

## ラットの坐骨神経切断肢における 膠原線維量の検討

### The effects of sciatic nerve injury on collagen synthesis in rat skeletal muscle

堤 恵理子<sup>1)2)</sup> 村田 祐造<sup>3)</sup> 相馬 健亮<sup>4)</sup> 関 奈々美<sup>4)</sup>  
西井 章浩<sup>4)</sup> 堀川 悦夫<sup>2)</sup>

ERIKO TSUTSUMI<sup>1)2)</sup>, YUZO MURATA<sup>3)</sup>, TAKEAKI SOUMA<sup>4)</sup>, NANAMI SEKI<sup>4)</sup>,  
AKIHIRO NISHII<sup>4)</sup>, ETSUO HORIKAWA<sup>2)</sup>

#### 要旨:

【目的】坐骨神経麻痺による不動筋の膠原線維量を坐骨神経切断肢と正常側肢で比較した。  
【方法】8週齢 Wistar 系雄性ラット3匹を使用した。坐骨神経を切断して3週後に屠殺し、前脛骨筋を摘出した。薄切後、渡辺らが考案したアザン変法により染色を行った。  
【結果】坐骨神経切断肢群は、正常肢群と比較すると膠原線維面積が増加した( $p=0.006$ )。  
【考察】今回、脱神経筋である前脛骨筋におけるコラーゲン合成亢進を明らかにし、拮抗筋である腓腹筋との違いが示唆された。その違いは、異なるコラーゲンタイプの分布様式による可能性が考えられる。

**Abstract:** The purpose of the present investigation was to study the effect of sciatic nerve injury (SNI) on the connective tissue of the tibialis anterior (TA). In 3 rats the sciatic nerves of the right hind limbs were cut. The left hind limbs were kept free to serve as control. During a period of 21 days, a distinct atrophy developed in the denervated muscles and was accompanied by fibrotic changes, which were the increase of collagen fiber. In the denervated muscles collagen biosynthesis of tibialis anterior differed from that of gastrocnemius, which is the antagonist to tibialis anterior. This fact may demonstrate a dependence on the distribution of collagen types.

**Key words:** 坐骨神経切断 (sciatic nerve injury), 筋萎縮 (muscular atrophy)  
膠原線維 (collagen fiber)

受付日:平成23年10月6日,採択日:平成23年12月14日

1) 西九州大学 リハビリテーション学部

*Faculty of Rehabilitation Sciences, Nishikyushu University*

2) 佐賀大学大学院 医学系研究科

*Graduate School of Medicine, Saga University*

3) 佐賀大学 医学部

*Faculty of Medicine, Saga University*

4) 西九州大学 リハビリテーション学部 リハビリテーション学科 理学療法専攻

*Faculty of Rehabilitation Sciences, Nishikyushu University*

## はじめに

骨、軟骨、結合組織などは、細胞外マトリックス（細胞間質）が非常に豊富で、細胞はそれに埋もれたように散在する。これらは支持組織と総称され、その細胞間質は組織の物理的な性質（密度、硬さ、弾性、抗張力など）を決めるという点で、細胞よりはるかに重要な意味を持っている。細胞外マトリックスは線維とそれを埋める基質からなり、組織の種類や太さや走向によって組織の力学的な性質が決定され、動物線維の代表は膠原線維である（藤田ら2002）。

膠原線維はほとんどすべての結合組織に見られる主要な線維であり、人体中で最も多いタンパク質であるコラーゲンからなる。その主な機能は張力に対し、引張り強さを与えることである。形態や、アミノ酸組成、物理的性質から少なくとも27の異なる膠原線維が分類されている（Young et al 2009）。

骨格筋は主に収縮要素で構成されているが、骨格筋線維とその線維を取り囲む膠原線維は骨格筋の適切な動きを維持するために必要である（Cohn et al 2000）。骨格筋の弾性は収縮要素だけでなく、筋組織内の結合組織によるものでもある（Williams et al 1981）。この骨格筋内の結合組織は、筋が収縮している間に筋組織の動きを統合し、筋細胞をしっかりと束ね、毛細血管と神経を互いにしっかりと密着させる（Jarvinen et al 2002）。また筋組織は、細胞外の力学的支持体として細胞外マトリックスの一種である基底膜を持っており、細胞外マトリックスは重力を含む機械的刺激に対して、骨格筋収縮の張力を発揮して腱組織へ伝達する役割を果たしている。多くの細胞は細胞外マトリックスとの接着を必要とし、細胞外マトリックスへの接着の解離によりアポトーシスが誘導される。これらにより骨格筋は、細胞内の細胞骨格と細胞内外の機械的刺激に応答することができる（小黒 - 安藤 2008）。このように骨格筋と細胞外マトリックスの相互関係は重要である、と考えられる。

一般的に筋原性や神経原性の筋萎縮は、筋組織にコラーゲンの蓄積と線維化を引き起こす。本実験のような筋に対する神経支配の欠如は、その筋の自発的な収縮を抑制する。筋や関節の結合組織機構やコラーゲンに関する身体的活動の効果については、多くの研究がなされており、それらは身体的活動の質が筋内コラーゲンの機能的、機能的な変化に影響を及ぼすとされている（Savolainen et al 1988）。

坐骨神経切断後の萎縮した骨格筋細胞を取り囲む結

合組織について、Salonen ら（1985）は腓腹筋において筋周膜と筋内膜でタイプIとタイプIIIのコラーゲンが増加したと報告している。彼らはまず、白黒の顕微鏡写真を9人が観察して免疫蛍光の強度を視覚的に見積もり、その後5人の免疫組織化学に慣れている観察者が別々にスライドを観察し、半定量的な膠原線維量を算出している。また、Williams（1988）は、10日間短縮位で固定化した筋で、染色した膠原線維をコンピューターに取り込み定量化し、膠原線維量が増加したことを報告している。

現在までに、動かないように固定した筋（immobilized muscles）に関して、結合組織の増加が数多く報告されている（Jarvinen et al 2002, Jozsa et al 1988, 1990, Williams 1988）。

Savolainenら（1987）は、不動1週後のヒラメ筋では、コラーゲン特有の構成アミノ酸であるヒドロキシプロリン濃度（須釜ら1996）は上昇するが、3週間後ではコントロールと同程度まで戻った、と報告している。また須釜ら（1996）は、不動7週後のヒラメ筋では、ヒドロキシプロリン量/単位筋湿重量は増加した、としている。Savolainenら（1988）は坐骨神経切断3週後のヒラメ筋において、ヒドロキシプロリン濃度が増加したことを生化学的に報告している。

筋によって不動後のヒドロキシプロリン濃度が異なっており、沖田（2009）によると、不動による筋内のコラーゲンの含有量を生化学的に検討した報告では一定の見解が得られていない。現在までに、コラーゲン含有量やコラーゲン合成がよく相関するといわれる活性を指標として生化学的に報告しているものは多いが、脱神経により萎縮した筋の膠原線維を病理学的（視覚的）に染色後定量化し、その量を介入前後に比較した研究は少ない。

今回は、坐骨神経切断による膠原線維量を画像解析ソフト Image J (ver .1.44) (宮東ら2007, 2011) を用いて、定量化により検討した。特に筋の伸張位や短縮位などに関係なく、坐骨神経麻痺を惹起させたラットに関して、若干の知見を得たのでここに報告する。

## 実験動物及び方法

8週齢（予備飼育2週間）のWistar系雄性ラット3匹（体重：248±5.5g）を使用した。ラットは当大学付属動物実験室にて一定環境（室温：24℃）下で飼育を行い、自由摂水・摂食とし、運動は自由とした。

2週間の予備飼育後、アバチン（5ml～10ml）を

表1 体重の推移 (g)

| 月/日       | 2/15 | 2/16 | 2/17 | 2/18 | 2/19 | 2/21 | 2/22 | 2/23 | 2/24 |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 (ラット番号) | 254  | 234  | 248  | 254  | 254  | 271  | 277  | 284  | 292  |
| 2         | 244  | 239  | 251  | 247  | 249  | 260  | 264  | 271  | 277  |
| 3         | 245  | 238  | 250  | 250  | 250  | 267  | 270  | 275  | 280  |

  

| 月/日       | 2/25 | 2/26 | 2/28 | 3/1 | 3/2 | 3/3 | 3/4 | 3/7 | 3/8 |
|-----------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 (ラット番号) | 296  | 297  | 300  | 316 | 316 | 320 | 329 | 344 | 345 |
| 2         | 280  | 280  | 285  | 295 | 301 | 301 | 305 | 325 | 325 |
| 3         | 287  | 285  | 285  | 301 | 305 | 307 | 311 | 327 | 327 |

表2 最終時体重と筋湿重量

| ラット (匹) | 最終時体重    | 筋湿重量 左 (g) | 筋湿重量 右 (g)  | 筋湿重量/体重 左       | 筋湿重量/体重 右        |
|---------|----------|------------|-------------|-----------------|------------------|
| 3       | 332 ± 11 | 0.75 ± 0.1 | 0.41 ± 0.06 | 0.0023 ± 0.0003 | 0.0012 ± 0.0002* |

\*p=0.006 筋湿重量 / 体重の左と右の比較

腹腔内投与し麻酔下にて右殿部を切開し、右坐骨神経を切断した。神経が再接着するのを防ぐため、切断部近位側断端で縫合を実施した後、筋および皮膚縫合を行った。なお左後肢は対照側とした。切断して3週経過後（体重の推移 表1）、アバチンによる過麻酔で全匹屠殺し、前脛骨筋（Tibialis Anterior：以下、TA）を摘出した。

TAは筋湿重量を計測した後に10%ホルマリン液にて固定した。その後4等分し、近位から2番目を用いてパラフィン包埋し、マイクロトームで薄切後（5µm厚）、渡辺らが考案したアザン（染色）変法（1974）を使って染色を行った。

アザン（染色）変法は、脱パラフィンを実施し、媒染剤に浸漬した後、マロリー・アゾカルミンG染色液に浸漬して、核、細胞質などの実質を染色した。続いてリンタングステン酸水溶液にて分別後、アニリン青水溶液に浸漬することにより膠原線維の染色を行った。組織は光学式顕微鏡（100倍）にて観察後、デジタルカメラ（OLYMPUS E 330）を用いて撮影をした。その後、Image J（ver .1.44）を用いて取り込み膠原線維面積の算出を行った。

膠原線維面積は、各一匹につき4～5視野（両側で9～10視野）を検討し（畠山ら1996）、その平均を算出した。統計学的検討としてSPSS（ver .19）を用いて対応のあるt検定を実施し、有意水準を5%未満とした。

本実験計画は西九州大学における動物実験の実施に関する指針に準拠して作成され、当大学の動物実験委員会の承認を得て実施した。

### 結果

坐骨神経切断肢群（n=3：以下、SNI群）の筋湿重量は、正常肢群（n=3：以下、Intact群）に比較して54%であった（SNI群：0.75 ± 0.1g、Intact群：0.41 ± 0.1g、p=0.052）。相対重量比（体重で除した筋湿重量）は、Intact群に比較してSNI群が54%であった（p=0.006 表2）。また、SNI群は、Intact群に比較して膠原線維面積が増加した（SNI群：16.115 ± 20.325µm<sup>2</sup>、Intact群：3.802 ± 2.948µm<sup>2</sup>、p=0.036）。

### 考察

今回は末梢神経切断による神経原性筋萎縮を促し、結合線維量を比較検討した。神経原性筋萎縮とは、下位（第二次）運動ニューロンおよび/または上位（第一次）運動ニューロンの病変、または末梢神経の病変により骨格筋の萎縮性病変が起こる状態をいう。萎縮を示す筋線維の数や分布様式は、脊髄前角神経細胞および末梢神経軸索障害の程度により影響を受ける（村上俊一 1992）。例えば、今回のように大多数の軸索が障害を受けているときは、骨格筋は大群性萎縮を示す。

Satoら（2009）は、坐骨神経切断後14日間でコントロール群と比較して、ヒラメ筋の筋湿重量が約30%へ減少、Savolainenら（1988）も坐骨神経切断後TAの筋湿重量が3週間で64%減少したことを報告している。彼らは、いずれもコントロール群のラットを別に作成しており、1匹のラットで坐骨神経切断肢と正常肢を分けて使用していない。しかし、本実験では、1匹のラットの坐骨神経切断肢と正常肢を比較しており、これが約20%の筋湿重量の違いになったと考えられる。

また1匹のラットで実験側と対照側の含有量を生化学的に比較し、実験側において有意に増加したとの報告もある。(Jozsa et al 1988, Salonen et al 1985, 須釜ら1996, Williams 1988)。Williams (1988)は、筋が短縮位で不動化期間に、筋線維組織に対するコラーゲン(結合組織の主要素)の割合が増加する、と述べている。Jozsaら(1990)は筋短縮位と筋延長位で固定した場合について、どちらも膠原線維の割合は増加したが、固定肢位と筋によって変化したことを述べている。そして、筋を固定すると筋周膜と筋内膜の膠原線維が増加し、その増加が毛細血管循環を障害しその障害が毛細血管循環を障害する悪循環を生みだす、としている。

今回、収縮という本来の機能を失った筋組織(脱神経筋)は、膠原線維が増加する結果となった。以前我々は、脊髄損傷ラットの骨格筋のミオシン重鎖アイソフォームについて報告しているが(堤ら2001)、脊髄損傷ラット下肢骨格筋の摘出時、コントロールラットと比較すると、筋外膜の外側に粘弾性のある物質が増加していることに気づいていた。その物質はおそらく皮下組織の脂肪だが、痙性麻痺の骨格筋にそのような状態変化が起こるということに基づいて、今回の実験を企画した。筋組織を光学式顕微鏡にて観察時、筋周膜における膠原線維層の厚さの増加に気付いて、アザン(染色)変法を実施することとなった。不動状態は、様々な物質の代謝を変化させると考えられる。

Salonenら(1985)はコラーゲン代謝に神経の影響が存在するのは明白で、坐骨神経障害は腓腹筋に線維増多(線維化)を引き起こし、筋周膜と筋内膜の両方で増加すると報告しており、特に筋内膜においてコラーゲンタイプⅢが増加していた。本研究では筋内膜における膠原線維の増加は見られなかった。このことは拮抗筋におけるコラーゲンタイプの差を反映していると考えられる。コラーゲンタイプは、Ⅰが組織の強度にⅢが組織の伸張性に関与するとされ(沖田ら2011)、この違いは骨格筋のコンプライアンスを維持するために生理学的に重要である、とされている。

Jozsaら(1988)は、筋の不動化された状態に注目して実験を行っており、骨格筋内の結合組織は週が経過するにつれて増加する、と報告している。彼らはまた骨格筋が含む各アイソフォーム(typeⅠやtypeⅡなど)にも着目し、膠原線維量の変化は各筋の機能によるだろうと述べている。

Savolainenら(1988)は、コラーゲン合成の反応は

脱神経筋と下肢固定に廃用性萎縮筋では異なる可能性があるとし、廃用性萎縮筋は線維のサルコメアの数を増減することによって、慢性的な緊張肢位や弛緩肢位に対応することができる、と述べている。このように、脱神経によるコラーゲン合成の適応反応の規制と萎縮は関連していないらしい、と結論づけている。

今回は、下腿の背屈筋である前脛骨筋(TA)における脱神経筋のコラーゲン合成亢進を、膠原線維量の変化解析により明らかにし、拮抗筋である腓腹筋との違いが示唆された。その違いは、異なるコラーゲンタイプの分布様式による可能性が考えられるが、さらにそれらについての免疫組織化学的検索が有用だと考えられる。本研究においては前脛骨筋のみの報告となったが、他の筋の検証も必要だと考える。

## 謝 辞

本研究にご協力をいただいた佐賀食肉衛生研究所の小野晴彦氏と研究所の方々、山下医科器械株式会社佐賀支社の川島澄俊氏に厚く御礼申し上げます。

## 文献

- Cohn RD & Campell KP (2000) Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 23: 1456-1471.
- 藤田尚男と藤田恒夫(2002) V支持組織・標準組織学総論(第4版). 東京, 医学書院. 139-180.
- 島山優一, ら(1996) 肝線維化率からみた肝硬変切除後の肝再生能に関する実験的研究. *日消外会誌* 29(3): 691-698.
- Jarvinen T et al (2002) Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscle. *J Muscle Res Cell M* 23: 245-254.
- Jozsa L et al (1988) Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: an experimental study in the rat calf muscles. *Exp Mol Pathol* 49: 267-278.
- Jozsa L et al (1990) The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. *J Bone Joint Surg* 72 B: 293-297.
- 宮東昭彦と川上速人(2007) 画像解析ソフト(Image Jなど)の使用と展開. *細胞組織化学* 2007. 東京, 学際企画, 181-190.
- 宮東昭彦と川上速人(2011) 画像解析技術の活用法. *細胞組織化学* 2011. 東京, 学際企画, 131-140.
- 村上俊一(2007) 6. 神経原性筋萎縮症. 東京, 中山書店, 197-238.
- 日本病理学会編(1981) 病理技術マニュアル3 病理組織標本作成技術(下) - 染色法 -. 東京, 医歯薬出版, 45-58.
- 沖田 実(2007) 筋による拘縮の発生とその改善のメカニズム. In: 筋機能改善の理学療法とそのメカニズム - 理学療法の科学的基礎を求めて - [第2版] 山田 茂他編, 東京, ナップ, 119-137.
- 沖田 実, ら(2011) 骨格筋の変化からみた拘縮の病態と物理

- 的刺激の影響 . J. Jpn. Othop. Assoc. 85: 420-425.
- 小黑 - 安藤麻美 (2008) 骨格筋の重力応答と廃用性萎縮 : 細胞外基質・コラーゲンと分子シャペロンから探る . Jpn Soc Biol Sci Space 22(4): 167-171.
- Salonen V et al (1985) Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. Muscle Nerve 8: 125-131.
- Savolainen J et al (1987) Effect of immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscles. Am J Physiol 252: R 883-R 889.
- Savolainen J et al (1988) Effects of denervation and immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscle and tendon. Am J Physiol 254: R 897-R 902.
- 須釜 聡, ら (1996) 関節固定が筋および腱組織コラーゲンの可溶性に及ぼす影響 . 理学療法学 . 23(2): 72-79 .
- 堤恵理子, ら (2001) 脊髄損傷ラットにおける骨格筋ミオシン重鎖アイソフォームの経時的変化 . 広島大学保健学ジャーナル 1(1): 60-64 .
- Williams PE (1988) Effect of intermittent stretch on immobilized muscle. Ann Rheum Dis 47: 1014-1016.
- Williams PE & Goldspink G (1981) Connective tissue changes in surgically overloaded muscle. Cell Tissue Res 221: 465-470
- Young B et al (2009) 4 結合組織 . 機能を中心とした図説組織学 (第5版), 澤田 元, 依藤 宏, 大野伸一, 佐々木克典 (訳), 東京, 医学書院, 65-81 .
- Yusuke S et al (2009) Differential expression of sarcoplasmic and myofibrillar proteins of rat soleus muscle during denervation atrophy. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73(8): 1748-1756.