

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究C

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500476

研究課題名（和文） 走査型電子顕微鏡を用いた廃用性萎縮筋の解析

研究課題名（英文） Observation of atrophied skeletal muscle using scanning electron microscopy

研究代表者

坂本 美喜 (SAKAMOTO MIKI)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：40365177

研究成果の概要（和文）：本研究では、走査電子顕微鏡および免疫染色法を用いて廃用性萎縮筋の筋原線維・筋膜および筋間質の変化を解析した。実験には、廃用性萎縮を生じた若年マウス（5週齢）のヒラメ筋を用いた。その結果、走査電子顕微鏡像では、筋線維の辺縁部に波状構造を呈する部位が観察された。免疫組織染色で波状構造物を解析した結果、基底膜であることがわかった。波状構造付近の筋原線維の構造は乱れていたが筋原線維の融解像は観察されず、また基底膜分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼの発現変化も認められなかった。廃用性萎縮筋では基底膜が細胞質内に侵入するような形態変化が生じることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study analyzed the histological and ultrastructural changes of atrophied muscle fibers using scanning electron microscopy (SEM) and immunohistochemistry. We used an animal model of disused muscle atrophy. In muscle fibers of the immobilization group, wave-like structure was observed: it appeared as a groove, and was thought to be endomysium inserted into the cytoplasm of the muscle fiber. The wave-like structure was positive for anti-collagen IV antibody. Based on these results, the structure which inserted into the cytoplasm and formed a groove was confirmed to be endomysium. Moreover, myofibrillar disruption and MMP expression were not observed at region of the wave-like structure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション医学、廃用性筋萎縮、走査型電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は可塑性を有する組織であり、加わる刺激の違いにより肥大や萎縮を呈する。骨格筋の萎縮は、神経・筋疾患、加齢、長期臥

床など様々な原因で生じ、特に廃用性筋萎縮は多くの疾患で共通する問題であり、この予防と早期の改善を図ることは社会復帰を目指す上でも重要である。

廃用性筋萎縮に関する報告では、筋容量の減少、筋タンパク量の低下、筋横断面積の減少や筋線維タイプ比率の変化など多くの変化が生じる。また、筋細胞のみならず、骨格筋の間質におけるマクロファージや線維芽細胞の増加、筋内膜においても肥厚や線維走行の乱れなど構造変化が生じることが報告されており、筋柔軟性の低下や関節可動域低下の要因になることが推測されている。

我々は、廃用性筋萎縮の実験モデルとして関節固定モデルを作成し、廃用性筋萎縮の形態的变化について調査をしてきた。その結果、筋短縮位で固定したマウスヒラメ筋の筋縦断面の観察では、固定後3日から筋線維の波打つような形態的变化(wave-like structure)を認め、廃用性変化の初期の形態的特徴となる可能性を示した(Sakamoto M, et al. Health and Behavior Science 5, 2006)。

2. 研究の目的

本研究では、関節固定モデルを用いて、骨格筋線維の形態や間質の変化、筋膜の変化について組織学的・免疫組織学的方法と走査型電子顕微鏡(SEM)を用いた微細構造の観察により明らかにする。SEMを用いた本方法は、岡らが開発した観察方法であり、パラフィン切片を試料としてSEMでの観察が可能である(Oka K, et al. Health and Behavior Science 6, 2008)。一般に、筋の微細構造観察には透過型電子顕微鏡(TEM)が用いられてきた。しかしTEMは、試料の作成が非常に煩雑であり、観察範囲も限られるという欠点も有する。

今回のSEMを用いた方法は、1)従来より幅広く用いられているパラフィン切片を用いて観察をおこなえる、2)低倍率での観察も可能であり、切片全体にわたって観察し、任意の部位を高倍率で観察できる、3)SEMで観察した切片に連続した切片について、免疫組織化学的手法で比較できる、などの特徴があり、本方法で骨格筋の変化をとらえる意義は大きいと考えられる。

廃用性筋力低下に対する理学療法を処方するうえでは、骨格筋に生じている変化を詳細にとらえ、変化に適した運動処方や物理療法を実施することが重要である。本研究は、萎縮筋の機能回復をはかるうえで有効な治療法を確立するための基礎的資料となるものと考えられる。

3. 研究の方法

1) 実験方法

(1) 実験動物：ICR系雌マウス

(2) 廃用性筋萎縮モデルの作成

マウスヒラメ筋を短縮位となるように足関節を底屈位に固定したモデルを作成した。観察時期は、関節固定後1, 2, 3, 4, 5, 7, 10日間を観察時期とした。

2) 走査型電子顕微鏡を用いた解析

先行研究(Oka et al; Health and Behavior Science 6, 2008)を参考にサンプルを作成した。採取したヒラメ筋は速やかに5℃に冷却したアセトン溶液中に入れ脱水・固定した。その後、通常の方法でパラフィン包埋を行い、厚さ8μmの切片を作成し、脱パラフィン処理を行ったのち、Pt-Pdイオンスパッタリングを施した。その後、走査型電子顕微鏡で観察した。

3) 免疫組織化学染色

(1) 筋線維の形態について

走査型電子顕微鏡観察で用いた切片と連続した切片を用いて、免疫組織染色(抗デスミン抗体、抗ラミニン抗体、コラーゲンIV抗体、抗コラーゲンI抗体、抗MMP2抗体)をおこなった。

(2) 筋間質の観察

採取筋は、10%バッファホルマリンで固定し、通常の方法にてパラフィン包埋した。厚さ8μmの縦断連続切片を作成し、脱パラフィン後にヘマトキシリン・エオシン(HE)で染色した。間質における単核細胞の数の測定には、切片上で最も遊離単核細胞が集中している部位をコンピュータ画像から探し、単位面積(500 x 500μm)あたりの細胞数を数えた。

また、免疫組織染色(抗マクロファージ抗体、抗好中球抗体、抗線維芽細胞抗体、抗デスミン抗体)も実施した。

4. 研究成果

1) 筋線維および筋膜の構築学的変化

(1) コントロール群

コントロール群のヒラメ筋について、HE染色で観察すると、筋辺縁は直線状を示しておりSEM像でも同様の所見がみられた(SEM像; 図1a)。コラーゲンIV抗体で染色すると筋辺縁は陽性となり筋基底膜であることが確認された(図1b)。SEMで拡大して観察すると、筋線維内には筋原線維が認められ、またT管と思われる筋原線維に直行して走行する構造物も観察された(図2a, b)。

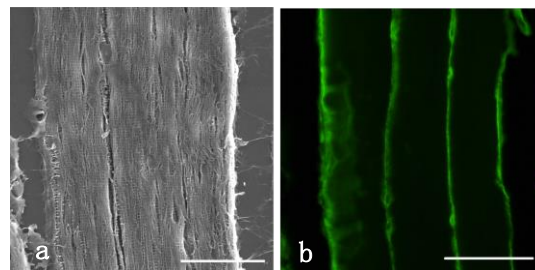


図1：コントロール群におけるSEM像および免疫染色像；(Scale bar; 50μm)

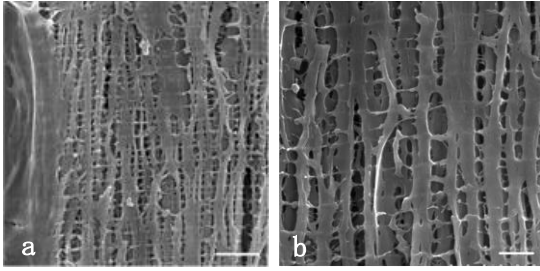


図 2 : コントロール群における SEM 像
(Scale bar; a:5µm, b; 2µm)

(2) 固定群

①10 日間固定群の筋線維では、筋線維の波状構造が観察された (図 3)。波状構造の部位周辺において筋原線維の構造は保たれており明らかな破綻は認められなかった。波状構造部位をさらに高倍で観察すると、筋線維の外側部に位置する構造物が筋の細胞質に入り込み溝のような構造をとっている所見が多数観察された (図 3:b)。コラーゲン IV 抗体を用いた免疫組織染色を実施したところ、この構造物は基底膜であることが確認できた (図 4b)。

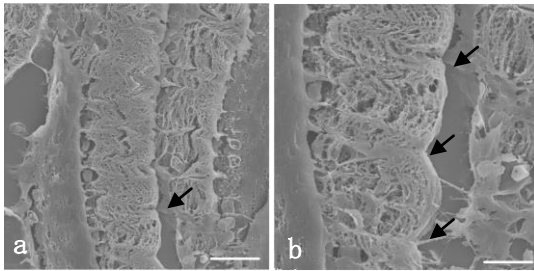


図 3 : 固定群における SEM 像。矢印は基底膜が変形している部位を示す。
Scale bar: a;50µm, b; 25µm

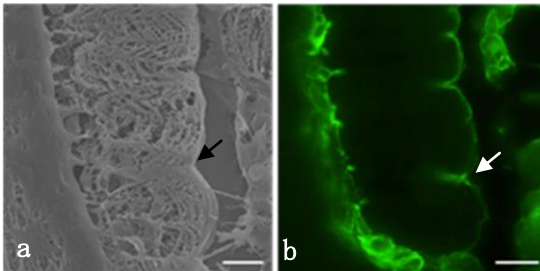


図 4 : 固定群における SEM 像および IHC 像。
矢印は、基底膜が細胞質に入り込んでいる部位。a, b は連続切片。
Scale bar; 25µm

②固定群のヒラメ筋基底膜における MMP-2 の発現

筋基底膜における MMP-2 の発現変化について、免疫組織染色を用いて観察した。その結果、コントロール群と固定群の両群における発現パターンの違いは認められなかった。

2) ヒラメ筋間質における変化

廃用性萎縮筋では、筋間質におけるマクロファージの増加や線維芽細胞の増加が報告されている。そこで、本研究においても固定による筋萎縮の程度と筋間質の単核細胞数の変化を観察した。その結果、筋横断面積は固定後 3 日においてコントロール群 (0 日) と比較してタイプ I 線維・タイプ II 線維ともに萎縮を示した。間質における単核細胞数は、固定後 3 日よりコントロール群 (0 日) と比較して増加傾向が認められ、固定後 10 日で最も多かった (図 5)。この単核の細胞について、免疫組織染色を用いて同定を試みたところ、好中球はわずかに検出されたものの、マクロファージ、線維芽細胞は検出できなかった。

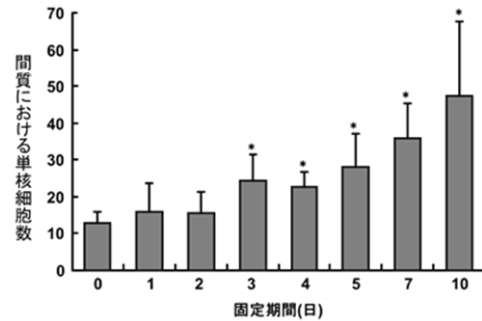


図 5 : 間質における単核細胞数の経時的推移

(* : $p < 0.05$ vs control (0 日))

本実験では、関節固定によって惹起した廃用性萎縮筋の基底膜と筋原線維および筋間質の変化を、免疫組織染色法および走査型電子顕微鏡を用いて観察した。廃用性萎縮筋では、筋線維に波状の構造が観察され、さらに波状の部位では筋線維内に基底膜が入りこむ像が認められた。しかし、基底膜の分解酵素の一つである MMP2 の変化は検出されなかった。また、先行研究で報告されている筋原線維の明らかな破綻はみられなかった。筋間質においては、単核細胞数が固定期間の延長とともに増加した。筋萎縮も同時期に出現したことから単核細胞の出現と筋萎縮に関連があることが示唆されたものの、マクロファージや好中球、線維芽細胞等の細胞の同定はできず、今度さらに検討する必要がある。

以上より、筋短縮位にて惹起された廃用性萎縮は短期間で大きな萎縮が生じる。しかし、筋原線維や基底膜の構造は著明な変化が認められなかったことから、比較的すみやかに回復することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① Sakamoto M, Maehara A, Muro M, Oka K .Changes of interstitial free mononuclear cells in the process of disuse muscle atrophy. Health and Behavior Sciences 10 (2) 93-100, 2012. 査読あり
- ② Koga H, Sakamoto M, Muro M, Oka K. Observation of perimysium in skeletal muscle. Health and Behavior Sciences 10 (1) 33-38, 2011. 査読あり

〔学会発表〕(計5件)

- ①坂本美喜, 甲賀弘憲, 岩波裕治, 岡和之, 室増男, マウスヒラメ筋における筋線維タイプ構成比率と筋横断面積および筋線維総数の加齢的推移. 日本健康行動科学学会第11回学術大会, 東京, 2012年10月6日発表.
- ② Sakamoto M, Koga H, Muro M, Oka, K. Observation of wave-like structure in atrophied skeletal muscle using scanning electron microscope and immunohistochemistry. The 16 Annual Congress of the European College of Sport Science, イギリス, 2011年7月7日発表。
- ③ Koga, H., Sakamoto, M., Muro M., Oka K. Observations of perimysium using scanning electron microscopy and immunohistochemical techniques. Koga, H., Sakamoto, M., Muro M., Oka K. The 15 Annual Congress of the European College of Sport Science, トルコ, 2010年6月26日発表。
- ④ Sakamoto M, Koga H, Muro M, Oka K. Observation of perimysium in skeletal muscle under scanning electron microscopy. The 15 Annual Congress of the European College of Sport Science, トルコ, 2010年6月25日発表。
- ⑤坂本美喜, 甲賀弘憲, 原田 孝, 室 増男, 岡和之: 走査型電子顕微鏡による筋周膜の観察. 第21回運動器リハビリテーション学会, 東京, 2009. 7. 11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本美喜 (SAKAMOTO MIKI)
北里大学・医療衛生学部・講師
研究者番号: 40365177