

# 筋微細構造における損傷回復過程の変化

犬塚 貴久

## Change of recovery process from crush injury in muscle microstructure

Takahisa INUZUKA

### I. 序論

骨格筋における損傷からの再生過程に関する多くの研究は筋長軸方向に対して垂直な横断面にて行われてきた。筋横断面積や筋線維組成が骨格筋の横方向の構造を表す一方で、骨格筋長軸方向の構造を表すものとして筋節 (sarcomere) がある。発育期においては、骨格筋の成 (伸) 長に対して筋端部での筋節生成が時間的遅延をもつため中央部の筋節が引き伸ばされることが考えられ<sup>4)</sup>、同時期に一過性の筋張力低下が報告されている<sup>5)6)</sup>。一方で不慣れな運動や伸張性収縮をとまなう運動を行うと、遅発性筋痛を引き起こす。筋痛を起こすと筋張力の低下を引き起こす。筋痛は筋が損傷している状態であるが、この際の張力低下は損傷量のみ依存するだけでなく、筋節の乱れによる低下の可能性も十分に考えられる。

また、骨格筋損傷に関して、筋の中央部で起こるといふ報告がある<sup>7)8)</sup>一方で、筋の端部で起こるといふ報告もある<sup>2)9)</sup>。筋の中央部は神経筋接合部が存在し、筋衛星細胞も数多く存在する<sup>10)</sup>。一方で、筋端部は発育期において最も盛んな筋節生成が行われる部位である。このような違いから骨格筋長軸方向における損傷からの再生能に違いが起こる可能性が考えられる。また、発育期は骨の成 (伸) 長に刺激を受けて、筋端部で盛んに筋節生成が行われる一方で、成熟期では骨の成長が完了したことから筋端部での筋節生成が停止していることが考えられる。このような違いからも同様に筋節の再生能に違いが起こる可能性が考えられる。

そこで本研究では、成熟期及び発育期ラットの筋の異なる部位に運動性損傷モデルとして挫滅損傷を施し、損傷からの回復にとまなう筋節構造の

変化を明らかにすることを目的とした。

### II. 方法

本研究には実験動物として Fischer344 系雌性ラット (日本 SLC 株式会社) を用いた。成熟期として生後 16 週齢のラットを 10 匹、また発育期として生後 3 週齢のラットを 17 匹用いた。被験筋は長趾伸筋 (Extensor Digitorum Longus Muscle: 以下 EDL) とした。損傷モデルとして、ラットの被験筋を吸引麻酔下にて露出させ、1 mm 幅のピンセットの先端部で 5 秒間強く圧迫することにより挫滅損傷を惹起させた。また、損傷部位は右脚被験筋を筋腹部、左足被験筋を末梢側筋端部とした。損傷前及び損傷から 3 日後、7 日後、15 日後、60 日後に腹腔内に注入した十分な麻酔下において断頭屠殺処置および脱血処置を行った。その後、左右脚より被験筋を摘出し、液体窒素により瞬間凍結し、凍結マイクローム (LAICA 社製: CM1850) を用いて、厚さ 16 $\mu$ m の縦断切片を作成した。縦断切片は両腱が含まれるよう作成し、それぞれ 1 枚のスライドガラスに 2 枚の切片を貼付した。筋節構造の観察には、被験筋の中核側筋端部、筋中央部 (右脚筋は挫滅損傷部)、末梢側筋端部 (左脚筋は挫滅損傷部) 及びその四等分点の五か所を中核側筋端部より①~⑤の番号を付して観察し、各測定部における 100 $\mu$ m あたりの筋節数と筋節長を測定した。100 $\mu$ m あたりの筋節数と筋節長の測定は、縦断切片を光学顕微鏡 (OLYMPUS 社製: BX43) 下で TIFF 形式画像として取り込み、OLYMPUS 社製 cellSens Standard を用いて行った。

測定した筋節数と筋節長の数値は Microsoft office Excel 2013 のデータ分析ツールを用いて統計処理を行った。等分散・不等分散を判断するた

めにf検定を行い、f検定の結果、等分散の場合は等分散を仮定した2標本によるt検定、不等分散の場合は分散が等しくないと仮定した2標本によるt検定を行い、平均値を比較した。なお、全ての検定において有意水準は5% ( $p<0.05$ )とした。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 成熟期ラット

成熟期ラットの損傷後における100 $\mu$ mあたりの筋節数の経時変化をFig.1に示した。(A)は筋の中央部を損傷させたもの、(B)は末梢側筋端部を損傷させたものをそれぞれ表している。また、グラフ中の線分①は中枢側筋端部、②は①と③の間点、③は筋中央部、④は③と⑤の間点、⑤は末梢側筋端部の変化を表している。(A)・(B)ともに損傷部及びその近傍部位(Aでは②③、Bでは④⑤)での筋節数が損傷3から7日後にかけ

て有意に低値を示した。これは明らかに損傷による影響と考えられるが、近傍部位でも大きな変化が観察されたのは、骨格筋の構造上EDLには前脛骨筋が覆い被さっており、挫滅損傷を施す際にピンセットが斜めに侵入した結果、実際には(A)では②、(B)では④まで損傷が及んでいたと考えられる。一方で、損傷部では反対の健常筋端部(Aでは⑤、Bでは①)での筋節数が損傷7日後に一過性に増大を示した。その後、損傷15日後にはまだ乱れが観察されるものの、損傷60日後には損傷前との間に有意な差はみられず、完全に回復することが確認された。

Fig.2は成熟期ラットにおける損傷後の筋節長の経時変化を示している。筋中央部損傷時(A)、末梢側筋端部損傷時(B)ともに損傷3から7日後に損傷部及びその近傍(Aでは②③、Bでは④⑤)の筋節長が有意に高値を示した。一方損傷7日後には損傷部とは遠位の筋端部(Aでは⑤、B

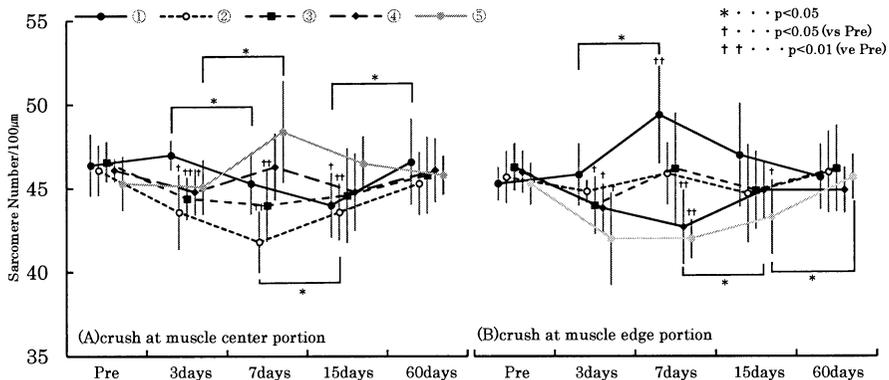


Fig.1 Change of sarcomere number in 100 $\mu$ m range after crush injury in adult rat.

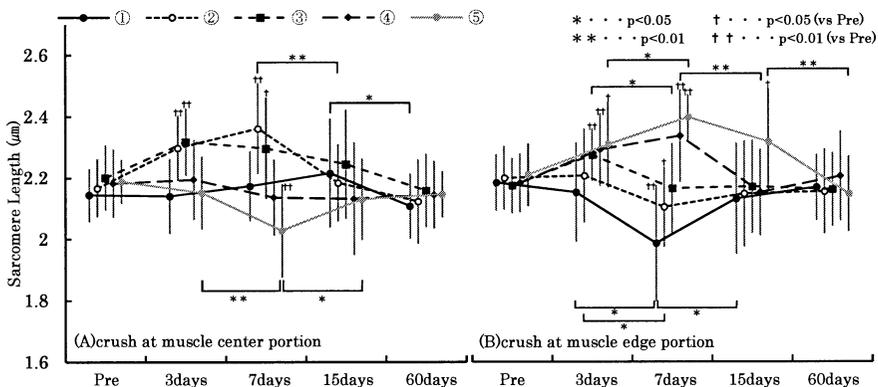


Fig.2 Change of sarcomere length after crush injury in adult rat.

では①の筋節長が有意に低値を示し、これらの結果から筋節数の少ない部位では筋節長が引き伸ばされ、筋節数が増加している部位では筋節長が短縮する結果が得られた。筋節長の変化でも損傷15日後にはまだ乱れがみられるものの、損傷60日後には完全に回復することが確認された。

2. 発育期ラット

発育期ラットにおける100 $\mu$ mあたりの筋節数をFig.3に、筋節長をFig.4に示した。発育期では損傷前(Pre)の段階で筋端部に対して筋中央部の筋節数が低値を示し、筋節長が高値を示している。これは過去の報告にあるように発育による筋の成(伸)長に対し、筋端部での筋節生成が追いつかないため中央部の筋節が引き伸ばされているためと考えられる。損傷後の変化では、成熟期で観察された損傷3から7日後における損傷部での筋節数減少・筋節長増加が発育期では観察されなかった。一方で損傷7から15日後に筋端部のみ

ではなく、全体的に筋節数増加・筋節長減少が観察された。その後損傷60日後には損傷前との間に有意な差は認められず、完全に回復することが確認された。また、発育期ラットにおける一連の変化は筋端部よりも筋中央部の筋節が引き伸ばされているという関係性を維持したまま起こることが観察された。

III. 考察

成熟期ラットにおいて、損傷3から7日後に損傷部における筋節数が減少し、筋節長が増大したことは、筋損傷による筋膜損傷にともない細胞外カルシウムの流入が筋小胞体からのカルシウム放出を誘発し、高カルシウム濃度部位の過収縮を引き起こしたことにより、周辺の構造観察のできる比較的安定した筋節が引き伸ばされたためと考えられた。

また、損傷7日後には損傷部とは遠位の健常筋

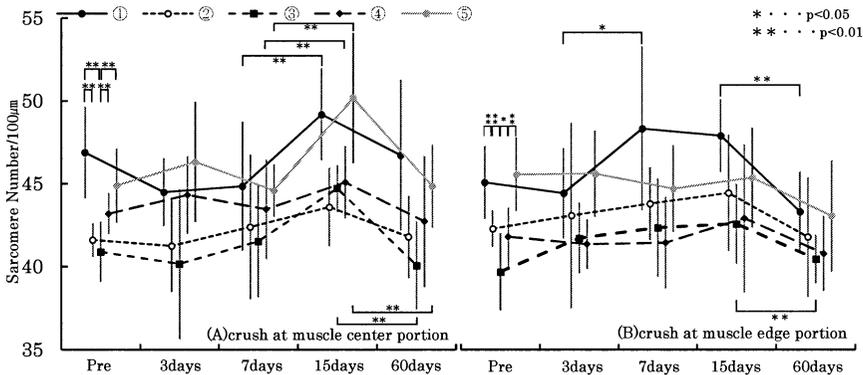


Fig.3 Change of sarcomere number in 100 $\mu$ m range after crush injury in growth rat.

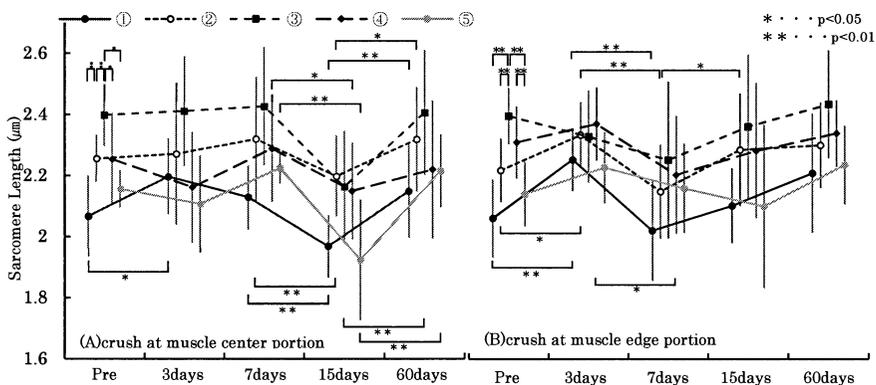


Fig.4 Change of sarcomere length after crush injury in growth rat.

端部における筋節数が増加し、筋節長が減少した。筋収縮たんぱくの合成については、筋腹よりも筋腱移行部。特に遠位端で最も盛んであることが報告されている。また、筋端部は発育期において最も盛んな筋節生成能を示す部位である。これらのことから、筋損傷により損傷部の筋節が引き伸ばされたことに刺激を受けて筋端部での筋節生成が行われていることが考えられた。

一方で、発育期ラットにおいては成熟期ラットにて損傷3から7日後に観察された損傷部における筋節数減少・筋節長増加が観察されなかった。これは、発育期においては常に筋端部での筋節生成が行われていることや損傷後における血流量増加は成熟期よりも発育期の方が著しかったこと<sup>3)</sup>、発育期ではサテライト細胞が多く存在している<sup>1)</sup>という報告があることから成熟期よりも回復に適した環境が整っているため、発育期では早急な回復が行われたためと考えられた。

発育期ラットにおいては損傷7から15日後に筋端部のみではなく全体的な筋節数増加・筋節数減少が観察された。発育期では骨の伸長に筋が引き伸ばされることに刺激を受けて筋端部で筋節の生成が行われる。筋損傷が起きた際は損傷部にて高たんぱく濃度による過収縮が起こることから筋は長軸方向に引き伸ばされることになるため筋端部で筋節の生成が行われることが考えられる。これらのことから、発育期においては常時の筋節生成が行われている上に損傷刺激が加わったことにより損傷7から15日後には過剰な筋節生成が起きていることが考えられた。

本実験で損傷後に得られた同一筋内で筋節構造の不均一は筋発揮にマイナスの影響を及ぼすことが考えられるが、損傷60日後には損傷前の状態まで回復することから損傷からの回復にはサテライトセルの増殖活性やたんぱくの同化亢進といった修復に加え、筋節構造の規則性回復が重要であり、損傷回復の一つの見方であることが示された。

#### IV. 主要参考文献

- 1) Allbrook, D.B., Han, M.E. and Hellmuth, A.E. :Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity. *Pathology*, 3, 233-243, 1971.
- 2) Baker, B.A., Mercer, R.R., Geronilla, K.B., Kashon, M.L., Miller, G.R., Cutlip, R.G. Impact of repetition number on muscle performance and histological response. *Med Sci Sports Exer.* 39, 1275-1281, 2007.
- 3) 加賀谷照彦, 加賀谷淳子:運動処方—その生理学的基礎—, 杏林書院, 1983.
- 4) 春日規克, 馬詰良樹:生後発育にともなうマウス骨格筋線維長と筋節長の変化. *体力科学*, 32, 134-139, 1983.
- 5) 春日規克:生後発育にともなうマウス骨格筋の筋力特性:形態変化との関係. *体力科学*, 33, 229-234, 1984.
- 6) 春日規克, 加藤勝, 金丸香津子:発育期マウス骨格筋の筋節長, 筋節数および筋張力の変化. *体力科学*, 37, 46-50, 1988.
- 7) Kirkendall, D.T., Garrett, W.E. Clinical perspectives regarding eccentric muscle injury. *Clin Orthop Relat Res*, 403, 81-89, 2002.
- 8) Lehto, M.U., Jarvinen, M.J. Muscle injuries, their healing process and treatment. *Ann Chir Gynaecol*, 80, 102-108, 1991.
- 9) Pizza, F.X., Peterson, J.M., Baas, J.H., Koh, T.J. Neutrophils contribute to muscle injury and impair its resolution after lengthening contractions in mice. *J Physiol*, 562, 899-913, 2005.
- 10) Schoenfeld, B.J. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *J Strength Cond Res*, 24, 2857-2872, 2010.

(指導教員 春日 規克)