

〔原 著〕

ラット咀嚼筋線維の肥大あるいは萎縮を評価する指標について

石井 久淑, 太田 勲, 山根 美子, 猪股孝四郎

北海道医療大学歯学部口腔生理学講座

(主任：猪股孝四郎教授)

Appropriate index for evaluation of hypertrophy or atrophy in the masticatory muscles

Hisayoshi ISHII, Isao OOTA, Yoshiko YAMANE and Koshiro INOMATA

Department of Oral Physiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of HOKKAIDO

(Chief : Prof. Koshiro INOMATA)

Abstract

This study investigated the appropriate indexes for evaluation of hypertrophy or atrophy in masticatory muscles of the rat. Masseter muscle of Wistar male rats was used in the study. The muscle was excised under anesthesia with pentobarbital and quickly frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen. Serial cross sections (10 μ m in thickness) of the middle portion of the muscle was cut on a cryostat microtome at -25°C . The cross sections were cut at nearly right angles and at an oblique angle (about 45°) with the long axis of the muscles. These sections were stained with NADH-TR. The cross sectional area (CSA) and the short diameter of the muscle fibers were measured with an Image Processing and Analysis System (Quantimet 600). There were no significant differences in the short diameter of the fibers sectioned at right angles and at oblique angles. The CSA of the muscle fibers sectioned obliquely was 15% larger than that at the nearly right angles. This difference was statistically significant.

The results indicate that the short diameter of muscle fibers may be used as an index to evaluate muscle hypertrophy and atrophy.

Key words : Rat, Masseter muscle, Short diameter

受付：平成10年3月31日

緒 言

骨格筋線維は種々な要因により肥大したり, 萎縮したりすることが知られている。例えば, 適度な運動負荷は筋線維を肥大させ^{13),14),18)}, 除神経あるいは筋の不動化は筋線維を萎縮させる^{6),8)}。筋線維の肥大あるいは萎縮の程度を評価するために, つぎのような指標が用いられている。①筋線維の横断面積^{3),7),10),11),15),19)}, ②筋線維の横断面の短径と長径の平均値¹⁶⁾, ③筋線維の短径^{1),9)}である。しかし, これらは主として四肢筋について用いられている指標である。顎顔面あるいは口腔領域に存在する骨格筋に関する指標については, 十分に検討されていない。

本論文は, 咀嚼筋の肥大あるいは萎縮を評価するための簡便で, しかも妥当な指標について検討した。

材料と方法

1 材 料

実験には本学動物実験センターにおいて恒常的条件下(明暗周期12時間, 室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$)で飼育したWistar系雄性ラットを用いた。

3週齢で離乳したラットを固型飼料(飼育用MF, オリエンタル酵母)で飼育し, 飼育期間中は飼料および水は自由に摂取させた。

7週齢のラットの腹腔内にsodium pentobarbital(50mg/kg body weight)を投与し, 麻酔した条件で速やかに咬筋浅部を摘出し, これを実験に用いた。

2 凍結切片の作製

摘出した咬筋の筋腹中央部を小組織片とし, これを可能な限り素早く, 液体窒素で冷却したイソペンタン中に投入して凍結固定した。凍結した小組織片は, クリオスタット(Cold tome CM-501, サクラ精機)にて -25°C 下で厚さ $10 \mu\text{m}$ の連続切片とした。この際, 同一の組織片から, 可能な限り直角に横断した切片ならびに約

45度で横断した切片を作製した。

なお, 飼育及び実験は「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」(日本生理学会制定)に基づいて行った。

3 筋線維の横断面積と筋線維の短径の測定

切片は, 室温で30分以上乾燥し, NADH-tetrazolium reductase 染色用の反応液(NADH 3.2mg, Nitroblue tetrazolium 8.0mg, Mops buffer 2.0ml, 蒸留水 8.0ml)中で 37°C , 40分間インキュベートした後, グリセリンゼリーにて封入し, 顔面神経が横走している部位の近傍の筋線維について, 筋線維の横断面積(cross sectional area; 以下CSAと略す)ならびに短径(short diameter)を画像処理&解析システム(Quantimet 600, ライカ)を用いて測定した。

結 果

咬筋の横断面の組織像をFig. 1に示す。咬筋浅層部は, NADH活性の高い線維と低い線維の2種類の筋線維によって構成されていた。これは, Miyataらの報告と一致していた¹²⁾。筋線維をほぼ直角に切った筋線維の横断面像は, 円形に近い多角形を示した(Fig. 1 A)。一方, 筋線維を約45度で切った筋線維の横断面像は, 著しい長楕円形を示した(Fig. 1 B)。

NADH活性の高い筋線維ならびに低い筋線維のそれぞれ50本についてCSAと短径を測定した。ほぼ直角に横断したNADH活性の高い筋線維のCSAと短径は, それぞれ 1392.9 ± 219.5 (mean \pm SD) μm^2 および $33.1 \pm 2.9 \mu\text{m}$ であった。一方, 約45度で横断したNADH活性の高い筋線維のCSAと短径は, それぞれ $1605.3 \pm 237.4 \mu\text{m}^2$ および $33.1 \pm 2.9 \mu\text{m}$ であった(Fig. 2 A, B)。また, NADH活性の低い筋線維においては, ほぼ直角に横断した筋線維のCSAと短径は, それぞれ $1581.7 \pm 248.8 \mu\text{m}^2$ および $34.6 \pm 3.8 \mu\text{m}$ であった。約45度で横断した筋線維のCSAと短径は, $1878.4 \pm 213.6 \mu\text{m}^2$ および $33.6 \pm$

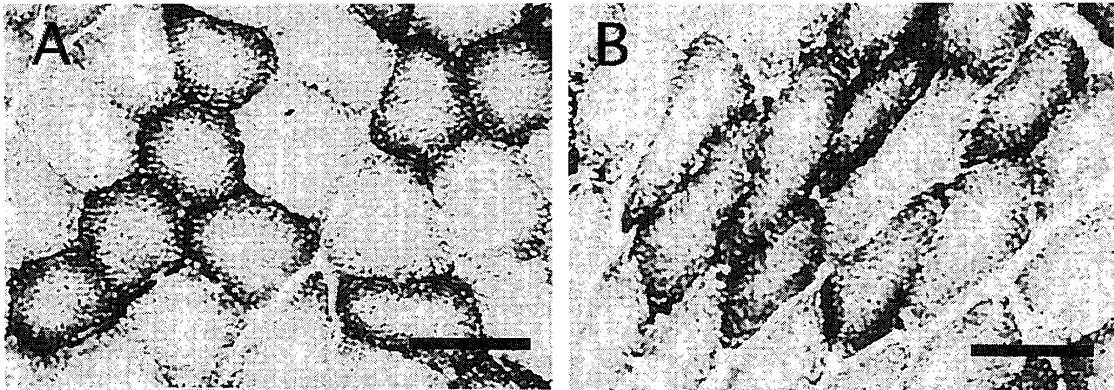


Fig. 1 Cross sections of masseter muscles stained with NADH-TR. The cross sections are cut at nearly right angles (A), and at an oblique angle (B) with the long axis of muscle fibers. These image were made using an Image Processing and Analysis System (Quantiment 600, Leica) connected to a personal computer. Bar : 50 μ m.

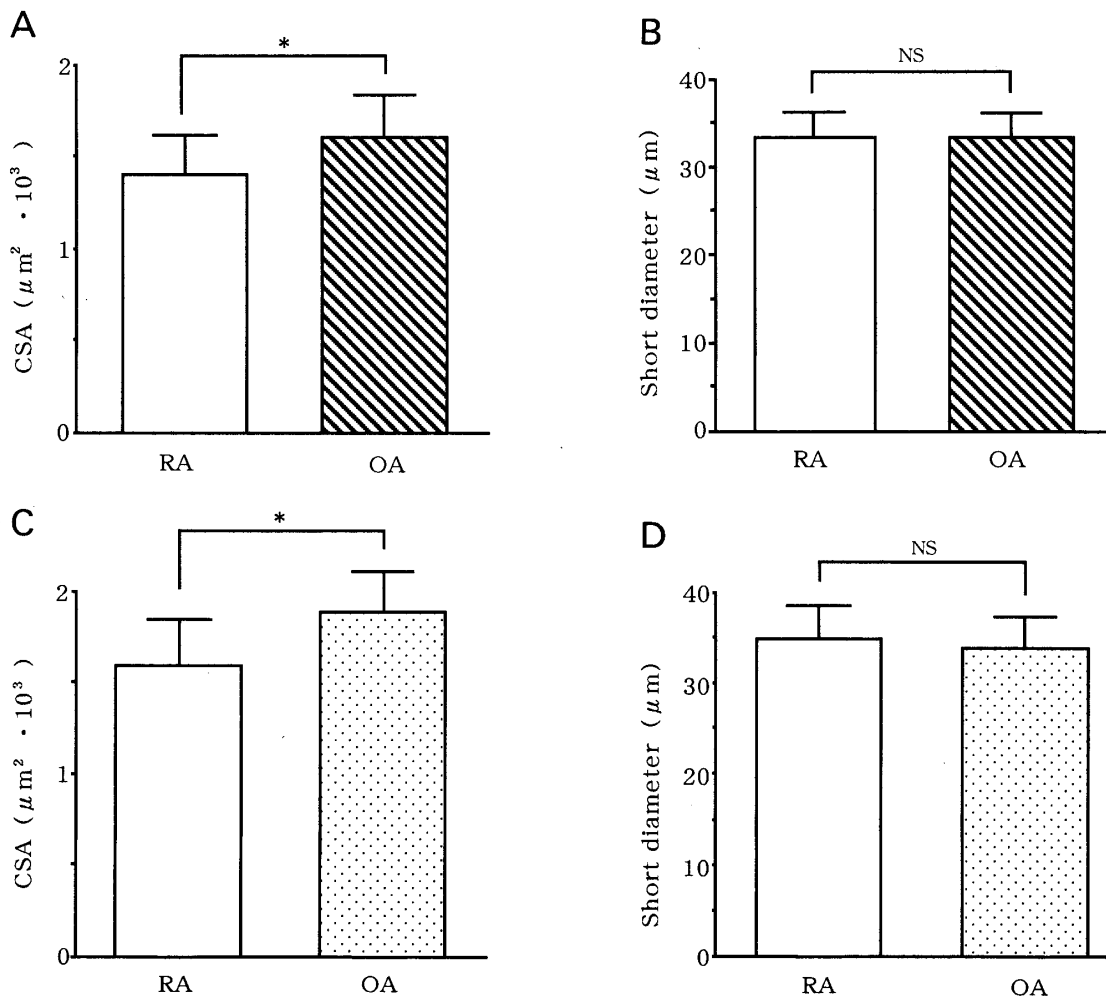


Fig. 2 Cross sectional area (CSA) and short diameter of muscle fibers in rat masseter muscles. A and B show data from the muscle fibers of the high NADH activity. C and B show data muscle fibers of the low NADH activity. The cross sections are cut at nearly right angles (RA), and at an oblique angle (OA) with the long axis of muscle fibers. Values are means \pm SD. * : $P < 0.001$.

3.4 μ mであった (Fig. 2 C, D)。

以上述べたように、筋線維の短径は、筋線維のNADH活性の高低にかかわらず、横断の角度の違いによる有意な差は認められなかった。これに対して、NADH活性の高い筋線維ならびに低い筋線維のいずれにおいても約45度で横断した筋線維のCSAは、ほぼ直角に横断した筋線維のそれに対して平均15%大きな値を示し、この差は有意であった。

考 察

本研究において筋線維のCSAは、組織標本作製時の横断の角度に強く影響されるが、短径は、角度による有意差は認められなかった。このことは、咬筋の筋線維は長い紡錘形であるので、筋線維の走行を考慮して筋肉の筋腹中央部を横断しさえすれば、十分な指標となることが示された。同様なことは、四肢筋についてThompsonらにより報告されている¹⁷⁾。筋線維のCSAは、組織標本作製時において筋肉が可能な限り直角に横断されていれば、有効な指標となることが知られている^{4),5),8),13)}。しかし、筋線維の長軸に対して直角に横断した切片を常に得ることは困難である。本研究において咬筋の筋線維のCSAは、切片作製時の横断の角度に強く影響され、異なった角度で横断された筋線維のCSAを比較の対象とする場合には、過大評価される可能性があることに注意しなければならない。

なお、一般にNADH活性の低い筋線維は、NADH活性の高い筋線維に比較して太いことが知られており^{2), 12)}、本研究においても従来の報告と同様の結果が示された。

以上述べたように、筋線維の短径は、咀嚼筋である咬筋においても、四肢筋と同様に、組織切片作製時における横断の角度によって受ける影響が少ない。したがって、筋線維の短径は、咬筋の発育や種々の条件を負荷したときの変化あるいは老化にともなう変化を形態的に比較評

価するのに十分に信頼性のある指標であることが明らかにされた。

結 論

ラット咀嚼筋の肥大あるいは萎縮を評価する指標について検討した。実験には、Wistar系雄性ラットの咬筋を用いた。摘出した咬筋は、小組織片とし、液体窒素で凍結固定した後、同一の組織片から可能な限り直角に横断した切片と約45度で横断した切片を作製した。切片にNADH-TR染色を施し、顔面神経が横走している部位の近傍の筋線維について筋線維の横断面積 (cross sectional area; 以下CSAと略す) ならびに短径 (short diameter) を画像処理&解析システム (Quantimet 600) を用いて測定した。筋線維の短径は、筋線維のNADH活性の高低にかかわらず、横断の角度の違いによる有意な差は認められなかった。しかし、筋線維のCSAは、NADH活性の高い筋線維およびNADH活性の低い筋線維のいずれにおいても、約45度で横断した筋線維が、ほぼ直角に横断した筋線維に対して平均15%大きな値を示した。この値は有意であった。

以上より、筋線維の短径は、咀嚼筋についても肥大あるいは萎縮を評価するための妥当な指標であることが示された。

参考文献

1. Aberle, E. D. and Stewart, T. S. : Growth of fiber types and apparent fiber number in skeletal muscle of broiler-and layer-type chickens. *Growth*, 47 : 135-144, 1983.
2. Ishihara, A. and Taguchi, S. : Histochemical differentiation of fibers in the rat slow and fast twitch muscles. *Jpn. J. Physiol.*, 41 : 251-258, 1991.
3. Aniansson, A. G., Grimby, M. H. and Krotkiwski, M. : Muscle morphology, enzyme activity and muscle strength in elderly men and women. *Clin. Physiol.*, 1 : 73-86, 1981.

4. Chiakulas, J. J. and Pauly, J. E. : A study of postnatal growth of skeletal muscle in the rat. *Anat. Rec.*, 152 : 55-62, 1965.
5. Colling-Saltin, A. -S. : Some quantitative biochemical evaluations of developing skeletal muscles in the human foetus. *J. Neurosci.*, 69 : 187-198, 1978.
6. Carter, G. M. and Harkness, E. M. : Alterations mandibular form following motor denervation of the masseter muscle. An experimental study in the rat. *J. Anat.*, 186 : 541-548, 1995.
7. Edström, L. and Torlegard, K. : Area estimation of transversely sectioned muscle fibers. *Zwiss. Mikr.*, 69 : 166-178, 1969.
8. Ensco, M. and Puddy, D. : Increase in the number of nuclei and weight in skeletal muscle of rats of various ages. *Am. J. Anat.*, 114 : 235-244, 1964.
9. Kowalewski, R. and Miltzow, M. : Postnatal development of masticatory muscles in the Wistar rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout). A Histochemical Study. *Anat. Anz.*, Jena 170 : 205-211, 1990.
10. Layman, D. K., Hegarty, P. V. and Swan, P. B. : Comparison of morphological and biochemical parameters of growth in rat skeletal muscles. *J. Anat.*, 130 : 159-171, 1980.
11. Lexell, J., Sjöström, M., Nordlund, A. S. and Taylor, C. C. : Growth and development of human muscle : A quantitative morphological study of whole vastus lateralis from childhood to adult age. *Muscle Nerve*, 15 : 404-409, 1992.
12. Miyata, H., Sugiura, T., Kawai, Y. and Shigenaga, Y. : Effect of soft diet and aging on rat masseter muscle and its motoneuron. *Anat. rec.*, 237 : 415-420, 1993.
13. Ontell, M. and Dunn, R. F. : Neonatal muscle growth : A quantitative study. *Am. J. Anat.*, 152 : 539-556, 1978.
14. Rosenblatt, J. D. and Woods, R. I. : Hypertrophy of rat extensor digitorum longus muscle injected with bupivacaine. A sequential histochemical, immunohistochemical, histological and morphometric study. *J. Anat.*, 181 : 11-27, 1992.
15. Sillau, A. H. and Natalio Banchemo : Skeletal muscle fiber size and capillary. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 158 : 288-291, 1978.
16. Song, S. K., Shimada, N. and Anderson, P. J. : Orthogonal diameters in the analysis of muscle fiber size and form. *Nature London*, 200 : 1220-1221, 1963.
17. Thompson, E. H., Levine, A. S., Hegarty, P. V. J. and Allen, C. E. : An automated technique for simultaneous determinations of muscle cell number and diameter. *J. Anim. Sci.*, 48 : 328-337, 1979.
18. Tamaki, T., Uchiyama, S. and Nakano, S. : A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 24(8) : 881-886, 1992.
19. 内山秀一, 玉木哲朗, 中野昭一 : ラット骨格筋の絶対成長と体重を基準とした相対成長に関する研究, 日本生理誌56 : 7-16, 1994.