

膝関節炎モデルラットの痛みと廃用性筋萎縮に対する

筋収縮運動の影響

—対側肢の筋収縮運動が患側肢に及ぼす影響について—

井上慎太郎・松崎敏朗

要旨

本研究では、一側膝関節炎モデルラットを用い、関節炎と不動により惹起される痛みと廃用性筋萎縮に対する対側肢の筋収縮運動の影響について行動学的・組織化学的に検討した。実験動物には Wistar 系雄性ラットを用い、1) 対照群、2) 右側膝関節に関節炎を惹起させ同側後肢を 2 週間ギプスで不動化する不動群、3) 不動群と同様の処置に合わせて、対側肢の腓腹筋に電気刺激を行う運動群に振り分けた。結果、右側腓腹筋の筋線維断面積は、不動群に比べ運動群が TypeIIa 線維のみ有意に高値を示したが、TypeI・IIb 線維では認められず、廃用性筋萎縮の進行抑制は明らかではなかった。ただ、廃用性筋萎縮に伴う 1 筋線維あたりの毛細血管数の減少は運動群において明らかに軽度であり、対側肢の筋収縮運動による何らかの影響が反映していると推測された。一方、関節炎と不動により惹起される炎症所見と痛みに関しては不動群と運動群の間に差はなく、対側肢の筋収縮運動による抗炎症作用は認められなかった。

はじめに

術後急性期の患者では、医学的管理により活動範囲が制限される場合があり、加えて、炎症と痛みが激しい場合には患側肢への積極的なアプローチが行えない。そのような状況では、患側肢は不活動状態に陥り、廃用性筋萎縮の発生を許してしまう¹⁾。また、近年の報告により、四肢が不動状態に陥ると皮膚の変化や中枢神経感作などにより痛みが発生することが明らかにされており²⁾、炎症に不動状態が重なると状況がさらに悪化する可能性がある。実際に、寺中ら³⁾の報告では、ラット膝関節に起炎剤を投与して同側下肢を 4 週間不動すると、起炎剤を投与したのみのラットより足底の機械的刺激に対する痛みが増加し、痛みの慢性化を助長することが明らかにされている。一般に、術後急性期の患者に対するリハビリテーションとしては、急性期から患側肢の運動を行っていくことで痛みの程度を減少できるといわれているが、実際の臨床では、患側へ直接アプローチすることは前述した理由などにより困難である。したがって、炎症と痛みが激しい患側肢の廃用性筋萎縮や不動に伴う痛みに対しては、遠隔から予防または治療効果を狙えるような手段が望まれる。

一方、骨格筋が内分泌器官であるという報告が多くなされており、筋収縮運動により筋細胞がサイトカインを血中に放出することが明らかにされている。そして、血中のサイトカインは遠隔の臓器において抗炎症作用、毛細血管の増加といった様々な効果を及ぼすと報告されている^{4~6)}。加えて、骨格筋と毛細血管の間には相関があることが様々な先行研究から報告されている。例えば、藤野ら⁷⁾は、廃用性筋萎縮に伴い骨格筋毛細血管に退行性変化が生じることを報告しており、また、金尾ら⁸⁾は筋線維肥大に伴い骨格筋毛細血管数が増加することを報告している。さらに Devici ら⁹⁾の研究では、慢性低酸素化でラットを飼育することで 1 筋線維あたりの毛細血管数の増加し、それに伴い筋断面積が増加することを明らかにしている。つまり、毛細血管数の増減によって筋線維サイズが変化することが示唆している。以上のことを考慮して患側肢の炎症と痛み、廃用性筋萎縮に対するアプローチを考えたとき、次のような仮説が立てられる。すなわち、患側ではなく対側肢に筋収縮運動を行い、血中にサイトカインを放出することができれば、患部の炎症を抑制し、また、毛細血管を増加させることにより廃用性筋萎縮の進行を抑制できる可能性がある。

そこで本研究では、動物モデルを用い、炎症急性期の患側肢が不動状態におかれた状態で、対側肢に運動を負荷した場合をシミュレーションした。具体的には、一側関節炎モデルラットの患側肢をギプスで不動化し、その状態で対側肢に電気刺激による筋収縮運動を行い、患側肢の炎症と廃用性筋萎縮に及ぼす影響を検討した。

材料と方法

1. 実験プロトコル

(1) 実験動物

実験動物には8週齢のWistar系雄性ラット21匹を用い、これらが無作為に1)右側膝関節に関節炎を惹起させ、同部位をギプスで不動化させる群(以下、不動群;n=7)、2)不動群と同様の処置を行った後、対側に電気刺激による筋収縮運動を負荷する群(以下、運動群;n=7)、関節炎の疑似処置として生理食塩水を右側膝関節に注入する群(以下、対照群;n=7)の3群に振り分けた。なお、今回の実験は長崎大学が定める動物実験指針に準じ、長崎大学先端生命科学支援センター動物実験施設で実施した。

(2) 関節炎の惹起方法

不動群と運動群の各ラットは、ペントバルビタールナトリウム(40 mg/kg)の腹腔内投与によって麻酔を行った後、右側膝関節周囲を剃毛し、30ゲージの注射針(NIPRO)を用いて膝蓋靭帯の直上から起炎剤を投与した(患側肢)。起炎剤には生理食塩水に溶解した3% λ -カラゲニン・3%カオリン(Sigma, Wako)混合液100 μ lを用いた。なお、対照群に対しては疑似処置として上記と同様の方法で生理食塩水100 μ lを右側膝関節に注入した。

(3) ギプス固定の方法

不動群と運動群に対しては、関節炎の発症を確認した後、患側肢の自発運動を制限する目的でギプス固定を行った(図1)。具体的には、ペントバルビタールナトリウム(40 mg/kg)の腹腔内投与によって麻酔を行った後、右側膝関節を最大伸展位の状態でギプス包帯を用いて2週間不動化した。なお、その際足指は浮腫の発生と皮膚の状態を確認するために露出させ、ギプスの緩みや浮腫を確認した際には適宜巻き替えを行っ

た。

(4) 筋収縮運動の実施方法

運動群においては、左側の腓腹筋に電気刺激による筋収縮運動を負荷した(対側肢)。具体的には、ペントバルビタールナトリウム(40 mg/kg)の腹腔内投与によって麻酔を行い、左側の下腿後面に電極を添付し(図1)、低周波治療器トリオ300(伊藤超短波社)を用いて通電した。通電条件は刺激周波数100Hz、刺激強度4mA、パルス幅250 μ sec、2秒間収縮—2秒間弛緩とし、電気刺激の際には足関節底屈運動が生じていることを確認した。運動頻度は1日1時間、週5回で、実験期間は2週間とした。



図1 背面からみたラット

右側:患側肢(関節炎+ギプス固定)
左側:対側肢(電気刺激), 矢印:電極

2. 評価方法

起炎剤投与前と投与後1, 3, 7, 14日目に、以下に述べる方法で右側膝関節の腫脹と圧痛閾値、足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値を測定・評価し、それにあわせて体重を測定した。

(1) 膝関節の腫脹

右側膝関節の腫脹は、右側膝関節の内・外側裂隙間の横径を用いて評価した。膝関節の横径はノギスを用いて測定した。

(2) 膝関節の圧痛閾値

右側膝関節の圧痛閾値は、プッシュプルゲージ(AIKOH ENGINEERING社製)を用いて測定した。具体的には、覚醒下で右側膝関節の外側

裂隙部に圧刺激を加え、後肢の逃避反応が出現する荷重量(N)を測定することで圧痛閾値を評価した。なお、測定は5回行い、その平均値をデータとして採用した。

(3) 足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値

足底部の機械的刺激に対する痛覚閾値は、von frey filament (VFF)テストにより評価した。VFF テストとは、フィラメントの太さの違うことによって皮膚に入力される機械的刺激の強度が異なることを利用した痛覚検査法であり、今回は、4g と 15g の VFF を使用し、足底をそれぞれ 10 回刺激し、その際の痛み関連行動(刺激時における刺激側後肢の逃避反応)の出現回数を測定することで評価した。なお、4g の VFF はアロディニアを、15g の VFF は痛覚過敏を評価する。

(4) 相対重量比

実験終了後は、両側腓腹筋を摘出し、筋湿重量を計測し、体重 1kg あたりの相対重量比を算出した。その後、トラガントガムに包埋し、液体窒素で冷却したイソペンタン液内(-80℃)で急速凍結した。凍結した試料は、クリオスタット(Leica 社製)を用いて 7 μm 厚に薄切し、連続横断切片とし、組織学的・組織化学的検索に供した。

(5) 組織学的・組織化学的検索

横断切片には、ヘマトキシリン&エオジン(以下、H&E)染色を施し、筋線維壊死や浮腫などの筋病理学的所見の有無を確認した。また、筋線維タイプを分別するため横断切片を酸性前処理(pH4.3)によるミオシン ATPase 染色を施し、混合筋部の拡大像(100 倍)を顕微鏡用デジタルカメラを用いて撮影した。そして、画像解析ソフト(Image J)を用いてタイプ I, IIa, IIb 線維の筋線維断面積を一筋あたり各々 100 本以上計測した。さらに、毛細血管を可視化するためにアルカリフォスファターゼ染色(以下、AP 染色)を施し、混合筋部の拡大像(200 倍)を無作為に 1 筋あたり 5 視野撮影した。そして、視野内に含まれる全ての毛細血管数と筋線維数をカウントし、一筋線維あたりの毛細血管数を算出した。

(6) 統計処理

各検索結果については一元配置分散分析(以下、ANOVA)を適用し、3 群間の有意差を判定した。そして、ANOVA にて有意差を認め

場合は、事後検定として Fisher の PLSD 法を適用し、2 群間の比較を行った。なお、すべての統計手法とも有意水準は 5%未満とした。

結果

1. 体重

起炎剤投与後 7 日目までは対照群、不動群、運動群の 3 群間に有意差は認めなかったが、14 日目において、対照群に比べ不動群と運動群が有意に低値を示した(図 2)。

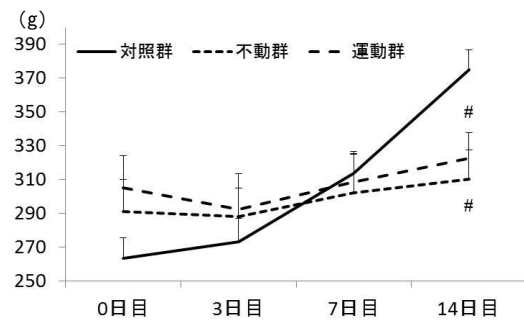


図 2 体重の変化

#:対照群との有意差(p<0.05)

2. 炎症と痛覚閾値

運動群と不動群では、起炎剤投与後 1 日目から右側膝関節(患側肢)に腫脹が発生し、膝関節の横径は対照群に比べ有意に高値を示した。しかし、3 日目以降は運動群と不動群の腫脹は消失し、3 群間に有意差を認めなかった。

運動群と不動群の右側膝関節(患側肢)の圧痛閾値は、起炎剤投与後 1 日目から対照群に比べ有意に低下し、14 日目までその状態が続いた。運動群と不動群との間に有意差は認めなかった(図 3)。

右側足底部(患側肢)の VFF4g に対する痛覚閾値は、実験期間を通して 3 群間に有意差を認めなかった。VFF15g に対する痛覚閾値では、起炎剤投与後 1 日目から、対照群に比べ不動群と運動群が有意に低下したが、運動群と不動群の間に有意差は認めなかった。その後 3, 7 日目では 3 群間に有意差を認めなかった。しかし、14 日目においては不動群が再び上昇を示し、不動群と対照群の間に有意差を認めた(図 4)。

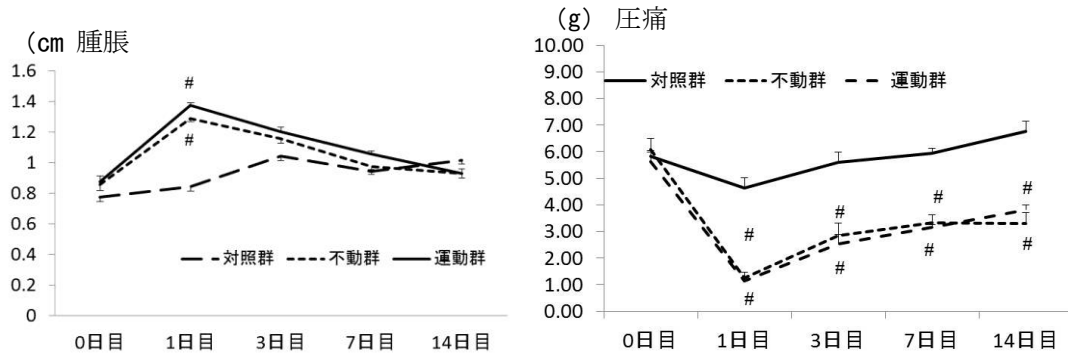


図3 右側膝関節(患側肢)の腫脹と圧痛閾値の変化

#:対照群との有意差(p<0.05). 平均±標準誤差.

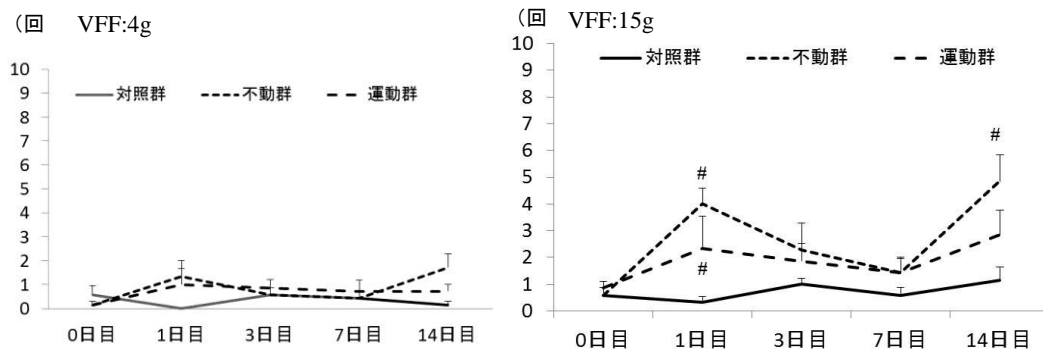


図4 右側足底部(患側肢)の痛覚閾値の変化

#:対照群との有意差(p<0.05). 平均±標準誤差.

3. 相対重量比・筋線維横断面積

左側腓腹筋(対側肢)の相対重量比は、運動群が他の2群と比較し有意に高値を示した。また、右側腓腹筋(患側肢)のそれは不動群と運動群が対照群と比較し有意に低値を示したが、不動群と運動群の2群間に有意差は認めなかった(図5)。

左側腓腹筋(対側肢)の筋線維横断面積を比較すると、タイプI線維では、対照群($1647.3 \pm 418.6 \mu\text{m}^2$)と不動群($1608.1 \pm 492.6 \mu\text{m}^2$)に比べ運動群($1778.3 \pm 559.5 \mu\text{m}^2$)が有意に高値を示した。タイプIIa線維では、対照群($1765.5 \pm 357.6 \mu\text{m}^2$)、不動群($1624.6 \pm 427.1 \mu\text{m}^2$)、運動群($1657.2 \pm 365.4 \mu\text{m}^2$)の3群間は同程度であった。タイプIIb線維では、対照群($2409 \pm 599.0 \mu\text{m}^2$)に比べ不動群($1957.8 \pm 508.163 \mu\text{m}^2$)と運動群($2218.0 \pm 602.4 \mu\text{m}^2$)が有意に低値を示した。また、不動群と運動群の2群を比較すると、運動群の方が有意に高値を示した(図6)。

次に、右側腓腹筋(患側肢)の筋線維横断面

積を比較すると、タイプI線維では、対照群($1809.2 \pm 558.2 \mu\text{m}^2$)に比べ不動群($1038.0 \pm 368.8 \mu\text{m}^2$)と運動群($1021.1 \pm 357.8 \mu\text{m}^2$)が有意に低値を示し、不動群と運動群の間に有意差は認めなかった。タイプIIa線維では、対照群($1755.4 \pm 371.7 \mu\text{m}^2$)に比べ、不動群($1014.1 \pm 328.5 \mu\text{m}^2$)と運動群($1095.3 \pm 286.5 \mu\text{m}^2$)で有意に低値を示し、また、不動群に比べ運動群が有意に高値を示した。タイプIIb線維では、タイプI線維と同じ傾向を認め、対照群($2356.8 \pm 624.3 \mu\text{m}^2$)と比べ不動群($1670.2 \pm 523.5 \mu\text{m}^2$)と運動群($1632.1 \pm 471.7 \mu\text{m}^2$)が有意に低値を示した(図6)。

4. 毛細血管数

左側腓腹筋(対側肢)の1筋線維あたりの毛細血管数は、対照群(2.32 ± 0.14)に比べ運動群(2.17 ± 0.24)と不動群(1.89 ± 0.40)が有意に低値を示し、不動群と運動群の2群を比較すると運動群の方が有意に高値を示した。また、右側腓

腹筋(患側肢)でも同じ傾向が認められ、対照群(1.94 ± 0.20)に比べ運動群(1.78 ± 0.15)と不動群(1.50 ± 0.30)が有意に低値を示し、不動群と

運動群の2群を比較すると運動群の方が有意に高値を示した(図7)。

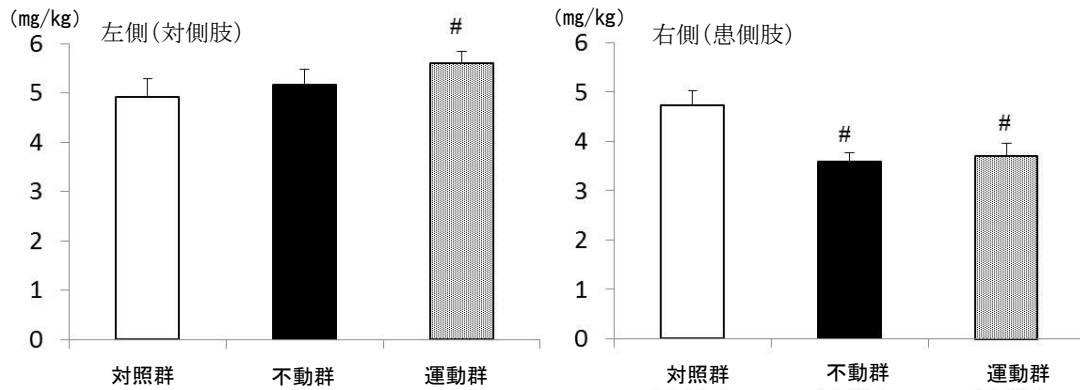


図5 相対重量比

#:対照群との有意差(p<0.05). 平均±標準偏差.

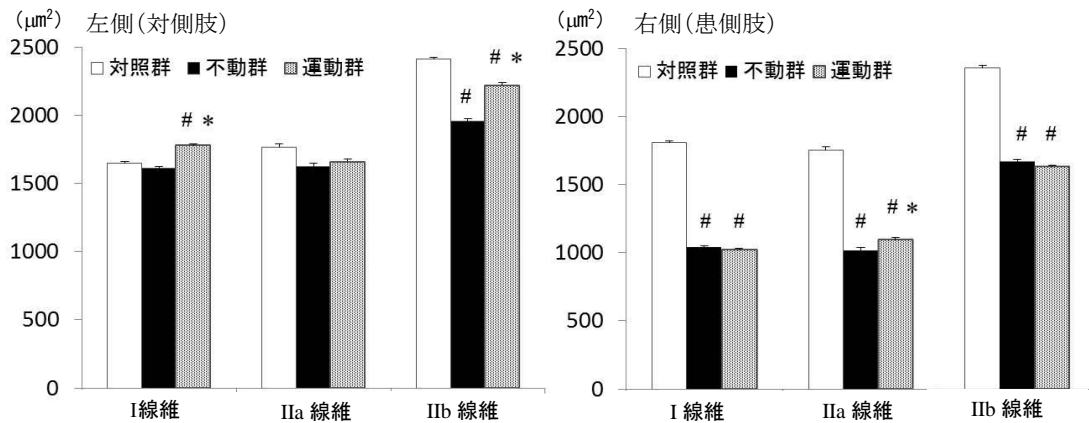


図6 筋線維断面積

#:対照群との有意差(p<0.05),*:不動群との有意差(p<0.05). 平均±標準偏差.

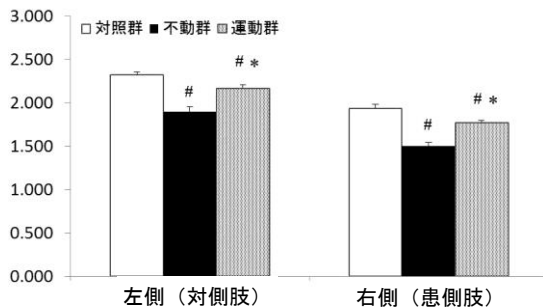


図7 1筋線維あたりの毛細血管数

#:対照群との有意差(p<0.05),*:不動群との有意差(p<0.05). 平均±標準偏差.

考察

本研究では、ラット膝関節炎モデルを用いて急性期の炎症による痛みや医学的管理などにより患側肢に積極的なアプローチを行えないため、対側肢の運動を行う場合をシミュレーションし、対側肢の運動が患側肢の痛みと廃用性筋萎縮に及ぼす影響を検討した。

今回の結果では、不動群と運動群の両群において、起炎剤投与後1日目から腫脹と圧痛閾値の低下を認め、また2群間に有意差を認めなかったことから、同程度の炎症が発生したといえる。そして、それぞれの推移をみると、腫脹と圧痛閾

値のいずれも起炎剤投与 14 日目まで、不動群と運動群の 2 群間に有意差を認めていない。このことは、対側肢の運動が炎症やそれに伴う痛みに対して効果はなかったことを示している。一方、不動群と運動群において、起炎剤投与後 1 日目から患側肢の足底部の痛覚閾値が低下し、痛覚過敏の発生を認めた。この症状は、膝関節に関節炎が惹起されたことにより、脊髄内で中枢性感作が生じたことが反映されていると考えられる²⁾。そして、3 および 7 日目においては痛覚過敏の症状と腫脹と対照群と同じレベルに復帰しており、このことから、今回作成した関節炎モデルは 3 日間で鎮静したと推測される。しかしその後、不動群において、足底部の痛覚過敏症状が起炎剤投与後 14 日目に再度出現した。これは、不動群において不動に伴う痛みが発生したこと示唆していると思われる。すなわち、四肢の関節がギプス固定等で不動化されると、末梢からの刺激が減弱・消失し、また皮膚に組織学的変化が生じ、痛覚過敏が発生することが明らかにすることが報告されており²⁾、今回の不動群でも同様の変化が発生したと考えられる。一方、運動群の足底部の痛覚閾値を見ると、起炎剤投与後 14 日目において対照群との間に有意差は認められなかった。ただ、不動群と運動群の間にも有意差は認められず、運動群において不動に伴う痛みが発生していなかったとは言い難い。また、不動群と運動群の膝関節炎の腫脹および圧痛覚閾値の低下は変わらなかったことから考えても、対側肢の筋収縮運動の影響と考えるより、評価の誤差として捉えるのが妥当であろう。

次に、対側肢(左側)の腓腹筋の結果を見ると、不動群のタイプ IIb 線維の筋線維断面積、および1筋線維あたりの毛細血管数は、対照群と比較して有意に低値を示した。これは、関節炎惹起による体重の減少、もしくはギプス固定による活動量の減少が影響したものと推測される。これに対して、運動群の相対重量比は、対照群のそれと比較し有意に高値を示した。また、運動群のタイプ I・IIb 線維の筋線維断面積は不動群のそれより有意に高値を示した。このことは、運動群に負荷した対側肢の電気刺激による筋収縮運動が、腓腹筋の筋線維肥大を惹起させたと考えられる。また、運動群の一筋線維あたりの毛細血管

数は不動群に比べ有意に高値を示し、これは筋線維肥大に伴い毛細血管が新生したものと考えられる⁷⁾。つまり、今回運動群に負荷した電気刺激による筋収縮運動は、筋線維肥大を誘導するのに十分な負荷量であり、このことから、筋収縮運動による血中へのサイトカインの放出も起きていたと推察される。

一方、患側肢(右側)の腓腹筋では、不動群と運動群の相対重量比、ならびに全筋線維タイプ筋線維断面積は対照群に比べ有意に低値を示した。これは、患側肢がギプス固定により不動状態にさらされたことによる廃用性筋萎縮の発生とみて間違いない。不動群と運動群では、先行研究と同様に、廃用性筋萎縮に伴う1筋線維あたりの毛細血管数の減少も確認されている⁷⁾。また、不動群と運動群の2群を比較すると、運動群の1筋線維あたりの毛細血管数は不動群のそれと比較し有意に高値を示した。この結果は、対側肢の筋収縮運動が廃用性筋萎縮に伴う毛細血管数の減少を抑制したことを示唆していると考えられる。そのメカニズムとしては、対側肢の電気刺激による筋収縮運動がサイトカインの一つである血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)の発現と血中への放出を促し、血中の VEGF に患側肢の骨格筋が反応して廃用性筋萎縮に伴う毛細血管数の減少が抑制されたのではないかと考える。今回は血中 VEGF 濃度を計測していないため推測の域を脱さないが、先行研究¹⁰⁾によると、電気刺激による筋収縮運動は筋内の低酸素状態を引き起こし、それによって低酸素誘導因子(HIF)が誘導され VEGF の発現を促進するとされている。骨格筋に対する電気刺激は、筋内でずり応力により血管内皮壁に圧と緊張を与え、こうした現象によっても VEGF は誘導されるという報告もある¹¹⁾。また、Tirziu ら¹²⁾の先行研究では、心筋梗塞モデルマウスに対して尾静脈から VEGF を投与すると、心筋肥大と心機能回復の効果が得られたという報告があり、そのメカニズムとして、VEGF が血管内皮細胞増殖を促進し、毛細血管密度を増加させ、毛細血管数の増加は血管内皮細胞が分泌する一酸化窒素(NO)の分泌を促進することが明らかにされている。そして、Tirziu ら¹²⁾は、NO が骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞の活性化や血管

拡張などを制御していることから、NO の分泌量のベースラインが増加することで筋線維肥大を促進したと論じている。つまり、VEGF に対する毛細血管の反応や、NO に対する筋衛生細胞の反応については心筋と骨格筋に違いはないと考ええると、毛細血管の増加が誘導された患側肢の腓腹筋では、廃用性筋萎縮の進行が抑制される可能性はある。しかしながら、患側肢(右側)の腓腹筋の筋線維断面積を運動群と不動群と比較すると、タイプ IIa 線維のみ運動群の方が有意に高値を示したが、Type I とタイプ IIb は2群間に有意差を示さなかった。今回筋線維を解析した腓腹筋の混合筋部(深層)には各筋線維タイプがほぼ均一に分布しており、また、毛細血管の増減に対する反応性が筋線維タイプによって異なるとの報告は見あたらない。したがって、今回の筋線維断面積の結果には疑問が残るところであり、対側肢の筋収縮運動により患側肢の廃用性筋萎縮の進行を抑制することが可能かどうかを明らかにすることはできなかった。

以上のことから、対側肢の筋収縮運動は、患側肢の廃用性筋萎縮に伴う毛細血管数の減少を抑制するが、患側肢の炎症や痛み、廃用性筋萎縮に対しては効果を示さないと考えられ、我々の仮説は支持されなかった。ただ、片岡ら¹³⁾は、毛細血管の新生が障害される糖尿病モデルラットでは、ギプス固定により惹起した廃用性筋萎縮

はギプスを解除しても回復しなかったことから、廃用性筋萎縮の回復には毛細血管が重要であることを報告している。このことを踏まえて考えると、対側肢の筋収縮運動は、患側肢の廃用性筋萎縮に伴う毛細血管数の減少を抑制することにより、その後の廃用性筋萎縮の回復の進行に好影響を与える可能性が残される。つまり、術後急性期の患者において炎症と痛みが激しく患側肢への積極的なアプローチが行えない場合でも、対側肢または遠隔部の筋収縮運動を主とした積極的なアプローチを展開すれば、炎症と痛みが鎮静した後、リハビリテーションによる患側肢の廃用性筋萎縮の回復がスムーズに進むことが期待され、今後はこの点を明らかにしていきたい。

謝辞

今回の実験において、ご指導、ご協力いただいた長崎大学大学院医歯薬学総合研究科運動障害リハビリテーション学研究室の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 沖田実, 松原貴子・他: 機能障害科学入門. 千住秀明(編), 神陵文庫, 福岡, 2010, pp.183.
- 2) 沖田実: Pain Rehabilitation—ペインリハビリテーション, 松原貴子, 沖田実, 森岡周, 三輪書店, 東京, 2011, pp.134-157.
- 3) Teranaka K, Sakamoto J, et al.: Effect of immobilization and low-intensity isotonic muscle contraction on swelling and pain threshold in a model of rat experimental arthritis. PAIN RESEARCH 29: 151-160, 2014.
- 4) 真鍋康子, 藤井宣晴: 糖尿病における運動とマイオカイン. Diabetes Frontier 24: 174-179, 2013-2014.
- 5) 田島文博, 古澤一成・他: 障害者スポーツ医学の最先端—残存骨格筋は内分泌器官である—. Jpn J Rehabil Med 47: 304-309, 2010.
- 6) Mark D Ross, Antony L Wekesa, et al.: Resistance Exercise Increases Endthelial Progenitor Cells and Angiogenic Factors. Medicine and science in sports and exercise 46(1):16-23, 2014.
- 7) 藤野英己, 上月久治・他: 廃用性筋萎縮における毛細血管リモデリングと血管増殖因子の抑

制. 理学療法学 23: 203-208, 2008.

- 8) 金尾洋治, 勝田 茂: スプリントおよび持久トレーニングがラットの骨格筋線維および毛細血管の発達に及ぼす影響. 体力科学 32: 311-319, 1983.
- 9) Devici D, Marshall JM, et al.: Chronic hypoxia induces prolonged angiogenesis in skeletal muscles of rat. *Exp Physiol* 87: 3287-3291, 2002.
- 10) Forsythe JA, Jiang BH, et al.: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16: 4604-4613, 1996.
- 11) Hudlicka O, Brown MD, et al.: Effect of long-term electrical stimulation on vascular supply and fatigue in chronically ischemic muscles. *J Appl Physiol* 77: 1317-1324, 1994.
- 12) Tirziu D, Chorianopoulos E, et al.: Myocardial hypertrophy in the absence of external stimuli is induced by angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 117: 3188-3197, 2007.
- 13) Kataoka H, Nakano J, et al.: Hyperglycemia inhibits recovery from disuse-induced skeletal muscle atrophy in rats. *Physiol Res* 63: 465-474, 2014.

(指導教員 中野治郎)