研 究

内喉頭筋の組織呼吸に関する実験的研究

富 田 まり子

Experiments on Intratissue Respiration of
Intrinsic Laryngeal Muscles

Mariko Tomita

(Saga Medical School)

The intrinsic laryngeal muscles contract in a slightly different fashion with each movement during respiration, deglutition and phonation. The present study evaluates the oxygen metabolism of each intrinsic laryngeal muscle, with two different experimental procedures: (1) Immunohistochemical distribution of myoglobin in the intrinsic laryngeal muscles, and (2) tissue oxygen pressure in the intrinsic laryngeal muscles during electrical stimulation of the laryngeal nerves.

1. In the first series of experiments, the ratio of myoglobin-rich fibers accounted for 67.6% of the cricothyroid muscles, 47.4% of the posterior cricoarytenoid muscles, 33.9% of the lateral cricoarytenoid muscles, 31.6% of the thyroarytenoid muscles and 31.5% of the interarytenoid muscles.
2. No definite pattern was observed in the arrangement of myoglobin-rich fibers in any of the intrinsic laryngeal muscles.
3. In the posterior cricoarytenoid muscle, myoglobin-rich fibers were thicker than myoglobin-poor fibers. On the contrary, myoglobin-poor fibers were thicker in the thyroarytenoid, lateral cricoarytenoid and interarytenoid muscles. However, in the cricothyroid muscles there was no relationship between the amount of myoglobin and the diameter of the muscle fibers.
4. In the second series of experiments, during stimulation of the laryngeal nerves in the cricothyroid and thyroarytenoid muscles, intramuscular tissue oxygen pressures decreased with the onset of muscle contraction. The tissue oxygen pressure dropped further at 30 Hz than at 10 Hz and showed an even greater decrease at 60 Hz than at 30 Hz.
5. Tissue oxygen pressure decreased more in thyroarytenoid than in cricothyroid muscle.
6. The results of the present studies indicate that for laryngeal function oxygen supply is more necessary in slow muscles, such as the cricothyroid and posterior cricoarytenoid muscles than in fast muscles, such as the thyroarytenoid, lateral cricoarytenoid and interarytenoid muscles.

Key words: intrinsic laryngeal muscles, myoglobin, tissue oxygen pressure, intra-tissue respiration

目 次

I 緒言

II 内喉頭筋におけるミオグロビンの免疫組織化学的検索

1. 研究対象および方法

2. 研究成績

(1) 染色性の相違からみた筋線維の分布

(2) 染色性の相違と筋線維の直径との関係

3. 小括

III 内喉頭筋の組織内酸素分圧測定

1. 研究対象および方法

2. 研究成績

(1) 安静時の組織内酸素分圧

(2) 喉頭神経刺激時の組織内酸素分圧

1) 上喉頭神経外枝刺激時の前筋の変化

2) 反回神経刺激時の内筋の変化

3) 前筋, 内筋における組織内酸素分圧の変化の比較

3. 小括

IV 総括と考案

V 結語

緒 言

骨格筋は赤筋線維と白筋線維の2種類より構成され, 赤筋線維は, 酸化系の酵素を多く含み, 遅いが持続的な収縮を示す. 一方, 白筋線維は, 解糖系の酵素に富み, 敏速かつけいれん的な収縮を行う. 肉眼的に赤筋線維の多い筋は赤色調を呈し赤筋と称され, 反対に白筋線維の多い筋は白色調を呈しており白筋と称されている. また, 収縮特性の相違より, 前者は遅筋, 後者は速筋とも呼ばれている.

内喉頭筋は複雑かつ協調的な収縮を行い, 呼吸, 嚥下, 発声などの機能を担っている. 内喉頭筋についても各筋間で赤筋および白筋線維の分布差が認められており, その収縮特性についての研究は多々認められ, 各筋間における特性に相違のあることが指摘されている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾. またエネルギー代謝という観点からの研究も散見され⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾, 酵素の組織化学的検索により各筋間の相違が報告されている.

今回, エネルギー代謝に欠くことのできない酸素供給という観点に着目し, 各内喉頭筋の検討を行った. この目的のため二つの異なった実験方法を用いた. 第一に筋組織内で酸素運搬を担っているミオグロビンの検索である. 第2には酸素電極法による組織内酸素分圧の測定であ

る. この実験には手技上の問題もあり, 前筋および内筋について比較した. この結果, 各内喉頭筋の酸素供給について, 2, 3の知見が得られたので, 機能との関連について若干の考案を加え報告する.

内喉頭筋におけるミオグロビンの免疫組織化学的検索

1. 研究対象および方法

研究対象は, 10kg前後の成犬3頭である. イソゾール静脈麻酔後, 喉頭を輪状咽頭筋をふくめて一塊として摘出した. 10%ホルマリンにて48時間固定した後, 輪状甲状筋(前筋), 後輪状披裂筋(後筋), 外側輪状披裂筋(側筋), 甲状披裂筋(内筋), および横披裂筋(横筋)を分離した. さらに, これらの筋の走行と直角方向で, 約5mm幅の筋肉片を取り出した. なお, 今回対照としては輪状咽頭筋を用い, 同様に試料の作製を行った. 通常の方法にてパラフィン包埋とし, 約4μmの横断切片を作製後, ゼラチンスライドに装着した. キシレンで脱パラフィンし, アルコール〜水にて親水化した後, P A P法(peroxidase anti-peroxidase)にてミオグロビンを染色した.

1) 1% H₂O₂/メタノール5分間

2) PBS(phosphate buffer saline)洗浄

- 3) 1% normal swine serum 30分間
- 4) 抗ミオグロビン抗体 (×2000) 4℃ overnight
- 5) P B S 洗浄
- 6) anti-rabbit IgG 抗体 (×50) 45分間
- 7) P B S 洗浄
- 8) PAP (peroxidase-antiperoxidase complex) (×80) 45分間
- 9) PBS. tris buffer 洗浄
- 10) diaminobenzidine にて発色 2 ～10分間
- 11) ヘマトキシリン核染色
- 12) 脱水, 透徹, 封入

観察は、染色標本を同倍率のカラー写真に撮影し行った。筋線維をミオグロビンの染色性の相違によって分類し、各筋における筋線維の分布比率を求めた。さらに、筋線維の直径との相関についても検討した。

2. 研究成績

(1) 染色性の相違からみた筋線維の分布

PAP法によりミオグロビンは茶褐色に染色されるが、今回その染色性の相違より筋線維を2種類に分類した。つまり濃く染色された線維を Myoglobin-rich な線維、淡く染色された線維を Myoglobin-poor な線維とした。各筋について、摘出後検索した全筋線維に対する Myoglobin-rich な線維の占める比率を以下検討した(表1)。

1) 前筋 (図1)

Myoglobin-rich な線維の比率は、平均67.6

±12.2%, 最高83.6%, 最低50.0%であった。筋内での、Myoglobin-rich な線維と Myoglobin-poor な線維の分布の局在に一定の傾向は認められなかった。

2) 後筋 (図2)

Myoglobin-rich な線維の比率は、平均47.4 ±6.2%, 最高56.3%, 最低37.1%であった。各線維の分布の局在に一定の傾向は認められなかった。

3) 側筋 (図3)

Myoglobin-rich な線維の比率は、平均33.9 ±8.6%, 最高45.1%, 最低24.1%であった。各線維の分布の局在に一定の傾向は認められなかった。

4) 内筋 (図4)

Myoglobin-rich な線維の比率は、平均31.6 ±1.3%, 最高41.9%, 最低30.1%であった。遊離縁寄り、外側寄りでも、比率はほとんど同

図1 輪状甲状筋 (前筋) のミオグロビン染色 (×50)

図2 後輪状披裂筋 (後筋) のミオグロビン染色 (×50)

表1 全筋線維数に対する Myoglobin-rich な線維の占める割合	
	Myoglobin-rich な線維の数/ 全筋線維数 (%)
前筋	67.6 ± 12.2
後筋	47.4 ± 6.2
側筋	33.9 ± 8.6
内筋	31.6 ± 1.3
横筋	31.5 ± 1.6
輪状咽頭筋	52.6 ± 6.9

程度であり、また各線維の分布の局在にも一定の傾向は認められなかった。

5) 横筋 (図5)

Myoglobin-rich な線維の比率は、平均31.5 $\pm$ 1.6%, 最高33.1%, 最低29.3%であった。各線維の分布の局在に一定の傾向は認められなかった。

6) 輪状咽頭筋 (図6)

Myoglobin-rich な線維の比率は、平均52.6 $\pm$ 6.9%, 最高62.1%, 最低43.3%であった。各線維の分布の局在に一定の傾向は認められなかった。

(2) 染色性の相違と筋線維の直径との関係
筋線維の直径の算出にあたっては、日本光学社製ソフト『画像解析システムCOSMOZONE 98』を用いた(表2)。まず、カラー写真上で筋線維の断面積を測定し、その面積に相当する円を仮定した。さらに、その円の直径を求め、

筋線維の直径とした。

1) 前筋

Myoglobin-rich な線維の直径は、平均34.8 $\pm$ 4.9 μ m, 最高47.7 μ m, 最低22.8 μ mで、Myoglobin-poor な線維の直径は、平均33.8 $\pm$ 3.8 μ m, 最高46.8 μ m, 最低24.7 μ mであった。

2) 後筋

Myoglobin-rich な線維の直径は、平均37.8

図5 横筋(横筋)のミオグロビン染色 (×50)

図3 外側輪状披裂筋(側筋)のミオグロビン染色 (×50)

図6 輪状咽頭筋のミオグロビン染色 (×50)

図4 甲狀披裂筋(内筋)のミオグロビン染色 (×50)

表2 Myoglobin-rich な線維と Myoglobin-poor な線維の直径の比較

	Myoglobin-rich な線維	Myoglobin-poor な線維
前筋	34.8 $\pm$ 4.9	33.8 $\pm$ 3.8
後筋	37.8 $\pm$ 4.0	33.2 $\pm$ 5.7
側筋	30.5 $\pm$ 5.3	38.9 $\pm$ 5.1
内筋	25.0 $\pm$ 4.6	32.5 $\pm$ 5.2
横筋	31.4 $\pm$ 3.8	36.2 $\pm$ 5.1
輪状咽頭筋	35.3 $\pm$ 4.8	32.6 $\pm$ 4.5

(単位: μ m)

±4.0 μ m, 最高 50.7 μ m, 最低 28.0 μ m で, Myoglobin-poor な線維の直径は, 平均33.2±5.7 μ m, 最高51.2 μ m, 最低23.5 μ mであった。

3) 側筋

Myoglobin-rich な線維の直径は, 平均30.5±5.3 μ m, 最高 42.5 μ m, 最低 15.2 μ m で, Myoglobin-poor な線維の直径は, 平均38.9±5.1 μ m, 最高49.7 μ m, 最低22.9 μ mであった。

4) 内筋

Myoglobin-rich な線維の直径は, 平均25.0±4.6 μ m, 最高 41.4 μ m, 最低 16.8 μ m で, Myoglobin-poor な線維の直径は, 平均32.5±5.2 μ m, 最高44.4 μ m, 最低19.6 μ mであった。

5) 横筋

Myoglobin-rich な線維の直径は, 平均31.4±3.8 μ m, 最高 41.7 μ m, 最低 25.7 μ m で, Myoglobin-poor な線維の直径は, 平均36.2±5.1 μ m, 最高52.8 μ m, 最低19.9 μ mであった。

6) 輪状咽頭筋

Myoglobin-rich な線維の直径は, 平均35.3±4.8 μ m, 最高 44.8 μ m, 最低 21.4 μ m で, Myoglobin-poor な線維の直径は, 平均32.6±4.5 μ m, 最高50.9 μ m, 最低21.9 μ mであった。

後筋については, t 検定の結果, 1%の危険率で, Myoglobin-rich な線維のほうが太いことがわかった。側筋, 内筋, 横筋に関しては, 同様の検定の結果, Myoglobin-poor な線維の方が, 有意に太かった。前筋については, 両者の太さに有意差は認められなかった。なお対照として用いた輪状咽頭筋では, 後筋同様, Myoglobin-rich な線維のほうが太かった。

3. 小括

(1) すべての筋線維のうち Myoglobin-rich な線維の占める比率は, 前筋, 後筋, 側筋, 内筋, 横筋の順に大であった。対照として用いた輪状咽頭筋では, 後筋とはほぼ同様の分布を認めた。

(2) 各筋とも, Myoglobin-rich な線維と poor な線維の分布の局在に一定の傾向は認められなかった。

(3) 各線維の直径は, 後筋については Myoglobin-rich な線維のほうが太く, 側筋, 内筋, 横筋については, Myoglobin-poor な線維のほうが太かった。前筋については, 両者に有意差は認められなかった。また, 輪状咽頭筋では, Myoglobin-rich な線維のほうが太かった。

内喉頭筋の組織内酸素分圧測定

1. 研究対象および方法

研究対象は, 10kg前後の成犬12頭である。イソゾールにて静脈麻酔後, 気管切開にて気道を確保した上で, 実験を行った。組織内酸素分圧測定は, 喉頭神経刺激時の, 甲状披裂筋 (内筋), 輪状甲状筋 (前筋) について施行した。内筋は内喉頭筋の中で速筋群に, 前筋は遅筋群に位置し, また両者は手技上, 測定が比較的容易であるため, 対象として用いた。これに加えて, 血圧, 心拍数を同時記録した。

組織内酸素分圧測定には, PO₂ 測定装置 (POG-200 エム・ティー技研) を用い, 電極はニードル型白金鈹電極を用いた。calibration は, 38℃生理食塩水中に, zero solution を入れ 0mmHg を決定し, さらに room air の bubbling を行い, 150mmHg を決定し, この2点間で校正した。

循環系のモニタリングは, 血圧トランスデューサー (P-50 日本光電製) を設置し, ポリグラフを使用し, 血圧, 心拍数を同時記録した。

喉頭神経の刺激には, 刺激発生装置 (SEN-3201 日本光電製) を用いた。反回神経および上喉頭神経外枝を切断し, それらの末梢側を液体パラフィンに浸し, 0.1msec, supramaximum threshold にて刺激した (図7)。

2. 研究成績

(1) 安静時の組織内酸素分圧

安静呼吸時における前筋, および内筋の組織内酸素分圧について検討した。前筋, 内筋ともに種々の測定値が得られた。前筋では最低 8.8 mmHg, 最高 62.5 mmHg であるが, 大多数において, すなわち約80%は 15~40 mmHg の範囲に認

められた。内筋では最低 18mmHg, 最高 78.5mmHg であったが, 約70%は 40~60mmHg の範囲にみられ, 前筋より内筋に高い酸素分圧値が認められた(図8)。

(2) 喉頭神経刺激時の組織内酸素分圧

1) 上喉頭神経外枝刺激時における前筋の組織内酸素分圧の変化(図9)

30秒間の短時間刺激では, 20Hz, 40Hz, 60Hz のどの刺激頻度でも, 収縮開始後, 速やかに酸素分圧は低下しはじめ, 収縮後は, 徐々に元のレベルに戻った。120秒間の長時間刺激では, 収縮開始後, 30秒ないし60秒くらいまでは低下し続け, その後 plateau に達し, 収縮後は徐々に元のレベルに戻った。短時間, 長時間刺激ともに刺激頻度が増すに従い, 酸素分圧は, より低下する傾向があった。なお, 少数例においては, 20Hz の低頻度刺激で, 収縮開始後若干の酸素分圧の上昇をみたのち, 低下する場合が認められた。収縮終了後の酸素分圧の変化では, 徐々に元に戻る場合や, 上昇しその後徐々に

に減少し元のレベルに戻る場合の2種類のパターンが認められた。収縮終了後の酸素分圧のパターンと刺激時間や刺激頻度との間には一定の関係は認められなかった。なお, 前筋は, 40Hz 以上の刺激で強縮した。また, 筋収縮中の血圧, 心拍数の変化は全く認められなかった。

2) 反回神経刺激時における内筋の組織内酸素分圧の変化(図10)

変化のパターンは前筋と同様であった。つまり, 短時間刺激, 長時間刺激ともに, 刺激頻度が増すに従い, 酸素分圧はより低下する傾向があった。なお内筋は, 60Hz の刺激で強縮した。前筋と同様, 筋収縮中の血圧, 心拍数の変化は全く認められなかった。

3) 前筋, 内筋における組織内酸素分圧の変化の比較

上喉頭神経外枝刺激時における前筋の組織内酸素分圧の低下度と反回神経刺激時における内筋のそれとを比較した(表3)。両者とも刺激時間が長いほど, また刺激頻度が増加するほど

図7 喉頭神経刺激時の組織内酸素分圧測定 block diagram

表3 喉頭神経刺激時における前筋・内筋の組織内酸素分圧の低下

刺激時間		30 秒			120 秒	
刺激頻度		20Hz	40Hz	60Hz	20Hz	60Hz
前筋		2.95± 1.83 (n = 6)	5.09± 2.32 (n = 7)	5.45± 2.30 (n = 6)	5.44± 2.14 (n = 5)	7.77± 2.01 (n = 6)
内筋		11.23± 6.96 (n = 8)	14.82± 9.05 (n = 11)	15.43± 7.58 (n = 11)	19.88± 15.57 (n = 6)	25.45± 17.45 (n = 4)

(mmHg)

図8 安静時の組織内酸素分圧の出現頻度
A) 前筋 B) 内筋

酸素分圧はより低下する傾向があった。さらに、両者を比較した場合、すべての条件下で酸素分圧の低下度は内筋のほうが大きかった。

次に、各条件下で酸素分圧が低下する速度

を比較する目的で、変化値（低下度）の $1/\tau$ （0.63）倍に至るに要する時間を求めた（表4）。前筋、内筋とも刺激頻度が増すに従い、速く低下する傾向が認められた。しかし、各筋

図9 上喉頭神経外枝刺激時における前筋の組織内酸素分圧および血圧、心拍数の変化
(A) 短時間刺激 (30秒) (B) 長時間刺激 (120秒)

図10 反回神経刺激時における内筋の組織内酸素分圧および血圧、心拍数の変化
(A) 短時間刺激 (30秒) (B) 長時間刺激 (120秒)

表4 筋収縮中の組織内酸素分圧の低下速度
(低下度の $1/\tau$ (0.63) 倍に至るに要する時間)

刺 激 時 間	30 秒			120 秒	
	20Hz	40Hz	60Hz	20Hz	60Hz
前 筋	16.9± 5.8 (n = 5)	13.7± 5.5 (n = 7)	11.4± 5.6 (n = 6)	20.6±13.4 (n = 5)	19.6±14.2 (n = 5)
内 筋	14.8± 3.6 (n=14)	13.7± 4.0 (n=14)	12.7± 3.5 (n=12)	19.7± 6.2 (n=10)	13.8± 5.4 (n = 4)

(単位 秒)

の間では、有意差は認められなかった。

3. 小括

(1) 収縮中の酸素分圧は、前筋、内筋とも刺激時間が長いほど、また刺激頻度が増すほどより低下する傾向があった。

(2) 酸素分圧の低下度は、前筋、内筋を比較した場合、内筋の方が大きかった。

(3) 収縮中の酸素分圧は、各筋とも刺激頻度が増すに従い速く低下する傾向があった。しかし、各筋の間では、有意差はなかった。

総括と考案

喉頭は、気道の防御的括約機能という原始的な器官から発し、その後分化を繰り返しながら、呼吸、嚥下、発声という高次な機能を営む器官へと発達した。このような機能には、内喉頭筋の複雑かつ協調的な運動が関与している。内喉頭筋における収縮特性については、その特異性が種々報告されている^{1) 2) 3) 4) 5) 6) 13)}。Martensson ら²⁾は、犬内喉頭筋の収縮時間を測定し、各内喉頭筋間の相違について報告している。収縮時間は前筋で 35msec、後筋で 30 msec、内筋で 14msec、側筋では 16msec であり、前二者は相対的に遅い収縮特性を、後二者は相対的に速い収縮特性を有すると述べている。また、佐藤ら⁶⁾も、犬内喉頭筋の収縮時間と不完全強直から完全強直になる刺激頻度、いわゆる融合頻度を測定し報告している。収縮時間、および融合頻度はそれぞれ、前筋で38 msec、40Hz、後筋で 42msec、45Hz、内筋で

14msec、95Hz、側筋で 21msec、90Hz と報告している。つまり、前二者は相対的に遅い収縮特性を、後二者は相対的に速い収縮特性を有している。以上の結果から、犬内喉頭筋では前筋、後筋は遅く、内筋、側筋は速い収縮特性を有する筋であると言えそうである。

村上⁴⁾は、ネコ内喉頭筋の融合頻度を測定している。後筋は 45Hz、内筋は 75Hz、側筋は 65Hz であったと報告している。これは、後筋が遅い収縮を、内筋、側筋が速い収縮を行うと解釈でき、犬内喉頭筋と同様の傾向を示した。また、牛島³⁾は内喉頭筋以外のネコ諸骨格筋の収縮特性について、諸家の報告をまとめている。収縮時間および融合頻度はそれぞれ、速筋の代表である眼筋(内直筋)で 7.5~10msec、350Hz、腓腹筋で23~ 40msec、100Hz、遅筋の代表であるヒラメ筋で 94~120msec、30Hz であるとし、内喉頭筋の収縮特性は腓腹筋あるいはそれより速い筋と同程度と考えられる。すなわち、内喉頭筋は各筋間に収縮特性の差は認められるが、全身の骨格筋の中ではすべて速筋群に含まれるといえる。

進⁷⁾は、筋電図学的研究から内喉頭筋の収縮特性を検討している。前筋は呼気、発声、嚥下時に、後筋は呼気時に、phasic な放電をする以外にも常に持続性の放電をしているとし、側筋、内筋は呼気、発声、嚥下時に phasic な放電をするのみと報告している。すなわち前二者は tonic で遅い収縮をし、後二者は phasic

で速い収縮をしていると解釈できる。

骨格筋は、組織学的に赤筋線維と白筋線維の2種類の筋線維から構成されている。赤筋線維は、ミトコンドリアが豊富で酸化系の酵素に富み、遅いが **tonic** で持続的な収縮を行う。これに対し、白筋線維はミトコンドリアが少なく解糖系の酵素を多く含み、敏速で **phasic** な収縮を行う。赤筋線維の多い筋は、赤色調を呈することより赤筋とよばれている。赤筋は収縮速度が遅いため、機能的には遅筋ともよばれている。一方、白筋線維の多い筋は、白色調を呈することより白筋とよばれている。白筋は収縮速度が速いため、機能的には速筋とよばれている。筋線維に対する研究は、組織化学的手法の発達により種々報告されるようになった。

Engel¹⁴⁾ は、筋収縮の際エネルギー代謝系の酵素として欠くことのできない **ATP ase (pH 9.4)** を染色し、その活性の低い筋線維を **type I** 線維、活性の高い筋線維を **type II** 線維と名付けた。その後、**type I** 線維は酸化還元酵素 (**SDH, NADH**) の活性が高く、解糖系酵素 (**phosphorylase**) の活性が低いことがわかった¹⁵⁾。ゆえに好氣的代謝による持続的なエネルギー遊離が行われ、**tonic** で持続的な収縮を行っている。一方、**type II** 線維は、酸化還元酵素活性が低く、解糖系の酵素活性が高いことが知られている¹⁵⁾。すなわち、嫌氣的解糖系による爆発的なエネルギー遊離が行われており、**phasic** で爆発的な収縮を行っている。つまり、機能面を考え併せると **type I** 線維は赤筋線維と、**type II** 線維は白筋線維と対応すると考えられる。

内喉頭筋の筋線維における種々の酵素組織化学的研究は、Sahgal ら¹¹⁾ によって行われている。彼らは、**rhesus monkey** の内喉頭筋の **ATP ase, NADH, LDH, SDH, PAS** 染色を行い、筋線維の分類を行っている。**type II** 線維の比率は、後筋60%、前筋70%、内筋81%、側筋88%であったと報告している。すなわち、内喉頭筋では全体として **type II** 線維の比率が

高く、中でも内筋、側筋で高い比率を示した。

これは内喉頭筋が骨格筋全体でみた場合、速筋群に位置することを裏付けるものである。また、笠¹²⁾は、犬内喉頭筋を **ATP ase (pH 9.4)**, **ATP ase (pH 4.4)**, **SDH, NADH, phosphorylase** 染色を行い分類している。その結果、**type II** 線維の占める割合は、後筋60.2%、前筋47.2%、内筋83.2%、側筋87.9%、横筋90.4%であったとしている。この報告からも内筋、側筋に **type II** 線維の多いことが確認されている。さらに、内筋については、内側遊離縁から外側へいくに従って、**type I** 線維の比率が次第に減少していくとし、この連続変化は、発声のコントロールになんらかの意味をもつものであろうと推察している。

今回、組織呼吸、特に酸素供給という観点から、内喉頭筋間のエネルギー代謝の相違について検討を加えた。ミオグロビンは、酸素と結合親和性の高いヘム蛋白で、主として心筋や骨格筋に存在し、血中の酸素を筋組織内に運搬する機能をもっている。分子量は17600と小さく、筋細胞の細胞質中に含まれている。肉眼的に赤筋が白筋より赤く見えるのは、ミオグロビンの含有量が白筋に比して豊富なためとされている。言い換えれば、赤筋線維がすなわち **Myoglobin-rich** な線維、白筋線維がすなわち **Myoglobin-poor** な線維である。今日までミオグロビンの研究は、その多くが組織化学的手法を用いて行われてきた。ミオグロビンは水溶性で容易に拡散してしまうため、通常のパラフィン切片での染色は行えず、グルタルアルデヒドによる固定後、凍結切片を作製し染色されていた。しかし、この手法は手技的に煩雑であるため、今回はその後新たに開発された免疫組織化学による酵素抗体法を用いた。本法は、従来の組織化学的手法に比して、感度や特異性の点で非常に優れており、手技上もホルマリン固定・パラフィン切片で染色できるという利点がある^{16) 17)}。

組織化学的手法を用いたミオグロビンの研究

では、諸家により染色性の相違によって筋線維の分類がなされている。しかし、この分類法は、定性的なものであるため報告者によってまちまちで、5種類、3種類、あるいは2種類に分けられている¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾。今回は、染色性により2種類に分類することができた。そして、染色性の濃い筋線維を **Myoglobin-rich** な筋線維、反対に淡いものを **Myoglobin-poor** な筋線維と分類して取り扱った。しかし、この分類が **ATP ase (pH9.4)** の活性の違いにより区別された **type I** 線維と、**type II** 線維に完全に相応するものか否かは明確ではない。最近では、**type II** 線維をさらに **II A** と **II B** に分類し、**type I** 線維と **type II A** 線維が **Myoglobin-rich** な線維で、**type II B** 線維が **Myoglobin-poor** な線維であるとの報告もあり²¹⁾、ミオグロビン含有比率と **type I**、**II** 線維との相応性については今後の検討が必要であると思われる。

今回のミオグロビン染色の結果から、**Myoglobin-rich** な線維は前筋、後筋に多く、内筋、側筋、横筋には少ないという結果を得た。すなわち、前筋、後筋のほうがより酸素の供給が豊富であり、内筋、側筋、横筋は前二者に比して酸素の供給が低いと思われた。今回、対照として用いた輪状咽頭筋は、**upper pinch cock** として常時食道入口部を閉鎖しており、嚥下時時のみ弛緩する。すなわち、常に持続的な収縮を行っている特殊な筋と考えられる²²⁾²³⁾²⁴⁾。この筋のミオグロビン含有比率は後筋と同程度であり、両者とも持続的な収縮に関与する点から考えれば、同程度の酸素供給が行われている結果と類推できた。

さらに、今回、ミオグロビン含有比率と筋線維直径との関係についても検討を加えた。**Ranvier**²⁵⁾は、ウサギの下肢筋について、赤筋線維の直径が白筋線維より小さいことを報告した。また、笠²⁴⁾は成犬の下咽頭収縮筋について、**type I** 線維が **type II** 線維より小さかったと報告した。この様に筋線維別に直径の大小が

報告されているが、ミオグロビン染色では明確な差は認めなかった。菊地²⁶⁾は、ラットに木につかまらせて体重を支える静的負荷をかけたところ、赤筋線維17.1%、白筋線維6.3%と赤筋線維の肥大率が大であり、トレッドミル走による短時間の動的負荷では逆に白筋線維の肥大率が大であったと述べている。ミオグロビン染色では、側筋、内筋、横筋は **Myoglobin-poor** な線維のほうが大きく、後筋、輪状咽頭筋は **Myoglobin-rich** な線維のほうが大きかった。側筋、内筋、横筋は速筋の性質を有しており、後筋、輪状咽頭筋は遅筋の性質を有している。この点を考慮すれば、各筋ともその性質を担っているものの筋線維が太いということであり、これも一種の運動負荷と考えると興味ある結果と思われた。

組織内酸素分圧測定には、微小白金電極による酸素電極法を用いた。酸素電極法とは、電解分析法の一種であるポーラログラフィーの一変法である。つまり、陽陰極間に適正な電圧（印加電圧）が加えられることによって、陰極にあたる白金電極に分極している水素イオンが溶存酸素によって脱分極され脱分極電流が生じる。この脱分極電流が酸素の拡散電流と呼ばれ、陰極近傍の酸素濃度に比例する。図11は、空気と平衡した生理食塩水中に酸素電極を入れ、印加電圧を徐々に増加したときの電流電圧曲線である。0.3~0.6Vの間では **plateau** を形成しており、この範囲では電極表面で $4\text{H}^+ + 4\text{e} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ のような還元反応が生じ、電極周囲で還元された酸素の量に比例して脱分極電流が流れ、電流値が酸素分圧を表すことになる²⁷⁾。本実験では、印加電圧を0.5Vとした。

組織内酸素分圧は酸素の需要と供給のバランスにより決定されるが、これには自律神経や酸塩基平衡など種々の要因が関与している。しかし、主として組織内酸素分圧の変化は血流の変化とほぼ同様の動態を示すと考えられている。安静時における組織内酸素分圧は同一筋内でも部位により異なることはすでに報告されてい

る²⁸⁾²⁹⁾。その理由として、古瀬ら³⁰⁾は、電極と毛細血管との距離や毛細血管自体でも動脈側と静脈側による違いによって組織内酸素分圧は左右されるとしている。今回の結果でも前筋、内筋とも組織内酸素分圧は広範囲にわたる分布を示した。

筋収縮時の筋血流に関する報告は、今までに散見される。低頻度刺激による弱い収縮では、筋血流は収縮の強さに比例して増加していく³¹⁾³²⁾。しかし、高頻度刺激による強い収縮では、筋血流は漸減傾向をとる。これは筋内圧上昇により筋組織内の血管が圧迫されて筋血流が減少するためと考えられている³²⁾。また、収縮終了後の筋血流の変化については、収縮直後の急激な血流の増加、**postcontraction peak flow**と、その後一旦低下した後再び生じる増加、**postcontraction hyperemia** が知られている³²⁾。**postcontraction peak flow** は、筋収縮中、血流が減少するような強い収縮で出現している。これは、筋収縮中の筋血流障害が収縮の終了とともに消失し、急激に血流が増大するためといわれている。一方、**postcontraction hyperemia** は、比較的弱い収縮でも認められる。これは、筋収縮によって生じた代謝物質による血流増加と推察されている。喉頭の血流動態に関する研究として、Yagi³³⁾ は、喉頭静脈より流出する血液量を測定し、喉頭の血流

は平均6.7ml/minであったと述べている。さらに、両側反回神経を電気刺激し、血流の変化を測定している。刺激頻度が増加するに従い血流は増加し、15Hz で最高に達し、15Hz 以上の刺激頻度になると、逆に血流は徐々に減少している。つまり、15Hz 以上の高頻度刺激では、喉頭筋が強い収縮をおこして血流は減少するのである。以上のように、筋収縮時の血流の動態については、すでに詳細な報告がなされているが、収縮中の筋組織内酸素分圧の変動に関する研究は少ない。斎藤³⁴⁾ は、家兎の大腿四頭筋を用い、筋血流と筋組織内酸素分圧の変化を同時に連続測定している。低頻度刺激による弱い収縮では組織内酸素分圧は、筋血流の変化と一致して上昇し、収縮後は徐々に元のレベルにもどっている。しかし、高頻度刺激による強い収縮では組織内酸素分圧は減少している。これは筋内圧上昇による筋血流障害の結果とみられている。しかし、収縮後の組織内酸素分圧の変化については、一定の傾向を認めていない。

今回、手技上比較的測定が容易な前筋、内筋について組織内酸素分圧測定を行った。内喉頭筋の中でも前筋は遅筋群に、内筋は速筋群に位置するためこの二者をその代表と考え検討を加えた。前筋、内筋とも収縮中の酸素分圧は低下することが分かった。しかし、20Hz という低頻度刺激の場合は、刺激開始直後、若干酸素分

図11 生理食塩中における酸素電極のポーラログラム

圧の上昇を認めた後、低下する場合もあった。また収縮後の酸素分圧の変化では、一定の傾向は認められなかった。これは阿部³²⁾の報告と一致している。すなわち、収縮中の酸素分圧の低下は、筋内圧上昇による血流の障害と考えられる。前筋、内筋の変化を比較した場合、収縮中の酸素分圧の低下は前筋の方が小さかった。すなわち前筋の方が内筋に比し、収縮中血流障害が少なく、血流が良好に保たれていると考えられた。

前筋は呼吸、発声、嚥下時の **phasic** な収縮以外にも、常に持続的な収縮を行っている。後筋も、呼吸時の **phasic** な収縮以外にも常に持続的な収縮を行っている。このためには持続的なエネルギーが必要で、好氣的代謝が盛んに営まれ、多くの酸素を必要とすると思われる。これに対し、内筋、側筋、横筋は声門の閉鎖に関与し、呼吸、発声、嚥下時のみ **phasic** な収縮を行っている。**phasic** な収縮には爆発的なエネルギーが必要で、このためにはむしろ、嫌氣的代謝がより関与し、酸素をあまり必要としないと考えられる。ミオグロビン染色より、**Myoglobin-rich** な線維は前筋、後筋に多く、内筋、側筋、横筋に少ないという結果を得た。つまり、前筋、後筋のほうが、内筋、側筋、横筋に比して酸素の供給が豊富であると考えられ、各筋の機能との関連性についても興味深い。また、組織内酸素分圧測定より、収縮中の酸素分圧の低下は、前筋のほうが内筋より小さいという結果を得た。つまり、これは前筋のほうが、内筋に比して収縮中血流が良好に保たれていると考えられる。以上のように、内喉頭筋を組織呼吸という点から考えた場合、前筋、後筋は持続的な収縮に、内筋、側筋、横筋は **phasic** な収縮に適した酸素の供給がなされており、各筋の機能を裏付けるものと思われた。

結 語

内喉頭筋を組織呼吸、特に酸素供給の相違という観点に注目し、ミオグロビン染色および組織内酸素分圧測定を行い、以下の結果を得た。

1) **Myoglobin-rich** な線維の占める比率は前筋、後筋、側筋、内筋、横筋の順に大きかった。

2) 各筋とも **Myoglobin-rich** な線維と **poor** な線維のばらつきに一定の傾向は認められなかった。

3) 各線維の直径は、後筋については **Myoglobin-rich** な線維の方が大きく、側筋、内筋、横筋については **Myoglobin-poor** な線維の方が大きかった。前筋については有意の差は認められなかった。

4) 筋収縮中の組織内酸素分圧の変化は、前筋、内筋とも刺激時間が長いほど、また刺激頻度が増すほど、より低下する傾向があった。

5) 前筋、内筋を比較した場合、内筋の方が酸素分圧はより低下した。

6) 呼吸、嚥下、発声に際し、前筋、後筋は持続的な収縮を、内筋、側筋、横筋は **phasic** な収縮を行っており、各筋の酸素供給の相違は、その収縮特性に合理的であると思われた。

稿を終わるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました進 武幹教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究に直接の御指導、御鞭撻を戴きました松尾浩一講師に衷心より謝意を表します。さらに、実験に御協力戴いた教職員各位に感謝致します。

なお、本論文の一部は第65回日耳鼻福岡県地方部会学術講演会（1986年2月）、および第87回日本耳鼻咽喉科学会総会学術講演会（1986年5月）において口演した。

参考文献

- 1) 広戸幾一郎、平野 実、豊住頼一、他：喉頭筋の機能。耳鼻臨床 57 : 1~9, 1964.
- 2) Martensson A and Skoglund CR: Contraction properties of intrinsic laryngeal muscles. Acta Physiol Scand 60 : 318~336, 1964.
- 3) 牛島達次郎：喉頭筋の機械的収縮特性に関する実験的研究。日耳鼻 71 : 1494~1509, 1968.
- 4) 村上 泰：喉頭筋収縮力の Biophysics —特に声帯運動との関連性を中心として—。日耳鼻 75

- : 800~808, 1972.
- 5) 平野 実: 音声外科の基礎と臨床. 耳鼻 21: 239~440, 1975.
 - 6) 佐藤文彦, 矢野原邦生, 竹之内智, 他: 内喉頭筋の収縮特性と声門運動. 日耳鼻 85: 951~956, 1982.
 - 7) 進 武幹: 内喉頭筋の作動様式に関する筋電図学的研究. 耳鼻臨床 55: 472~492, 1962.
 - 8) 富田英寿, 小池祐一, 富田春英: 喉頭筋の組織化学的研究. 耳鼻 13: 286~294, 1967.
 - 9) 川野 璋: 内喉頭筋の生化学的および電子顕微鏡学的研究. 耳鼻 14: 306~343, 1968.
 - 10) Hall-Craggs ECB: The contraction times and enzyme activity of two rabbit laryngeal muscles. J Anat 102: 241~255, 1968.
 - 11) Hast SV: Histochemistry of primate laryngeal muscle. Acta Otolaryngol 78: 277~278, 1974.
 - 12) 笠 誠一: 内喉頭筋の酵素組織化学的研究. 耳鼻 28: 394~402, 1982.
 - 13) Hirose H, Ushijima T, Kobayashi T, et al: An experimental study of the contraction properties of the laryngeal muscles in the cat. Ann Otol 78: 297~306, 1969.
 - 14) Engel WK: The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular diseases. Neurology (Minneapolis) 12: 778, 1962.
 - 15) White A: 生化学(鈴木 旺, 他訳). 1076~1095 頁, 広川書店, 東京, 1979.
 - 16) 向井 清: パラフィン切片を使用した免疫組織化学. 病理と臨床 2: 1475~1478, 1984.
 - 17) 川生 明: 免疫組織化学の技術. 病理と臨床 2: 1401~1417, 1984.
 - 18) James NT: Histochemical demonstration of myoglobin in skeletal muscle fibres and muscle spindles. Nature 219: 1174~1175, 1968.
 - 19) Morita S, Cassens RG and Briskey EJ: Localization of myoglobin in striated muscle of the domestic pig; benzidine and NADH-TR reactions. Stain Technology 44: 283~286, 1969.
 - 20) Morita S, Cassens RG and Briskey EJ: Histochemical localization of myoglobin in skeletal muscle of rabbit, pig and ox. J Histochem Cytochem 18: 364~367, 1970.
 - 21) Nemeth PM and Lowry OH: Myoglobin levels in individual human skeletal muscle fibers of different types. J Histochem cytochem 32: 1211~1216, 1984.
 - 22) 渡辺 宏, 小宮山莊太郎, 笠 誠一, 他: 中・下咽頭筋の発声と嚥下時の作動に関する筋電図学的研究. 耳鼻 22: 236~241, 1976.
 - 23) 渡辺 宏: 輪状咽頭筋の筋生理—イヌにおける中・下咽頭筋の生理的機能—. 耳鼻 26: 828~843, 1980.
 - 24) 笠 誠一: 下咽頭収縮筋の酵素組織化学的研究. 耳鼻 27: 43~59, 1981.
 - 25) Ranvier ML: Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs, chez les lapins et chez les raies. CR Acad Sci (Paris) 77: 1030~1034, 1873.
 - 26) 菊地邦雄: 筋トレーニングの組織化学的研究—静的筋トレーニングと動的筋トレーニングの骨格筋線維に及ぼす影響の比較—. 体育学研究 16: 67~74, 1971.
 - 27) 八木舎四: 酸素電極法の適応限界について. 日新医学 49: 235~246, 1962.
 - 28) Whalen WJ, et al: Tissue PO_2 in normal and denervated cat skeletal muscle. Am J Physiol 227: 1221~1225, 1974.
 - 29) 曾 憲昭: 自律神経緊張状態における骨格筋組織内酸素分圧値の頻度分布について. 岩手医誌 28: 298~312, 1976.
 - 30) 古瀬 彰, 水野 明, 吉竹 毅, 他: 術中・術後ショック時の末梢循環の新しいモニター. 骨格筋 PO_2 , PCO_2 , pH の連続的測定. 日外会誌 74: 1439~1441, 1973.
 - 31) Arai M and Endoh H: Blood flow through human skeletal muscle during and after contraction. Tohoku J Exp Med 114: 379~384, 1974.
 - 32) 阿部栄二: 筋収縮時の筋内圧と筋血流に関する実験的研究. 日整会誌 55: 399~410, 1981.
 - 33) Yagi M, JH Ogura, Kawasaki M, et al:

Physiological studies of the replanted canine larynx. Ann Otol 75:849~864, 1966.

- 34) 斎藤晴樹: 筋収縮時の筋血流, 筋組織酸素分圧およびpHの変動. 日整会誌 56:487~499, 1982.

原稿採択: 昭和62年3月25日

別刷請求先: 富田まり子

〒840-01 佐賀市鍋島町大字鍋島三本杉
佐賀医科大学耳鼻咽喉科学教室