3 : 咬筋筋電図の分析法

A: 咀嚼運動時の咬筋筋電図 (Raw EMG) を全波整流・平滑化 (ARV) し、ARV 筋電図 (ARV EMG) を得た。咀嚼時の咬筋筋波形は、裁断相 (灰色) と臼磨相 (黒色) で異なる。裁断相は振幅の小さい波形で、臼磨相は振幅の大きい、等間隔の波形となる。

B: 同時に記録した左側咬筋 ARV 波形 (L-MM) と右側咬筋筋波形 (R-MM) を、X 軸・Y 軸にそれぞれプロットすることで、リサーチ筋電図を作製した。

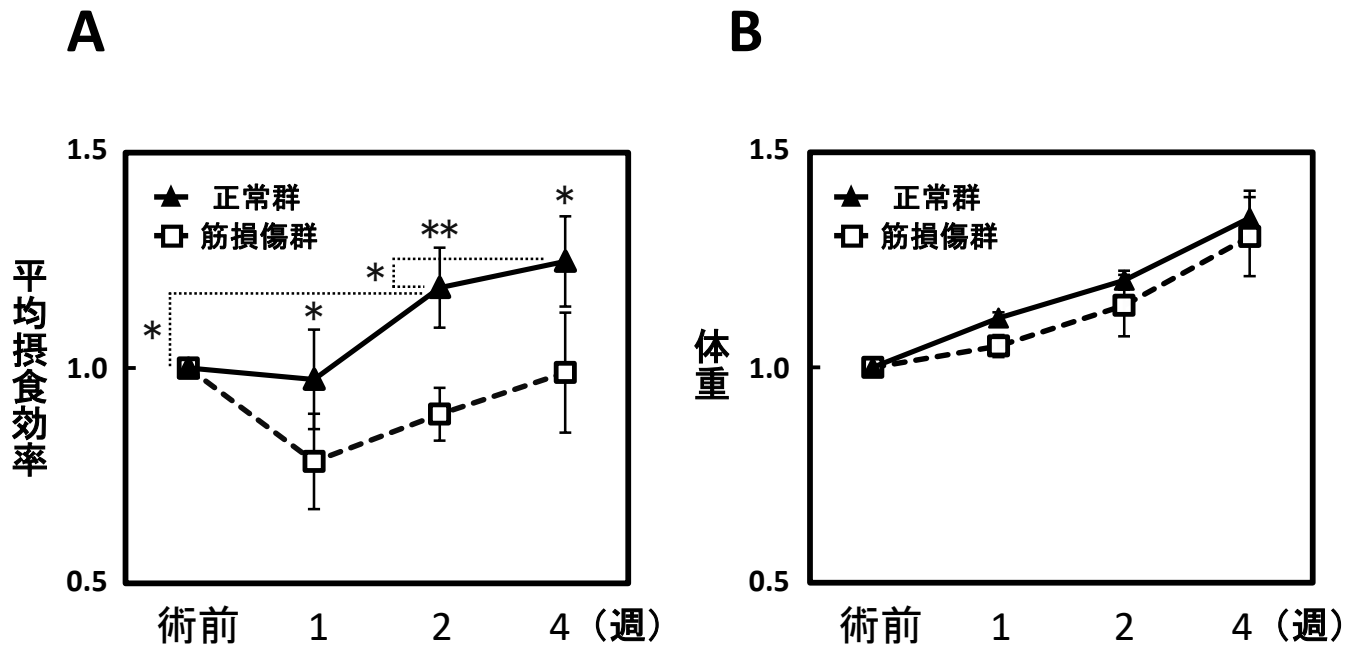


図 4 : 筋損傷モデルの成長変化ならびに摂食機能変化

A: 平均摂食効率の経時的変化を示す。術後は筋損傷群で正常群と比較し、有意に低い値を示した。また正常群では摂食効率の経時的な増加がみられた。

B: 体重変化を示す。群間に有意な差はなかった。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Two-way Repeated-Measures ANOVA , Post Hoc Test : Shaffer)

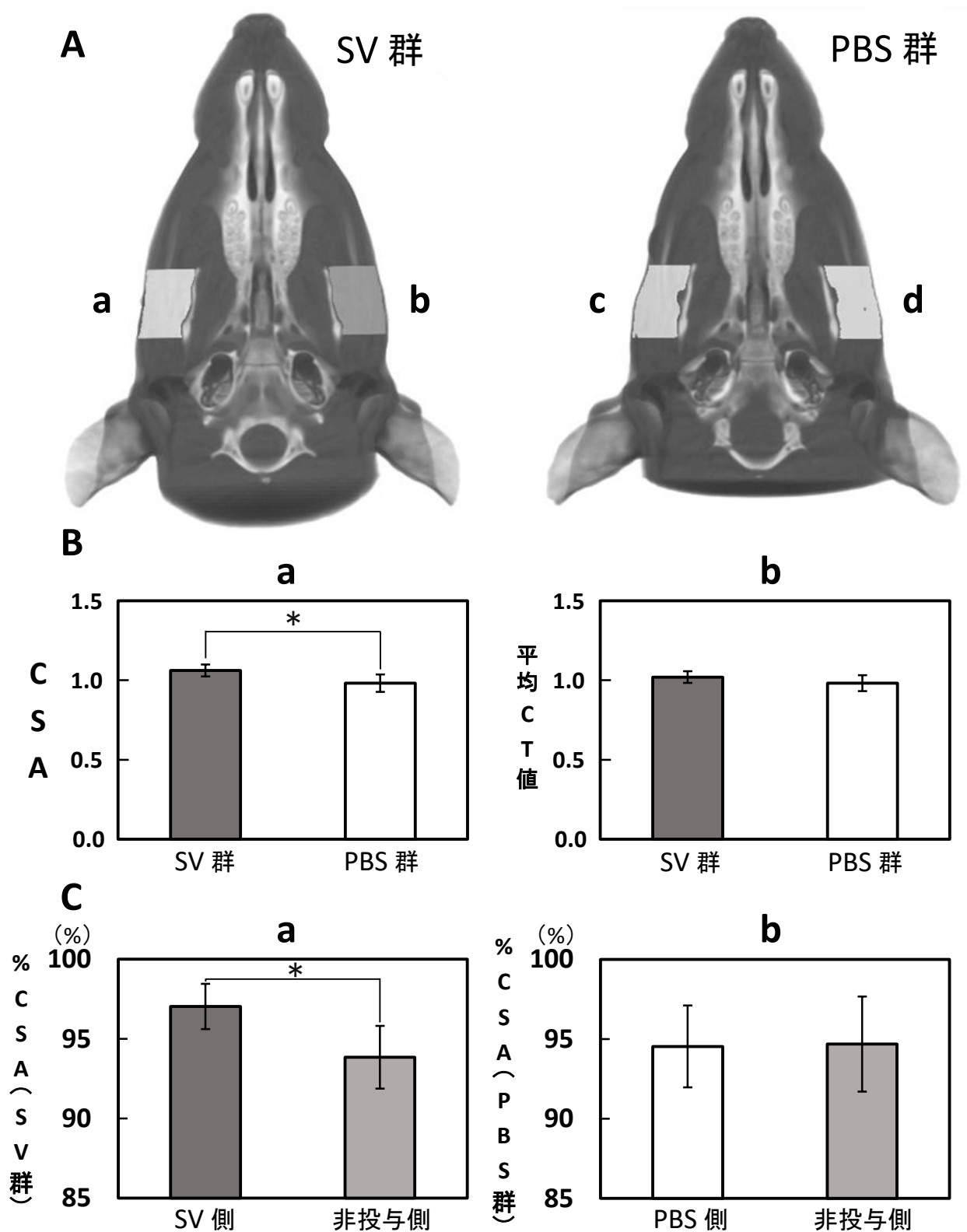
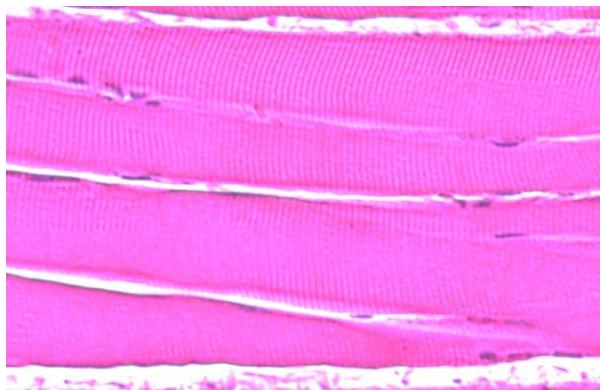
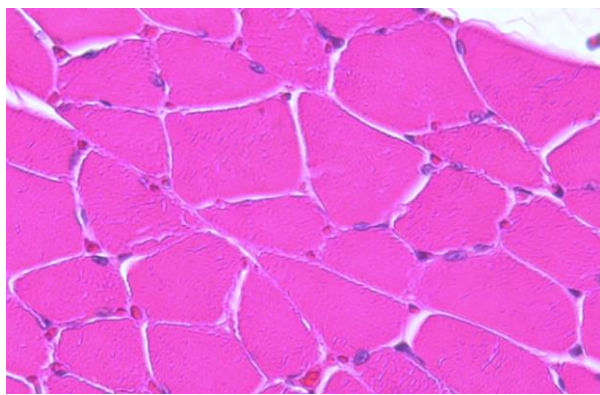
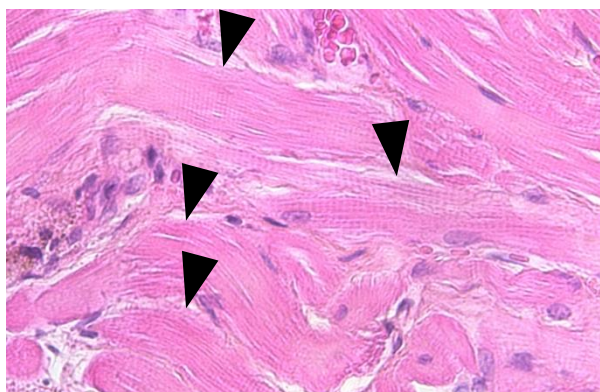
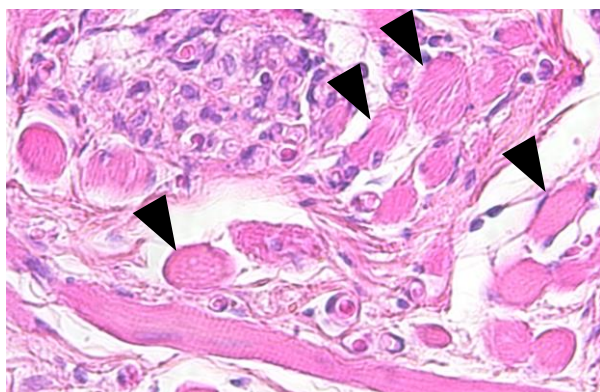
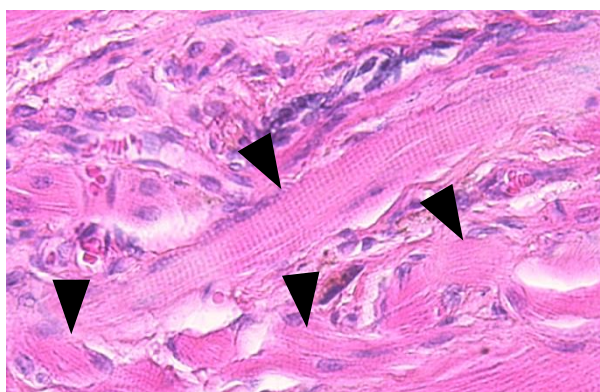
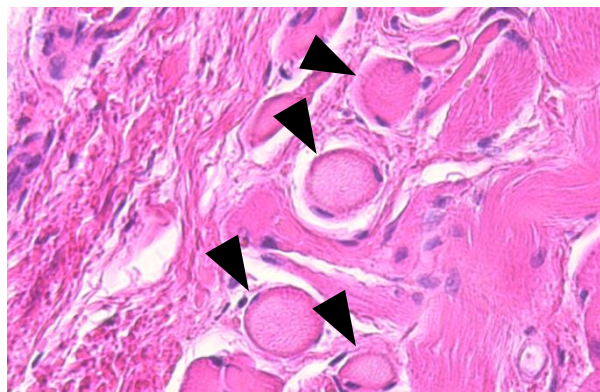


図 5 : CT画像解析の結果

A: ラット頭部横断面での CT 画像の典型例を示す。SV 群 (a,b) において、SV 側 (b) では咬筋外側表面になだらかな膨隆が観察されるが、非投与側 (a) においてはわずかに陥凹を認めた。PBS 群 (c,d) においては、両側で陥凹を認めた。

B: CSA (a) はSV 群では SV 側でわずかに大きな値を示し、非投与側との比率では、PBS 群より有意に高い結果であった。平均 CT 値 (b) は両群とも非投与側と差がなかった。
(* $p < .05$:Student's t -test)

C: %CSA の結果を示す。SV 群 (a) では SV 側で非投与側より有意に高い値を示したが、PBS 群 (b) では両側で有意差はなかった。(* $p < .05$:Paired t -test)

A**a****b****B****a**S
V
側**b****c**P
B
S
側**d**

50μm

図 6 : 再生筋線維の成熟

A: 正常群の咬筋の H-E 染色像を示す。筋線維縦断面 (a) では、筋線維の横紋構造が確認された。また筋線維横断面 (b) では、細胞辺縁に核を有する筋線維が確認された。

B: 術後 8 週目のラット咬筋の典型例として SV 群の SV 側 (a,b) および PBS 群の PBS 側 (c,d) の H-E 染色像を示す。筋線維縦断面 (a,c) で、瘢痕組織内に存在する筋線維 (▲) において横紋構造が確認された。また筋線維横断面 (b,d) で、瘢痕組織内に存在する筋線維 (▲) において細胞辺縁に核を有する様子が確認された。どちらも成熟した筋線維においてみられる構造であり、再生筋線維 (▲) はある程度成熟していると判断された。

B: 各群の筋線維径の平均値を示す。SV 群 (a) ではSV 側はコントロール側より有意に大きな径となっていたが、PBS 群 (b) では両側に有意差はなかった。(* $p < .05$: Paired t -test)

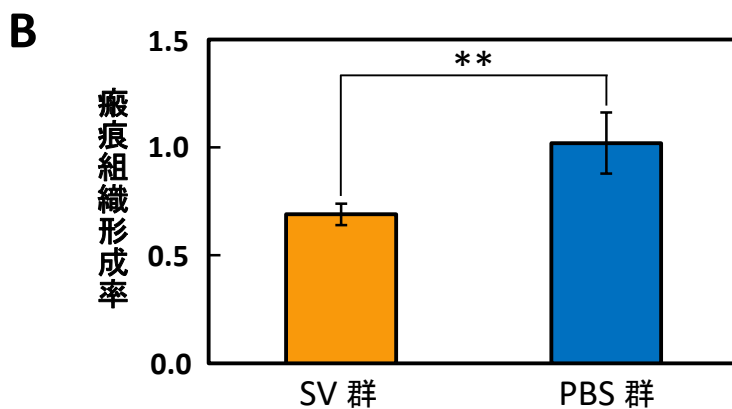
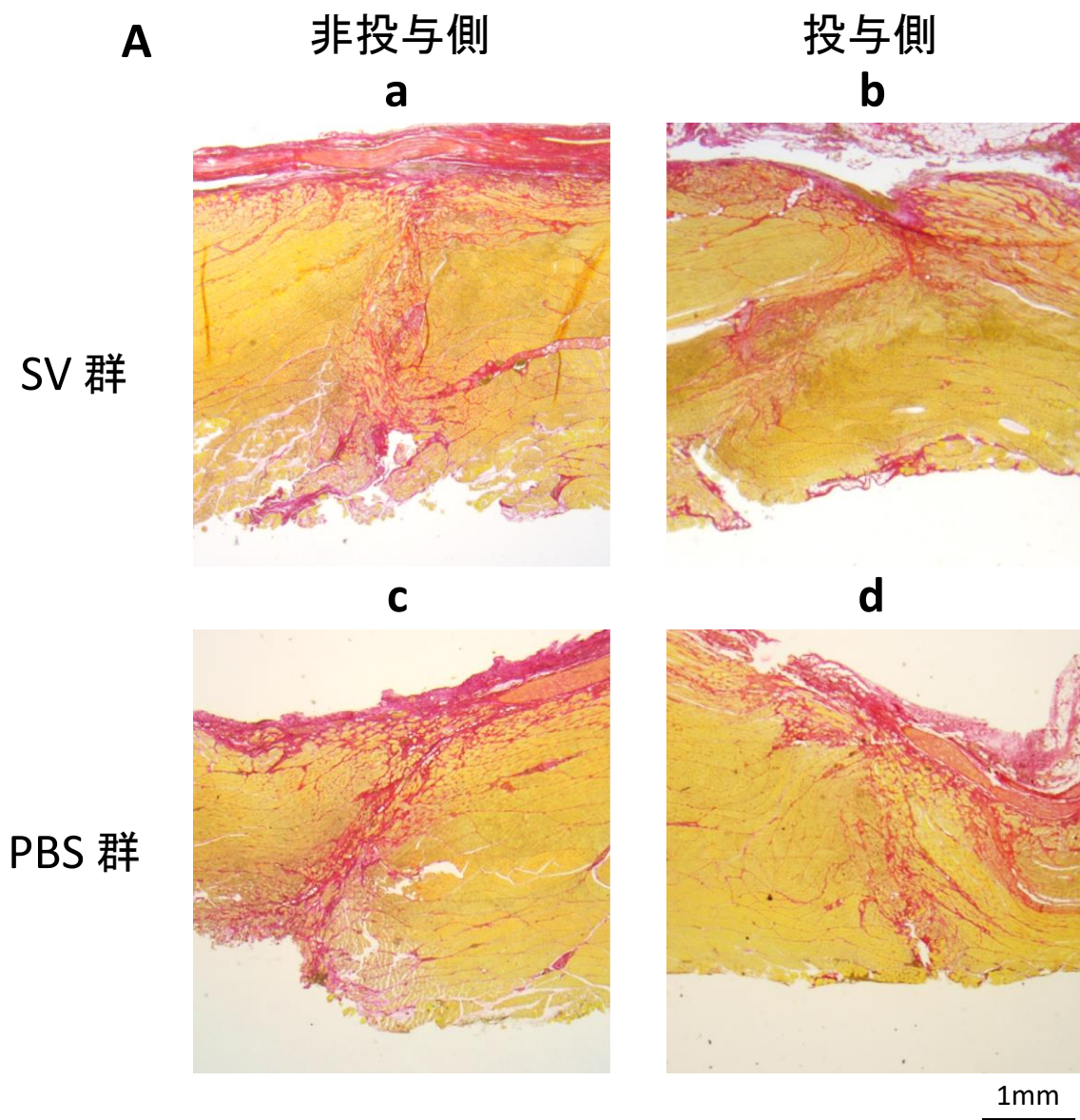


図 8 : 瘢痕組織形成量

A: シリウスレッド染色弱拡大像の典型例を示す。SV 群 (a,b) では非投与側 (a) で切断部相当部に広範囲に瘢痕組織 (赤色染色部位) がみられるが、SV 側 (b) では瘢痕組織は比較的小範囲に局限していた。PBS 群 (c,d) では、両側ともに広範囲の瘢痕組織を認めた。

B: 瘢痕組織形成量の結果を示す。SV 群では SV 側は非投与側より瘢痕面積は小さく、0.69 倍程度であったが、PBS 群では両側で同程度の瘢痕形成量であり、非投与側との比率では、SV 群は PBS 群と比較し、有意に小さい値となった。(** $p < .01$: Student's t -test)

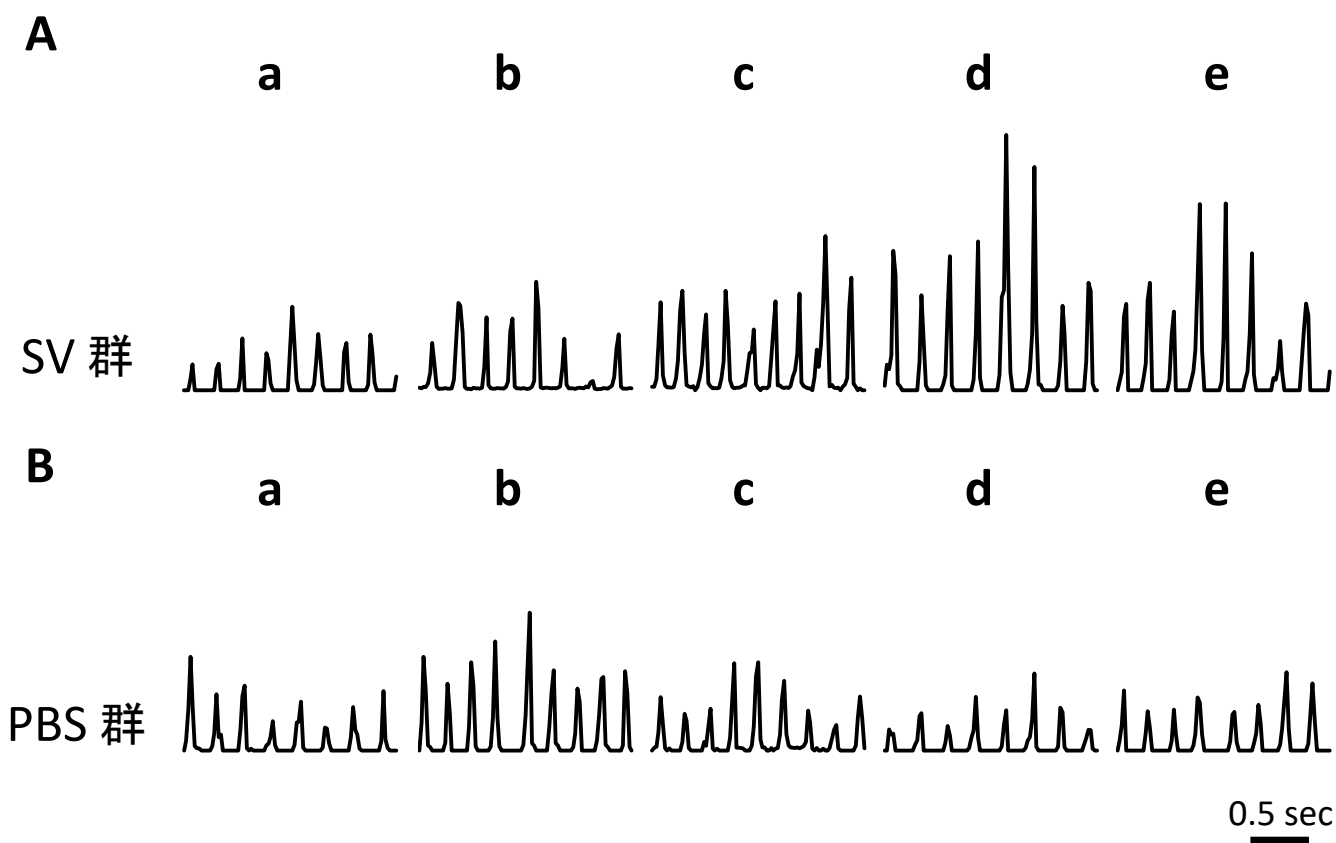


図 9 : 咬筋筋活動の経時的変化

経時的な筋活動の変化の典型例示す。術後 1 週 (a)・2 週 (b)・4 週 (c)・6 週 (d)・8 週 (e) の咬筋 ARV 波形を 2 秒ずつ並べた。

A: SV 群における筋活動の変化を示す。術後 1 週目から 6 週目まで (a-d)、筋活動の増加が観察され、術後 8 週目は若干の低下を認めた。

B: PBS 群における筋活動の変化を示す。術後 2 週目以降 (b-e) は術後 1 週目 (a) より増加を示すものの、その変化量は SV 群と比較し少なかった。

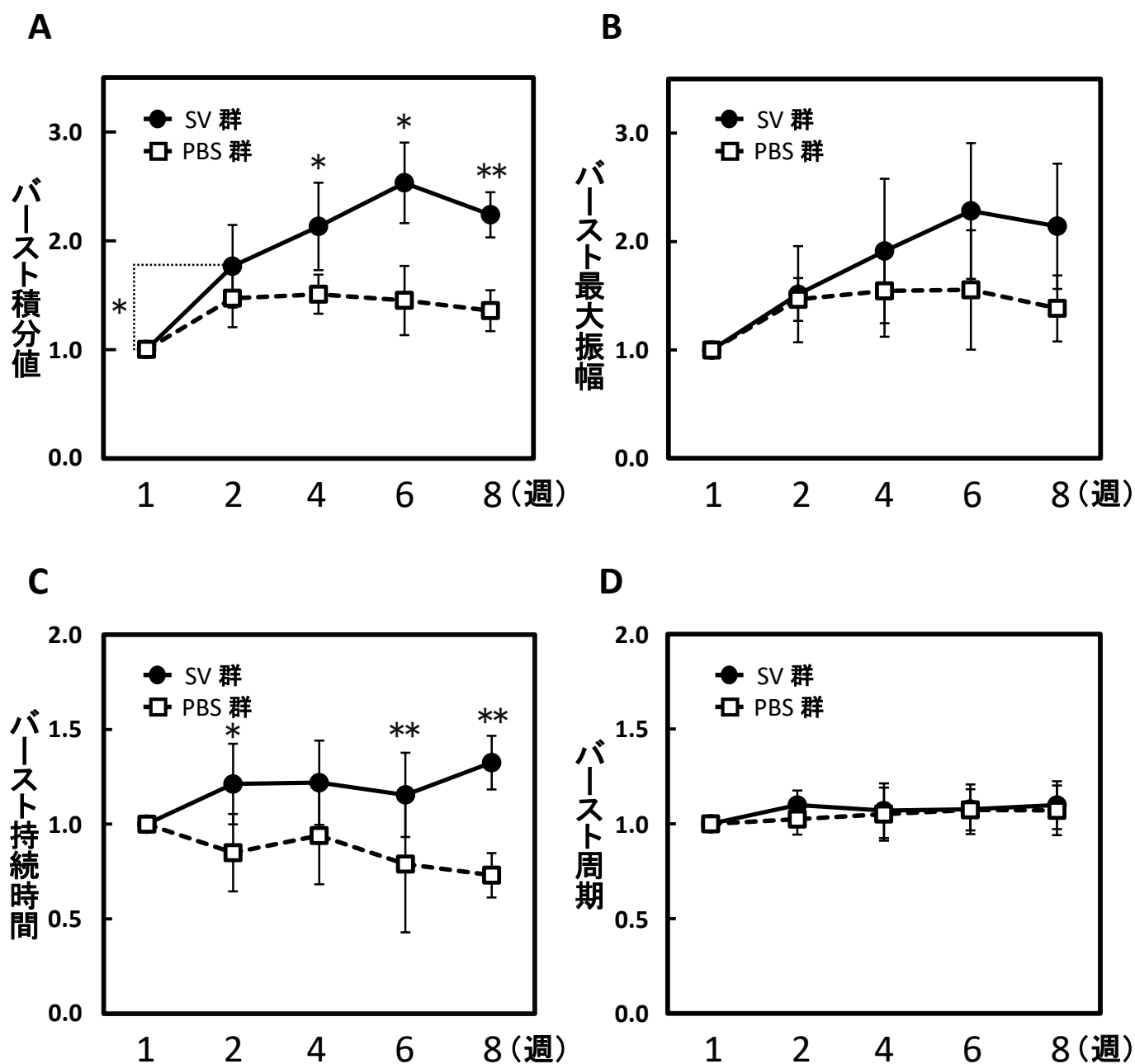


図 10: 咬筋バースト特性に関する各パラメータの分析

- A:** バースト積分値の経時的変化を示す。積分値はSV 群で術後 1 週目から術後 6 週目まで増加傾向を認め、術後 1 週目から 2 週目では有意な増加であった。SV 群は術後 4,6,8 週においてPBS 群に対し有意に高い値を示し、術後 1 週目の 2.5 倍程度まで増加していた。
- B:** バースト最大振幅の経時的変化を示す。最大振幅の経時的な変化は、積分値の変化と類似していたが、統計学的な有意差はなかった。
- C:** バースト持続時間の経時的変化を示す。持続時間は経時的に有意な変化はみられなかったものの、SV 群はPBS 群と比較し、術後 2,6,8 週目で有意に高い値を示した。
- D:** バースト周期の経時的変化を示す。周期はわずかな増加傾向を示すものの、有意差はなく、群間での有意差もなかった。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Two-way Repeated-Measures ANOVA, Post Hoc Test: Shaffer)

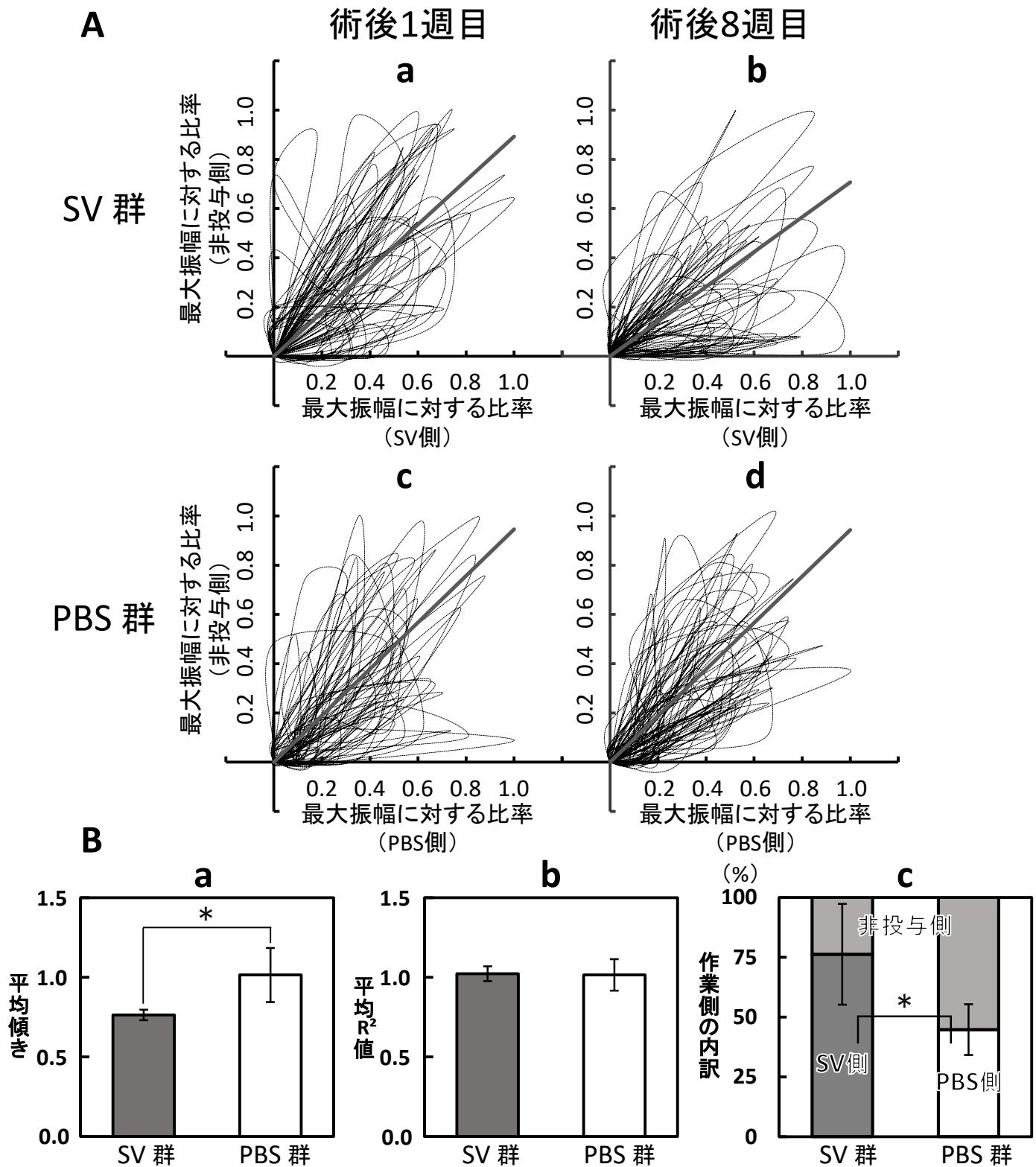


図 11 : リサーチ筋電図に関する各パラメータの分析

- A:** リサーチ筋電図の典型例を実線で示し、50 バーストでの平均の近似直線を灰色実線で示す。両群とも術後 1 週目 (a, c) では、左右に比較的均等に咀嚼していた。SV 群では術後 1 週目 (a) に対し、術後 8 週目 (b) で平均傾きが小さくなっており、左側に偏りの大きい咀嚼が増加していた。PBS 群では術後 8 週目 (d) で傾きに変化はなかった。
- B:** 咀嚼サイクルごとの傾きの平均値 (a) は術後 1 週目と比較し、PBS 群では変化なく、SV 群では 0.76 倍程度と PBS 群に対し、有意に低い値を示した。 R^2 値 (b) に関しては両群共に変化なく、有意差はなかった。作業側の内訳 (c) は、術後 8 週目で SV 群は 76% 程度を SV 側を作業側としており、PBS 群より有意に高い値となった。(* $p < .05$: Student's t -test)

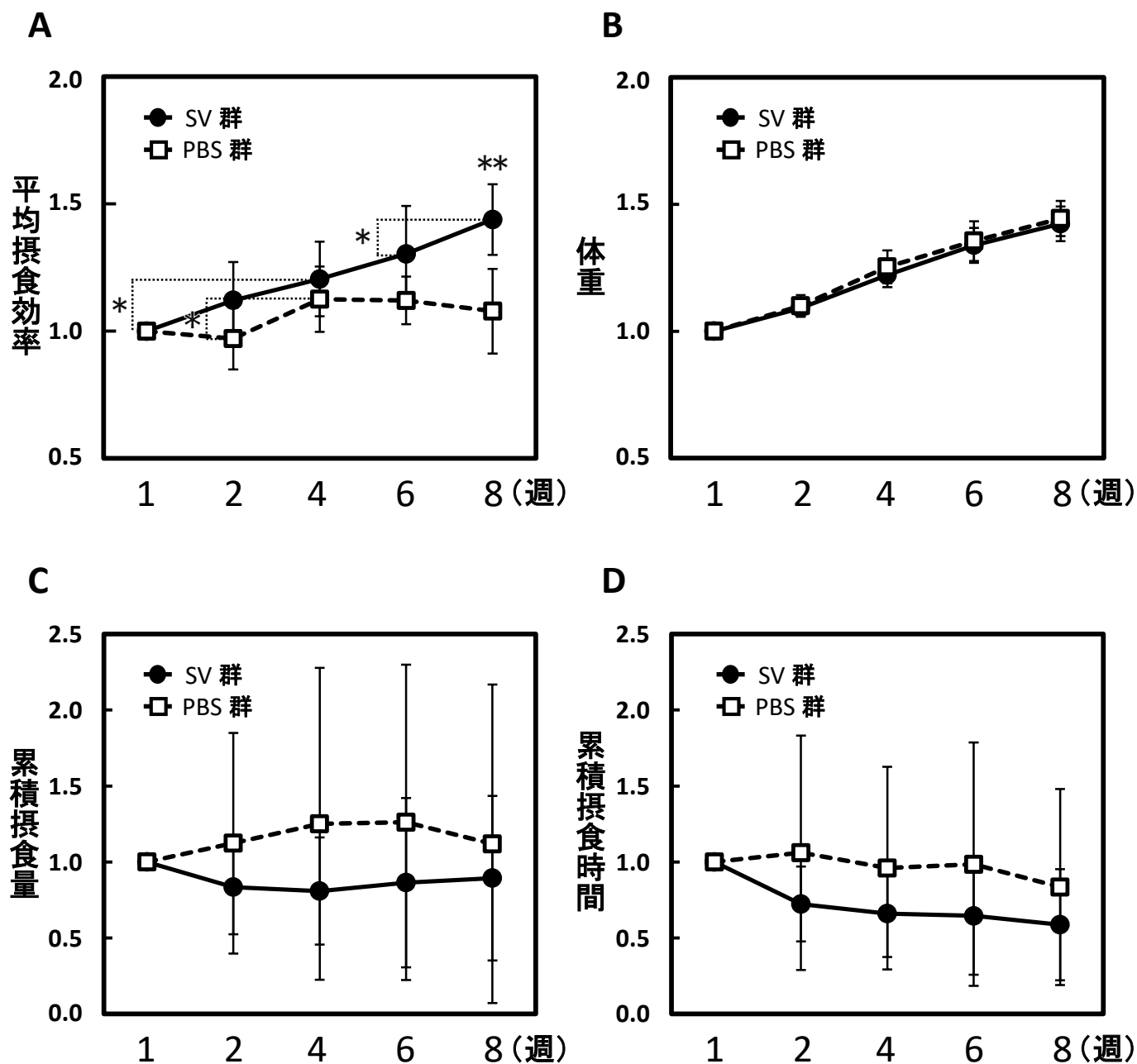


図 12: 摂食行動特性に関する各パラメーターの分析

A: 平均摂食効率の経時的変化を示す。摂食効率はSV群で術後1週目から増加傾向を認め、術後1週目から4週目、6週目から8週目で有意な増加を示した。術後8週目で術後1週目の1.4倍程度まで増加しており、PBS群と比較し、有意に高い値となった。

B: 体重変化の経時的変化を示す。体重は経時的な増加傾向を示したが、群間で有意差がなかった。

C: 累積摂食量の経時的変化を示す。摂食量は経時的な変化はほとんどなく、PBS群で高い値を示したが、統計学的有意差はなかった。

D: 累積摂食時間の経時的変化を示す。SV群で経時的に若干の減少傾向を認めたが、統計学的な有意差はなく、群間でも有意差はなかった。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Two-way Repeated-Measures ANOVA, Post Hoc Test: Shaffer)