遺伝子発現解析を目的とした骨格筋少量採取のための生検針応用方法の開発

飛奈 卓郎[1)] 森 里子[2)] 阿部 征次[3)] 西田 裕一郎[4)]
庄野 菜穂子[5)] 清永 明[1)] 進藤 宗洋[1)] 田中 宏暁[1)]

Application of biopsy needle to take small muscle tissue sample for the analysis of gene expression

Takuro TOBINA[1)] Satoko MORI[2)] Masatsugu ABE[3)] Yuichiro NISHIDA[4)]
Naoko SHONO[5)] Akira KIYONAGA[1)] Munehiro SHINDO[1)] Hiroaki TANAKA[1)]

Abstract

The needle biopsy described by Bergstrom was the most commonly used technique to obtain human skeletal muscle for over 40 years. Approximately 100mg of human skeletal muscle was taken from vastus lateralis by the modified (aspiration) method. Recent analytical method such as real time PCR enabled us to analyze gene expression from vary small amount of tissues. The fine needle biopsy which is usually used to obtain the other tissues is expected to take sufficient amount of skeletal muscle for the analysis of gene expression. Thus, in this study, we applied fine needle biopsy technique to muscle tissue. The fine needle (diameter of 1.4mm) was used to obtain skeletal muscle tissues from vastus lateralis in eight young men. Furthermore, the skeletal muscle tissue obtained by regular needle (diameter of 6.0mm) technique was used as positive control. Skeletal muscle samples obtained by each biopsy procedure were used to measure gene expression level of β-myosin heavy chain slow by real time PCR. On the other hand, blood sample was used as negative control. The PCR products were separated by 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized under ultra violet.

The amount of tissue obtained by the fine needle was 6.3 (3.8) mg (median and IQR). The amount of total RNA extracted was 3.6 (1.7) μg. β-myosin heavy chain slow gene expression could be detected in both samples by the fine needle biopsy and by the regular needle biopsy but not in the blood sample.

These results indicate that the fine needle biopsy may be a useful technique to take skeletal muscle sample at least for the analysis of gene expression.

---

1) 福岡大学スポーツ科学部
Faculty of Sports and Health Science, Fukuoka University, Fukuoka, JAPAN.
2) 飯塚病院健康管理センター
Iizuka Hospital Health Promotion Center, Fukuoka, JAPAN.
3) 福岡経済大学
Fukuoka University of Economics, Fukuoka, JAPAN.
4) 豊栄加齢研究所
Houei Institute of Aging, Miyazaki, JAPAN.
5) ライフスタイル医科学研究所
Institute of Lifestyle Medical Science, Fukuoka, JAPAN.

緒　言

Hill と Hartree が骨格筋の熱産生について[2)] Meyerhof が骨格筋での乳酸の産生と代謝に関する研究で、ノーベル賞を受賞したのは80年以上前のことである[4)]。つまり、1920年代には既に、骨格筋の機能について多くの研究者が興味を抱いていた。しかし、実際にヒトの骨格筋を対象とした研究が盛んになったのは Bergstrom が発案した筋ニードルバイオプシー法[1)] が用いられるようになった1962年以後である。この方法の導入によりヒトの運動に伴う骨格筋代謝適応あるいはトレーニングに伴う骨格筋の適応機序に関する研究が飛躍的に進んだ。このニードルバイオプシー法[1)] は40年以上経った今でもスタンダードな筋生検法として用いられている。

我々は Bergstrom のニードルバイオプシー法を基に、さらに効率よく骨格筋を採取するため、外針に50ml のシリンジを接続し、陰圧をかけて窓から骨格筋を引き込み内針で切除する方法を用いている。この方法であれば１回の生検で100 mg 以上の骨格筋を採取できるが、皮下注射による局部麻酔やメスによる皮膚の切開などの時間を要するため、時間当たりの生検対象者数が制限される。また、骨格筋の表層と深層では毛細血管密度などの組成が異なる。そのためニードルの挿入深度を一定にする必要があるが、直径が４～６ mm のニードルでは mm 単位の挿入深度の調整は困難である。

近年の分子生物学的分析手法の発達により、微量のサンプルでも遺伝子・タンパク発現や酵素活性の分析が可能となった。直径が注射針と同程度の生検針であればメスで切開する必要もないため、生検部位の麻酔も簡易なもので十分である。また、細い針であれば骨格筋内への挿入深度も容易に調整できる。

そこで本研究では、従来の筋生検針より径の小さい針を用いて、骨格筋を採取する方法（小径針筋生検：Fine needle muscle biopsy）を開発するとともに、採取した組織で遺伝子発現が分析可能であるかを検討した。

方　法

１．対象者

本研究の趣旨を理解して参加の同意を得た若年男性８名である。本研究プロトコールは福岡大学研究倫理審査の承認を得た。

２．生検針の選定と骨格筋生検

筋生検部位は外側広筋で股関節と膝関節の中点とした。針の挿入深度は、生検部位の皮脂厚（キャリパーによる皮脂厚測定値の半分）とした。

最初に、18ゲージの注射針と50ml のシリンジを用いて生検を試みた。無麻酔下で骨格筋内へ注射針を挿入して、シリンジで陰圧をかけながら骨格筋をそぎ取るように注射針を数回、抜き差しした。骨格筋から抜いた注射針を RNA 抽出溶液中で洗い、組織が採取できたかを目視で確認した。採取したサンプルから約４ µg の total RNA を得たが、視認できるだけの大きさの筋組織を得ることはできず、血液混入によるものと考えられた。

次に組織（骨髄、ガン組織、肝や腎）採取用の生検針を用いて検討を行った。骨格筋組織は線維質であり、最初に試みたシリンジで吸引するだけでは採取が困難であることから、内針に入り込んだ組織を外針が切除する方式の生検針を採用することとし、内針の組織が入り込む部分が、できるだけ大きい生検針を選択した（Bard MAGNUM Needle, C.R. Bard Inc, GA）(Figure 1.)。この生検針には10mm ごとに印が付いている上に径も小さいため、針の挿入深度を一定にすることが容易である。またこの器具はバネ式で、トリガーを押すと内針が22mm 飛び出し、直後に外針が組織を切除する。このように針の挿入深度を一定にすることが容易で、自動的に組織を採取できるため、生検者の技術による差を少なくすることが可能である。

小径針筋生検の２時間以上前に、生検部位にリドカインテープ（ペンレス、日東電工株式会社、東京）を貼付した。生検針の挿入を容易にするた

め、生検直前に18ゲージ（直径1.2 mm）の注射針で予め皮膚に穴を開けた。皮膚の穴から垂直に16ゲージ（直径1.4mm）の生検針を挿入して組織を採取した（Figure 2.）。採取した組織は、直ちにガーゼの上で血液を取り除き、電子天秤（R-200D, Sartorius AG, Goettingen）で重量を測定した後、液体窒素で凍結させ、－80℃で保存した。筋採取は同一の穴から連続して行い、１人当たり６～８回実施した。小径針筋生検は医師の管理の下、トレーニングを積んだ看護師が行った。

また、小径針筋生検で採取した組織が骨格筋であるかを確認するためのポジティブコントロールとして、従来のニードルバイオプシー法によって採取された骨格筋を用いた。本研究の対象者とは異なるが、この骨格筋は事前に、ニードルバイオプシーの技術に熟練した医師によって採取され、液体窒素で凍結の後、－80℃で保存されていたものである。

一方、ネガティブコントロールとして全血を用いた。血液はRNA抽出直前に25ゲージの針の付いた目盛り付きシリンジを用いて、正肘静脈から350 μl 採取した。

３. 遺伝子発現解析

小径針筋生検により得た組織が骨格筋であるか確認するために、骨格筋に特異的に発現するβ-myosin heavy chain slow（β-MHC slow）の遺伝子発現の検出を行った。

小径針筋生検で採取した62サンプルのうち、無作為に抽出した９つのサンプル、ニードルバイオプシーで採取した骨格筋と全血350 μl を、それぞれ800 μl のRNA抽出溶液（ISOGEN、株式会社ニッポンジーン、東京）に入れ、ポリトロンホモジナイザーで粉砕した。サンプルが微量であるため、エタノール沈澱の段階で３ μl の共沈剤（Ethachinmate、株式会社ニッポンジーン、東京）を加えて total RNA を回収した後、DNase (DNase I Amplification Grade, Invitrogen, CA）処理を行った。Total RNA の濃度は260nm の波長を用いた吸光度分析（V-530、日本分光株式会社、東京）で測定し、１μg 相当の total RNA から cDNA を合成した（Transcriptor Fast Strand cDNA synthesis kit, Roche Diagnostics, Basel)。

β-MHC slow の遺伝子発現の定性分析のため、リアルタイム PCR 法（LightCycler, Roche Diagnostics, Basel）を用いた。β-MHC slow のプライマー配列は Lui et al の論文[3]から得た。リアルタイム PCR は SYBER Green I をレポーターとした試薬（LightCycler FastStart DNA master SYBER Green I, Roche Diagnostics, Basel）を用いて行った。PCR 産物を1.5%アガロースゲル電気泳動で分離して、波長304nm の UV 照射下で写真撮影を行い、目視で非特異的な PCR 産物が無いことを確認した。

４. 統計処理

対象者間の組織採取量の比較には Kruskal-warris 検定を用いた。また、生検を繰り返すことによる組織採取量の変化は Friedman 検定を用いて比較を行った。生検回数が６回の対象者がいるため、この統計処理は６回までの値で行った。

結　果

対象者特性を Table 1 に、小径針筋生検の結果を Table 2 に示す。小径針筋生検による組織採取量は6.3（3.8)mg（中央値と（四分位範囲））であった。また、１回の小径針筋生検から得られた骨格筋では3.6（1.7) μg の total RNA が抽出できた。

対象者間の組織採取量と、回数間の組織採取量に有意差は認められなかった。

β-MHC slow の遺伝子発現解析の結果を Figure 3. に示す。血液から得た cDNA では PCR 産物が確認できないが、小径針筋生検とニードルバイオプシーで採取したサンプルから合成した cDNA では PCR 産物のバンドを確認することができた。この結果から、小径針筋生検で採取した組織が骨格筋であることが分かった。

考　察

本研究では効率的かつ軽度の侵襲で遺伝子発現解析に必要な骨格筋量を確保することを目的として、細い生検針を応用して骨格筋を採取する方法（小径針筋生検：Fine needle muscle biopsy）を実施し、検証を行った。その結果、小径針筋生検でも１回当たり６mg 程度の骨格筋を採取できることを示した。また、対象者間での筋採取量にも差が認められなかったことから、対象者の個人差なく小径針筋生検が筋採取に使用できる可能性を示した。更に６回まででではあるが、繰り返しによる筋採取量の低下も認められなかった。つまり、連続して生検することで組織採取量を増やすことができる。また、運動後の骨格筋の経時的変化を研究する上で、より多くのポイントでの筋採取を可能にする。

リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析には、通常１ μg の total RNA から合成した cDNA が用いられる。本研究で使用した装置では、その cDNA から４回の分析が可能である。本研究では１回の小径針筋生検で採取した骨格筋からおよそ３ μg の total RNA が抽出できることが分ったが、これは12回（duplicate で６種類）の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で分析できることになる。

今回、我々が行った小径針筋生検の所要時間はおよそ３分（筋採取６回の場合）であり、入室から退室までの時間はおよそ10分と、対象者の拘束も短時間であった。また、事前にリドカインテープを貼付しておけば、数分以内に筋生検が可能であるため、運動直後の骨格筋採取も可能である。

小径針筋生検で採取した骨格筋の切片では、筋線維20本程度を捉えることが限界である。そのため組織化学的分析による骨格筋線維組成の評価や、骨格筋内の輸送体の局在などを目的とした研究では、本研究で提案した小径針筋生検で対応が困難である。とはいえ骨格筋線維組成は、ホモジナイズサンプルのミオシン重鎖アイソフォームの定量を行い、その割合から推定することができるかもしれない。

本研究の結果から我々は、遺伝子発現の分析には十分な筋組織量を、短時間で簡易に採取することができる方法として、小径針筋生検を提案する。この方法は研究の場のみならず、骨格筋の疾患の診断への応用も可能であろう。

謝　辞

本研究に参加していただいた対象者の方々、生検針の選定に当たりアドバイスを頂いた順天堂大学の内藤久士先生に心より御礼申し上げます。本研究は文部科学省科学研究費基盤研究A19200049の補助を受け実施された。

参考文献

1．Bergstrom J. Muscle electrolyte in man. Scand J Clin Lab Med. 14: 9. 1962.
2．Hill AV and Hartree W. The four phases of heat-production of muscle. J Physiol. 54: 84-123. 1920.
3．Liu Y, Schlumberger A, Wirth K, Schmidtbleicher D, Steinacker JM. Different effects on human skeletal myosin heavy chain isoform expression: strength vs. combination training. J Appl Physiol. 94:2282-8. 2003.
4．Raju TN. The Nobel chronicles. 1922: Archibald Vivian Hill (1886-1977), Otto Fritz Meyerhof (1884-1951). Lancet. 352: 1396. 1998.

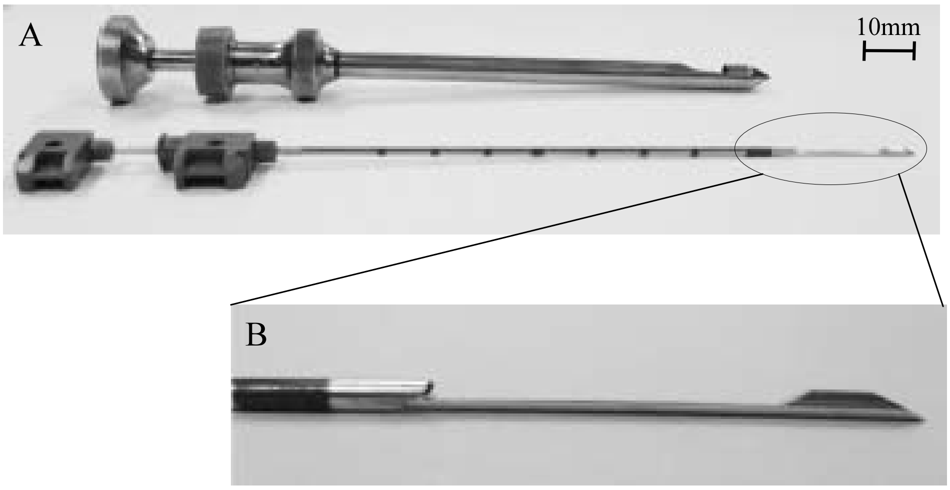

Figure 1. Biopsy needles
A : Regular biopsy needle (upper: φ6.0mm) and fine biopsy needle (lower: φ1.4mm) (Bard MAGNUM Needle).
B : Inner needle window of fine biopsy needle.

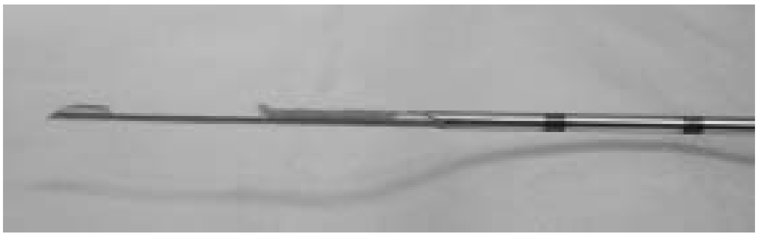

Figure 2.
Small amount of human skeletal muscle was obtained by fine needle (φ1.4mm) biopsy.

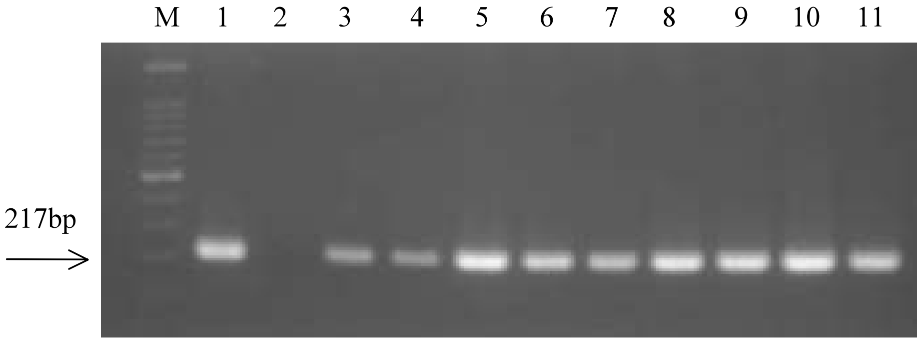

Figure 3. β-myosin heavy chain slow gene expression.
M: 100bp ladder, 1: Regular needle biopsy, 2: Blood, 3-11: Fine needle biopsy

Table 1. Characteristics of the subjects.

Age (year)	23.8±2.3
Height (cm)	172.5±6.9
Weight (kg)	68.3±6.7
Skinhold thickness（mm）	4.9±0.7

N = 8
Data shown as mean ±SD

Table 2. The amount of tissues obtained by fine needle biopsy.

Subject	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th	Median	IQR
A	5.9	3.9	6.3	5.6	6.4	5.3	6.4	2.4	5.8	1.4
B	9.9	10.7	7.9	8.2	3.1	11.3	10.6	9.5	9.7	2.5
C	6.7	11.9	9.9	11.5	6.9	6.0	5.1	3.4	6.8	4.5
D	3.6	3.1	6.0	5.9	10.3	11.8	11.3	9.5	7.8	5.2
E	5.8	3.3	5.9	7.0	4.5	8.9	-	-	5.9	1.9
F	7.1	8.0	9.0	8.6	5.7	4.5	8.3	10.9	8.2	2.0
G	6.5	8.2	9.6	10.9	5.8	4.9	6.4	6.0	6.5	2.6
H	8.0	5.7	5.9	8.7	4.3	10.6	6.7	11.3	7.4	3.3
Median	6.6	6.9	7.1	8.4	5.8	7.5	6.7	9.5		
IQR	1.5	5.1	3.2	2.5	2.1	5.6	3.1	5.5		

Abbreviation; IQR: Interquartile range　Unit: mg

(平成20年２月29日受理)