

白血病モデルラットのヒラメ筋における 形態学および組織化学的变化

増田彩香・村田千晶

要旨

本研究では、白血病モデルラットを作成し、白血病が骨格筋にもたらす影響について形態学および組織化学的に検討した。実験動物には8週齢のWistar系雄性ラットを用い、1)対照群(n=10)、2)N-ニトロソ-Nメチル尿素投与により白血病を惹起させる実験群(n=17)に振り分けた。そして、実験開始から168日後、実験群のラットを明らかに白血病の発症が認められるSevere群(n=5)、発症前発症初期であると判断されるMild群(n=9)に分別し、ヒラメ筋を採取して解析を行った。結果、Mild群、Severe群において筋線維壊死が認められたが、統計学的には対照群との有意差は認められなかった。次に、筋線維直径を測定したところ、Mild群、Severe群の筋線維直径は対照群に比べ有意に低値を示し、その萎縮率はタイプII線維が著明であった。また、ミトコンドリア活性および毛細血管数を測定すると、対照群に比べSevere群のみが低値を示し、対照群とMild群の間に有意差は認められなかった。以上のように、白血病モデルラットの骨格筋では、他の固形がんと同様にがん悪液質の影響による筋萎縮が観察され、白血病の病態の進行とともにミトコンドリア機能異常や末梢循環の低下が加わっていくと推察された。

はじめに

近年、がん患者の増加とともに、がんに対するリハビリテーションも盛んに行われるようになってきた。その内容としては、がん患者では高頻度で筋力低下がみられることから¹⁾、筋力トレーニングが主体となっている。がん患者に対する筋力トレーニングの介入効果は多くの研究で確認されており、既にシステムティックレビューによるエビデンス構築も進められつつある^{2,3)}。しかしながら、これまでの研究における対象者は術後の患者または症状が軽度な患者であることが多く、病状が進行して筋萎縮が激しい患者でのエビデンスは得られていない⁴⁾。がん患者の筋力低下は予後や生活の質(Quality of Life: QOL)に直接的に影響すると報告されているため⁵⁾、病態が進行したがん患者にも効果的な筋力トレーニングを提供することは最大の課題であり、それを解決すべく、がん患者の骨格筋の病態を解明することを目的とした基礎研究・臨床研究が積極的に進められている。

がん患者の筋力低下には、倦怠感や抑うつな

どの精神症状、抗がん剤の副作用による末梢神経障害などが関与することもあるが⁶⁾、主には廃用性筋萎縮とがん悪液質の影響が大きいといわれている^{7,8)}。特に、がん悪液質は、進行性の異化亢進に伴う著しい筋組織の減少と全身機能の低下を呈するため、リハビリテーションを進める上で大きな問題となる。すなわち、がん悪液質の影響が大きくなると、異化亢進が筋力トレーニングによる筋タンパク質の合成促進作用を打ち消してしまうため、筋肥大または筋力増強の効果は得られにくくなる⁷⁾。また、がん患者の筋力低下の原因は筋萎縮だけではなく、代謝異常による筋収縮不全の影響も大きいとされている。Robertら⁹⁾は、大腸がんモデルラットの白筋である長趾伸筋(以下、EDL)と赤筋であるヒラメ筋(以下、SOL)を採取し、筋萎縮と筋出力の関係を解析した結果、筋萎縮の程度は長趾伸筋に比べヒラメ筋が軽度であるにもかかわらず、両筋には同程度の筋出力の低下が認められたとされている。この結果は筋萎縮だけでは説明できず、筋収縮機能に何らかの問題があることを示唆している。また、Tothら¹⁾は、がん患者の骨格筋の筋収縮

機能を解析した結果、ミトコンドリア面積の縮小が認められ、ミトコンドリア面積と筋の収縮速度は負の相関関係にあることを報告している。つまり、がん患者の骨格筋においては、エネルギー生産・供給の低下といった代謝機能の異常が引き起こされることによって筋収縮機能が低下し、筋力低下の原因になっていると考えられる。

しかしながら、これまでの先行研究のほとんどは固形がんを対象としたものであり、白血病を代表とする血液がんについては不明な点が多く見受けられる。例えば、Laviano ら¹⁰⁾は、血液がん患者の55%に悪液質の影響がみられると報告しているが、これに対してToth ら¹¹⁾は血液がん患者において悪液質の影響がみられるのはわずか15%であると報告しており、血液がんの悪液質の頻度や影響については統一した見解が得られていない。また、血液がんのモデル動物を用いた基礎研究は極めて少なく、血液がんでも固形がんと同様ながん悪液質の影響が見られるのか、それとも異なるのか不明である。

そこで本研究では、血液がんの骨格筋の特徴を捉えることを目的とし、白血病モデルラットの骨格筋を形態学および組織化学的手法を用いて解析した。

材料と方法

1. 実験動物

実験動物には8週齢のWistar系雄性ラット27匹を用い、これらを実験群として1)N-ニトロソ-Nメチル尿素(以下、NMU)を投与し、白血病を惹起させる群(以下、実験群;n=17)、2)白血病の疑似処置として生理食塩水を投与する群(以下、対照群;n=10)の2群に振り分けた。なお、今回の実験は長崎大学が定める動物実験指針に準じ、長崎大学先端生命科学支援センター動物実験施設で実施した。

2. 白血病モデルラットの作成方法

白血病モデルラットの作成としては、Tsai ら⁹⁾の方法を参考にし、実験群の各ラットにNMU(35mg/kg)を隔週、6回静脈投与した。対照群に対しては疑似処置として上記と同様の方法で生理食塩水を静脈投与し、すべてのラットに餌と水



図1 白血病を発症したラット

白血病を発症し病態が進行するとリンパ節の腫脹が認められる(Severe群)。

を自由に与えた。先行研究¹²⁻¹⁴⁾の結果を参考にすると、本モデルはNMU投与から約100日後で発症し、150日後付近から症状が悪化、死亡していくと予想される。そこで、今回は実験期間を168日間とし、NMU投与前および投与後140日、154日、168日に採液と体重測定を行った。また、本モデルでは白血病発症の時期に個体差があることを考慮し、リンパ節の腫脹が肉眼的に確認でき白血病が確実に発症していると判断されるラットをSevere群(図1)¹³⁾、また、リンパ節の腫脹は認められず発症前または発症初期と思われるラットをMild群に分別し、以下の解析を進めることとした。

3. 解析方法

1) 血液学的解析

NMU投与前および投与後140日、154日、168日に採血(抗凝固剤添加)し、チュルク液を添加して赤血球のみを破壊した後、ビルケルチュルク式血球計算盤と顕微鏡を用いて白血球をカウントした。また、NMU投与後168日の血液は、遠心分離(1500ppm, 10分)して血漿とし、ELIZAキット(R&D社製, RTA00)を用いて腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor- α : 以下、TNF- α)の含有量を計測した。

2) 筋湿重量

実験終了後は、三種混合麻酔(8.0mg/kg)による麻酔下でヒラメ筋を摘出し、筋湿重量を計測した。その後、筋試料はトラントガムに包埋し、液体窒素で冷却したイソペンタン液内(-80°C)で急速凍結した。そして、クリオスタット(Leica社製)を用いて連続横断切片(10 μ m)を作製し、組織学的・組織化学的検索に供した。

3) 組織学的検索

連続横断切片には、ヘマトキシリン・エオジン(以下、H&E)染色を施し、筋線維壊死などの筋病理学的所見の有無を確認した。また、定量解析として、全視野における壊死線維数をカウントし、Nakanoら¹⁵⁾の筋病理スケールを用いて評価した。

4) 組織化学的検索

筋線維タイプを分別するため連続横断切片にミオシン ATPase 染色(pH11.0)を施し、筋線維タイプの分別を行った。そして、顕微鏡用デジタルカメラで全視野を撮影(100倍)した後、画像解析ソフト(Image J)を用いてタイプ I, II 線維の筋線維直径を1筋あたり各々100本計測した。また、ミトコンドリア活性の解析として、コハク酸脱水素酵素(Succinate dehydrogenase: 以下、SDH)染色を行った。SDH染色はその染色強度(濃度)がミトコンドリア活性を反映するとされている¹⁶⁾。定量解析としては、1筋あたり5視野を無作為に撮影(100倍)した後、画像解析ソフト(Image J)を用いてグレースケール化し、画像内に含まれる全筋線維の染色強度を測定した。さらに、毛細血管を可視化するためにアルカリフォスタフェーゼ染色を行い、1筋あたり5視野を無作為に撮影(100倍)した後、画像内に含まれる全ての毛細血管と筋線維をカウントし、1筋線維あたりの毛細血管数を算出した。

4. 統計学的処理

統計学的処置としては、一元配置分散分析(以下、ANOVA)またはカイ二乗検定を適用し、3群間での有意差を判定した。そして、ANOVAにて有意差を認めた場合は、事後検定としてFisherのPLSD法を適用し、2群間の比較を行った。なお、すべての統計手法とも有意水準は5%未満とした。

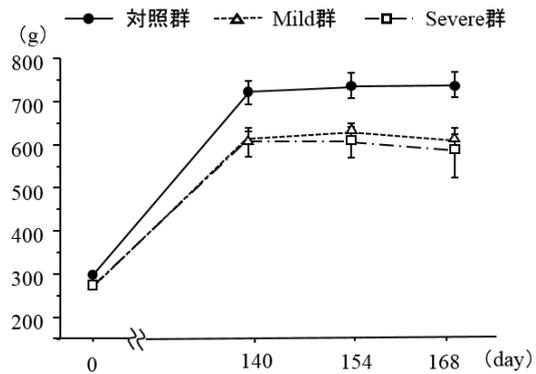


図2 体重の変化

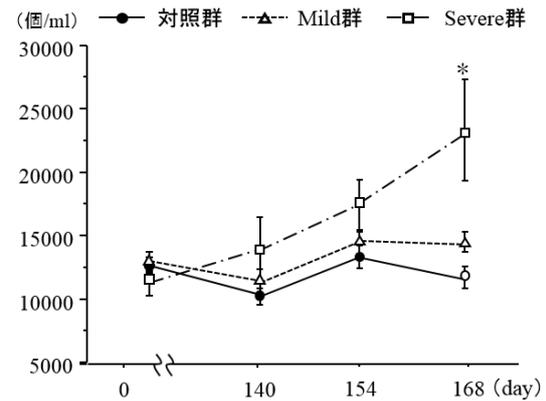


図3 白血球数の変化

*: 対照群との有意差(p<0.05)

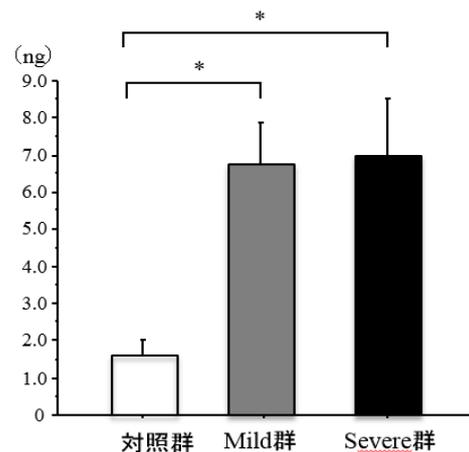


図4 血漿中 TNF- α 含有量

*: 対照群との有意差(p<0.05)

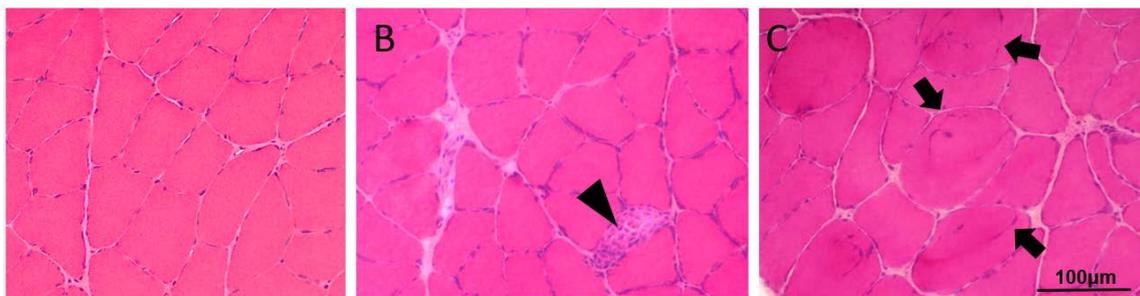


図5 H&E 染色像

A: 対照群, B および C: Severe 群. Mild 群, Severe 群では壊死線維(矢頭)や Fiber Splitting 現象(矢印)が認められる.

結果

1. 体重, 白血球数, TNF- α の変化

実験期間終了後, リンパ節の腫脹の有無により白血球の進行を判定した結果, Mild 群に 9 匹, Severe 群に 5 匹が該当した. 実験期間中に実験群のうち 3 匹が病変により死亡した.

次に, 各群の体重の変化を見ると NMU 投与後 140, 154, 168 日目において, 対照群と比べ Mild 群, Severe 群はともに低値を示したが有意差は認めなかった(図 2). 白血球数は, NMU 投与後 140, 154 日目までは対照群, Mild 群, Severe 群の 3 群間に有意差は認めなかったが, 168 日目において, 対照群に比べ Severe 群が有意に高値を示した(図 3). 実験期間終了時における血漿中の TNF- α は, 対照群(1.60 \pm 1.35 ng/ml)に比べ Mild 群(6.92 \pm 3.68 ng/ml), Severe 群(7.0 \pm 3.39 ng/ml)はともに有意に高値を示したが, Mild 群と Severe 群の 2 群間に有意差は認めなかった(図 4).

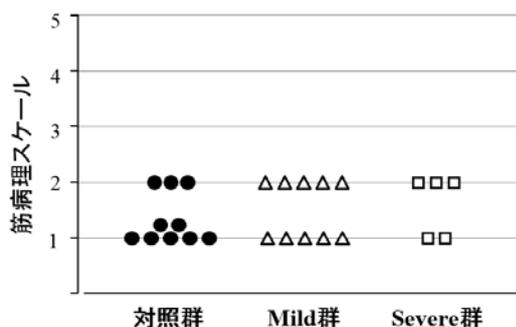


図6 筋線維壊死の出現頻度

筋線維 500 本あたりの壊死線維数: Scale1, 0 本; 2, 1~5 本, 3, 6~10 本, 4, 11~20 本, 5, 21 本以上.

2. 筋湿重量

ヒラメ筋の筋湿重量は, 対照群(274.9 \pm 32.2 mg)と比較して Mild 群(229.6 \pm 23.4 mg), Severe 群(190.1 \pm 58.5 mg)はともに有意に低値を示したが, Mild 群と Severe 群の 2 群間に有意差は認めなかった.

3. 筋病理所見

H&E 染色像を鏡した結果, Mild 群, Severe



図7 ミオシン ATPase 染色像(pH11.0)

A: 対照群, B: Mild 群, C: Severe 群. アルカリ性前処置による染色では, 白く染まるのがタイプ I 線維 (I), 黒く染まるのがタイプ II 線維(II)である. Mild 群, Severe 群では筋萎縮が見受けられる.

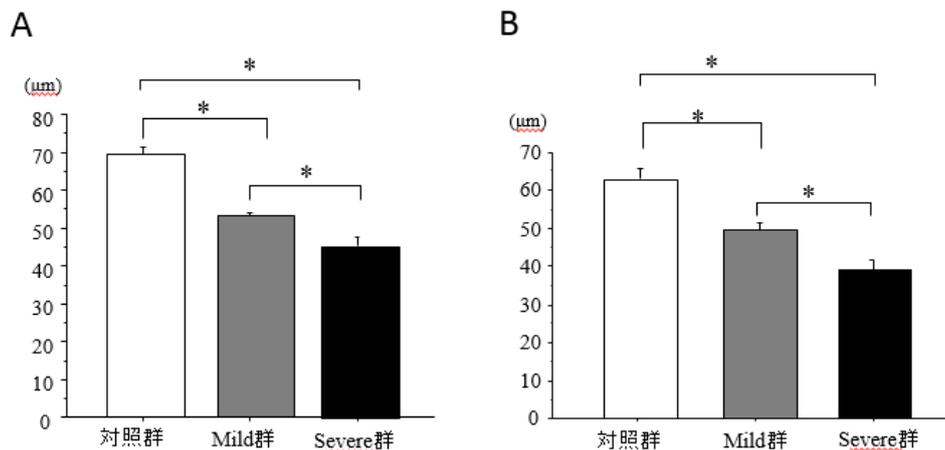


図8 筋線維直径

A:タイプ I 線維, B:タイプ II 線維. *:対照群との有意差(p<0.05)

群に壊死線維が若干認められた(図 5). しかし, 壊死線維数を病理スケールにあてはめて統計学的に比較すると, 3 群間に有意差は認められなかった(図 6). また, 筋線維の壊死と再生が繰り返し起きた時に出現する Fiber Spritting 現象も観察されたが, その出現頻度は少なかった(図 5).

4. 筋線維直径

ヒラメ筋の筋線維直径を比較すると, タイプ I 線維では対照群と比較して Mild 群, Severe 群が有意に低値を示し, また, Mild 群と Severe 群を比較すると Severe 群の方が有意に低値を示し, 対照群に対する萎縮率は Mild 群, Severe 群それぞれ 24.0%, 30.1%であった. タイプ II 線維でも同様な傾向が認められ, Mild 群, Severe 群がそれぞれ 26.2%, 35.8%の萎縮率を示した(図 7, 8).

5. ミトコンドリア活性

SDH 染色像(図 9)を定量解析した結果, ヒラメ筋のミトコンドリア活性は, 対照群(57.42±6.05)と Mild 群(52.72±6.25)との間に有意差は認めなかった. しかし, 対照群と比較して Severe 群(50.32±5.43)は有意な低値を示した(図 10).

6. 毛細血管数

ヒラメ筋の一筋線維あたりの毛細血管数は Severe 群が最も低値を示し, 対照群と Severe 群

および Mild 群と Severe 群間に有意差が認められた. しかし, 対照群と Mild 群間に有意差は認めなかった(図 11, 12).

考察

本研究では, 白血病モデルラットを用い, 白血病により生じるヒラメ筋の変化を, 形態学および組織化学的に検討した. その結果, Mild 群, Severe 群ともに若干の筋病理学的所見は認められたものの, 正常を逸脱しているとは言えない程度であった. 白血病では白血病細胞と呼ばれる腫瘍化した造血幹細胞が血液に遊出し¹⁷⁾, 全身を循環するという固形がんとは異なった特徴を持つが, 今回の結果から考えると, 白血病細胞が筋組織に直接作用するようなことは起きていないと思われる. しかし, Mild 群, Severe 群のヒラメ筋には全体的に筋萎縮が認められ, 白血病発症による何らかの影響を受けていることは間違いない. これらの変化がどのような影響により生じたかを考えると, 要因としては廃用性筋萎縮とがん悪液質があげられる. Desplanchessら¹⁸⁾の報告によれば, 5 週間の廃用性筋萎縮モデルラットのヒラメ筋における筋線維断面積を Type 別に検討した結

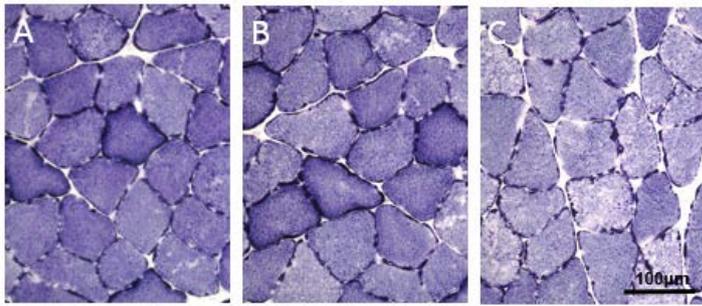


図 9 SDH 染色像

A: 対照群, B: Mild 群, C: Severe 群. Severe 群では筋線維が薄く染色されていることから, ミトコンドリア活性が低いといえる.

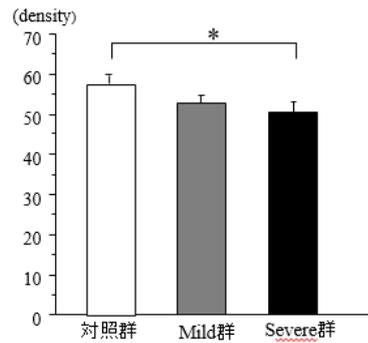


図 10 ミトコンドリア活性

*: 対照群との有意差 ($p < 0.05$)

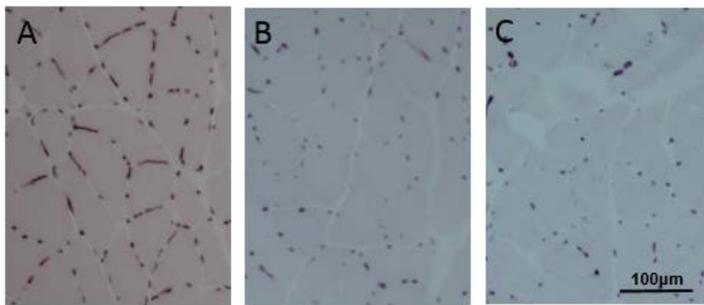


図 11 アルカリフォスタファターゼ染色像

A: 対照群, B: Mild 群, C: Severe 群. 筋線維の周囲に見える黒点が毛細血管である.

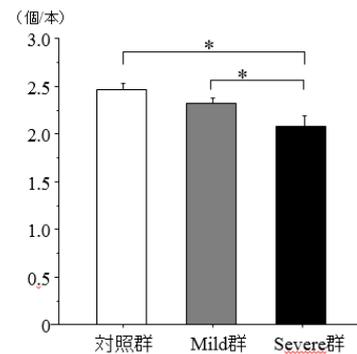


図 12 毛細血管数

*: 対照群との有意差 ($p < 0.05$)

果, タイプ I 線維の萎縮率は 60%であったのに対してタイプ II 線維の減少率は 33%であったとされており, 廃用性筋萎縮の場合は, 遅筋であるタイプ I 線維に優位の筋萎縮が認められる. 一方, がん悪液質の影響により筋萎縮が生じた場合は, 速筋であるタイプ II 線維に優位の筋萎縮が生じることが知られている^{9,19)}. 今回の結果を見ると, Mild 群, Severe 群のタイプ I 線維の萎縮率はそれぞれ 24.0%, 30.1%, これに対してタイプ II 線維のそれはそれぞれ 26.2%, 35.8%であり, タイプ II 線維に優位の萎縮がみられている. つまり, 筋線維タイプの萎縮率から考えると, Mild 群, Severe 群で見られる筋萎縮はがん悪液質の影響が強かったと推測される.

一方, Severe 群のヒラメ筋では, ミトコンドリア活性の低下, 毛細血管の減少が認められた. Desplanchess ら¹⁸⁾の先行研究によれば, 廃用性筋萎縮を惹起したラットの骨格筋では, 活性酸素種 (ROS) の過剰産生により酸化ストレス障害が

誘発され, 筋萎縮やミトコンドリア活性の低下を引き起こすと報告されている. また, 藤野ら²⁰⁾も同様に, 廃用性筋萎縮を惹起したラットの骨格筋では, 酸化系酵素反応の低下によりミトコンドリア活性の低下が見られると報告している. 一方, 前述した通り, がん悪液質の影響でもミトコンドリア機能障害が生じることがよく知られている¹⁾. これは, がん病巣から放出された炎症性サイトカインの影響であり, 誘導性一酸化窒素シンターゼ (iNOS) が活性されることにより, 酸化系酵素の合成を阻害し²¹⁾, ミトコンドリア活性の低下がエネルギー供給の低下, タンパク質合成能の低下, 筋核アポトーシスを誘導して筋萎縮を促進する²²⁻²³⁾. つまり, 今回認められたミトコンドリア活性の低下は, 筋萎縮と同様に, 廃用性筋萎縮, がん悪液質のいずれの影響によっても生じる可能性がある. そこで, 今回のモデルにおける廃用性筋萎縮の影響を検討するため, 追加実験にて白血球モデルラットの活動量を測定した. 具体的には,

Wistar 系雄性ラット 27 匹を 1)NMU 投与により白血病を惹起させる実験群, 2)疑似処置として生理食塩水を投与する対照群の 2 群に無作為に分け, 今回の実験と同様の白血病モデルラットを作成した. そして MNU 投与後, 小動物用自発活動量測定装置 (山下技研, HAMB2003) を用いて活動量を 1 時間測定した (午前 10 時~午後 3 時で測定). その結果, 対照群と実験群の活動量の間には有意差は認められなかった (図 12). つまり, 白血病モデルラットで廃用性筋萎縮が強く生じていた可能性は低く, 筋線維直径の結果を合わせて考えても, ミトコンドリア活性の低下はがん悪液質の影響が強かったのではないと思われる. ただし, 今回の追加実験は, 飼育期間中を通して継時的に計測したわけではないため, 廃用性筋萎縮の発生を否定することはできない. この点は本研究の限界といえる.

毛細血管数の減少に関しては, 廃用性筋萎縮により生じることは報告されているが²⁰⁾, がん悪液質により毛細血管数が生じたという報告は見あたらない. 今回は Severe 群において有意な減少が認められており, これががん悪液質の影響により生じたとすると, 新たな知見といえる. すなわち, がん患者の骨格筋で特異的に持久力が低いのは⁹⁾, ミトコンドリア活性の低下だけでなく, 毛細血管数の減少が相まってエネルギー供給を著しく減少させている可能性があることを示唆している. この点はさらに検討を深めていく必要がある. また, Mild 群と Severe 群間の結果をみると, 筋湿重量, 筋線維直径は両群とも対照群と比較して有意に低下しているのに対し, Mild 群ではミトコンドリア活性と毛細血管数の有意な低下は認められなかった. 今回の Severe 群は, 確実に白血病が発症して進行したラットであるのに対して, Mild 群は発症前または発症初期と思われるラットである. つまり, 本モデルではミトコンドリア活性の低下と毛細血管数の減少に先行して, 筋萎縮が進行していたと考えられる.

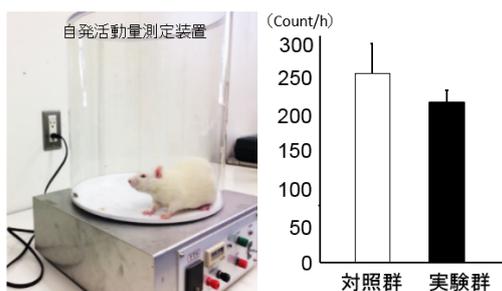


図 12 活動量の測定 (追加実験)
2 群間に有意差は認められなかった.

以上のことから, 白血病モデルラットのヒラメ筋においては筋萎縮, ミトコンドリア活性の低下, 毛細血管数の減少といったがん悪液質の影響が認められ, その中でも筋萎縮がより早期に進行することが明らかとなった. これらの知見は, 血液がん患者に対して, どの時期にどのような介入を行うべきかを考える上で参考になるであろう. ただ, 今回の実験においては, 廃用性筋萎縮モデルや固形がんモデルとの直接的な比較, がん悪液質の生化学的指標による判定, ミトコンドリアの生化学的解析等を行っていないため, 推測の域を脱しない点も多い. 今後, さらなる検討が加えられて血液がんの骨格筋の病態解明が進むとともに, それに対する効果的なリハビリテーションが確立されることを期待する.

謝辞

今回の実験において, ご指導, ご協力いただきました, 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科運動障害リハビリテーション学研究室の諸先生方に厚く御礼申し上げます.

参考文献

- 1) Toth MJ, Miller MS, et al.: Molecular mechanisms underlying skeletal muscle weakness in human cancer; reduced myosin-actin cross-bridge formation and kinetics. *J Appl Physiol.* 1985; 114: 858-868.
- 2) Stene GB, Helbostad JL, et al.: Effect of physical exercise on muscle mass and strength in cancer patients during treatment--a systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013; 88: 573-93.
- 3) Persoon S, Kersten MJ, et al.: Effects of exercise in patients treated with stem cell transplantation for a

- hematologic malignancy: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2013; 39: 682-690.
- 4) 石井 瞬, 中野治郎, 他: 保存的治療が適応となるがん患者に対する低強度運動が身体活動量, 身体・精神症状, QOL におよぼす影響. *Pain Rehabilitation.* 2015; 5: 36-42.
 - 5) Kilgour RD, Vigano A, et al.: Handgrip strength predicts survival and is associated with markers of clinical and functional outcomes in advanced cancer patients. *Support Care Cancer.* 2013; 21: 3261-3270.
 - 6) Brown DJ, McMillan DC, et al.: The correlation between fatigue, physical function, the systemic inflammatory response, and psychological distress in patients with advanced lung cancer. *Cancer.* 2005; 103: 377-382.
 - 7) 片山寛次: がん悪液質の病態と管理. *日本静脈経腸栄養学会雑誌.* 2015; 30: 917-922.
 - 8) 水落和也: 悪性腫瘍のリハビリテーション. *リハビリテーション医学.* 2001; 38: 46-57.
 - 9) Roberts BM, Frye GS, et al.: Cancer cachexia decreases specific force and accelerates fatigue in limb muscle. *Biochem Biophys Commun.* 2013; 435: 488-492.
 - 10) Laviano A and Meguid MM: Nutritional issues in cancer management. *Nutrition.* 1996; 12: 358-371.
 - 11) Toth MJ: Mechanisms of Cancer Cachexia. *Physiol Rev.* 2009; 89: 381-410.
 - 12) Tsai C, Huang H, et al.: An Anthocyanin-Rich Extract from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus Inhibits N-Nitrosomethylurea-Induced Leukemia in Rats. *J Agric Food Chem.* 2014; 62: 1572-1580.
 - 13) 平林容子, 井上 達: 化学発がんモデル. モデル動物利用マニュアルー疾患モデルの作成と利用(がん). 小幡裕一, 他(監修), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 2012, pp.445-459.
 - 14) Chang YC, Hsu JD, et al.: High incidence of acute promyelocytic leukemia specifically induced by N-nitroso-N-methylurea (NMU) in Sprague-Dawley rats. *Arch Toxicol.* 2012; 86: 315-27.
 - 15) Nakano J, Yoshimura T, et al.: Laminin-Induced Autoimmune Myositis in Rats. *Neuropathol Exp Neurol.* 2005; 64: 790-796.
 - 16) Wüst RC, Jaspers RT, et al.: Region-specific adaptations in determinants of rat skeletal muscle oxygenation to chronic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297: H364-H374.
 - 17) 永岡 隆: 広視野電顕像によるヒト白血病骨髄静脈洞の定量形態学的研究. *北里医学.* 1984; 14: 330-341.
 - 18) Desplanches D, Mayet MH, et al.: Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J Appl Physiol.* 1987; 63: 558-663.
 - 19) Ciciliot S, Rossi AC, et al.: Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45: 2191-2199.
 - 20) 藤野英己, 上月久治, 他: 廃用性萎縮筋における毛細血管リモデリングと血管増殖因子の抑制. *理学療法科学.* 2008; 203: 203-208.
 - 21) Suzuki H, Asakawa A: Cancer cachexia--pathophysiology and management. *J Gastroenterol.* 2013; 48: 574-594.
 - 22) Fearon KC: The 2011 ESPEN Arvid Wretling lecture: cancer cachexia: the potential impact of translational research on patient-focused outcomes. *Clin Nutr.* 2012; 31: 577-582.
 - 23) Antunes D, Padrão A, et al.: Molecular insights into mitochondrial dysfunction in cancer-related muscle wasting. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1841: 896-905.

(指導教員: 中野治郎)