

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号 : 12612

研究種目 : 挑戦的萌芽研究

研究期間 : 2011~2012

課題番号 : 23650403

研究課題名(和文) 筋代謝産物を生体内で観察するバイオイメーjing技術

研究課題名(英文) Bioimaging technique to observe skeletal muscle metabolites in vivo

研究代表者

狩野 豊 (KANO YUTAKA)

電気通信大学・情報理工学研究科・教授

研究者番号 : 90293133

研究成果の概要(和文) : 本研究は, 生体内における筋細胞内pH (pHi)制御機構を明らかにすることを目的として, *in vivo*環境下における動物モデルを考案し, 筋線維への異なるpH溶液のインジェクションによるpHi動態を観察した. Wistar系雄性ラットを対象として, 麻酔下で外科的に露出した脊柱僧帽筋にpH感受性蛍光指示薬であるBCECF-AMを負荷した. 低pH溶液を筋線維に直接注入し, その動態を評価した. その結果, *in vivo*環境下で単一筋線維レベルのpHi動態を観察することに成功し, 低pH溶液に対する動態を明らかにした.

研究成果の概要(英文) : Using an *in vivo* bioimaging model and microinjection technique, we tested homeostasis of intracellular when low pH solution was loaded in single fiber by microinjection. The intact spinotrapezius muscle of adult male Wistar rats was exteriorized and loaded with the fluorescent probe BCECF-AM. Muscle was loaded low pH solution by microinjection. This model offers a unique opportunity to investigate the consequences of experimental manipulations of pH on muscle buffering dynamics under close-to-physiological conditions.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野 : 総合領域

科研費の分科・細目 : 健康・スポーツ科学 ・ スポーツ科学

キーワード : バイオイメーjing, 骨格筋, ホメオスタシス

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は運動の強度や時間によって動員される筋線維が異なる. 筋線維の動員パターンは筋線維タイプと関係している. 筋線維タイプは遅筋型 (Slow Twitch) と速筋型 (Fast Twitch) に大別できる. 低強度運動で動員される Slow Twitch 線維はミトコンドリアが多く, 乳酸をエネルギー基質として利用する. Fast Twitch 線維はミトコンドリアが少なく, 解糖系酵素活性が高いことから, 乳酸が産生されやすい. したがって, 血液中に

漏出される乳酸は筋内の乳酸産生と消費のバランスを反映している.

乳酸は乳酸塩と水素イオン (H^+) として代謝され, 結果として筋細胞と血液中の pH の低下を生じると考えられる. また, 近年, 運動中の pH 低下は乳酸の代謝にともなう H^+ の産生の他, ATP 分解による H^+ の産生に起因するという研究報告がある. これまで, 筋収縮にともなう H^+ が, いつ, どこで産生され, 筋細胞に蓄積し, 血液中に運搬されるのかについて, 直接的な証明は得られていない.

2. 研究の目的

筋収縮による代謝活動の亢進にともなう、筋線維中には様々な代謝産物が生じる。なかでも「乳酸」は代謝産物の代名詞ともなっている。乳酸は乳酸塩と水素イオン (H^+) として代謝され、結果的に筋線維中の pH 低下を生じさせる。そこで本研究では生きたままの筋組織において筋細胞内 pH (pH_i) を筋線維毎にリアルタイム計測できる *in vivo* バイオイメージング法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 被験動物

本研究では、Wistar 系ラット (雄)、体重 247-344 g、10-14 週齢を用いた。全ての実験は、電気通信大学実験委員会の承認を得たものであり、本学動物実験等規程にしたがって行われた。

(2) 外科的処置

本実験では、ラット脊柱僧帽筋を対象とした。この筋は、ヒトの大腿四頭筋と類似した筋線維組成 (Type I : 40%, Type II A : 7%, Type II D/X : 17%, Type II B : 35%) を有している (DeLp & Duan, 1996)。また、最薄部位では筋線維 10 本程度の厚さであり、環状の血管ネットワークが筋の剥離後も維持されているために、神経活動や血流が維持された状態での顕微鏡観察が可能である (Gray, 1973; Sonobe et al., 2008)。外科的処置のためにラットにソムノペンチル (共立製薬, 100 ml/kg/Body weight) を腹腔内注入することで麻酔した。また、必要に応じて麻酔は適宜追加した。処置中のラットは、体温を保持するために実験中常に 37°C に維持されたホットプレートの上に静置した。

麻酔下において、ラットの右脊柱僧帽筋の組織を傷つけないように慎重に組織から剥離・露出し、表面を覆う結合組織などを顕微鏡下で可能な限り取り除いた。脊柱僧帽筋に特徴的な環状の細動静脈を維持するため、筋の近位部において主となる供給動脈を傷つけないように注意しながら筋の一部を剥離した。剥離した筋は筋長を維持するために、馬蹄型の針金のリングに縫合糸 (Sigma) で固定した。

外科的処置の間、対象筋表面の乾燥を防ぐために pH 7.35-7.40 に平衡化し、37°C に維持した Krebs-Henseleit bicarbonate-buffered solution (KHB) 溶液 [$NaHCO_3$: 21.8 mM, $NaCl$: 132 mM, KCl : 4.7 mM, $MgSO_4$: 2 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 2 mM (equilibrated with 95% N_2 -5% CO_2)] を滴下することで常に保湿した。また、溶液はラットの体温に近づけるため 37°C に管理された恒温槽によって保温した。

(3) pH 感受性蛍光指示薬の負荷

本実験では、pH 感受性蛍光指示薬として最終濃度が 10 μM になるように KHB 溶液で希釈した BCECF-AM を用いた。外科処置後、露出させた脊柱僧帽筋をチャンバー内に浸る程度に引き伸ばし、BCECF-AM 溶液内で 45 分インキュベーションした。インキュベーション終了後、負荷されなかった余分な BCECF-AM を取り除くため KHB 溶液で 15 分間の洗浄を行った。

(4) *in vivo* バイオイメージング観察

Fig. 1 に実験の模式図を示した。BCECF-AM を負荷した筋は、ラットを側臥位にし 37°C に保たれたガラスホットプレート上に静置した。固定された筋線維をガラスホットプレート上で落射型蛍光顕微鏡を用いて観察した。まず透過光によって血流の有無、組織の状態を観察し、血流のない部分や剥離によって傷ついた組織の領域などは対象外とした。

明視野、蛍光画像の取得には高感度 CCD デジタルカメラ、画像取得・解析ソフトウェア NIS-Elements AR を用いた。明視野画像は自動露光で画像を取得し、蛍光観察の光源にはキセノンランプを使用し、445 nm と 500 nm のフィルターによって 2 種類の励起光を得た。測光は 535 nm のフィルターを通して観察した。pH 感受性蛍光指示薬の BCECF-AM は 500 nm 付近で励起した場合には pH_i の低下 (H^+ 濃度上昇) に伴い蛍光強度が減少するのに対し、440 nm 付近で励起した場合蛍光強度は変化しない。この特性から、2 種類の波長によって励起し、蛍光強度の比をとることにより、色素の濃度、光源強度、細胞の大きさ、厚さ等に関係なく pH と対応付けることができる (レシオメトリー法)。蛍光画像取得時の蛍光フィルタブロックの切り替えは、この画像取得ソフトに連動した蛍光フィルタブロックのチェンジャーにより自動で切り替えた。蛍光画像は 445 nm, 500 nm とともに 0.1-0.7 秒間の露光時間、Gain は 150 で画像を取得し、実験中に画像取得ソフトを用いて、445 nm, 500 nm で励起した 2 枚の 535 nm の蛍光画像を除算処理 (F500/F445 : R) した ratio 画像を経時的に取得した。 pH_i の値は、画像に設定した ROI の範囲を数値化し、安静時 (R_0) からの変化率を pH_i の変化 (R/R_0) として表した。また、画像は疑似カラーにより、 pH_i の変化を色調で視覚化した。

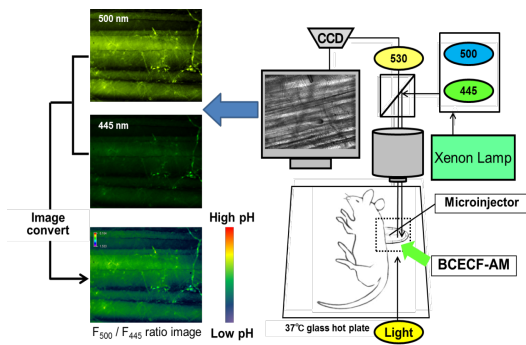


Fig. 1. *in vivo* バイオイメージング実験システム

(5) マイクロインジェクション方法

マイクロインジェクションに使用したキャピラリーは、ガラス管をプーラーで引き伸ばし（二段引き、No.1 ヒーター：65.1, No.2 ヒーター：60.0-60.2, おもり：3-4, スライダー（ヒーター側）：2.5-3.5, スライダー（おもり側）：5-7）、先端を研磨機で約 $5 \mu\text{m}$ に加工したものを使用した。マイクロインジェクションは、電動マイクロインジェクターを用い、 N_2 ガスを用いて、35 psi（約 24,000 Pa）で 1-3 秒間溶液の注入を行った。

(6) 実験プロトコル

実験 1. *in vivo*, *in vitro* コントロール

本実験では、*in vivo* コントロール ($n = 7$) と、*in vitro* コントロール ($n = 6$) にグループ分けした。

in vivo コントロール実験においては、*in vivo* バイオイメージング観察法を用いて、筋が乾燥しないように常に KHB 溶液で保湿しながら、pre 値を取得後、5 分ごとに 90 分間撮影を行った。取得した画像は、NIS-Elements AR を用いて、1 本の線維に 3 つの ROI を設定したものを 5 本の線維で行い、これを平均化したものを筋線維の pH_i とした (Fig. 2-a)。

in vitro コントロール実験においては、BCECF-AM を負荷した脊柱僧帽筋をラットから切除し、 37°C のガラスホットプレートに乗せた。その後、*in vivo* コントロールと同様に、筋が乾燥しないように KHB 溶液で保湿しながら、pre 値を取得後、5 分後とに 90 分間撮影を行った。

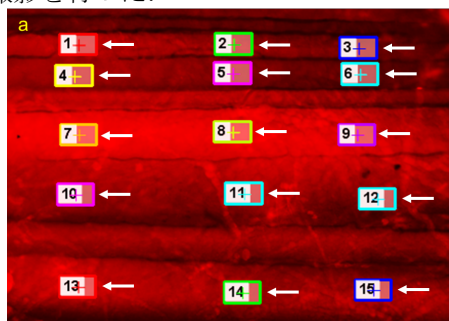


Fig. 2-a. *in vivo*, *in vitro* コントロールの取得画像と評価方法

実験 2. 単一筋線維への注入実験

本実験では、1 秒間の PIPES 溶液注入グループ ($n = 12$)、3 秒間の PIPES 溶液注入グループ ($n = 7$)、1 秒間の HEPES 溶液注入グループ ($n = 4$) にグループ分けをした。測定線維にキャピラリーをセットし、明視野画像を取得した。蛍光画像の取得は約 1 秒毎に 90 秒間おこなった。まず、キャピラリーを筋内に挿入した状態で 30 秒間蛍光画像を取得していき、そのまま撮影を続けながら PIPES 溶液注入グループは、pH 6.5 になるように HCl と KOH で調整した PIPES 溶液 (KCl: 122 mM, Dextrose: 11 mM, MgCl_2 : 1.0 mM, KOH: 18 mM, PIPES: 15 mM, EGTA: 1.0 mM, 37°C , pH 6.5) を 35 psi で 1 秒間または 3 秒間で注入した。また、HEPES 溶液注入グループは pH 12 になるように HCl と KOH で調整した HEPES 溶液 (KCl: 86.7 mM, Dextrose: 11 mM, MgCl_2 : 1.0 mM, KOH: 53.3 mM, HEPES: 9.5 mM, EGTA: 2.0 mM, 37°C , pH 12) を 35 psi で 1 秒間注した。注入後速やかにキャピラリーを筋から抜き、観察を 90 秒まで観察を続けた。その後、溶液注入から 5 分ごとに 20 分間蛍光画像の取得をした。取得した画像は、NIS-Elements AR を用いて、ROI を Injection Fiber, Injection Fiber の上の 2 本の Fiber 1, Fiber 2, Injection Fiber の下の 2 本の Fiber 3, Fiber 4 の 5 本に設定し、解析を行った (Fig. 2-b)。また、明視野画像で確認し、溶液を注入した線維の筋直径を計測した。

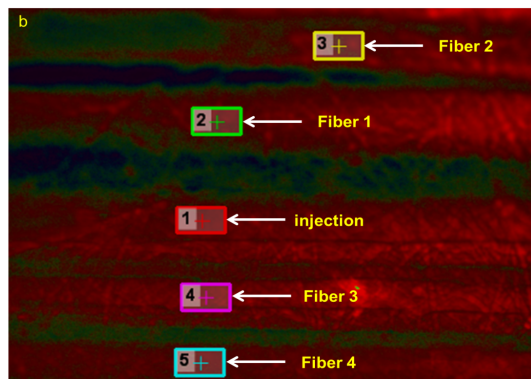


Fig. 2-b. インジェクション実験の評価方法

4. 研究成果

実験 1

Fig. 3 は、90 分間の *in vivo* 環境下と *in vitro* 環境下でのラット脊柱僧帽筋の pH_i の相対値変化 (R/R_0) を示している。*in vivo* 環境下では、90 分間での pH_i 変化はほぼ一定を保っている。しかしながら、*in vitro* 環境下では、*in vivo* 環境下に比べ、10 分後には pH_i の低下が観察され、25 分後からは *in vivo* 環境下に比べて有意な低下を観察した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. *in vivo*)。

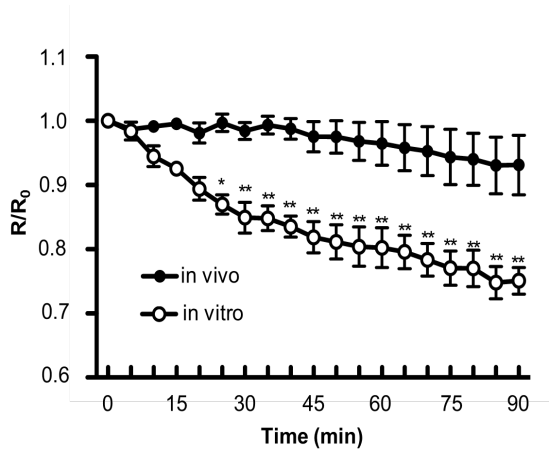


Fig. 3. *in vivo* と *in vitro* の pH_i 変化 (mean \pm SE, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. *in vivo*).

実験 2

Fig. 4 は、1 秒間と 3 秒間の異なる時間で PIPES 溶液を注入した時の Injection Fiber の pH_i の相対値変化 (R/R_0) を示している。両注入時間において、溶液注入後に有意な pH_i の低下 (1 秒注入; 77.9 ± 1.3 , 3 秒注入; 66.7 ± 1.5 , $p < 0.05$) が観察された。また、3 秒間の注入時間においては、1 秒間の注入時間と比べ、溶液注入直後から有意な pH_i の低下を示した (Fig. 4-b)。その後、両注入時間ともに、20 分間で pH_i の回復が観察された (1 秒注入; 71.7 ± 6.4 %, 3 秒注入; 53.5 ± 4.9 %, $p < 0.05$)。注入直後に 3 秒間の注入時間においては 1 秒間の注入時間よりも有意に pH_i が低下していたものの、5 分間の回復では pH_i に有意な差は観察されなかった。しかしながら、15 分後からまた有意な差が観察された (* $p < 0.05$ vs. 3 sec, Fig. 4-a)。この時、両注入時間において、回復動態に早い回復動態と遅い回復動態の二局面が見られた。

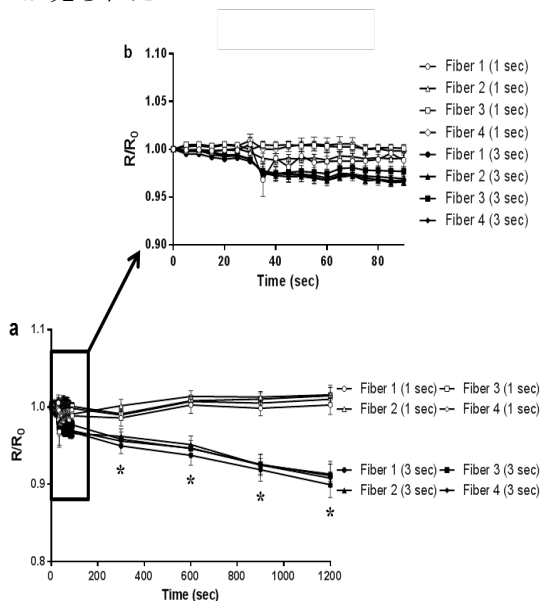


Fig. 4. pH 6.5 溶液を異なる時間 (1 sec, 3 sec) で注入した時の Injection Fiber (1200 秒間:a, 90 秒間:b) の pH_i 変化 (mean \pm SE, * $p < 0.05$ vs. 3 sec).

Fig. 5 は 1 秒間と 3 秒間の異なる時間で PIPES 溶液を注入した時の周辺の筋線維 (Fiber 1, Fiber 2, Fiber 3, Fiber 4) の pH_i の相対値変化 (R/R_0) を示している。90 秒間では、1 秒間と 3 秒間で有意な差はされなかったものの (Fig. 5-b), 5 分後からは、1 秒間に比べ 3 秒間で有意な pH_i の減少が確認された (Fig. 5-a)。この時、溶液を注入した線維の経に違いは確認されなかった。

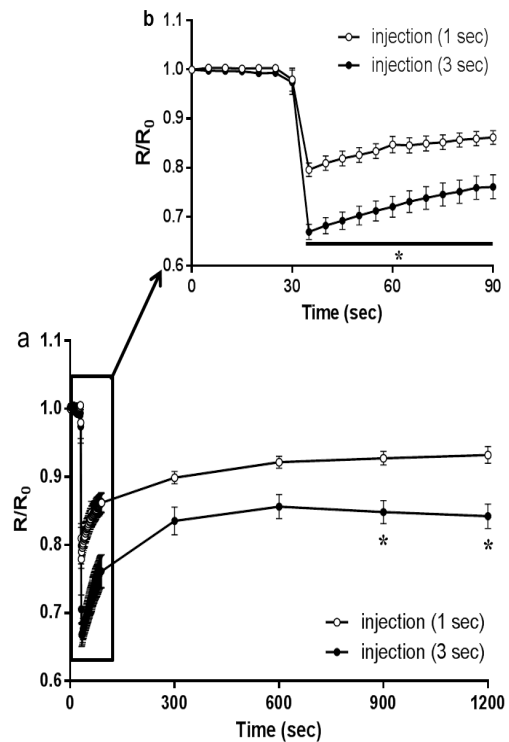


Fig. 5. pH 6.5 溶液を異なる時間 (1 sec, 3 sec) で注入した時の隣接筋線維 (1200 秒間:a, 90 秒間:b) の pH_i 変化 (mean \pm SE, * $p < 0.05$ vs. 3 sec).

以上のように、本研究はラットの生体モデルにバイオイメージング技法を適用することに成功した。生体恒常性が維持された本研究モデルの実験により、細胞内の代謝産物の一つである H^+ イオン動態を評価することができた。今後、筋疲労に関わる様々なイオン動態に加え、ミトコンドリア分布などの筋の代謝的・形態的特性を同時に観察するモデルを構築することにより、筋線維間でのエネルギー交換や複雑な疲労メカニズムの解明が期待できる。

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 1 件)

1. Yutaka Kano, Takashi Sonobe, Tadakatsu Inagaki, Mizuki Sudo and David C Poole. Mechanisms of exercise-induced muscle damage and fatigue: Intracellular calcium accumulation. J. Phys. Fitness Sports Med, 1: 505-512, 2012. 8 (査読有)
DOI.org/10.7600/jp fsm. 1. 505

[学会発表] (計 7 件)

1. Yoshinori Tanaka, Tadakatsu Inagaki, Takuma Kimura, David C Poole, Yutaka Kano: In vivo measurement of intercellular pH and contractile performance during repetitive stimulation in rat skeletal muscle. Med. Sci. Sport Exer. San Francisco, USA 44, (2012, 5).

2. Takuma Kimura, Tadakatsu Inagaki, Yoshinori Tanaka, David C Poole, Yutaka Kano: In vivo imaging of intracellular sodium ion following eccentric contractions in rat skeletal muscle Med. Sci. Sport Exer. San Francisco, USA 44, (2012, 5).

3. Yoshinori Tanaka, Tadakatsu Inagaki, Takuma Kimura, David C Poole, Yutaka Kano: In vivo measurement of intercellular pH and contractile performance during repetitive stimulation in rat skeletal muscle. The Systems Biology of Exercise: Cardiorespiratory & Metabolic Integration. Univ. of Leeds, 2012, 8, 12-13. UK. (2012, 9).

4. 田中嘉法, 稲垣薫克, 木村卓磨, 狩野豊. 筋収縮時の筋細胞内 pH 変化に対する膜輸送体の関与. 第 67 回体力医学会, 体力科学 61 巻, 582, 岐阜 (2012, 9).

5. 木村卓磨, 稲垣薫克, 田中嘉法, 狩野豊. 筋細胞内ナトリウムイオンに対する血流の影響. 第 67 回体力医学会, 体力科学 61 巻, 582, 岐阜 (2012, 9).

6. 田中嘉法, 稲垣薫克, 木村卓磨, 狩野豊. 単一筋線維レベルでの in vivo pH イメージング. 第 66 回体力医学会, 体力科学 60 巻, 616, 山口 (2011, 9).

7. 木村卓磨, 稲垣薫克, 田中嘉法, 狩野豊. 伸張性筋収縮後の細胞内ナトリウムイオンの

可視化. 第 66 回体力医学会, 体力科学 60 巻, 617, 山口 (2011, 9).

[その他]

ホームページ等

<http://www.pc.uec.ac.jp/sp/kano/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

狩野 豊 (KANO YUTAKA)

電気通信大学・情報理工学研究科・教授

研究者番号: 90293133