外眼筋の機械的特性に関する研究

第2報 ボツリヌス毒素注入外眼筋における受動的伸長—張力特性

岡 野 正 樹
岡山大学医学部眼科学教室

要 約

ボツリヌスA型毒素の外眼筋におよぼす影響を検討するために，白色家兎の上直筋に本毒素を注射した．毒素注射後3日から4週目に，外眼筋張力測定装置を用いて眼球付着部で切り離した上直筋の伸長—張力曲線を連続的に記録した．本装置は著者が開発したもので受動的に引き伸ばされた外眼筋の張力を測定するひずみゲージと，小型モーターと連動し変位量を検出するポテンショメーターからなる．毒素注入群の粘弾性抵抗は対照群に比べて1週目で有意に小さかったが，2週目，3週目では逆に大きかった．毒素注入群の伸長性は対照群に比べて3週目で有意に小さかった．（日眼会誌 97：150—155，1993）

キーワード：ボツリヌス毒素，伸長—張力曲線，上直筋，粘弾性抵抗，伸長性

Passive Length-Tension Curves of Extraocular Muscles after Botulinum Toxin Injection

Masaki Okano
Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

Abstract

Botulinum A toxin was injected into the superior rectus muscles of albino rabbits. Length-tension curves of detached superior rectus muscles were continuously measured with a length and tension measuring device developed by the author. The device consists of a strain gauge for measuring passive length-tension, and a position encoder equipped with an eddy current motor. The passive load of the muscle injected with Botulinum A toxin was significantly less than that of control muscle a week after the injection, however, it was greater than that of control muscle in 2 or 3 weeks after the injection. The compliance of the treated muscle was significantly less than that of control muscle at 3 weeks after the injection. (J Jpn Ophthalmol Soc 97 : 150—155, 1993)

Key words: Botulinum toxin, Length-tension curve, Superior rectus muscle, Passive load, Compliance

---

I 緒 言

近年，斜視治療において神経毒であるボツリヌスA型毒素を外眼筋に注射し，眼位矯正に応用しようという試みが行われつつある．しかしながら，従来の報告例[1)~7)]では臨床的な効果判定に終始するものが多く，

別刷請求先：700 岡山市鹿田町2—5—1 岡山大学医学部眼科学教室 岡野 正樹
（平成4年5月27日受付，平成4年7月27日改訂受理）
Reprint requests to: Masaki Okano, M.D. Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School. 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700, Japan
(Received May 27, 1992 and accepted in revised form July 27, 1992)

目的とする外眼筋単独に与える影響については，その作用機序を含めて未だ明らかではない．著者は外眼筋を眼球付着部で切り離した後，小型モーターで牽引することにより，外眼筋単独の伸長—張力特性を定量的に測定する方法を考案し先に発表した[8]．今回，この測定装置を用いてボツリヌスA型毒素を白色家兎の外眼筋に注射した場合の張力変化を経時的に記録し，外眼筋におよぼす影響を定量的に検討したので報告する．

II　実験方法

1．実験材料

実験動物には成熟白色家兎(体重2.1～4.5 kg)25匹を用いた．

2．実験手順

1）ボツリヌス毒素の注射

押田式家兎固定器（KN-317，夏目製作所）に家兎を固定し，2％リドカインで点眼麻酔および上，下眼瞼に浸潤麻酔を行った．眼球をわずかに下転させ，直視下にて1眼の上直筋にボツリヌスA型毒素（Oculinum）を5単位（0.1 ml）経結膜的に注射した．他眼の上直筋には生理食塩水を同量注射し対照とした．毒素注射後3日，1週，2週，3週，4週目に各5匹ずつ張力測定を行った．

2）伸長—張力曲線の記録

剃毛した耳静脈に22ゲージの静脈用カテーテル（エラスター針）を留置し耳静脈を確保した後，麻酔薬としてペントバルビタールナトリウム20 mg/kgを約3分かけて静注した．家兎固定台に伏臥位にて四肢および頭部を十分に固定した後，眼球結膜を角膜輪部近くで切開し上直筋を露出させた．上直筋を周囲組織から十分に剝離，4-0シルク糸を斜視手術の要領で眼筋の先端部にかけた後，眼球付着部で切断した．4-0シルク糸（3.0 cm）はケプラート糸（27.0 cmを介して外眼筋張力測定装置に接続し，張力0 gから最大張力40 gに達するまで低速度（0.2 mm/sec）で牽引した後，再び張力0 gに戻るまでの伸長—張力曲線を記録した．なお，再現性を確かめるために測定は2度繰り返した．

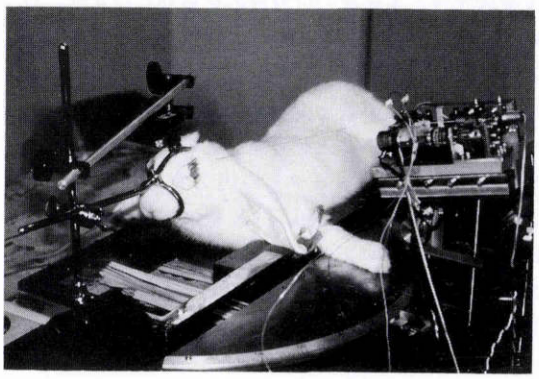

図1　実際の測定の様子．

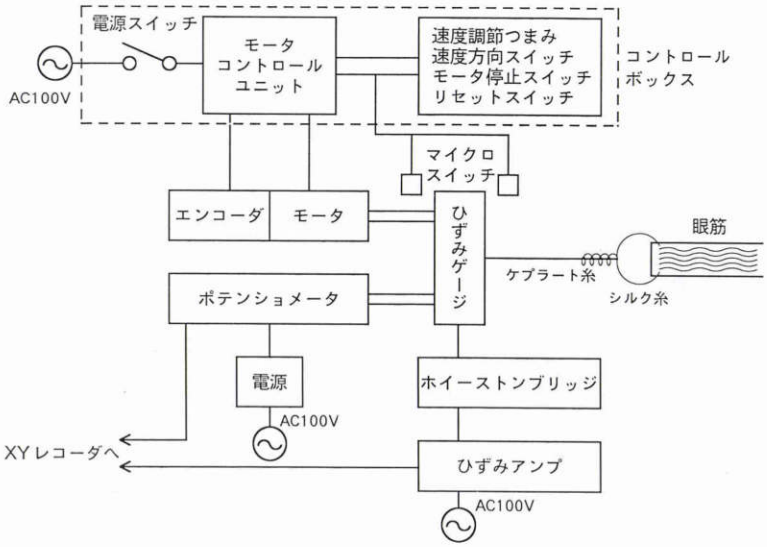

図2　外眼筋張力測定装置の系統図．

3. 測定装置の概要

本実験で使用した外眼筋張力測定装置は，著者が三菱電機と共同で開発したもので本体，固定台，制御部およびX-Yレコーダーからなる．実際の測定の様子を図1に，系統図を図2に示す．眼筋の張力はシルク糸および瞬間接着剤で固めたケブラート糸を介して，本体上のりん青銅板に伝えられる．このりん青銅板には直線性の優れたひずみゲージが取り付けられており，高い精度で張力を測定できる．また，遊星ギアー内蔵のDCサーボモーター（ハーモニックドライブシステムズRH-5)が回転することにより，りん青銅板は前後方向に移動し眼筋を牽引するという仕組みである．安全のため設定変位量を超えると自動的にモーターが停止するようマイクロスイッチを設けてある．家兎固定台と本装置の位置決めを最初に行えば，以後眼球を中心に常に半径30 cmの円周上を装置は動き，上下の角度も自由に可変できるよう工夫されているため，周囲組織の影響を受けず本来の筋の作用方向と同一方向に牽引することが可能である．りん青銅板と連動するポテンショメーターの出力をX-Yレコーダー（グラフテックWX 1100）のX軸に，ひずみゲージの出力をひずみアンプ（共和電業DPM 611-A）で増幅した後Y軸に入力し実時間で伸長—張力曲線の記録を行った．

4. 記録解析

伸長—張力曲線は張力0 gから最大張力に達するまで牽引している間の伸長相と，再び元の位置に戻る際に得られる回帰相の2本の曲線からなり，前者を上昇曲線，後者を回復曲線と呼ぶことにする．今回の記録の解析には上昇曲線を用いて以下の2つの指標について検討することにした．

1）粘弾性抵抗（passive load）

実際の測定曲線を図3に示すが，同様の曲線の解析を行った五十嵐ら[9]の方法に準じた．すなわち，上昇曲線は牽引初期には傾きがほぼ一定で直線とみなされるがそれを過ぎると指数関数的に張力が増大する．特に張力10 gまでは直線に近似されたため，張力0 gと10 gとを結んだ直線Kを作図しその傾きk（単位g/mm）を粘弾性抵抗の指標とした．

2）伸長性（compliance）

上昇曲線全相について非線形最適化法によりy=a

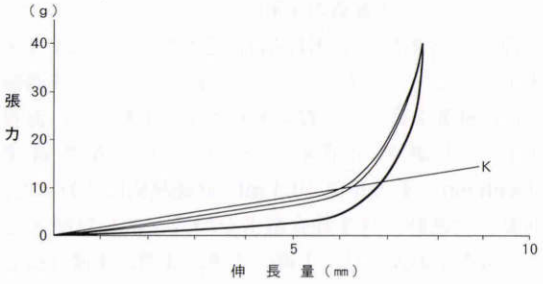

図3　実際の測定曲線．
測定を2度行っているため上昇曲線はわずかながら右へのシフトがみられるが，回復曲線はほぼ同一の軌跡をたどっている．直線Kは張力10 gまでの近似直線．

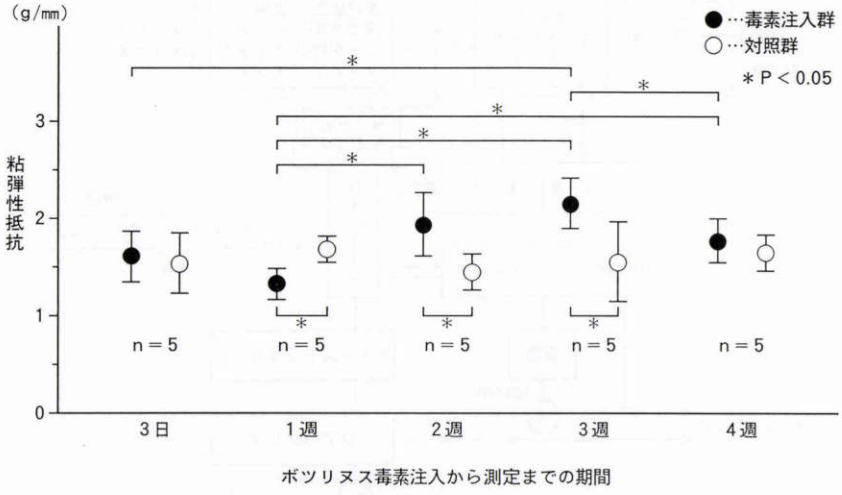

図4　ボツリヌス毒素注入から測定までの期間と粘弾性抵抗．
平均値±標準偏差

($e^{bx}-1$) という指数関数のあてはめを行いうまく近似することができた．この関数は弾性学の分野では生体の軟組織の特徴を表わす式[10]として一般に用いられており，特に定数bは曲線を決定づける重要な値とされている．この定数bの逆数をとり伸長性(単位 mm/g)の指標とした．

III 結　果

毒素注射の翌日から最終測定日である4週目まで，ほぼ全例に眼瞼下垂を認めた．

測定により得られた伸長一張力曲線は毒素注入群も対照群も指数関数様の曲線を描いた．2度目の測定時には上昇曲線はわずかに右へシフトしたものの，最大張力をかけたときの筋の長さ，および回復曲線はほぼ一致した(図3)．これは毒素注入から測定までの期間によらずほぼ同様の傾向を示した．そこで再現性は得られたものとして1度目の曲線を用いて記録の解析を行った．

1. 粘弾性抵抗 (passive load)

毒素注入群，対照群の粘弾性抵抗(g/mm)は3日目でそれぞれ1.62±0.27(平均値±標準偏差，n=5)，1.54±0.31，1週目1.33±0.14，1.69±0.10，2週目1.93±0.32，1.44±0.18，3週目2.16±0.26，1.55±0.41，4週目1.77±0.22，1.64±0.17であった．1週目で毒素注入群が対照群に比べて統計的に有意に小さかった(t-test，$p<0.05$)．2週目，3週目では逆に有意に大きかった(t-test，$p<0.05$)．3日目，4週目では有意な差はなかった(t-test，$p>0.05$)(図4)．

2. 伸長性 (compliance)

毒素注入群，対照群の伸長性(mm/g)は3日目でそれぞれ1.75±0.13(平均値±標準偏差，n=5)，1.76±0.27，1週目1.90±0.31，2.21±0.60，2週目2.09±0.36，1.94±0.35，3週目1.84±0.09，2.10±0.15，4週目1.73±0.26，1.98±0.29であった．3週目で毒素注入群が対照群に比べて統計的に有意に小さかった(t-test，$p<0.05$)．3日，1週，2週，4週目では有意な差はなかった(t-test，$p>0.05$)(図5)．

IV 考　按

ボツリヌス毒素はボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)によって産生される複合蛋白である．その抗原性からA-Gの7型が同定，精製されている．この内A型毒素は安定した形で結晶させることができ，筋麻痺を起こすのに強い力をもっていると考えられる．いずれの型も神経毒性が強く，ボツリヌス食中毒，乳児ボツリヌス症，創傷ボツリヌス症などが臨床的に知られており，眼科的症状としては視力低下，調節麻痺，外眼筋麻痺，眼瞼下垂，瞳孔散大などが知られている．

ボツリヌス毒素の作用機序としては，神経筋接合部でアセチルコリンの運動神経終末からの遊離を阻止することによると考えられている．この場合，アセチルコリンの放出部位を特異的に封鎖するのではなく，細

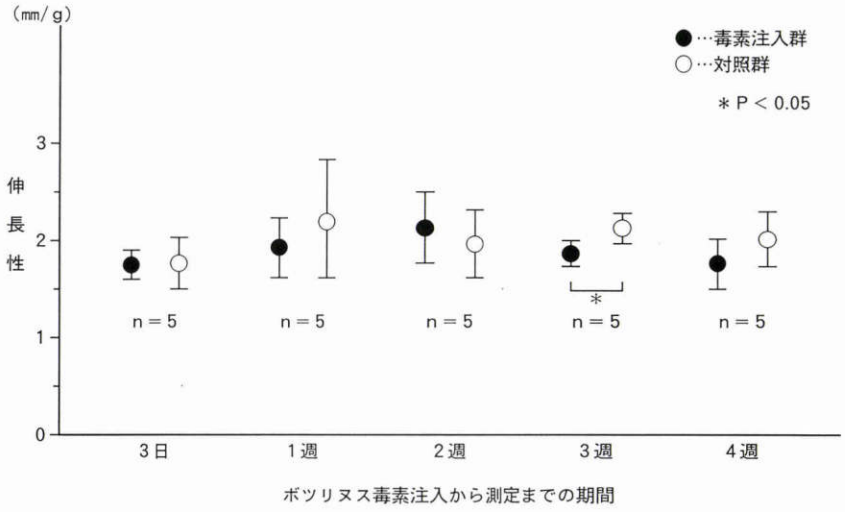

図5　ボツリヌス毒素注入から測定までの期間と伸長性．
平均値±標準偏差

胞内に進入し酵素的に作用するというSimpson[11]の説が有力である．また，神経筋に対する麻痺作用は永続的でなしに回復がみられることが多く，Duchen[12]は運動神経末端部からの発芽（sprouting）によると推測しているが，その詳細は作用機序とともに未だ解明されていない．

ボツリヌス毒素の筋肉麻痺作用に注目したScott[1)2)]は，眼科的に臨床応用することを1970年代後半に発表し，以後海外を中心として眼瞼痙攣や斜視の治療における有効性が確認されつつある．我が国でも岩重ら[3)~5)]，木村ら[6)]，大庭ら[7)]を中心として臨床応用が進められつつある．しかしながら，これらの報告の多くは臨床的なものであったために，眼筋単独の詳細なデーターを得ることは難しかった．そこで，今回著者はボツリヌス毒素が外眼筋の張力特性におよぼす影響を明らかにするために，先に報告[8)]した眼筋張力測定装置を用いて，これまでの報告にみられなかった家兎の外眼筋に毒素を注入し，その後眼球付着部で切り離して張力変化を経時的に測定した．

測定方法および解析方法は第1報[8)]にならうこととした．この測定方法は周囲組織の影響を受けず，本来の筋の作用方向と同一方向に筋を牽引することができるという特徴をもっており，正常白色家兎の上直筋，上斜筋，下直筋，下斜筋の粘弾性抵抗と伸長性については先に報告したところである．また，この第1報では測定条件として弾性限界，ひずみ速度，再現性の観点から検討し，筋肉を牽引する条件として最大張力50 g，牽引速度0.2 mm/secで再現性がよいことを確認した．今回はさらに生理的条件に近いと思われる最大張力40 g，牽引速度0.2 mm/secという測定条件にした．毒素を注入する筋については，第1報の測定時に結果が安定しており，手術操作が容易と思われる上直筋に限定した．

測定により得られた伸長—張力曲線は非線形であるためにその評価は難しい．毒素注入群，対照群のいずれも注入から測定までの期間によらず，ほぼ同様の曲線を描いたため同一のモデル関数で評価できると考えた．そこで上昇曲線のうちほぼ直線とみなされる部分には$y=kx$，曲線全体としては$y=a(e^{bx}-1)$という関数をあてはめ評価することにしたのである．

まず，比例定数kを指標とした粘弾性抵抗については，五十嵐ら[9)]のように変曲点をもった曲線であれば容易に近似直線Kを引き，その傾きkを求めることができるであろうが，著者のデータのように変曲点をもたない場合，必ずしもうまく近似できたとはいえないかもしれない．しかし，明らかに筋が弾性として機能している範囲内であり客観性をもたせるために，張力10 gまではHookeの法則に従うとみなし比例定数kを求め粘弾性抵抗として評価した．この比例定数kは力学的にはヤング率，あるいはバネ定数とも呼ばれ弾性体の性質を表わす指標で，実際に我々が手術時に感じる手ごたえは主にこの粘弾性抵抗であるといえよう．

毒素注入から3日目では対照群との間に有意な差はなかったが，1週目では対照群より粘弾性抵抗が有意に小さかった．ところが，2週目，3週目になると逆に対照群より有意に大きいという結果が得られた．そして，4週目になると再び対照群と有意な差がなくなった．この結果の解釈にあたっては筋線維，神経筋接合部を組織学的に検索した向野ら[13)]，Spencerら[14)]の報告が参考になる．すなわち，サルの内直筋にボツリヌスA型毒素を注射した向野ら[13)]は，注入から6日後に注射部位に一致して筋の萎縮があったとし，円形細胞の浸潤を認めたとしている．そして，注射から45日目には筋の萎縮はなく，細胞浸潤も認められないが，神経—筋接合部に近接して薄化した有髄神経線維および発芽を認めたと述べている．一方，同様にサルの内直筋にボツリヌスA型毒素を注射したSpencerら[14)]は，毒素注入から14日目に筋線維の中心部のミトコンドリアが周辺部に分散したことによる筋線維の肥厚を認めたとしている．そして，35日目には発芽を認め，42～56日目には筋線維はほぼ正常化したと述べている．これらの報告を著者の結果にあてはめると，1週目でみられた張力低下は筋の萎縮によると考えられ，2週目，3週目の逆転は筋線維の肥厚が，そして，4週目で有意差がなかったのは発芽による，と考えるのが妥当ではないであろうか．ネコの外眼筋にボツリヌスA型毒素を注射し，サクシニルコリンで収縮させ張力を測定したDennehyら[15)]もほぼ同様の考察をしている．その一方で，臨床的には1週前後で張力の低下がみられ，その傾向が約3か月以上続くとされている[3)~7)]．これらは患者に能動的に筋の収縮を促した張力（active force）であり，著者のように受動的に筋を伸長させた張力（passive load）とは性質が異なるだけに一概に比較はできないが，張力の経時的な変化に差がみられたという点で大変興味深いところである．

また，上昇曲線全体は先に与えた指数関係$y=a(e^{bx}-1)$にうまく近似できた．生体軟組織のうち大動

脈，腸間膜，皮膚，尿管，心筋などはこの指数関数に従うことが知られており[10]，今回著者が記録した曲線がうまく近似できたということは測定の妥当性を物語っているといえよう．この指数関数は主に定数bによって規定され，わずかな曲線の違いも正確に定数bに反映される．定数bは曲線全体の特徴を表わし，その逆数1/bは一定張力となる時の変位量を示すことから1/bを伸長性（compliance）の指標とした．毒素注入から3週目で対照群に比べ有意に小さかったが，3日，1週，2週，4週目では有意な差はなかった．3週目で伸長性が小さかったのは，粘弾性抵抗のところでも述べたように筋線維の肥厚が最も考えられる．しかし，張力10gまでを評価した粘弾性抵抗に対して1週目，2週目でも有意差がみられなかったことから，曲線全体からみるとボツリヌス毒素の影響はそれほど大きいものではないと思われる．言い替えれば，本毒素はどちらかと言えば張力の小さな部分の微細な筋線維の組成に影響を与えやすいのではなかろうか．

最後に，粘弾性抵抗および伸長性で得られた有意差は，純粋に筋肉の張力特性の変化を示唆しているのか，それとも手術操作を含めた測定系の要因によるのかは明らかではない．しかしながら，ボツリヌス毒素が眼筋の張力特性に変化を与えることは確かであろう．その場合の眼筋張力変化は，注入から1週前後で発現し経時的に変化するということが明らかになった．この結果を踏まえて，臨床的には眼瞼痙攣や斜視などの治療にボツリヌス毒素の応用が期待される．

稿を終えるにあたり，御懇篤なる御指導，御校閲いただいた恩師松尾信彦教授に深謝いたします．また直接御指導いただいた大月　洋助教授，ボツリヌス毒素（Oculinum）を快く提供して下さった帝京大学眼科岩重博康助教授，多大なる技術援助を頂いた三菱電機中央研究所武谷知明氏に感謝します．本論文の要旨は第96回日本眼科学会総会にて発表した．

文　献

1) **Scott AB**: Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. Ophthalmology 87: 1044—1049, 1980.

2) **Scott AB**: Botulinum toxin injection of the eye muscles to correct strabismus. Trans Am Ophthalmol Soc 79: 734—770, 1981.

3) **岩重博康，丸尾敏夫**：ボツリヌスA型毒素（Oculinum）による斜視治療．日眼会誌　90: 1366—1374, 1986.

4) **岩重博康，赤津史郎，丸尾敏夫**：Botulinum A型毒素（Oculinum）による眼性頭位異常の治療．眼臨　81: 951—961, 1987.

5) **岩重博康**：ボツリヌストキシンの治療への応用．筒井　純（編）：眼科Mook　35　神経眼科最近の進歩．金原出版，東京，126—136, 1987.

6) **木村　久，筒井　純，深井小久子，早川友恵**：ボツリヌストキシン療法と斜視手術—ボツリヌストキシンの注入量の検討—．臨眼　83: 2298—2300, 1989.

7) **大庭正裕，大井利明，五十嵐保男**：国産A型ボツリヌストキシンによる眼科的臨床応用．眼科手術 5: 63—69, 1992.

8) **岡野正樹**：外眼筋の機械的特性に関する研究．第1報．白色家兎における受動的伸長—張力特性．日眼会誌　96: 295—301, 1992.

9) **五十嵐保男，竹田　真，沢　正博**：覚醒下における正常ヒト外眼筋の機械的特性に関する研究．札幌医誌　54: 569—581, 1985.

10) **岡　小天**：レオロジー—生物レオロジー—．常華房，東京，454—456, 1974.

11) **Simpson LL**: Molecular pharmacology of Botulinum toxin and tetanus toxin. Ann Rev Pharmacol Toxicol 26: 427, 1986.

12) **Duchen LW**: An electron microscopic study of the changes induced by botulinum toxin in the motor end-plates of slow and fast skeletal muscle fibers of the mouse. J Neurol Sci 14: 47—60, 1971.

13) **Mukuno K, Scott AB, Ishikawa S**: Histopathological study on the monkey extraocular muscles under botulinum toxin injection. In: Reinecke RD (Ed): Strabismus II: Proceedings of the Fourth Meeting of The International Strabismological Association, October 25—29, 1982, Grune & Stratton, Asilomar, California, Orlando, 707—710, 1984.

14) **Spencer RF, McNeer KW**: Botulium toxin paralysis of adult monkey extraocular muscle. Structural alterations in orbital, singly innervated muscle fibers. Arch Ophthalmol 105: 1703—1711, 1987.

15) **Dennehy PJ, Lingua RW, Li KF, Hernandez E, Feuer W**: Succinylcholine-stimulated muscle tensions following botulinum injection in the domestic cat. Exp Eye Res 52: 445—449, 1991.