

原 著

肉離れ損傷筋における基底膜の特徴 — ラットを用いた基礎的研究

岩田 晃^{†1}, 野中紘士¹, 上 勝也²

¹大阪府立大学 地域保健学域 総合リハビリテーション学類 理学療法学専攻
大阪府羽曳野市はびきの3-7-30

²和歌山県立医科大学 医学部 解剖学第二講座
和歌山県和歌山市紀三井寺811-1

受付：2012年4月4日, 受理：2012年4月18日

Characteristics of basal lamina of strain — injured muscle cells in rat skeletal muscles

Akira IWATA^{†1}, Koji NONAKA¹ and Katsuya KAMI²

¹Department of Physical Therapy, Faculty of Comprehensive Rehabilitation, Osaka Prefecture University 3-7-30, Habikino, Osaka 583-8555, Japan; ²Department of Anatomy & Neurobiology, School of Medicine, Wakayama Medical University 811-1, Kimiidera, Wakayama 641-8509, Japan

Received April 4, 2012; Accepted April 18, 2012

Purpose: Muscle strain is one of the most common soft tissue injuries, and has a high recurrence rate. We hypothesized that damage of the basal lamina of the muscle cells at the injury site causes these re-injuries. The purpose of this study was to determine whether strain injury damages the basal lamina of muscle cells or not.

Methods: Eighteen Wistar adult male rats were divided into three groups: strain injury group, contusion injury group, and control group. Two days after injury, the gastrocnemius muscles were removed and the basal lamina and plasma membrane of these muscle cells were identified by immunohistochemical staining using laminine and dystrophin antibodies.

Results: The basal lamina of strain injured muscle cells was thick and irregular. The basal lamina ratio (basal lamina area / cross-sectional area) of these muscle cells was significantly larger than those of controls.

Conclusion: The present study indicated that the basal lamina of muscle cells was damaged by strain injury, and these results suggest that the damage of basal lamina may involve inhibition of satellite cell activities and delay the muscle regeneration processes. This may enhance the odds for re-injury.

Key words : 肉離れ；基底膜；形質膜

1 はじめに

筋損傷は最も頻度の高い外傷の一つで¹, スポーツ活動に関連する外傷の90%以上は打撲か肉離れである². これらは医学的な治療を必要とせず, 自然治癒にまかせることが多いが, 筋萎縮や疼痛, 関節可動域制限などの構造的, 機能的な問題が残存することも少なくない². 特に, 打撲と比較して, 肉離れは競技復帰に時間を要すこと, パフォーマンス

の低下や再発の頻度が高いことが知られている^{3,4}. このように予後が損傷方法によって異なるのは, 損傷時, もしくは再生過程のどちらかにおいて, 違いがあると考えられるが, 明らかにされていない.

1960年代に Mauro⁵ が, 筋衛星細胞を発見して以降, 損傷筋の再生に関する研究は数多く行われている. Jarvinen ら⁶ は, 再生過程を, ①破壊相 (destruction phase), ②修復相 (repair phase), ③リモデリング相 (remodeling phase) の3相に分けている. また, Huard ら⁷ は, ①変性と炎症 (degen-

[†]連絡著者 Email : iwata@rehab.osakafu-u.ac.jp

eration and inflammation), ②再生 (regeneration), ③線維化 (fibrosis) の3相に分けている。このように再生過程の相の分け方に違いはあるものの, 筋損傷を誘発する刺激 (挫傷, 遠心性収縮, 薬物など) の種類が何であるかに関わらず, 損傷した筋細胞は同じメカニズムで再生するとされている^{8,9}。このことから, 再生過程において, 肉離れのみの特異的なイベントが起こっていることは考えにくい。

そこで, 我々は再生過程に筋損傷モデル特有の違いがあるのではなく, 損傷自体に何らかの違いが存在するという仮説を立て, 筋にストレスが加えられる方向に着目した。打撲のように外力が直接筋に加わる場合, そのストレスは横断的に加えられるのに対して, 肉離れは牽引される方向から縦断的にストレスが加わる。横断的にストレスが加わると, ストレスが加わった部位に損傷が起こるのに対して, 縦断的ストレスでは, 伸張される部位だけでなく, 縦方向に配列された膜組織にも損傷が起こることが想定される。筋細胞は筋形質膜と基底膜に包まれていて, この二つの膜の間に筋再生に重要な役割を演じている筋衛星細胞が存在する⁶。先行研究における打撲損傷では, 筋形質膜は完全に破壊されるが, 基底膜はほとんど損なわれずに残存していることが明らかにされている¹⁰。これは壊死筋細胞の特徴の一つであり, 再生過程における新たな筋細胞の形成はこの基底膜内で, 筋衛星細胞が増殖, 分化, 融合することで進行する^{6,10,11}。つまり, 基底膜は筋再生の足場として非常に重要な役割を担っている。筋に縦断的にストレスがかかった場合, 基底膜に損傷が起こり易いとすれば, 筋衛星細胞の活動が制限され, 再生に時間を要することや, 完全な再生を妨げることが考えられる。不完全な再生筋細胞は, 外力に対して脆弱である可能性が高いことから¹², 再発率の高さに繋がる。そこで, 本研究では, 正常筋や打撲筋と比較して, 肉離れには筋細胞の膜成分, 特に基底膜の損傷の程度に差があるという仮説を立て, その検証を行うことを目的とした。

2 方法

2.1 実験概略

本研究では, 肉離れのモデルとして, 収縮時に伸張方向に外力を加える遠心性収縮を用いた。実験群は, 肉離れ群, 打撲群, およびコントロール群の3群に分け, 損傷2日後の筋細胞における形質膜と基底膜の特徴については免疫組織化学的解析により検討した。

実験動物は, 12週齢のWistar系雄ラット18匹 (各群6匹, 体重280-316g) を用いた。ラットには食餌および水を自由に摂取させ, 飼育室は12時間毎に明暗を切り替えた。なお,

本研究は日本生理学会の定める「動物実験に関する基本方針」に従い, また大阪府立大学の動物実験委員会の承認のもとで実施した (承認番号21-106号)。

2.2 損傷方法

打撲, 肉離れともに対象筋は右下腿三頭筋とした。打撲には, 実際に起こりうる打撲を想定して, 皮膚を切開せずに行う損傷方法であるドロップマス法を用いた^{12,13}。具体的には, ペントバルビタールによる麻酔下で, 640gの錘を25cmの高さから, 右下腿三頭筋の内側に当てた直径10mmのインパクトで落下させて損傷を起こした。

肉離れは, 打撲と同条件の麻酔下で, ステージ上に股関節90°屈曲位, 膝関節完全伸展位に固定した側臥位をとらせ, 電気刺激によって底屈を起こし, 同時に足関節背屈35°位まで徒手にて強制的に背屈させ, 遠心性収縮による肉離れを起こした。電気刺激は剃毛した左下腿後面皮膚上から, 刺激強度10mA, 周波数200Hzで行い, 収縮回数は50回とした。

2.3 免疫組織化学的分析

打撲群, 肉離れ群 (各群6肢) において, 損傷2日経過後に, またコントロール群については同週齢時に被験筋である下腿三頭筋を摘出し, 液体窒素で冷却したイソペンタンにて急速凍結後, 筋腹部から厚さ10 μ mの凍結切片を作成した。風乾後, 10%中性ホルマリンで15分間固定した。切片を0.1Mリン酸緩衝液で洗浄し, 10%正常血清と1%Triton X-100を含む0.1Mリン酸緩衝液にて, 室温で1時間インキュベートした。一次抗体として形質膜を染色するためのマウスモノクローナル抗ジストロフィン抗体 (1:100, Sigma) と基底膜を染色するためのラビットポリクローナル抗ラミニン抗体 (1:1,000, Sigma), 5%正常血清, 0.3%Triton X-100を含む0.1Mリン酸緩衝液にて, 室温で2時間インキュベートした。0.1Mリン酸緩衝液で10分間の洗浄を3回行い, 二次抗体としてAlexa Fluor 488標識抗マウスIgG抗体 (1:100, CSTジャパン) とAlexa Fluor 555標識抗ラビットIgG抗体 (1:100, CSTジャパン), 5%正常血清, 0.1%Triton X-100を含む0.1Mリン酸緩衝液にて, 室温で1時間インキュベートした。0.1Mリン酸緩衝液で10分間の洗浄を3回行い, 核を可視化するためVectashield Hard set Mounting Medium with DAPI (Vector Labs) にて封入を行った。3重蛍光染色を施した切片を, 蛍光顕微鏡を用いて組織観察を行った。

2.4 基底膜の測定

損傷筋細胞を3重蛍光染色で同定した後, 肉離れ群, コントロール群の筋細胞の面積, および基底膜の面積を測定した。具体的には, 肉離れ群の損傷筋細胞, およびコント

ロール群の正常筋細胞の面積とラミニン抗体によって免疫染色された部分の面積を画像解析ソフト ImageJ (NIH) を用いて計測し、さらに筋細胞面積に対する基底膜の割合 (基底膜比) を算出した。また、肉離れ群は壊死筋細胞を、コントロール群では各切片から 5 個ずつランダムに筋細胞を選択し、計測を行った。

2.5 統計処理

筋細胞面積、基底膜面積、基底膜比の 3 項目について、対応のない t 検定を用いて、正常筋細胞と肉離れ筋細胞の比較を行った。有意水準は 5% 未満とし、統計処理には PASW 18.0 (SPSS) を用いた。

3 結果

3.1 組織観察

肉離れ群、打撲群、コントロール群の 3 重蛍光染色顕微鏡画像を Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3 に示す。肉離れ群では、筋細胞実質内に核が認められる損傷筋細胞が筋組織に散在性に観察された。この損傷筋細胞におけるラミニン免疫染色の結果は、正常筋細胞と比較し、基底膜が厚く、波打つような膜の変形が観察された。また、ジストロフィン免疫染色では、筋細胞を取り巻く形質膜の部分だけでなく、細胞内部まで染色されている筋細胞が観察された。

打撲群には、損傷が広範囲に認められ、多くの核が損傷領域に観察された。肉離れ群と同様に損傷筋でもラミニン免疫染色によって基底膜が厚くなっている筋細胞が観察された。さらに、損傷が著しく、基底膜が観察されない部分もあった。ジストロフィン免疫染色では、明確な形質膜

が観察されず、筋細胞輪郭に沿って、免疫染色強度の低下した筋細胞が多く観察された。コントロール群においては、ラミニン免疫染色、ジストロフィン免疫染色ともに筋細胞周囲の基底膜と形質膜に相当する局在性を示した。

3.2 基底膜面積、基底膜比の比較 (肉離れ群とコントロール群の比較)

筋細胞の平均面積は、肉離れ群は $2602.2 \pm 1413.5 \mu\text{m}^2$ 、コントロール群は $3080.5 \pm 735.1 \mu\text{m}^2$ であった。基底膜の肉離れ群とコントロール群の面積はそれぞれ $1430.9 \pm 509.1 \mu\text{m}^2$ 、 $1101.8 \pm 262.5 \mu\text{m}^2$ であった。また、基底膜比は肉離れ群が $60.1 \pm 14.9\%$ 、コントロール群が $37.1 \pm 9.4\%$ であった。両群

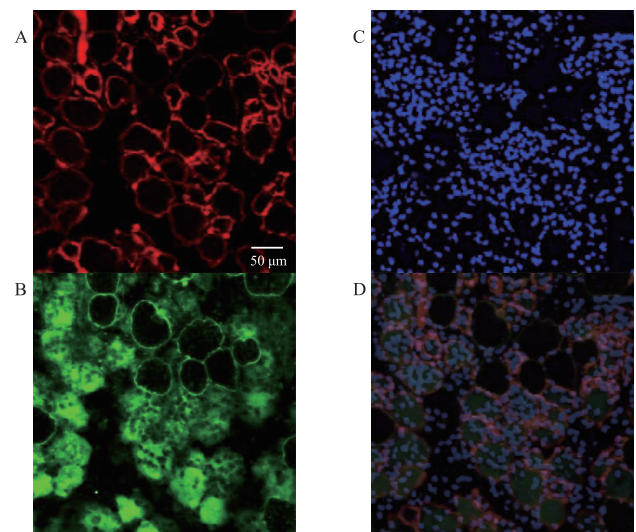


Fig. 2 打撲損傷 2 日後の蛍光顕微鏡像 (A) ラミニン免疫染色, (B) ジストロフィン免疫染色, (C) DAPI, (D) 重ね合わせ像

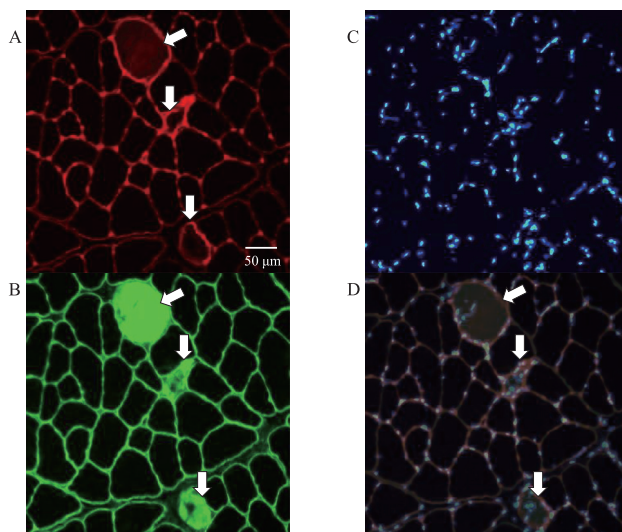


Fig. 1 肉離れ損傷 2 日後の蛍光顕微鏡像 (A) ラミニン免疫染色, (B) ジストロフィン免疫染色, (C) DAPI, (D) 重ね合わせ像 矢印は損傷筋を指す。

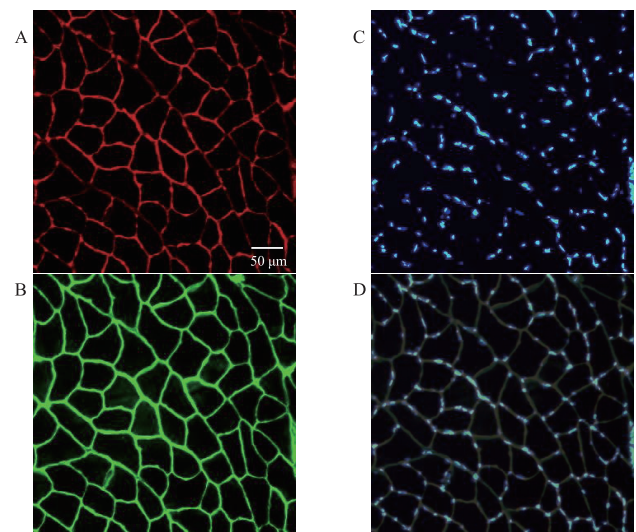


Fig. 3 コントロール群の蛍光顕微鏡画像 (A) ラミニン免疫染色, (B) ジストロフィン免疫染色, (C) DAPI, (D) 重ね合わせ像

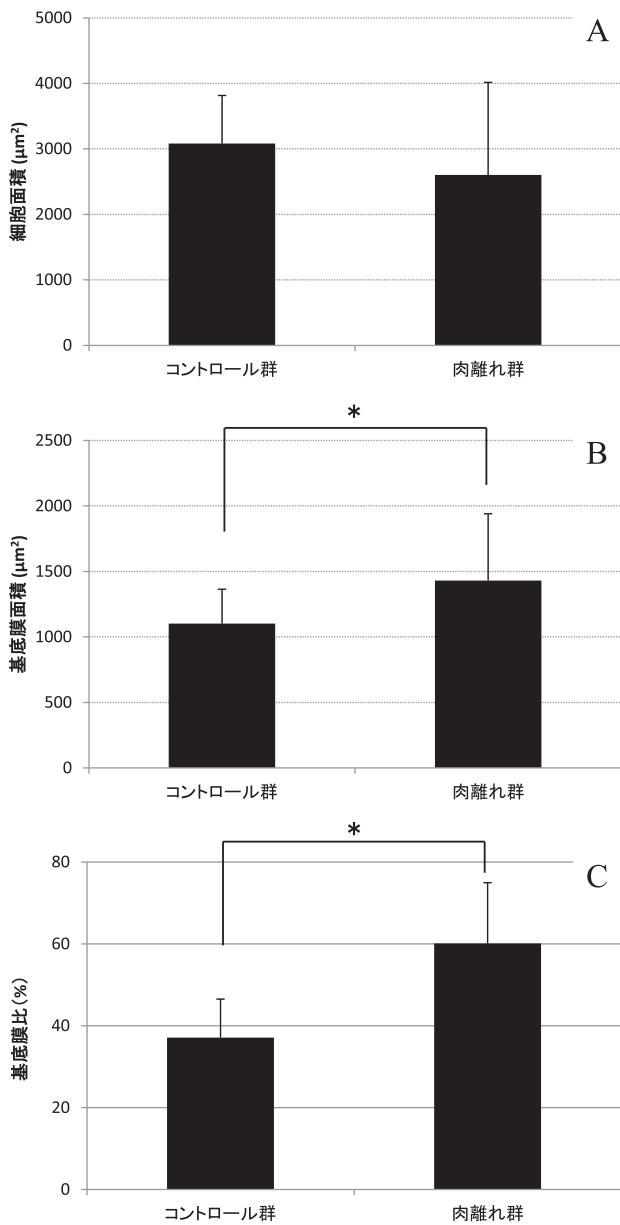


Fig. 4 肉離れ群とコントロール群の比較 (A) 筋細胞面積, (B) 基底膜面積, (C) 基底膜比 (平均値 ± SD, * $p < 0.01$)

の筋細胞面積には、統計的に有意な相違は認められなかったものの、基底膜面積および基底膜比は、肉離れ群がコントロール群よりも統計的に有意に高い値を示した ($p < 0.01$) (Fig. 4).

4 考察

肉離れ群では筋組織に散在性の損傷筋細胞が観察されたことは、先行研究¹⁰で明らかにされているそれらの特徴と一致していることから、肉離れ損傷は本研究で使用した実験モデルによって引き起こされることが確認された。肉離れ群の筋組織を免疫組織化学染色によって観察した結

果、損傷筋細胞の基底膜厚は、同一筋組織内で損傷が起っていない筋細胞のものと比較して、肥厚していることが確認できた。また、正常筋細胞との比較の結果、損傷筋細胞は、基底膜の面積が有意に大きく、また、基底膜の占める割合も有意に高いことが示された。筋損傷の2日後は炎症が激しい段階である¹²。これらの結果から、少なくともこの時期においては、肉離れ損傷によって、基底膜に何らかのダメージがあることが示された。

骨格筋は損傷を受けると、筋衛星細胞が活性化されて増殖を開始し、その後分化し、相互に、あるいは既存の筋細胞と融合することによって再生が進行する^{10,14}。このように筋衛星細胞は、筋再生に非常に重要な役割を演じるが、この細胞は筋形質膜の外側、基底膜の内側に未分化な状態で存在することが明らかにされている¹⁴。また、筋衛星細胞は基底膜に結合していて、筋活動が低下すると、その数が減少するとの報告もある¹⁵。これらの先行研究を考慮すると、肉離れ損傷によって、基底膜に損傷が起ると、その部位の筋衛星細胞数が減少することで筋芽細胞数が減少し、その結果として、再生速度の低下につながっている可能性が考えられる。また、筋損傷によって筋形質膜が破壊されても、基底膜は損傷されずに残存していることから、基底膜は筋再生の足場としての役割があると考えられている¹⁰。しかし、今回の結果のように基底膜にもダメージがあると仮定すると、筋再生の足場としての役割を果たせないため、再生が十分に行われぬ可能性も考えられる。

このように本研究では、肉離れ損傷によって、筋形質膜だけでなく、基底膜にも損傷が起ることを示すことができたが、肉離れ損傷を定義する上で、幾つかの限界が考えられる。まず、肉離れ群と打撲群の損傷程度を統一出来なかったために、打撲群と肉離れ群との定量的な比較が実施できなかったことが挙げられる。打撲群では、損傷の程度が非常に強く、基底膜が観察できない部分もあり、肉離れ群との定量的な比較が困難であった。このため、打撲と肉離れという損傷方法の違いによって基底膜にどのような変化が生じるかについて明らかにすることが出来ていない。また、ラミニン免疫染色を用いることで基底膜の変化を捉えることを試みたが、ラミニン抗体によって免疫染色される割合が細胞内で大きくなっていることが、基底膜の機能にどのような影響を及ぼすのかについて明らかにすることが出来ない点も、本研究の限界と考えられる。

5 結語

肉離れは、頻繁に遭遇する外傷であり、損傷筋の再生が不十分なことが多く、再発率が高いことはよく知られてい

るが、その要因については明らかにされていない。本研究では、筋損傷に伴う膜成分の損傷が再発を促す要因の一つであるという仮説を立て、肉離れ損傷後の基底膜と形質膜の変化を観察した。その結果、筋形質膜だけでなく基底膜の損傷も観察された。基底膜には、筋衛星細胞が存在し、筋再生の足場ともなることから、基底膜の損傷が完全な筋再生を妨げ、結果として、外力に対して脆弱になり、筋損傷の再発を高める一つの要因となっている可能性が示唆された。

6 謝辞

本研究は科学研究費補助金若手研究（B）（課題番号：22700546）の助成を受け、実施したものである。

文献

- 1 Chan YS, Li Y, Foster W, et al. (2003) Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. *J Appl Physiol*, 95: 771-780.
- 2 Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, et al. (2005) Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil*, 86: 1304-1310.
- 3 Croisier JL (2004) Factors associated with recurrent hamstring injuries. *Sports Med*, 34: 681-695.
- 4 Askling C, Saartok T, Thorstensson A (2006) Type of acute hamstring strain affects flexibility, strength, and time to return to pre-injury level. *Br J Sports Med*, 40: 40-44.
- 5 Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. (1961) *J Biophys Biochem Cytol*, 9: 493-495.
- 6 Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, et al. (2005) Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*, 33: 745-764.
- 7 Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. (2002) *J Bone Joint Surg Am*, 84: 822-832.
- 8 Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, et al. (2007) Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 21: 17-331.
- 9 Sato K, Li Y, Foster W, et al. (2003) Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle nerve*, 28: 365-372.
- 10 上勝也, 岩田晃, 浦井久子 (2007) 骨格筋の再生機構とリハビリテーション. *日本リハビリテーション医学会誌*, 44(3), 150-157
- 11 Charge SB, Rudnicki MA. (2004) Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev*, 84: 209-238.
- 12 Iwata A, Fuchioka S, Hiraoka K, et al. (2010) Characteristics of locomotion, muscle strength, and muscle tissue in regenerating rat skeletal muscles. *Muscle nerve*, 41: 694-701.
- 13 Kami K, Masuhara M, Kashiba H, et al. (1993) Changes of vinculin and extracellular matrix components following blunt trauma to rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*, 25: 832-840.
- 14 Chan YS, Li Y, Foster W, et al. (2005) The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. *Am J Sports Med*, 33: 43-51.
- 15 Darr KC, Schultz E. (1989) Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. *J Appl Physiol*, 67: 1827-1834.