ラット内喉頭筋における毛細血管分布様式

山形和彦¹⁾・湯本英二²⁾・河北誠二¹⁾・小森正博¹⁾
讃岐徹治¹⁾

Distribution of capillaries in the intrinsic laryngeal muscles in rats

Takahiko Yamagata, Eiji Yumoto, Seiji Kawakita,
Masahiro Komori and Tetsuji Sanuki

The distribution of capillaries in relation to muscle fiber types in the intrinsic laryngeal muscles (TA and PCA muscles in this paper) was investigated in comparison with common skeletal muscle (EDL muscle) in rats. The alkaline phosphatase stain method was applied to visualize the capillary, and the myosin ATPase stain method was applied to distinguish muscle fiber types. The mean cross section area of muscle fiber in EDL was greater than that of the intrinsic laryngeal muscles, though the ratio of capillaries per muscle fibers (C/F) in the PCA was significantly greater than that of the EDL. The capillary density (CD), number of capillaries per one sq mm, in the TA and PCA muscles was significantly greater than that of the EDL. These results suggest that the intrinsic laryngeal muscles are capillary rich in order to supply sufficient oxygen.

Key words: 内喉頭筋, 毛細血管, 筋線維タイプ, 酵素組織化学

はじめに

ミオシン ATPase 染色を用いた内喉頭筋の筋線維タイプ分類を論じた報告によれば、イヌの後輪状披裂筋（以下、後筋）はタイプ1線維の占める割合が高く、逆に甲状披裂筋（以下、内筋）ではタイプ2線維の割合が高いとされている^{1, 2)}。またヒト^{3~5)}ではイヌにおけるほど明瞭な差はないものの後筋は他の内喉頭筋よりタイプ1線維の占める割合の高いことがわかっている。

一方、四肢筋においては筋線維タイプ分類に加えて毛細血管の分布様式の検討が行われており、筋線維タイプにより毛細血管の分布様式の異なることが示されている^{6~8)}。つまり、好気性代謝を行うタイプ1線維 (slow oxidative fiber) は解糖系代謝を行うタイプ2b線維 (fast glycolytic fiber) より毛細血管の分布が豊富とされている。しかしこれまでに内喉頭筋の筋線維タイプ別に毛細血管の分布様式を論じた報告はみられない。本論文ではラットを用いて、1) 内筋・後筋の毛細血管分布、2) 内筋・後筋における筋線維タイプ別の毛細血管分布、3) 内筋・後筋の毛細血管分布と四肢筋との比較について検討したので報告する。

実験方法

実験には Wistar 系成熟雌ラット 3 匹 (体重250~300 g)

を用いた。致死量相当のペントバルビタール (100mg/kg) の腹腔内投与によって安楽死させた後、速やかに喉頭を摘出し、液体窒素で冷却したイソペンタンに浸して喉頭全体の急速凍結固定を行った。また四肢筋のうちタイプ2線維優位で速筋の代表である長指伸筋を摘出し同様に凍結固定した。内筋、後筋とも筋腹部の横断切片が得られるように喉頭の角度を調節し、厚さ10 μ mの連続横断切片を作製した。長指伸筋は筋腹部で厚さ10 μ mの連続横断切片を作製した。毛細血管の染色にはその内皮細胞を染色するアルカリフォスファターゼ染色 (図1) を用い、筋線維タイプ分類にはミオシン ATPase 染色 (pH4.2, 4.5, 10.5) を用いた。

検討項目には、平均筋線維断面積、タイプ1筋線維の構成比率、毛細血管数/筋線維数 (capillaries per fiber, 以下, C/F)、毛細血管密度 (capillary density; capillaries per one sq mm, 以下, CD)、筋線維周囲の毛細血管数 (図2, capillaries surrounding a fiber, 以下, CAF) を用いた。NIHimage を用いて無作為に抽出した100本の筋線維を計測し、その平均値を平均筋線維断面積とした。タイプ分類は一切片上すべての筋線維を対象とし、C/F も同様に一切片上すべての筋線維、毛細血管を対象とした。CD, CAF の計測には、光学顕微鏡下に80倍で写真撮影し、手札サイズに焼き付けた紙上で行った。

1) 愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室

2) 熊本大学医学部耳鼻咽喉科学教室

1) Department of Otolaryngology, Ehime University School of Medicine, Ehime

2) Department of Otolaryngology, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto

図1 アルカリフォスファターゼ染色
毛細血管（矢印）が濃染される。
（ラット内筋, scale bar: 10 μ m）

図2 CAFの計測法シェーマ
一本の筋線維の周囲に存在する毛細血管をCAFとした。
シェーマの筋線維Aの場合CAFは5, 筋線維Bの場合は4となる。

CDは紙上で2 cm 角の範囲（実測値は62.5 μ m）にある毛細血管数を対象とし、任意の5カ所で計測し平均値を求めた。CAFは各タイプ毎に無作為抽出の30本の筋線維を対象とした。統計学的検討には Mann Whitney U test を使い、p 値が0.05未満のものを有意差有りと判定しその旨を記した。

結 果

1) 平均筋線維断面積（表1）

内筋は207.9 $\pm$ 45.9 μ m²（平均 $\pm$ 標準偏差を示す、以下同様）、後筋は221.9 $\pm$ 74.3 μ m²と内喉頭筋間には有意な差がみられなかった。長指伸筋は929.1 $\pm$ 138.9 μ m²と明らかに内筋、後筋より太かった（ $p < 0.05$ ）。

2) タイプ1線維の比率（表1）

内筋は2.0 $\pm$ 0.8%，後筋は6.7 $\pm$ 1.4%，長指伸筋は3.3 $\pm$ 1.2%であった。後筋は他の筋よりタイプ1線維の比率が高かった（ $p < 0.05$ ）。各筋ともにタイプ1線維の集簇はみられず、筋内にはほぼ均一に分布していた。

3) C/F（表1）

内筋は1.18 $\pm$ 0.05，後筋は1.42 $\pm$ 0.08，長指伸筋は1.19 $\pm$ 0.04と後筋は明らかに内筋、長指伸筋より高値を示した（ $p < 0.05$ ）。

4) CD（表1）

内筋は2336.7 $\pm$ 273.8/mm²，後筋は3008.0 $\pm$ 424.5/mm²と後筋は内筋より明らかに高かった（ $p < 0.05$ ）。長指伸筋は629.3 $\pm$ 74.8/mm²で、内筋および後筋は明らかに長指伸筋より高値を示した（ $p < 0.05$ ）。

5) CAF（表2）

筋線維タイプ別に示す。内筋はタイプ1線維が3.3 $\pm$ 0.3，タイプ2b線維が2.7 $\pm$ 0.02，後筋はタイプ1線維が4.2 $\pm$ 0.5，タイプ2b線維が3.1 $\pm$ 0.5，長指伸筋はタイプ1線維が3.5 $\pm$

表1 各筋の計測結果

	内 筋	後 筋	長指伸筋
平均筋線維断面積（ μ m ² ）	207.9 $\pm$ 45.9*	221.9 $\pm$ 74.3**	929.1 $\pm$ 138.9
タイプ1筋線維構成比率（%）	2.0 $\pm$ 0.8	6.7 $\pm$ 1.4**、***	3.3 $\pm$ 1.2
C/F	1.18 $\pm$ 0.05	1.42 $\pm$ 0.08**、***	1.19 $\pm$ 0.04
CD（/mm ² ）	2336.7 $\pm$ 273.8*	3008.0 $\pm$ 424.5**、***	629.3 $\pm$ 74.8

*：内筋と長指伸筋との間に有意差を認める。

（平均 $\pm$ 標準偏差を示す）

**：後筋と長指伸筋との間に有意差を認める。

***：内筋と後筋の間に有意差を認める。

表2 CAF

	内 筋	後 筋	長指伸筋
タイプ1線維	3.3 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.5**、***	3.5 $\pm$ 0.3
タイプ2b線維	2.7 $\pm$ 0.02	3.1 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.1

**：後筋と長指伸筋との間に有意差を認める。

（平均 $\pm$ 標準偏差を示す）

***：内筋と後筋の間に有意差を認める。

表 3 sC/F

	内 筋	後 筋	長指伸筋
sC/F (/mm ²)	5777.4±249.8*	6600.8±348.1** ***	1330.9±40.3

*：内筋と長指伸筋との間に有意差を認める、

(平均±標準偏差を示す)

**：後筋と長指伸筋との間に有意差を認める、

***：内筋と後筋の間に有意差を認める。

0.3, タイプ2b 線維が 2.7 ± 0.1 であった。どの筋においてもタイプ1 線維のCAFはタイプ2b 線維より高い値を示した ($p < 0.05$)。後筋のタイプ1 筋線維のCAFは内筋や長指伸筋のそれより高い値を示した ($p < 0.05$) が、タイプ2b 線維は各筋間で明らかな差を認めなかった。

考 察

ミオシン ATPase 染色による内喉頭筋の筋線維タイプ分類は、イヌ^{1, 2)}、ヒト³⁻⁵⁾で検討され、後筋はタイプ1 線維の占める割合が比較的高いとされている。ラットを用いた我々の結果も、後筋で6.7%, 内筋で2.0%と後筋にタイプ1 線維が多い傾向であった。半谷ら⁹⁾もラットで検討し、タイプ1 線維が後筋では約10%認められたが、内筋ではほとんど認めなかったとし、やはり後筋のタイプ1 線維の占める割合は高かった。

廣戸¹⁰⁾は宿題報告の中で喉頭筋の組織呼吸について述べている。ワールブルグ検圧装置を用いて被検筋肉を恒温槽内で2時間振盪させ酸素消費量をまず測定した。測定後筋肉片を12時間乾燥させ乾燥重量を測定し、乾燥重量1 mgあたりの酸素消費量を呼吸係数としてイヌならびにヒトの内喉頭筋およびイヌ心筋、横隔膜、大腿筋を比較検討している。イヌにおいては前筋と後筋、ヒトでは内筋と後筋で呼吸係数が高く好気性代謝が盛んであることを示した。特に後筋で呼吸係数が高いのは、唯一の声門開大筋であるという理由以外に比較解剖学的ならびに筋電図学的研究から後筋が呼吸筋的性格を有することによるものとしている。今回の検討結果から後筋は内筋より毛細血管分布が豊富と考えられた。このことは、後筋における活発な好気性代謝を支えるために合目的な分布様式と考えられ、廣戸の報告と矛盾しないと思われた。

内喉頭筋ではこれまでに筋線維タイプ別に毛細血管分布を論じた報告がない。四肢筋では代謝の違いによりタイプ1 線維はタイプ2b 線維に比べて分布する毛細血管が多いとされている⁷⁾。今回の検討でも内筋、後筋ともにタイプ1 線維のCAFはタイプ2b 線維よりも高く、四肢筋の結果と同様であった。内筋と後筋を比較した場合、後筋のタイプ1 線維のCAFは内筋よりも高値を示した。CAFは筋線維への酸素供給の程度を反映する指標⁷⁾で、後筋におけるタイプ1 線維の筋活動の重要性を示唆する結果と考える。

四肢筋における毛細血管の検討で、C/FおよびCAFは筋線維径・断面積と正の相関が強く、CDは逆の関係とされている^{7, 8)}。今回、内筋、後筋は長指伸筋より平均筋線維断面積が小さいことを示した上でC/Fを検討し、これ

までの四肢筋の結果とは異なることを明らかにした。つまり筋線維断面積の小さい内喉頭筋が、断面積の大きい長指伸筋より毛細血管分布が豊富であった。平均筋線維断面積を用いてC/Fを補正し筋線維単位断面積当たりのC/F (standardized capillaries per fiber per one sq mm, 以下, sC/F)を検討したところ(表3), 後筋だけでなく内筋も長指伸筋より明らかに高い値を示した ($p < 0.05$)。すなわちこの結果は、内喉頭筋においては筋線維に対する毛細血管の比率が四肢筋に比べて非常に高いことを明らかにしており、内喉頭筋の特殊性を示すものと考えた。一方CDは四肢筋での報告と同様に筋線維径の小さい内筋、後筋が長指伸筋より高い値を示した。廣戸¹⁰⁾は前述の呼吸係数の検討から好気性代謝は心筋、横隔膜、内喉頭筋、大腿筋の順に高かったとしている。好気性代謝を直接調べたものではないが、内喉頭筋と長指伸筋を比較検討した我々の結果は廣戸の報告を支持するものである。生命維持に必須の呼吸、嚥下運動に関与する内喉頭筋と長指伸筋の筋活動の差が毛細血管分布に関連しているものと推察した。

ま と め

ラット内喉頭筋(内筋・後筋)の毛細血管分布様式を検討し、さらに長指伸筋と比較した。

- 1) 後筋は内筋よりも毛細血管分布に富むと考えられた。
- 2) 内筋、後筋について筋線維タイプ別に毛細血管分布を検討し、後筋のタイプ1 線維のCAFは内筋より高値を示した。後筋のタイプ1 線維の筋活動の重要性が示唆された。
- 3) 長指伸筋と比較した場合、筋線維が細いにもかかわらず内筋および後筋は長指伸筋より毛細血管分布に富むことを示した。各筋の担う筋活動の差が毛細血管分布に関連していると考えられる。

本論文の要旨は第10回日本喉頭科学会(金沢市)において口演した。

考 察

- 1) 笠 誠一：内喉頭筋の酵素組織化学的研究。耳鼻 28：394～402, 1982.
- 2) 河村裕二：内喉頭筋の筋線維構成と神経支配：イヌの後輪状披裂筋についての検討。日気食会報 39：20～28, 1988.
- 3) Teig E et al：Actomyosin ATPase activity of human laryngeal muscles. Acta Otolaryngol 85：272～281, 1978.

- 4) Malmgren LT : Histochemical characteristics of muscle fiber types in the posterior cricoarytenoid muscle. *Ann Otol* 90 : 423~429, 1981.
- 5) Rosenfield DB et al : Morphologic and histochemical characteristics of laryngeal muscle. *Arch Otolaryngol* 108 : 662~666, 1982.
- 6) Anderson P : Capillary density in skeletal muscle of man. *Acta Physiol Scand* 95 : 203~205, 1975.
- 7) Carry MR et al : Distribution of capillaries in normal and diseased human skeletal muscle. *Muscle & Nerve* 9 : 445~454, 1986.

- 8) Reed JZ et al : The metabolic characteristics of the locomotory muscles of grey seals (*Halichoerus grypus*), harbour seals (*Phoca vitulina*) and antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*). *J Exp Biol* 194 : 33~46, 1994.
- 9) 半谷公彦ほか : 内喉頭筋線維の分化に及ぼす支配神経の影響. *喉頭* 9 : 120~124, 1997.
- 10) 廣戸幾一郎 : 発声機構の面よりみた喉頭の病態生理. *耳鼻臨床* 59増刊1号 : 237~243, 1966.

別刷請求先 〒791-0295 温泉郡重信町志津川
愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室 山形和彦