

〔原 著〕

ラット咀嚼筋の毛細血管網に関する研究
2. 幼若ラット咬筋における血管新生誘導因子と
毛細血管網の発達の関係について

石井 久淑, 太田 勲, 田隈 泰信*, 広瀬 公治**, 猪股孝四郎

北海道医療大学歯学部口腔生理学講座

*北海道医療大学歯学部口腔生化学講座

**北海道医療大学歯学部口腔衛生学講座

(主任: 猪股孝四郎教授)

* (主任: 田隈 泰信教授)

** (主任: 上田 五男教授)

Studies of capillary networks in masticatory muscles in rats

2. Relationship between the vascular endothelial growth factor and development of capillary networks of the masseter muscle in young rats

Hisayoshi ISHII, Isao OOTA, Taishin TAKUMA*,
Kouji HIROSE** and Koshiro INOMATA

Department of Oral Physiology, *Department of Oral Biochemistry and **Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

(Chief: Prof. Koshiro INOMATA)

*(Chief: Prof. Taishin TAKUMA)

** (Chief: Prof. Itsuo UEDA)

Abstract

The relationship between the development of capillary networks and the amount of vascular endothelial growth factor (VEGF) of masseter muscles, and the influence of powder diet on these relationships were studied. The capillary-to-fiber ratio (C/F ratio) of the masseter muscle in the pelleted diet group increased significantly from 5 to 7 weeks. Similarly, the amount of VEGF in the masseter muscles increased significantly from 5 to 7 weeks. The C/F ratio and VEGF content of the powdered diet group were always lower than those of the pelleted diet group.

These results indicate that VEGF plays an important role in the development of capillary networks in the masseter muscle. It is also suggested that the masticatory load affects the

受付: 平成11年3月29日

development of capillary networks in masseter muscles.

Key words : VEGF, capillary network, masseter muscle, ELISA.

緒 言

前報¹⁾において、我々は通常の固型飼料で飼育した幼若ラットの咬筋の毛細血管網が、週齢とともに発達することを明らかにした。また、咬筋においても血管増生に対して血管新生誘導因子が関与している可能性があることを指摘した。

四肢筋における血管新生に関しては、血管内皮細胞に対するshear stressやwall tensionなどの物理的刺激が重要な制御要因として考えられている。近年、これらの要因と血管新生誘導因子との関係が次第に明らかにされている³⁻¹²⁾。しかし、咀嚼筋における毛細血管網の発達と血管新生誘導因子との関係は検討されていない。

本論文では、咀嚼筋における毛細血管網の発達と血管新生誘導因子の関係を明らかにする目的で、ラット咬筋におけるC/F ratioと血管新生誘導因子 (VEGF: vascular endothelial growth factor) の発現との関係について検討した。また、前報²⁾において、咬筋の発育は粉末飼料を摂取することにより遅延することを報告した。そこで、本論文では咬筋の毛細血管網の発達に対する粉末飼料の影響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4週齢まで飼育し、そのまま固型飼料を摂取させた群 (固型飼料群) と4週齢から粉末飼料 (飼育用粉末MF, オリエンタル酵母) を摂取させた群

(粉末飼料群) に分けて10週齢まで飼育した。本実験で用いた固型飼料および粉末飼料の組成、栄養価ならびに水分含量は等しく、形状のみが異なるものである。

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、飼育期間中は飼料および水は自由に摂取させた。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

麻酔したラットから両側の咬筋を摘出した。摘出した右側の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-502, 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。左側の咬筋は、 -80°C にて保存しVEGFの定量に用いた。

3. ATPase染色法

毛細血管の同定は、前報¹⁾の方法に準じてATPase染色法を用いた。すなわち、凍結切片は室温で24時間以上乾燥した後、pH3.7の前処理液で5分間反応させ、ATPase染色用の反応液 (ATPase 100mg, sodium barbital 8 ml, 0.8 M CaCl_2 4 ml, 蒸留水24ml, pH 9.4) 中にて 37°C 下で90分間incubationした。次いで、黄色硫化アンモニウムによって発色させ、脱水封入した。光学顕微鏡を用いて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) を用いて測定し、C/F ratioを求めた。

4. 免疫組織化学染色法 (ABC法)

切片は、 4°C のアセトン中にて5分間固定し

た後, Anti-VEGF antibody (P-20, Santa-cruz) $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む反応液中にて60分間incubationした。その後, ABC法(ABC Kit, Vectastain) に準じて処理し, ペルオキシダーゼ基質 (DAB基質キット, フナコシ)により発色させ, 脱水封入した。これらの反応は, すべて室温 ($20\sim 25^\circ\text{C}$)にて行った。なお, controlとしてはblocking peptide(P-20 P, Santacruz) $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む反応液によって処理した切片ならびに一次抗体を除いて染色した切片を用いた。作製した組織標本は, ATPase染色を施した組織標本と同様の部位について光学顕微鏡を用いて観察した。

5. 咬筋におけるVEGFの定量

咬筋の小組織片はプロテアーゼ阻害剤の

Pefabloc SC (0.1mM , Merck)を含むPBSでホモジネート ($100\text{mg}/\text{ml}$)した後, 5000rpm にて10分間の遠心分離を行い上清を得た。この上清中のVEGFの発現量をELISA Kit (Quantikine M, R&D)を用いて測定した。

結 果

1. 毛細血管網の変化

ATPase染色した咬筋の横断面像をFig. 1に示す。固型飼料群ならびに粉末飼料群ともに, 筋線維の周囲に茶褐色に濃染する毛細血管が認められた。しかし, 粉末飼料群における筋線維のATPase活性は, 固型飼料群に比較して低い傾向が認められた。これらの組織標本について, 顔面神経が横走している近傍に存在する筋線維

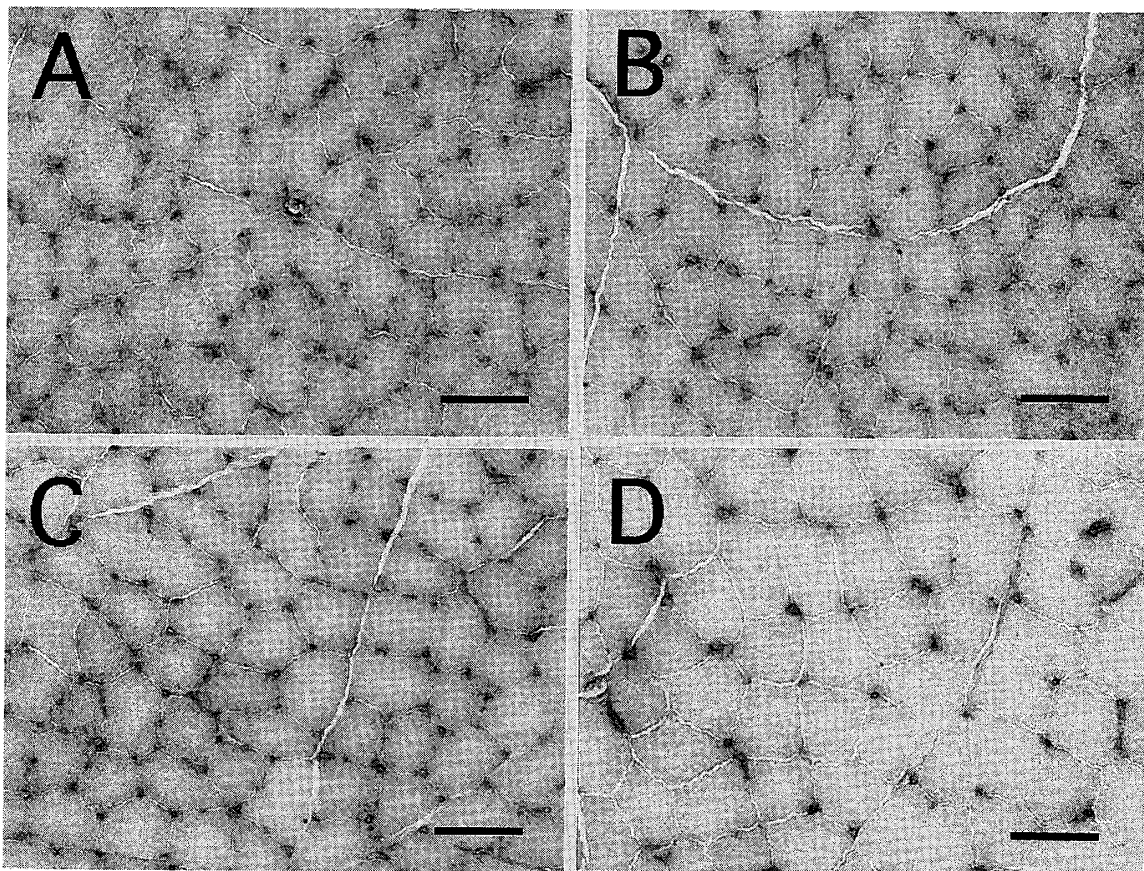


Fig. 1 Capillaries of the masseter muscles identified with ATPase activity. The sections were prepared from 5 (A, B) and 7 (C, D) week old rats fed either pelleted (A, C) or powdered (B, D) diet. These images were made with an Image Processing and Analysis System (Quantimet 600, Leica) connected to a personal computer. Bar: $50 \mu\text{m}$.

の数と毛細血管数を測定し、C/F ratioを求めた。

固型飼料群のC/F ratioは、5週齢では 1.24 ± 0.02 (mean \pm SE), 6週齢では 1.57 ± 0.03 , 7週齢では 1.72 ± 0.03 , 8週齢では 1.71 ± 0.04 , 9週齢では 1.72 ± 0.03 , 10週齢では 1.73 ± 0.04 であった。C/F ratioは、5週齢と7週齢の間で著明な増加を示したが、7週齢以降はほとんど変化が認められなかった。一方、粉末飼料群におけるC/F ratioは、5週齢では 1.11 ± 0.07 (mean \pm SE), 6週齢では 1.13 ± 0.03 , 7週齢で 1.31 ± 0.04 , 8週齢では 1.22 ± 0.04 , 9週齢では 1.24 ± 0.03 , 10週齢では 1.25 ± 0.03 であった。粉末飼料群のC/F ratioは5週齢から10

週齢の間でほとんど変化が認められず、固型飼料群に対して有意に低い値を示した (Fig. 2)。

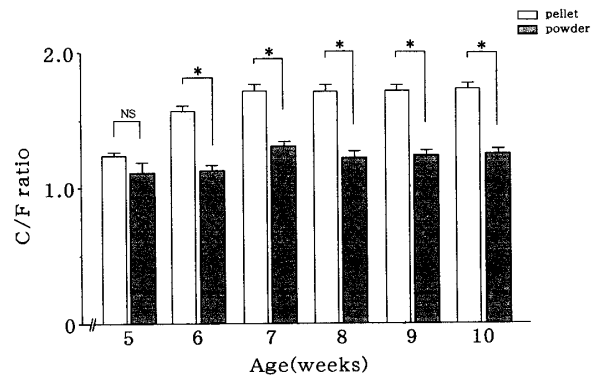


Fig. 2 Capillary-to-fiber ratios (C/F ratio) in masseter muscles of rats fed either pelleted or powdered diet. Bars and vertical lines represent the mean \pm SE. *P < 0.05.

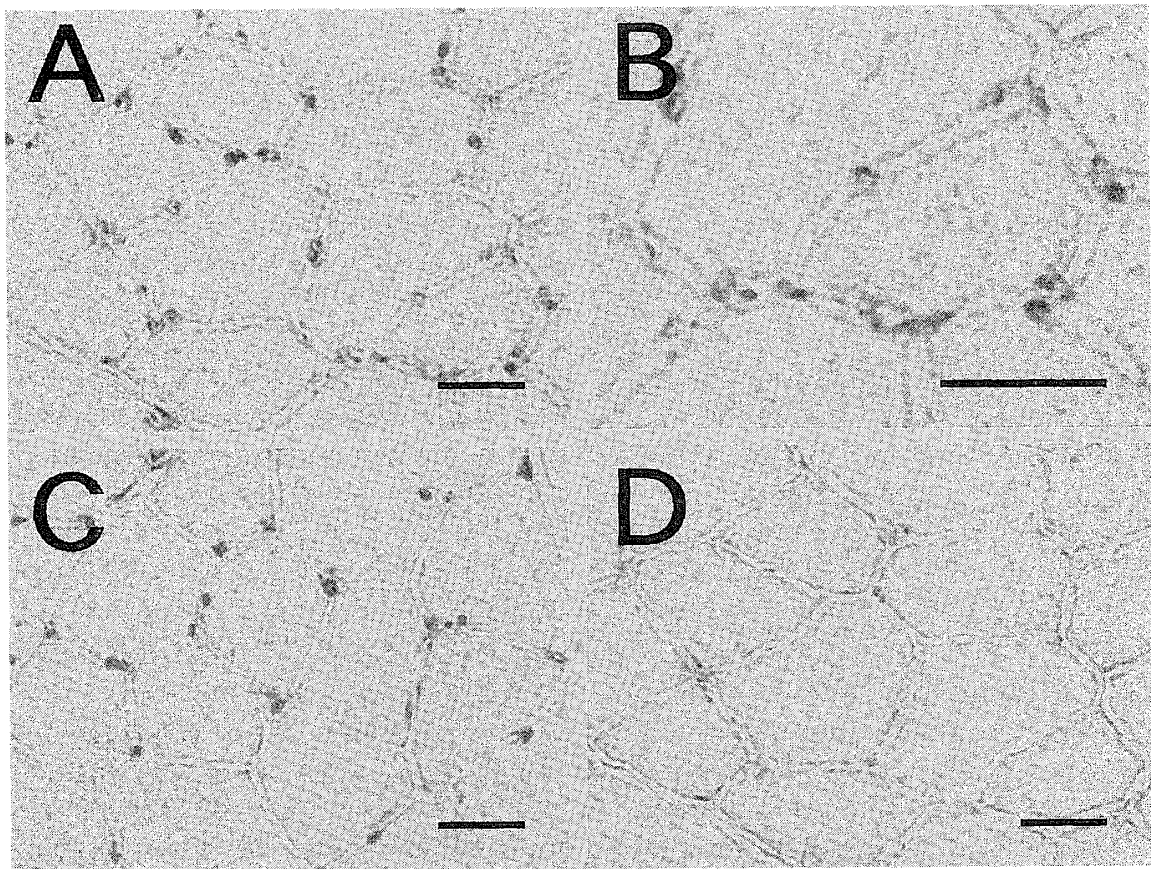


Fig. 3 Cross sections of the masseter muscles immunostained with anti-VEGF antibody. A : section prepared from a rat fed pelleted diet and stained with anti-VEGF antibody ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$). B : magnification of an area in A. C : section prepared from a rat fed powdered diet and stained with anti-VEGF antibody ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$). D : section prepared from a rat fed pelleted diet and preabsorbed with the VEGF blocking peptide ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$). These images were made with an Image Processing and Analysis System (Quantimet 600, Leica) connected to a personal computer. Bar : $25 \mu\text{m}$.

2. 咬筋におけるVEGFの変化

免疫組織化学染色における咬筋の横断面像をFig. 3に示す。Figs. 3A, Cは、固型飼料群ならびに粉末飼料群の咬筋において、それぞれAnti-VEGF antibody (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で反応を行ったものである。Fig. 3BはAの一部を拡大したものであり、Fig. 3Dはblocking peptide (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えて処理した固型飼料群の咬筋の切片である。固型飼料群および粉末飼料群の咬筋においては、血管内皮細胞ならびに筋線維束間にVEGFの陽性像が認められた (Fig. 3A-C)。一方、blocking peptideを加えて反応を行ったFig. 3Dにおいては、陽性像が認められなかった。また、一次抗体を除いて処理した切片においても陽性像は認められなかった。

咬筋におけるVEGFの発現量と週齢の関係をFig. 4に示す。7週齢における固型飼料群のVEGFの発現量は 14.1 ± 1.0 (mean \pm SE) pg/mg proteinであり、全実験群中で最も高い値を示した。同週齢における粉末飼料群のVEGFの発現量は 8.9 ± 0.6 pg/mg proteinであり、固型飼料群に比較して有意に低い値を示した。また、固型飼料群ならびに粉末飼料群のそれぞれのVEGFの発現量は、5週齢では 10.9 ± 0.9 および 9.86 ± 0.6 pg/mg protein, 6週齢では 11.3 ± 0.8 および 10.3 ± 0.5 pg/mg protein, 8週齢では 9.1 ± 1.5 および 9.2 ± 0.9 pg/mg proteinであり、5週齢お

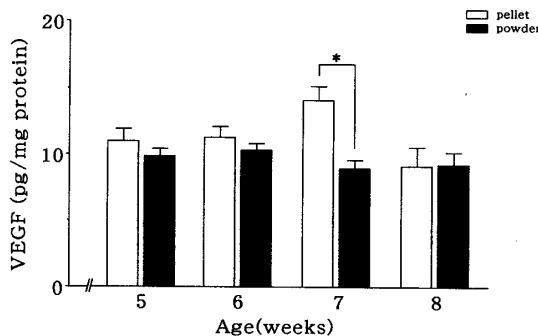


Fig. 4 Amount of VEGF in masseter muscles measured by ELISA. Bars and vertical lines represent the mean \pm SE. *P < 0.05.

よび6週齢における固型飼料群のVEGFの発現量は、粉末飼料群に対して高い傾向を示した。8週齢においては、固型飼料群ならびに粉末飼料群のVEGFの発現量はほぼ等しい値を示した。

考 察

血管新生は、誘導因子 (正の調節因子) と抑制因子 (負の調節因子) とのバランスによって調節されており、血管新生が起こるためには誘導因子の活性が抑制因子を凌駕しなければならないことが知られている¹³⁾。VEGFは、血管内皮細胞に特異的に作用する血管新生誘導因子であることが知られており、その受容体系はFlt-1, KDR/Flk-1の2種類が現在明らかにされている^{13),17)}。これらのVEGF受容体は特異的に血管内皮細胞に発現していることから、VEGFの作用機序は傍分泌 (paracrine) が基本と考えられている¹³⁾。VEGFの生体内における役割は、主として血管内皮細胞の増殖と透過性の亢進であることが知られている¹³⁾。さらに、VEGFは正常な循環系や組織形成に関与するものばかりでなく、炎症、糖尿病性網膜症、固形腫瘍の増殖時における腫瘍血管などの病的血管新生においても深く関係していることが知られている^{13),18),19)}。これらのことから、VEGFは血管新生の調節系において中心的な役割を担っていると考えられている¹³⁾。

本研究における免疫組織化学染色により、VEGFはラットの咬筋において血管内皮細胞および筋線維束間に存在が認められた。VEGF抗体の特異性は、blocking peptideによりほぼ完全に陽性反応が消失することで確かめられた。また、一次抗体を含まない反応液においてもVEGFの陽性反応が認められないことから、内因性のペルオキシダーゼによる反応でないことも明らかである。ELISAで測定した結果、固型飼料群のVEGFは、5週齢と7週齢の間で有意

に増加した。また、固型飼料群の毛細血管数は、前報¹⁾の報告と同様に5週齢から7週齢の間で著明に増加した。これに対して、粉末飼料群における毛細血管数ならびにVEGFの発現量は、全週齢を通じてほとんど変化が認められず、いずれの週齢においても固型飼料群に比較して低い値を示した。これらの結果は、VEGFが咬筋における毛細血管網の発達に密接に関与していることを示している。

血管新生を制御する要因は、局所的な低酸素状態、サイトカインあるいはホルモンなどの化学的要因と血管内皮細胞における血流に起因するshear stressやwall tensionなどの物理的要因の2種類が考えられている^{3),4),13),14),15),16)}。四肢筋においては、運動負荷や電気刺激による筋活動の増強がVEGFを増加させることが知られている³⁻¹²⁾。すなわち、HangらはM. anterior tibialisとM. extensor digitorum longusにおける電気刺激によって生ずる受動的な筋活動が、これらの筋肉におけるVEGFの発現量を増加させることを報告している¹⁰⁾。Annexらは、ウサギの四肢筋におけるCMNS (chronic motor nerve stimulation) モデル実験によって、VEGFの発現量が増加することを明らかにするとともに、免疫組織化学染色によってVEGFが血管内皮細胞ならびに筋線維束間における間質系細胞に発現していることを示しており、VEGFが骨格筋における血管密度の調節と維持に深く関わっていることを示唆している¹²⁾。

これらを考慮すると、咬筋の発育にともなう生ずる血管増生は、栄養素や酸素消費量の増加による局所的な低酸素状態あるいは代謝産物の増加にともなう局所環境の変化が、VEGFの発現を促し血管新生を惹起した結果と考えられる。また、上述のように咬筋におけるVEGFは血管内皮細胞ならびに筋線維束間に存在が認められた。これらの所見はAnnexらの報告に近似しており、咬筋における血管新生においてもpara-

crineによるVEGFの作用機序が主体を成していることが示唆される。

ラット咀嚼筋においては、授乳期における吸啜運動から離乳後の咀嚼運動を主体とする顎運動様式の変化は、広義の意味で筋肉の発育を促すトレーニングと考えられている¹⁹⁾。従来から咀嚼筋の活動を制御する手段として固型飼料を粉末飼料に換えて飼育する方法が用いられている^{21),22),23)}。太田らは、幼若ラットの咬筋に対する粉末飼料の影響を長期間にわたって検討し、幼若期における咀嚼負荷が咬筋の発育に対して重要であることを述べている²⁾。本研究において、粉末飼料を摂取したラットの咬筋においては、固型飼料群に比較して毛細血管数ならびにVEGFの発現量がともに低い値を示した。このことは、咀嚼負荷が咬筋における毛細血管網の発達に対して重要な因子の一つであることを示唆している。

なお、本研究におけるVEGFの定量は、PBSによるホモジネート (100mg/ml) から遠心分離により得られた上清を用いた。しかし、VEGFはヘパリンに対して強い親和性を有していることから、ヘパリン様の構造物に結合しているVEGFの抽出法については今後検討する必要がある。

結 論

固型飼料群の咬筋におけるC/F ratioならびにVEGFは、5週齢と7週齢の間で有意な増加を示した。一方、粉末飼料群の咬筋におけるC/F ratioならびにVEGFは、固型飼料群に比較して低い値であった。

以上の結果から、VEGFと咬筋の毛細血管網の発達は密接な関係があることが示唆された。また、咀嚼負荷は咬筋の毛細血管網の発達に対して重要な因子の一つであることが明らかにされた。

文 献

1. 石井久淑, 太田 勲, 山根美子, 猪股孝四郎: 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, 東日本歯誌, **17**(2): 199-204, 1998.
2. 太田 勲, 石井久淑, 山根美子, 猪股孝四郎, 山口昭彦: 幼若ラットの咬筋に対する粉末飼料の影響, 東日本歯誌, **17**(2): 183-190, 1998.
3. Zhou, A.-L., Egginton, S., Brown, M. D., and Hudlicka, O.: Capillary growth in overloaded, hypertrophic adult rat skeletal muscle: An ultrastructural study. *Anat. Rec.*, **252**: 49-63, 1998.
4. Egginton, S., Hudlicka, O., Brown, M.D., Walter, H., Weiss, J.B., and Bate, A.: Capillary growth in relation to blood flow and performance in overloaded rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, **85**(6): 2025-2032, 1998.
5. Roca, J., Gavin, T.P., Jordan, M., Siafakas, N., Wagner, H., Benoit, H., Breen, E., and Wagner, P. D.: Angiogenic growth factor mRNA responses to passive and contraction-induced hyperperfusion in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, **85**(3): 1142-1149, 1998.
6. Plyley, M. J., Olmstead, B. J., and Noble, E. G.: Time course of changes in capillarization in hypertrophied rat plantaris muscle. *J. Appl. Physiol.*, **84**(3): 902-907, 1998.
7. Monacci, W.T., Merrill, M.J., and Oldfield, E. H.: Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am. J. Physiol.*, **264**: C995-C1002, 1993.
8. Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney, M., Walsh, K., and Isner, J.M.: Constitutive expression of phVEGF₁₆₅ after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, **97**: 1114-1123, 1998.
9. Gute, D., Fraga, C., Laughlin, M.H., and Amann, J.F.: Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of high-intensity endurance-trained rats. *J. Appl. Physiol.*, **81**(2): 619-626, 1996.
10. 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**: H1827-1831, 1995.
11. Breen, E.C., Johnson, E.C., Wagner, H., Tseng, H.-M., Sung, L.A., and Wagner, P.D.: Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *J. Appl. Physiol.*, **81**(1): 355-361, 1996.
12. Annex, B.H., Torgan, C.E., Lin, P., 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.
13. 渋谷正史: 血管新生の分子機構—「血管系の分子生物学」の新たな展開へ向けて—, 細胞工学, **16**(7), 秀潤社, 1997, 944-948.
14. Zhang, Q.-X., Magovern, C.J., Mack, C.A., Budenbender, K.T., Ko, W., and Rosengart, T.K.: Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum. *J. Surg. Res.*, **67**: 147-154, 1997.
15. Fan, L., and Iseki, S.: Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the endocrine glands of the rat. *Arch. Histol. Cytol.*, **61**: 17-28, 1998.
16. Taichman, N.S., Cruchley, A.T., Fletcher, L.M., Hagi-Pavli, E.P., Paleolog, E.M., Abrams, W.R., Booth, V., Edwards, R.M., and Malamud, D.: Vascular endothelial growth factor in normal human salivary glands and saliva: A possible role in the maintenance of mucosal homeostasis. *Lab. Invest.*, **78**(7): 869-875, 1998.
17. Roeckl, W., Hecht, D., Sztajer, H., Waltenberger, J., Yayon, A., and Weich, H.A.: Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Exp. Cell. Res.*, **241**: 161-170, 1998.
18. Hammes, H.-P., Lin, J., Bretzel, R.G., Brownlee, M., and Breier, G.: Upregulation of the vascular endothelial growth factor/Vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes*, **47**: 401-406, 1998.
19. Auvinen, M., Laine, A., Paasinen-Sohns, A., Kangas, A., Kangas, L., Saksela, O., Andersson, L.C., and Hölttä, E.: Human ornithine

- decarboxylase-overproducing NIH3T3 cells induce rapidly growing, highly vascularized tumors in nude mice. *Cancer. Res.*, **57**:3016-3025, 1997.
20. 前田憲彦, 久米川正好: 咀嚼器官および消化器官の生後発達とその制御要因について, *歯基礎誌*, **26**: 993-1011, 1984.
21. Maeda, N., Kawasaki, T., Osawa, K, Yamamoto, Y., Sumida, H., Masuda, T., and Kumegawa, M.: Effects of long-term intake of a fine-grained diet on the mouse masseter muscle. *Acta. anat.*, **128**: 326-333, 1987.
22. 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.
23. Kiliaridis, S., Engström, C., and Thilander, B.: Histochemical analysis of masticatory muscle in the growing rat after prolonged alteration in the consistency of the diet. *Archs. Oral Biol.*, **33**(3): 187-193, 1988.