

〔原 著〕

ラット咀嚼筋の毛細血管網に関する研究

1. 幼若ラット咬筋の毛細血管網について

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)

Study of capillary networks in masticatory muscles in rats

1. Capillary network of masseter muscle in young rats

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 report investigates in relationship between the development of masseter muscle and capillary networks in young rats. Rats were fed pellets (from 4 to 10 weeks), and the wet weight of the masseter muscles in rats increased significantly with age (from 5 to 10 weeks). The fiber diameter of the muscles increased significantly from 5 to 7 weeks, and after 7 weeks the fiber diameter increased slowly. The C/F ratio also increased significantly from 5 to 7 weeks. There were no significant differences between the C/F ratio at 7 and 10 weeks.

These results indicate that the capillary networks of masseter muscle play an important role in the development of the masseter muscles in young rats.

Key words : masseter muscle, capillary network, ATP ase technique

緒 言

我々は前報¹⁴⁾において、幼若ラットの咬筋が発育にともなって著明な肥大を起こすことを明らかにした。骨格筋は発育あるいは適切な運動負荷によって肥大するが、同時に筋内の毛細血管網も発達することが四肢筋について知られている^{1),2),4),5),6),7),8),9),10)}。しかし、咬筋における毛細血管網が発育にともなってどのように変化するかについては、まだ詳細に検討されていない。

本論文では、咬筋の発育と毛細血管網の発達との関係を明らかにする目的で、5週齢から10週齢までのラットの咬筋について筋線維当たりの毛細血管数の変化を検討した。また、毛細血管の組織学的な同定法の一つである、ATPase染色法についても併せて検討した。

材料と方法

1. 材料

実験にはラット (Wistar, ♂, 三協ラボ) の咬筋を用いた。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10週齢まで飼育した。飼育期間中の飼料および水の摂取は自由にさせた。

なお、実験に用いたラット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。また、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。

2. 凍結切片の作製

ラットの腹腔内にsodium pentobarbital (50 mg/kg body weight) を投与し、麻酔した条件で速やかに両側の咬筋を摘出した。摘出した咬筋浅部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。

3. 筋線維あたりの毛細血管数 (capillary-to-fiber ratio; C/F ratio) の測定

切片の乾燥は、室温にて24~48時間行った。その後、ATPase染色法によって毛細血管を染色した。pH3.7から4.2の前処理液で5分間pre-incubationし、ATPase染色用の反応液 (ATPase 100mg, sodium barbital 8ml, 0.8 M CaCl_2 4ml, 蒸留水24ml, pH9.4) 中で 37°C 下で90分間incubationした。その後、黄色硫化アンモニウムによって発色させ、オイキットで封入した。顔面神経が横走している近傍の筋線維と毛細血管数を画像処理&解析システム (Quantimet 600, ライカ) を用いて計測し、C/F ratioを計算した。

結 果

1. 筋湿重量

筋湿重量と週齢の関係をFig.1に示す。咬筋湿重量は、5週齢で 630 ± 70 (mean \pm SD) mg, 6週齢で 890 ± 50 mg, 7週齢で 1080 ± 90 mg, 8週齢で 1210 ± 110 mg, 9週齢で 1390 ± 80 mg, および10週齢では 1520 ± 130 mgであった。

以上のように、咬筋湿重量は週齢とともに有意な増加を示し、10週齢の筋湿重量は5週齢の

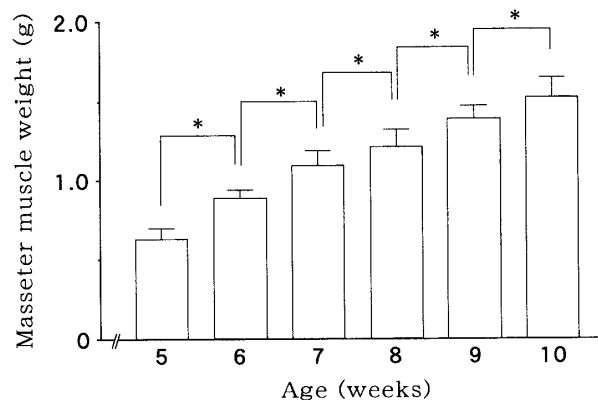


Fig. 1 Masseter muscle weight in rats of various ages. Each bar and its vertical line represent the mean and SD, respectively. * $P < 0.001$.

およそ2.5倍であった。この結果は、前報¹⁴⁾と同様であった。

2. 筋線維の直径

筋線維の直径と週齢の関係をFig.2に示す。筋線維の直径は、5週齢で 26.3 ± 2.7 (mean \pm SD) μm , 6週齢で $30.4 \pm 3.6 \mu\text{m}$, 7週齢で $36.3 \pm 4.2 \mu\text{m}$, 8週齢で $37.8 \pm 5.1 \mu\text{m}$, 9週齢で $38.7 \pm 5.4 \mu\text{m}$, および10週齢では $42.3 \pm 6.8 \mu\text{m}$ であった。

以上のように、筋線維の直径は週齢とともに有意に増大し、10週齢の筋線維の直径は5週齢のおよそ1.5倍であった。また、5週齢から7週齢の間で筋線維の直径の増大は顕著であったが、7週齢以降では緩徐であった。

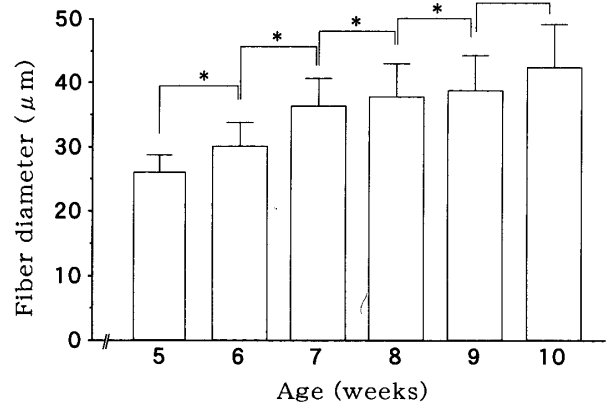


Fig. 2 Fiber diameter in masseter muscles in rats of various ages. Each bar and its vertical line represent the mean and SD, respectively. *P < 0.001.

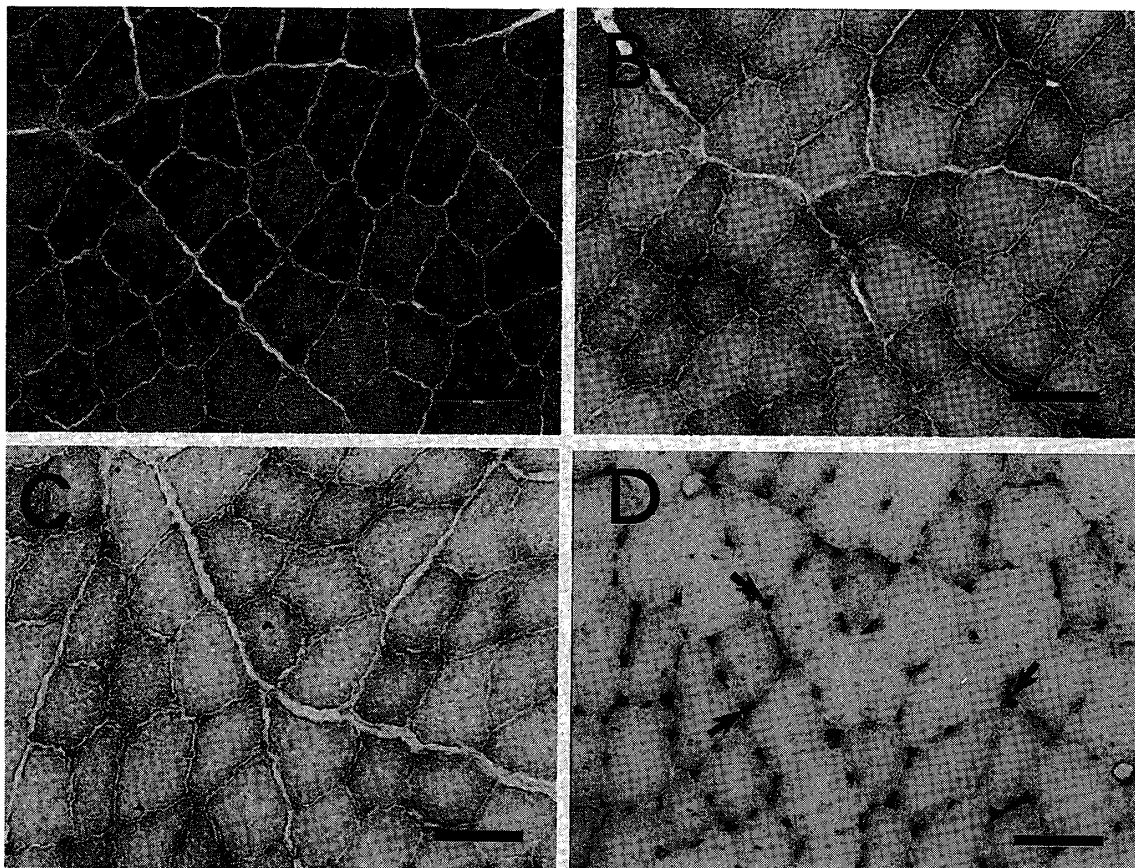


Fig. 3 Cross sections of masseter muscles stained with ATPase technique. Cross sections treated with pre-incubation medium at pH4.2 (A), pH4.0 (B) and pH3.7 (C), respectively. Also some cross sections treated with preincubation medium at pH3.7 after dry at a room temperature (20~25°C) for 24 to 48 hours (D). Capillaries are stained in black (arrows). These images were made using an Image Processing and Analysis System (Quantimet 600, Leica) connected to a personal computer. Bar : 50 μm .

3. 毛細血管数

種々の条件でATPase染色した咬筋の横断画像をFig.3に示す。Fig.3AからCは、従来の報告^{2),3)}に準じて切片をpH4.2(A), pH4.0(B), ならびにpH3.7(C)の前処理液にて処理した後、ATPase染色を行ったものである。いずれのpHによる前処理でも筋線維のATPase活性が十分に失活していないので、毛細血管と筋線維の識別が困難であった。一方、Fig.3Dは切片を48時間室温にて乾燥させ、上述のFig.3Cと同じpH3.7で前処理した後、ATPase染色を行ったものである。Fig.3より明らかなように、乾燥を室温にて十分に行った切片では、ほぼ完全に筋線維のATPase活性が失活しており、毛細血管のみを明確に同定することができた。なお、この方法で濃染した組織が毛細血管であることは染色部位を強拡大にし、管腔が存在すること、および管腔内に赤血球が存在することで確認した。C/F ratioは、単位面積 ($320\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$) あたりの筋線維数と毛細血管数から算出した。

咬筋のC/F ratioと週齢の関係をFig.4に示す。C/F ratioは、5週齢では 1.24 ± 0.05 (mean \pm SD), 6週齢では 1.57 ± 0.13 , 7週齢では 1.72 ± 0.12 , 8週齢では 1.71 ± 0.18 および10週齢では 1.73 ± 0.16 であった。

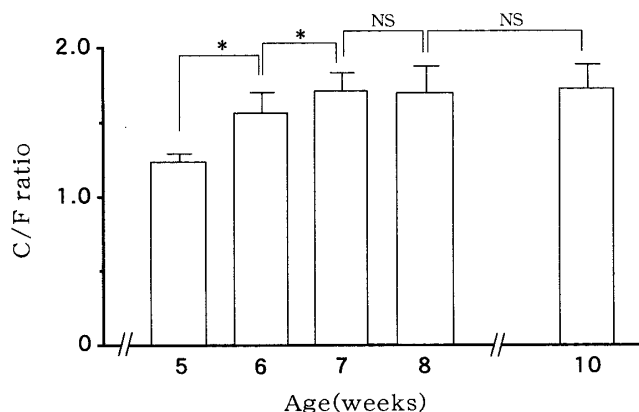


Fig. 4 Capillary-to-fiber ratio (C/F ratio) in masseter muscles in rats of various ages. Each bar and its vertical line represent the mean and SD, respectively. * $P < 0.001$.

以上のように、C/F ratioは5週齢から7週齢にかけて著明な増加を示したが、7週齢以降はほとんど変化がなかった。

考 察

一般に、筋肉内に分布する毛細血管は、成長期に著明に増加することが四肢筋について知られている。Sillau et al.は、成長期のラットのM. gastrocnemiusならびにM. tibialis anteriorにおけるC/F ratioが、週齢とともに著明に増大することを報告している^{2),3)}。また、Gute et al.は、骨格筋における毛細血管網の発達が運動の強度ならびに頻度に強く影響されることを明らかにした¹⁾。

本研究において、ラット咬筋の筋線維の直径は週齢とともに有意に増加し、特に5週齢から7週齢にかけての増加が顕著であった。同様に、C/F ratioの増大も5週齢と7週齢の間で著明であった。これらの結果は、ラットが3週齢で離乳した後、固型飼料を摂取することにより咀嚼運動時に咬筋に対する負荷が急激に増大したことを示す。さらに、咬筋における毛細血管網と筋線維の発育の間には密接な関係があること、ならびに毛細血管網が筋肉の発育に対して重要な役割を担っていることが示唆される。すなわち、筋肥大時における毛細血管網の発達は、代謝の亢進に伴って酸素や栄養素の需要量が増大するので、これらを供給するための現象であると考えられる。一方、筋湿重量の増加は実験期間中の全週齢を通じてほぼ一定であった。この筋湿重量の増加の程度、ならびに筋線維の直径とC/F ratioの増加の程度の間の相違は、筋肉の肥大に際して筋線維以外の間質成分、例えば血管網あるいは結合組織などの増加があることを示唆する。今後、この点は筋乾燥重量と湿重量の関係などを検討する必要がある。

生体内には、血管新生促進因子(VEGF, FGFなど)と抑制因子が存在しており、血管の新生

は促進因子が抑制因子を凌駕した時に惹起されると考えられている^{11),12),13)}。5週齢から7週齢の間における咬筋のC/F ratioの著明な増加時には、血管新生因子の発現量が増加していると考えられる。この問題については、現在実験を進めている。

次に、従来報告されているATPase染色による組織化学的な毛細血管の同定法は、咬筋については適切でないことが明らかにされた。すなわち、咬筋においては前処理液のpHは四肢筋におけるより、さらに低くpH3.7ないし3.8が適当であること、切片作製直後よりも24~48時間室温に放置し、十分に乾燥させた方がより毛細血管を明瞭に識別できることが明らかにされた。

結 論

成長期における咬筋の毛細血管網は、咬筋の発育とともに発達することが明らかにされた。毛細血管網は咬筋の発育に重要な役割を果たしていることが示唆された。咬筋の毛細血管の同定は従来のATPase染色法を改変することにより容易になった。

文 献

1. Gute D., Laughlin, M. H. and Amann, J. F. : Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of interval-sprint and low-intensity, endurance-trained rats. *Microcirculation*, 1(3) : 183-193, 1994.
2. Sillau, A. H. and Banchemo, N. : Effect of maturation on capillary density, fiber size and composition in rat skeletal muscle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 154 : 461-466, 1977.
3. Sillau, A. H. and Banchemo, N. : Skeletal muscle fiber size and capillary. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 158 : 288-291, 1978.
4. Grim, M., Mrazkova, O. and Carlson, B. M. : Enzymatic differentiation of arterial and Venous segments of the capillary bed during the development of free muscle grafts in the rat. *Am. J. Anat.*, 177 : 149-159, 1986.
5. Hansen-Smith, F. M., Hudlicka, O. and Egginton, S. : In vivo angiogenesis in adult rat skeletal muscle : early changes in capillary network architecture and ultrastructure. *Cell Tissue Res.*, 286 : 123-136, 1996.
6. Schmidt-Nielsen, K. and Pennycuik, P. : Capillary density in mammals in relation to body size and oxygen consumption. *Am. J. Physiol.*, 200(4) : 746-750, 1961.
7. Hudlicka, O., Brown, M. and Egginton, S. : Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol. Rev.*, 72(2) : 369-417, 1992.
8. Hargreaves, D., Egginton, S. and Hudlicka, O. : Changes in capillary perfusion induced by different patterns of activity in rat skeletal muscle. *Microvasc. Res.* 40 : 14-28, 1991.
9. Bigard, A. X., Brunet, A., Guezennec, C. Y. and Monod, H. : Effects of chronic hypoxia and endurance training on muscle capillarity in rats. *Pflügers Arch.* 419(3-4) : 225-229, 1991.
10. Dawson, J. M. and Hudlicka, O. : The effect of long-term activity on the microvasculature of rat glycolytic skeletal muscle. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, 8(1) : 53-69, 1989.
11. Annex, B. H., Torgan, C. E., Taylor, D. A., Thompson, M. A., Peters, K. G. and Kraus, W. E. : Induction and maintenance of increased VEGF protein by chronic motor nerve stimulation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 274 : H860-H867, 1998.
12. Hang, J., Kong, L., Gu, J. W. and Adair, T. H. : VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 269 : H1827-H1831, 1995.
13. Monacci, W. T., Merrill, and Oldfield, E. H. : Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am. J. Physiol.*, 264 : C995-C1002, 1993.
14. 太田 勲, 石井久淑, 山根美子, 猪股孝四郎, 山口明彦 : 幼若ラットの咬筋に対する粉末飼料の影響, 東日本歯学誌, 17 : 183-190, 1998.