

マウスのヒラメ筋を組織学的に評価するための 横断切片作製位置の検討

伊 東 佑 太

要 旨

実験動物の骨格筋に刺激を入力し、筋の大きさや機能の変化を調べる基礎的な研究では、効果判定に筋腹の薄切横断切片がよく用いられる。しかし、その評価方法は統一されておらず、定量的に変化が捉えられているか不明である。本研究では、マウスヒラメ筋の形態学的、組織学的な定量的解析を行うために、薄切切片作製位置の検討を行った。その結果、マウスヒラメ筋の最膨隆部が、これまで行われてきた筋腹の中央部ではなく、遠位端より約3 mmの部位にあることが判明した。筋腹が太い部位の方が多くの筋線維を含んでいると考えられるため、定量的にヒラメ筋の横断面を評価するためには、この最膨隆部位で薄切横断切片を作製する必要があると考える。

キーワード：薄切横断切片，筋線維数，組織学的評価，ヒラメ筋，マウス

はじめに

骨格筋は、運動、伸張刺激、電気刺激など様々な刺激により、成熟後もその大きさを変化させる。リハビリテーション分野では、病態骨格筋に対して種々の刺激を入力し、治療効果として、骨格筋の大きさの変化を期待する。

骨格筋への刺激入力の効果を調べた動物実験において、筋腹の大きさの変化は、筋湿重量や筋組織を横断面で薄切した標本を用いて評価されることが多い [1-5]。この内、筋湿重量に関しては、腱や筋膜などの結合組織の影響、浮腫や炎症反応により非収縮組織に生じる変化も反映され、筋組織（収縮組織）自体に起こる変化を定量的に評価できるとはいえない [6]。一

方、薄切横断切片の評価項目は、筋収縮組織の構成成分である筋線維の横断面積の平均値で行われることがほとんどである [1, 3, 4]。しかし、筋腹の太さを決める要素には、筋線維1本1本の太さだけでなく、その筋線維が筋腹に含まれている数も考慮に入れる必要がある [7]。そのため、筋腹の大きさの変化を評価するためには、筋湿重量や個々の筋線維の横断面積だけでなく、筋線維の数も含めた統合的な評価が必要であると考えられる。

薄切横断切片を用いて筋線維の横断面積や数を定量的に評価するためには、サンプル間のバイアスを防ぐために切片を作製する部位を統一する必要がある。筋腹は主に筋線維により構成されているため、筋腹の最も太い部位に筋線維

が最も多く、また筋線維の太さも太いと考えられる。従って、筋腹の最膨隆部位において薄切切片を作製すれば、筋線維の横断面積や数の定量的な評価が可能であると考えられる。しかし、これまでの筋の薄切横断切片を用いた研究においては、薄切する筋腹の部位について記載がなかったり [8]、筋腹の mid-berry [4, 9] とされているのみで、明確な薄切切片作製部位が規定されていない。また多くの筋では、筋腹の太さは全長に渡って均一ではなく、筋腹中央部が最も太いとは限らない。

これまでに述べたように、基礎的な評価方法が統一されていないために、骨格筋への種々の刺激の効果判定やそのメカニズムの解析には不明な点が多くある。従って、病態骨格筋に対する理学療法効果の基礎的な根拠も確立されていない。本研究では、筋線維の横断面積や数を定量的に評価するための予備実験として、マウスのヒラメ筋を形態学的、組織学的に観察し、筋線維の横断面積や数の評価に適した薄切切片作製部位を検討した。

材料と方法

対象

本研究のすべての実験は、名古屋学院大学動物実験委員会の承認を得て行った (No. 2007-007)。実験には、ICR 雄性マウス 6 匹 (体重 38-40 g, 日本エスエルシー)、12 側のヒラメ筋を供した。マウスは 10 週齢から飼育し、14 週齢でヒラメ筋を剖出した。飼育期間中は 25°C に設定した室内で、12 時間毎の明暗サイクルで飼育し、餌や水は自由に与えた。

凍結した筋腹の長径および横径の測定

マウス (3 匹, 6 側) から剖出したヒラメ筋

の長径および横径を、凍結処理の前後でデジタル手法を用いて計測し、横径が最も長い部位および凍結による筋への影響を調べた。ペントバルビタールナトリウム (40 mg/体重 kg) 麻酔下にて、マウスの皮膚を切開、ヒラメ筋表層にある腓腹筋を切除し、実体顕微鏡 (M125, Leica) 下で、露出した生体内にあるヒラメ筋を撮影した。その後ヒラメ筋を剖出し、計測した自然長までけん引して方眼紙上にピン固定し、実体顕微鏡下で撮影した。凍結処理によるヒラメ筋形態の変化を観察するため、撮影後のヒラメ筋を液体窒素にて冷却したイソペンタン内で急速凍結し、再度方眼紙上に置いて、実体顕微鏡下で撮影した。これらの撮影した画像はデジタルデータに保存し、画像解析ソフト (Image J) を用いて、生体内に存在するヒラメ筋の長径 (自然長)、凍結の前後で各々筋腹の長径 (図 2 → ←) および最膨隆部の横径 (図 2 ↑ ↓) を計測した。また、その計測値から凍結による筋の大きさの変化率および長軸上で横径が最も長い筋腹の位置を求めた。

筋腹横断面積の測定

ヒラメ筋の最膨隆部位を調べるため、マウス (3 匹, 6 側) から剖出したヒラメ筋の連続薄切横断切片を作製した。ペントバルビタールナトリウム (40 mg/体重 kg) 麻酔下にて、マウスから採取したヒラメ筋をコルク片に接着した。コルク片への接着はトララガントガムを用いて、ヒラメ筋長軸がコルクに対して垂直になるように、筋の近位側から接着した (図 1)。このコルク片に接着した筋を液体窒素にて冷却したイソペンタン内で急速凍結し、薄切まで -80°C で保存した。凍結した各サンプルから、クリオスタット (CM1510, Leica) を用いて、厚さ 5 μm の薄切横断切片を作製した。薄切横

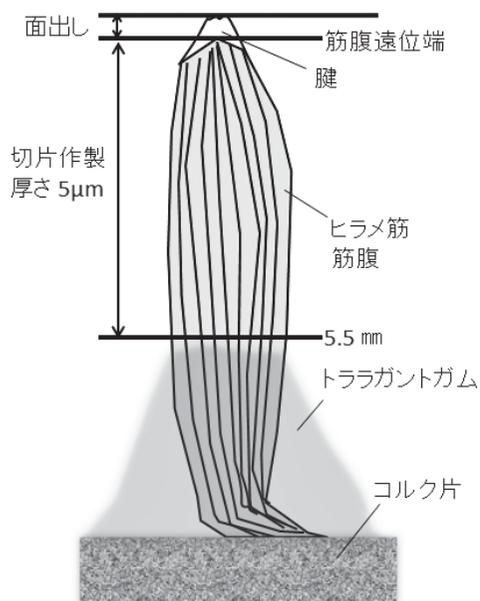


図1 ヒラメ筋のコルク設置模式図

ヒラメ筋薄切連続切片作製のための、凍結前コルク設置方法の模式図である。トララガントガムにより、筋腹近位端からコルクに設置した後凍結した。凍結後、筋腹の遠位端から5.5 mm 近位の高さまで、厚さ5 μmで薄切した。

断切片は、ヒラメ筋筋腹の遠位端から連続で、遠位端から近位方に5.5 mmの高さまで作製した。作製した連続薄切切片はHematoxylin and Eosin (H-E) 染色を施し、顕微鏡 (ECLIPSE TE300, Nikon) 下で撮影した。撮影した画像は、画像解析ソフト (Image J) に取り込み、筋腹全体の横断面積を各高さで測定した。測定値は切片10枚毎に平均値を求め、50 μm毎の部位間で比較した。

統計処理

凍結前後の筋腹の長径、横径の平均値の比較、Student's t検定を用いた。筋腹横断面積の部位間の比較には、一元配置分散分析を用いた。一元配置分散分析で有意差が認められた場合、Bonferroni法を用いて多群間比較検定を行っ

た。いずれの統計手法も有意水準は5%未満とした。

結果

ヒラメ筋横径の最長部位

ヒラメ筋筋腹の横径は遠位端から3.7 ± 0.4 mm近位の部位で、側方から観察すると0.99 ± 0.03 mm、上方から観察すると1.65 ± 0.05 mmであり、他部位に比較して最も大きかった。この値は、遠位端から1.9 mm近位の部位から5.2 mm近位の部位の範囲で有意な差がなく、ほぼ一定の横径であった (図2)。

凍結によるヒラメ筋長の変化

ヒラメ筋の生体内での自然長は11.32 ± 0.61 mmであった。これらの筋を剖出後、凍結処理を行うと、ヒラメ筋長軸長が11.54 ± 0.62 mmとなり (変化率101.94%)、凍結前後で有意差はなかった (表1)。

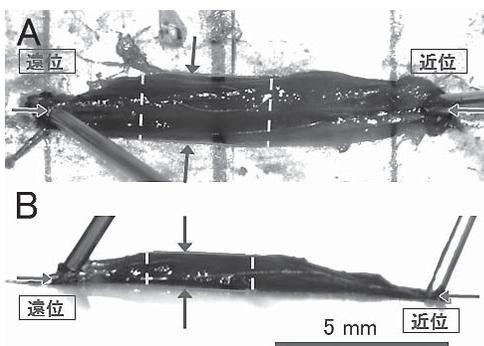


図2 マウスヒラメ筋横径の最長部位

マウスから剖出したヒラメ筋を、方眼紙上に生体内自然長 (→←) で固定した時の実体顕微鏡画像を示す (A: 方眼紙に対して垂直方向から撮影, B: 方眼紙に対して平行方向から撮影)。筋腹遠位端から3.7 mmの部位 (↑↓) で最も長く、その長さは、遠位端から1.9~5.2 mmの範囲 (---) で有意な差がなかった ($p > 0.05$)。

表1 凍結処理によるヒラメ筋筋腹の長径および横径の変化

| | 凍結前 | 凍結後 | (変化率) |
|---------|--------------|--------------|----------------|
| 長径 (mm) | 11.32 ± 0.61 | 11.54 ± 0.62 | (101.94%) n.s. |
| 横径 (mm) | 1.65 ± 0.05 | 1.66 ± 0.04 | (100.60%) n.s. |

mean ± SD ; n.s. : 凍結前後の値の間に有意差なし ($p > 0.05$)

ヒラメ筋の筋腹横断面積

ヒラメ筋筋腹の遠位端から3.1 mmの高さで $1.81 \pm 0.30 \text{ mm}^2$ に達し、そこから5.0 mmまでの範囲で有意な差がなかった (平均 $1.79 \pm 0.09 \text{ mm}^2$, 図3)。

考察

骨格筋に対する運動などの効果を調べた動物実験において、骨格筋の大きさの変化を組織学的に評価する際、薄切凍結横断切片から計測した筋線維横断面積が用いられることが多い [1,

3, 4, 9-11]。Ishiharaらの研究 [1, 9] に見られる筋線維横断面積の結果は、顕微鏡下の任意の視野に観察される筋線維100本から300本程度の平均値として表されている。しかし、筋腹中の部位により筋線維の太さや走行方向が異なる [12] (図Supplement 1)。

そのため、筋腹の特徴を示すためには、筋腹に含まれる筋線維を全数的に評価する必要があると考える。すなわち、筋の大きさを評価するためには、筋線維横断面積だけでなく、筋線維数も含めた統合的な評価が必要である。筋腹に含まれる筋線維の数は同一筋内であっても部位

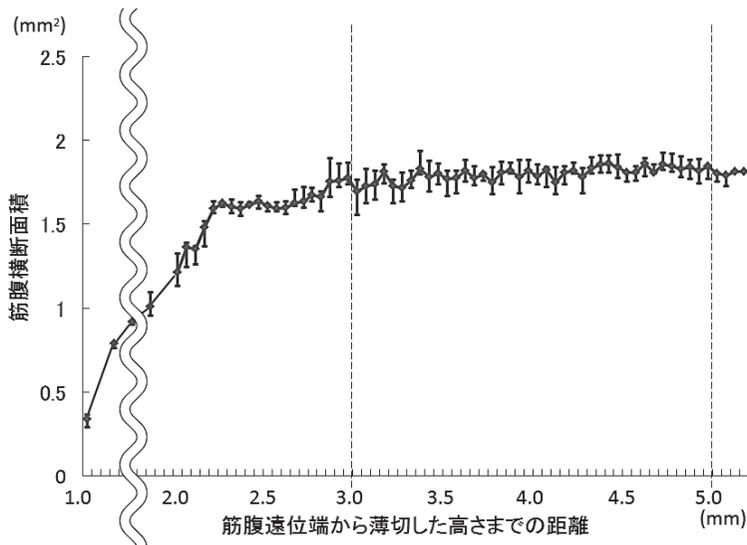


図3 マウスヒラメ筋の最膨隆部位

ヒラメ筋の筋腹遠位端からの各高さにおける筋腹の横断面積を示す (mean ± SD)。遠位端から3.1~5.0 mmの範囲 (---) で筋腹横断面積に有意な差がなかった ($p > 0.05$)。

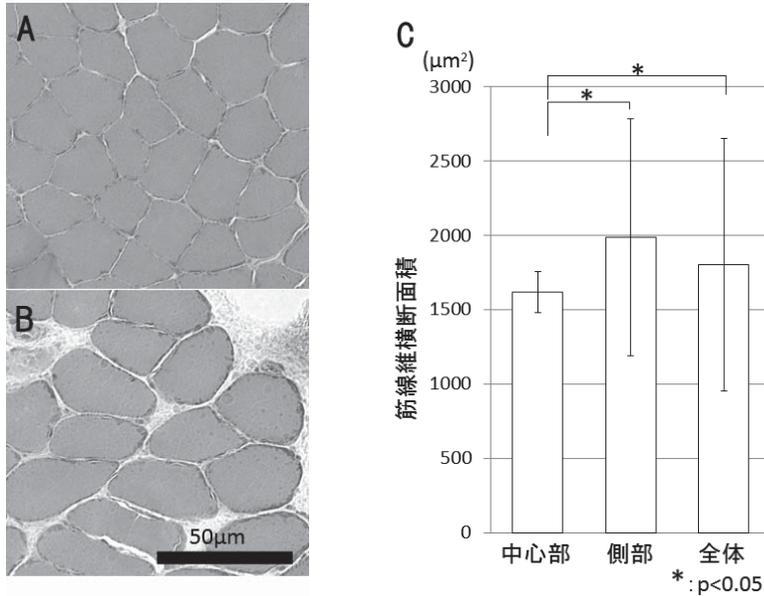


図 Supplement 1

薄切横断切片中の部位によって筋線維の太さにばらつきがあるかどうかを調べるため、H-E染色した薄切横断切片の筋腹中心部(A)および側部(B)の任意視野にある100本の筋線維横断面積を計測した。筋腹中心部における筋線維100本の横断面積の平均値は、筋腹側部に比べ有意に小さかった。また、筋腹中央部では、薄切横断切片中すべての筋線維の横断面積と比べても有意に小さかった(C)。

によって異なり(図Supplement 2)、筋腹が太い方が多くの筋線維を含んでいると考えられる。

従って、筋に含まれる筋線維を定量的に評価するためには、常に一定の部位で薄切横断切片を作製する必要がある、その部位は筋腹の最膨隆部位が相応しいと考えられる。

本研究の結果から、全長がおよそ11.5 mmのマウスのヒラメ筋は、筋腹遠位端から1.9~5.2 mmの範囲でおおよそ一様の横径を示し、それ以外の部位ではこの値よりも短かった。すなわち、この最大横径を有する部位は、IshiharaらやKonhilasら、Mitchellらの研究において薄切切片が作製されている筋腹の中央部よりも遠位方に存在していることがわかった。

免疫組織化学染色等に用いる薄切横断切片は、組織のエピトープを残すため新鮮凍結法で作製するが多い。一方、一般に骨格筋

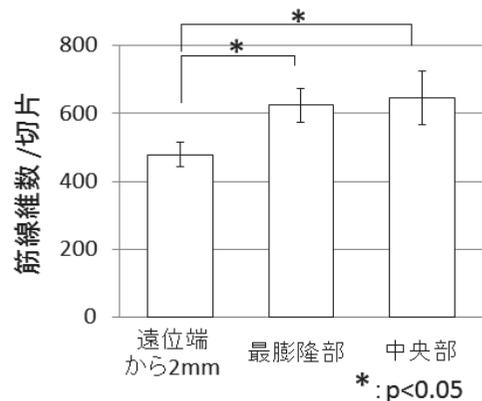


図 Supplement 2

筋腹の太さの違いによって含まれる筋線維の数が異なるかどうか調べるため、筋腹遠位端から2 mmの部位、筋腹長軸の中央部、および筋腹が最も太い部位において横断切片に含まれる筋線維数を比較した。筋腹の最膨隆部の筋線維数と筋腹中央部の筋線維数の間には有意な差はなかったが、筋腹遠位端から2 mmの部位は他部位に比べ有意に少なかった。

は65%から75%が水分で構成されている。水は凍結により8.6%体積膨張することが知られている。骨格筋の組織学的評価のための凍結処理は、液体窒素等を用いて瞬間的に行うため、柔軟性に富む筋細胞膜の変性は少なく、筋線維損傷はわずかであると考えられる [13, 14]。しかし、筋形質膜の損傷を起こさないまでも、水分の体積膨張により骨格筋の大きさは変化する可能性がある。そこで、液体窒素による凍結処理を行った時に、マウスヒラメ筋の大きさが変化するかどうかを確認した。凍結処理を行った結果、ヒラメ筋長軸長が生体内自然長の101.9%を示した。この割合は水の体積膨張率よりもはるかに小さく、長さにして0.2 mm程度である。前述した最大横径を有する範囲がおおよそ3 mm長あるため、凍結処理による筋腹最膨隆部のずれは、薄切横断切片を作製する上で考慮するほどではないといえる。

実際に評価に用いる筋腹が最も太い位置を検討するため、ヒラメ筋の横径が大きかった約3 mm長の範囲を含む筋腹の部位を薄切し、筋腹の横断面積を測定した。その結果、遠位端から近位3~5 mmの間で太さはほぼ一定であった。従って、薄切横断切片をヒラメ筋最膨隆部で作製するためには、IshiharaらやKonhilasら、Mitchellらの研究にみられる筋腹の中央部ではなく、遠位端からおおよそ3~5 mmの範囲の部位で作製することが望ましいとの結論を得た。以上を統括すると、マウスヒラメ筋の最膨隆部位は筋腹の中央部ではなく、中央部よりも遠位端よりのおおよそ3~5 mm長の範囲にあることが判明した。実際に筋がどのような状態であってもその部位が最膨隆部であるかどうかを確認する必要があるものの、マウスヒラメ筋の筋線維を定量的に評価するために、この最膨隆部位で薄切横断切片を作製することが必要であ

る。

文 献

- [1] Ishihara, A., Hirofuji, C., Nakatani, T., Itoh, K., Itoh, M., and Katsuta, S. (2002). Effects of running exercise with increasing loads on tibialis anterior muscle fibres in mice. *Exp Physiol* 87, 113-116.
- [2] Kawada, S., Tachi, C., and Ishii, N. (2001). Content and localization of myostatin in mouse skeletal muscles during aging, mechanical unloading and reloading. *J Muscle Res Cell Motil* 22, 627-633.
- [3] Konhilas, J. P., Widegren, U., Allen, D. L., Paul, A. C., Cleary, A., and Leinwand, L. A. (2005). Loaded wheel running and muscle adaptation in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H455-465.
- [4] Mitchell, P. O., and Pavlath, G. K. (2001). A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1706-1715.
- [5] van der Velden, J. L., Langen, R. C., Kelders, M. C., Willems, J., Wouters, E. F., Janssen-Heininger, Y. M., and Schols, A. M. (2007). Myogenic differentiation during regrowth of atrophied skeletal muscle is associated with inactivation of GSK-3beta. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1636-1644.
- [6] Peeze Binkhorst, F. M., Slaaf, D. W., Kuipers, H., Tangelder, G. J., and Reneman, R. S. (1990). Exercise-induced swelling of rat soleus muscle: its relationship with intramuscular pressure. *J Appl Physiol* 69, 67-73.
- [7] Goldspink, G. (1970). The proliferation of myofibrils during muscle fibre growth. *J Cell Sci* 6, 593-603.
- [8] Eash, J., Olsen, A., Breur, G., Gerrard, D.,

- and Hannon, K. (2007). FGFR1 inhibits skeletal muscle atrophy associated with hindlimb suspension. *BMC Musculoskeletal Disord* 8, 32.
- [9] Ishihara, A., Kawano, F., Ishioka, N., Oishi, H., Higashibata, A., Shimazu, T., and Ohira, Y. (2004). Effects of running exercise during recovery from hindlimb unloading on soleus muscle fibers and their spinal motoneurons in rats. *Neurosci Res* 48, 119-127.
- [10] Chiakulas, J. J., and Pauly, J. E. (1965). A Study of Postnatal Growth of Skeletal Muscle in the Rat. *Anat Rec* 152, 55-61.
- [11] Enesco, M., and Puddy, D. (1964). Increase in the Number of Nuclei and Weight in Skeletal Muscle of Rats of Various Ages. *Am J Anat* 114, 235-244.
- [12] E. H. Thompson, A. S. L., P. V. J. Hegarty and C. E. Allen (1979). An Automated Technique for Simultaneous Determinations of Muscle Fiber Number and Diameter. *Journal of animal science* 48, 328-337.
- [13] Grujic, R., Petrovic, L., Pikula, B., and Amidzic, L. (1993). Definition of the optimum freezing rate-1. Investigation of structure and ultrastructure of beef *M. longissimus dorsi* frozen at different freezing rates. *Meat Sci* 33, 301-318.
- [14] Petrovic, L., Grujic, R., and Petrovic, M. (1993). Definition of the optimal freezing rate-2. Investigation of the physico-chemical properties of beef *M. longissimus dorsi* frozen at different freezing rates. *Meat Sci* 33, 319-331.

The Position of Muscle Cross-Section for Histologically Evaluation in Mice.

Yuta Itoh

Abstract

The cross-section of the muscle belly is well used for the evaluation of stimuli effect in animal experiment. However, the method of evaluation is not unified. Thus, it is unclear that the changes of muscles are appreciated quantitatively. I analyzed the soleus muscle of the mice, and examined the position of muscle belly for section. In the result of this study, it proved that the thickest position existed in the distal portion of the soleus muscle, instead of in the midbelly. Myofibers abounds when a belly muscle is thick. Therefore, it was suggested that it is necessary to section from the thickest position of muscle belly for quantitive evaluation of the soleus muscle cross section.

Keywords : cross-section, Myofibers, Histologically Evaluation, Soleus muscle, mice