

【原著論文】

## 収束イオンビーム搭載走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM) 観察による筋損傷修復時に現れる骨格筋間質細胞の3Dネットワーク

小林 正利<sup>1)</sup>, 太田 啓介<sup>2)</sup>, 東 龍平<sup>3)</sup>, 中村桂一郎<sup>2)</sup>, 櫻井 忠義<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 日本体育大学体育学部健康教育学研究室

<sup>2)</sup> 久留米大学医学部解剖学講座顕微解剖・生体形成部門

<sup>3)</sup> 久留米大学電子顕微鏡室

### Observation of stromal cells interaction and formed 3D network following acute muscle trauma with focused ion beam scanning electron microscope (FIB-SEM)

Masatoshi KOBAYASHI, Keisuke OHTA, Ryuhei HIGASHI, Kei-ichiro NAKAMURA and Tadayoshi SAKURAI

**Abstract:** In this study, rats skeletal muscle tissue was observed after the trauma with focused ion beam scanning electron microscope (FIB-SEM) into 600 slice pictures, which were reconstructed into 3D images by program to develop the localization and formation of stromal cells.

As a result, it was observed that many cells invaded it in muscle fibers, and three kinds of cells were observed in the interstitial space of the gastrocnemius muscle at the 2 day after trauma.

The first cells had a spindle shape. The second cells that had rough endoplasmic reticulum (r-Er) developed to cell body. The third was granulocyte-like cells. These 3 types cells contacted or fused each other, and formed 3D network. It was suggested that these cells exchanged information each other. Therefore, it may be important that stromal cells were some roles in regeneration process after muscle trauma, including the possibility that they are niche.

(Received: April 29, 2013 Accepted: August 23, 2013)

**Key words:** FIB-SEM, muscle stromal cells, muscle regeneration

キーワード: FIB-SEM, 筋線維間質細胞, 筋再生

#### 1. 目 的

骨格筋組織では筋衛星細胞が組織幹細胞として働き筋再生や筋肥大に関係することが知られてきた。一方で骨格筋組織間質に存在する単核細胞が筋線維の修復に荷担するのではないかということも報告されている<sup>1,2)</sup>。しかしながら、これらの骨格筋組織間質に存在する単核細胞が筋修復過程において筋線維や筋衛星細胞と如何なる相互関係を有するのか等は未だ不明瞭な点が多い。このメカニズムを解明することでスポーツやリハビリ過程での効果的なトレーニング法の開発、更には今まで治療困難であった難病の治療法の確立の為にも極めて重要である。

我々は、GFP トランスジェニックマウスから骨髄を

移植した野生型マウス (骨髄細胞移植キメラマウス) を用いて骨髄由来細胞の分布と周囲の組織との形態学的な関連を明らかにしようとする研究<sup>3-6)</sup>を行ってきた。この動物の正常骨格筋においてGFP陽性骨髄由来細胞が骨格筋線維間質に一定のルールのもと点在し、且つ筋線維に近接して局在していることを観察した。併せて、GFP陽性細胞の殆どがマクロファージマーカー陽性であることを確認するとともに、線維芽細胞とも密接していることも観察してきた<sup>3-5)</sup>。更にはGFP陽性の筋線維もみられ、これは骨髄に由来する間質細胞が骨格筋再生・発達に何らかの関連を有することを示唆するものであり、再生中の骨格筋線維間に存在する細胞同士が互いに連絡・融合しているということも考えられる。

また、我々は、正常骨格筋内の筋紡錘外鞘周皮細胞と間質細胞とが密接し、何らかの情報交換を行っている可能性を明らかにし骨格筋正常構造の維持にもこれらの間質細胞が何らかの役割を演じている可能性を報告<sup>7)</sup>した。

しかしながら、骨格筋を損傷した場合、筋線維間質にある細胞がどのように骨格筋の再生・機能維持に関わり、構造変化や相互関係を示して行くのかについては未だ明らかになっていない。

一方で近年電子顕微鏡観察法の発展およびコンピュータ計算速度の発達に伴い電子顕微鏡観察による微細構造の3次元再構築も盛んに行われるようになってきた<sup>8,9)</sup>。特に収束ガリウムイオンビームを用いて試料表面を切削しながら走査型電子顕微鏡 (focused ion beam scanning electron microscope; 以下 FIB-SEM) で連続的に反射電子像を撮影し3次元再構築を試みた報告<sup>9)</sup>も見られる。この方法は電子顕微鏡レベルでの高分解能で比較的広範囲な試料面の観察と、深さ方向の情報取得に優れており細胞、組織レベルでの構造を解析するために有利であると考えられる。

そこで本研究は挫滅による筋損傷モデル動物を作製し、骨格筋組織内の間質細胞が如何なる相互関係を有するのかを明確にするため FIB-SEM で損傷筋試料を連続的に観察し、取得した画像を3次元再構築して検討を行った。

## 2. 方 法

### 1) 実験の方法試料の採取

実験は日本体育大学倫理審査委員会により審査、承認を請け (承認番号 第 012-A05 号)、日本体育大学動物実験規定に基づいて行った。

実験には10週齢雄 Sprague Dawley ラットを用い、動物をペントバルビタールナトリウムで深麻酔を行った後、Iwata ら<sup>10)</sup> および Kami ら<sup>11)</sup> の方法に従って、長さ 20 cm、底面の直径 1.0 cm、重さ 640 g の銅製の棒をアルミニウム製のシリンダーをガイドに 250 mm の高さから、動物の右脚腓腹筋に落下させ挫滅損傷を負荷した。その2日後に電子顕微鏡観察のための試料を採取した。

### 2) 試料の採取

電子顕微鏡観察試料は Ohta ら<sup>9)</sup> 及び小林ら<sup>7)</sup> の方法に従い動物をペントバルビタールナトリウム麻酔下で開胸、開腹し、心臓左心室より生理食塩水を灌流後、2%パラフォルムアルデヒド/2.5%グルタルアルデヒド/0.1 M PB により灌流固定を行った。その後、後肢から腓腹筋を摘出した。摘出した腓腹筋は 1 mm<sup>3</sup> 角に細切し、上記固定液にて 4°C で 2 時間浸漬固定を行

い 0.1 M PB にて 3 回洗浄後、2% OsO<sub>4</sub> と 1.5% フェロシアン化カリウムを 0.1 M PB に混和した溶液に 4°C で 1 時間浸漬した。さらに蒸留水で 5 回洗浄後、1% チオカルボヒドラジド水溶液に室温で 1 時間浸漬した。またさらに蒸留水で 5 回洗浄後、2% OsO<sub>4</sub> 水溶液に浸漬し、蒸留水にて 5 回洗浄の後、電子顕微鏡観察時のコントラストを上げるために 4% 酢酸ウラン・25% メタノール溶液で一晩ブロック染色を行い、その後蒸留水にて洗浄した。試料はさらに Walton<sup>12)</sup> のアスパラギン酸鉛水溶液にて 2 時間浸漬した。試料はエタノールの上昇脱水系列 (25%, 30%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, 各 10 分間) で脱水の後、エポキシ樹脂 (Epon 812, TAAB 社製) 包埋し 60°C で 72 時間重合させた。完全に重合した樹脂は 1.5 mm 角にトリミングし、Ultracut E microtome (Leica 社) 上にセットしたダイヤモンドナイフで表面を切削後に、走査型電子顕微鏡 (以下 SEM) 用試料ホルダーにセットした。

### 3) 収束イオンビーム搭載型走査型顕微鏡 (FIB-SEM) による観察および 3 次元再構築

SEM 用試料ホルダーに乗せた試料はチャージングを防ぐために表面にカーボン蒸着し FIB-SEM (Quanta 3D FEG, FEI 社製) にセットした。その後、図 1 に示すように試料表面 (図 1A 面) を加速電圧 5.0 KV bias 2.5 KV の条件で反射電子像を撮影し、観察していく場所を確定の後、図 1 に示す B 面について 50 μm × 50 μm × 60 μm の領域を収束ガリウムイオンビーム (加速電圧 30 KV, 3.0 nA) (以下 FIB) で 0.1 μm ずつ切削しながら Slice & View G2 operating software (FEI 社製) にて連続的に 600 枚の反射電子像の自動撮影を行った。得られた画像は Amira 5.4 software (VSG 社製) にて image stacking を施すとともに 3 次元再構築像を作製した。

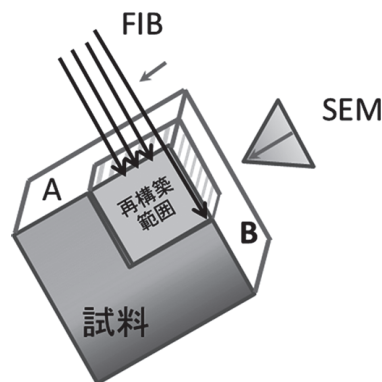


図 1 FIB-SEM による試料の観察  
A 面で像を確認し、試料を FIB で 0.1 μm ずつ切削しながら B 面を反射電子像で走査検出していく。

### 3. 結 果

#### 1) 樹脂包埋ブロック試料表面の観察

図1に示すA面が通常の試料ブロック表面である。ブロック表面の反射電子像を観察することにより、図2に示すように、損傷した筋線維が観察された。この筋線維の間質には炎症性の細胞が多数存在し、且つ損傷した筋線維内にも炎症性の細胞が多数侵入していた。この像から損傷筋線維および筋線維間質を含む領域を選択し、試料表面(図1A面)に直行する面(図1B面)について収束ガリウムイオンビームで0.1 $\mu\text{m}$ ずつ切削しながら連続600枚反射電子像撮影を行った。

#### 2) 3次元再構築像の観察

図3A, Dおよび図4Aは、600枚の連続写真から筋線維間質に存在していた細胞の一部をパソコンソフト(Amira 5.4)で3次元再構築を試み、各種方向から筋間質細胞を観察したものである。

連続写真を検索の結果、形態の異なる3種類の細胞が確認された。1つ目は、茶色で示した細長い細胞体で細長い突起を持つ細胞。2つ目は黄緑色で示す指状の構造を持ち単核で偽足を有し、細胞質には粗面小胞体が発達する細胞。3つ目は深緑色で示す球状で、細胞核が多葉に分かれ細胞内に特殊顆粒を持ち、顆粒白血球様の細胞であった。また、3種類の細胞が連続して存在し、3次元的に細胞相互のネットワークを作って存在していた。

#### 3) 間質細胞相互関係の観察

これらの間質細胞間、および損傷筋線維との相互関係について検索を行った。

図3, 4は3種類の細胞の位置関係を示したものである。3次元再構築像では3種類の細胞が非常に近接し、且つ連続して存在することが観察された。また、それぞれの細胞相互の関係を反射電子像写真で確認したところ、顆粒白血球様細胞が相互(図3A-C矢印)に密接しており、細長い細胞体で突起を有する細胞と顆粒白血球様細胞間(図3D-F矢頭)では細胞境界がはっきりせず、細胞間橋様の構造で融合していることが観察できた。細長い細胞で突起を有する細胞と粗面小胞体が発達する細胞間でも融合像が観察された(図4A, B矢印b)。特に粗面小胞体が発達する細胞同士(図4A, C矢印c)の融合像では細胞内小器官が共有されている像が確認され、損傷筋線維に密接するものや筋線維内へ侵入しようとしているような細胞も確認できた。

また、粗面小胞体が発達する細胞と顆粒白血球様細胞(図4A, D矢印d)共に密接し、相互に連絡していることが確認された。

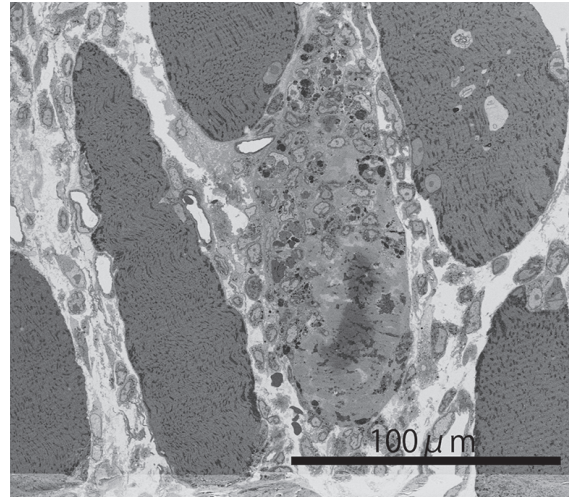


図2 FIB-SEMによるブロック表面の反射電子像観察  
損傷筋線維内および周辺に炎症性の細胞が侵入している。

### 4. 考 察

本研究で観察したような、筋組織間質において異なった形態を有した細胞相互ネットワークの働きについて考察を行った報告は見当たらない。しかしながら、過去の報告<sup>13-17)</sup>の透過型電子顕微鏡観察写真には、本研究で報告した細胞と非常に酷似した細胞が映し出されているものの、細胞相互の3次元的な連携については殆ど注目されて来なかった。また、従来の透過型電子顕微鏡観察であれば、図3E, Fに示す細長い突起様の細胞と、図4B矢印b右側に観察される細胞(図3A, D, 図4Aでは茶色で示す細胞)は同一の細胞であることが見逃された可能性が高く、異なった細胞であるように扱われてきたかもしれない。本研究においては、FIB-SEMによる600枚の連続電子顕微鏡写真データを詳細に観察することおよび3次元再構築を行い、様々な角度から詳細に観察したことで細胞全体像を把握し1つの細胞として捉えられた。それだけではなく、特に他の細胞との3次元的な細胞相互関係を明確に観察することが可能となった。このことにより異なった3種類の細胞相互の融合、接触による形態的連携という密接な情報連絡の存在を示唆する極めて重要な所見を得ることができたといえる。

挫滅や毒素の注入、凍結等で骨格筋損傷を負荷した場合、筋組織は再生能力を有することが知られている<sup>12-15)</sup>。その最初のカテゴリーは筋損傷から数時間後に急性期の炎症症状として始まり、好塩基球、血小板、赤血球、形質細胞、サーキュレイティングモノサイト(単球)等の血球系細胞が骨格筋線維周辺の毛細血管や毛細血管後細静脈から、外傷の影響となる外的要因によって破壊される事により血管外に進出し<sup>13)</sup>、24時間後には損傷筋周囲へ侵出してくるといふ報告<sup>16)</sup>があ



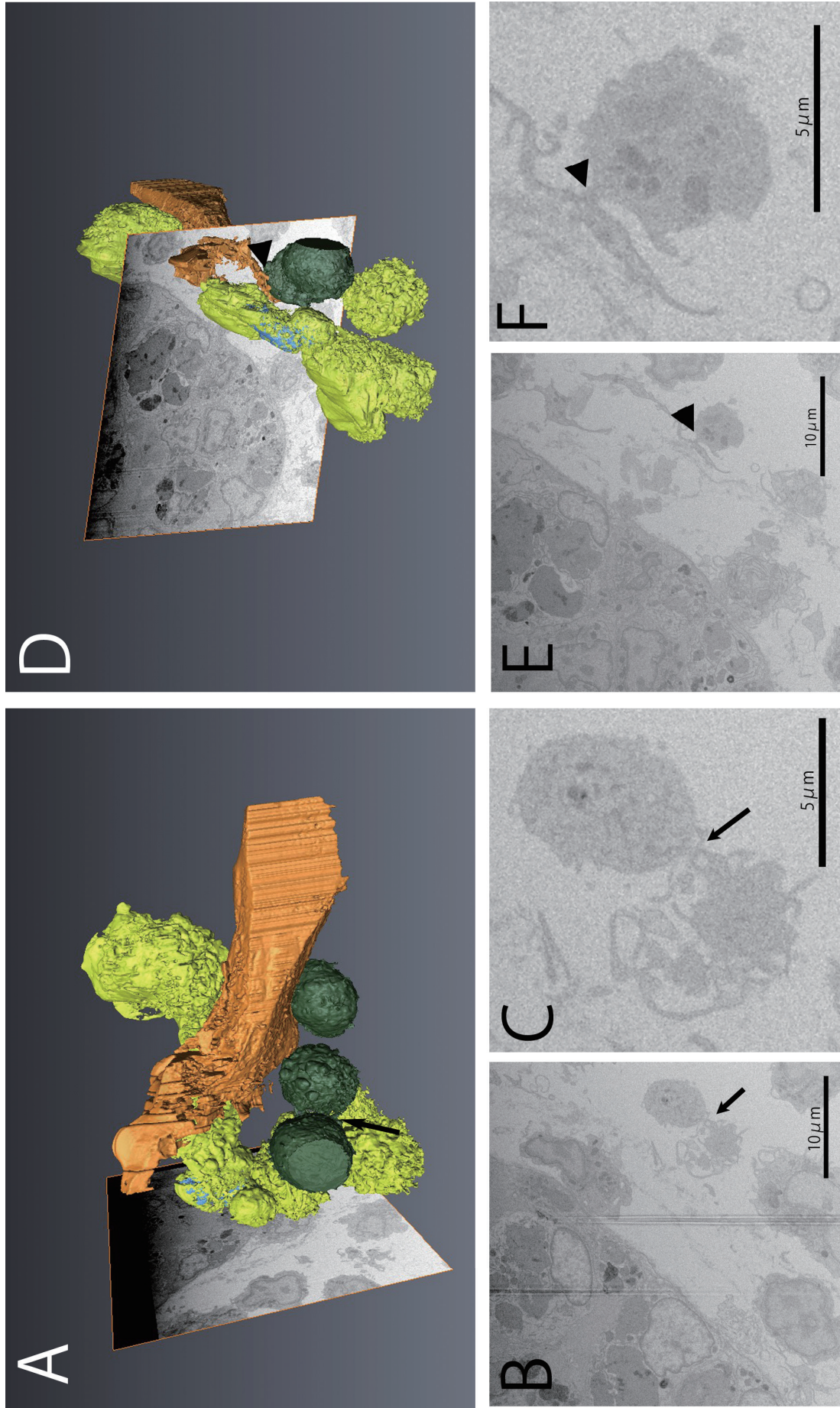


図3 血球系細胞相互関係および緑維芽細胞および血球系細胞との相互関係

A, D: 3次元再構築像。B-F: 電子顕微鏡像。C: Bの拡大。F: Eの拡大。B, C: 緑維芽細胞様細胞と血球系細胞が矢印部(▲)で融合している。A, D: 3次元再構築像。B-F: 電子顕微鏡像。C: Bの拡大。F: Eの拡大。B, C: 緑維芽細胞が矢印部(↑)で接合している。血球系細胞と血球系細胞が矢印部(▲)で融合している。



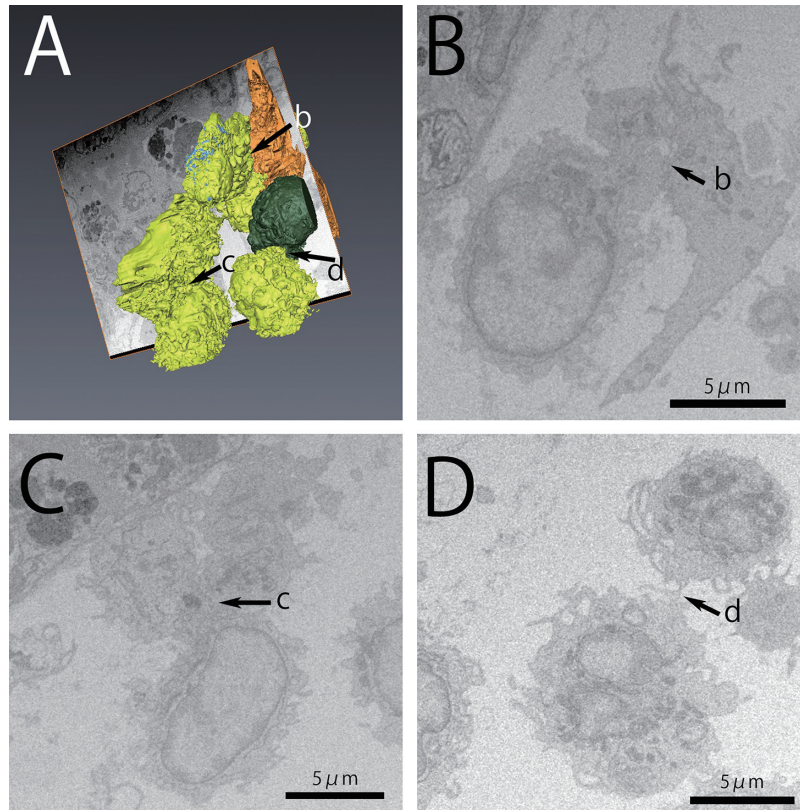


図4 線維芽細胞様細胞，血球系細胞，マクロファージ様細胞の相互関係  
 A；3次元再構築像。B，C，D；電子顕微鏡像。線維芽細胞様細胞とマクロファージ様細胞が融合している（矢印b）。マクロファージ様細胞が相互に融合している（矢印c）。マクロファージ様細胞と血球系細胞が接合している（矢印d）。

る。2日後には筋形質はマクロファージ等の炎症性細胞により基底膜を残して浸食され、その後5日から7日で基底膜を足場として筋形質膜が再生され、筋衛星細胞を含む筋芽細胞が増殖・融合して筋管を形成した後に成長した骨格筋細胞に再生していくことが知られている<sup>13,16,17</sup>。

本研究では挫滅損傷後2日のラット腓腹筋を観察したが、図2にみられるように損傷筋内および損傷筋周囲に多数の炎症性細胞を確認した。Fisherら<sup>16</sup>は透過型電子顕微鏡観察により損傷2日後に偽足を持った単核の細胞が現れることを示している。これは図3,4の3次元再構築像で、黄色で示す指状の偽足を持った細胞と形態が非常に良く似たものである。電顕観察においても、細胞の形態的特徴から細胞同定が可能である。これらの細胞については細胞質に発達した粗面小胞体を有しているという特徴から線維芽細胞様の細胞とも推察される。しかしながら、図4Cの細胞のように細胞内にライソゾーム様構造を持つものも観察されるとともに、指状の偽足を有することからマクロファージである可能性も否定できない。

骨格筋の再生過程においてマクロファージが重要な役割を演ずることはよく知られている<sup>17-19</sup>。マクロ

ファージは組織毎に様々な形態をとり、炎症性のマクロファージや組織常在型のマクロファージの存在が知られている。その機能は貪食、サイトカインやケモカインの分泌、抗原提示など免疫系の制御に関わることが知られている<sup>20</sup>。骨格筋においては筋線維が損傷した際に基底膜内に侵入し、損傷した筋細胞を貪食し<sup>13,16</sup>、マクロファージから出される分泌物やLIF、IL-6などの炎症性のサイトカインが骨格筋の再生、肥大に重要な役割を演ずることが知られている<sup>20-22</sup>。一方、マクロファージの中には従来から知られる貪食に関わるM1細胞とIL-10やIL-1raを産生し、過剰な免疫反応を負に制御し、創傷治癒、血管新生、骨格筋の再生機能等に関与するM2細胞が存在することも知られている<sup>23,24</sup>。Villaltaら<sup>23</sup>はmdxマウスによる研究で、筋線維が崩壊する際に筋組織中に存在するマクロファージがM1細胞で、その後の筋線維の再生過程に筋組織に存在するマクロファージはM2細胞であると報告しており、本研究で観察された細胞がマクロファージであるとするならばM1細胞に相当する細胞であるかもしれない。

また、本研究では細長い細胞体で突起を有する細胞を確認した（図3A, D-F, 図4A いずれも茶色で示す）。

これらの特徴からするとこれは線維芽細胞様の細胞ではないかと推察される。線維芽細胞は細胞外マトリクスのコラーゲンを産生分泌することや各種の生理活性物質の産生分泌能を有することが知られている<sup>25-27)</sup>。これらの線維芽細胞に分類される細胞のなかには小腸の特定の層に於いてネットワークを作っているものが報告<sup>28,29)</sup>されている。また、正常組織における線維芽細胞様細胞と骨髄由来のマクロファージ様細胞が密接して存在することも観察されており、この相互関係の重要性を示唆する報告もある<sup>3-5)</sup>。

組織損傷治癒過程に於いては筋線維芽細胞 myo-fibroblast (アクチン等の筋細胞形質を発現した線維芽細胞) が関与することが知られている。この細胞は、末梢血の単核球画分にあつて骨髄由来のコラーゲン産生能を有する細胞で、“circulating fibrocyte”という名がつけられている<sup>30,31)</sup>。この circulating fibrocyte は骨髄由来幹細胞の働きを演ずるのではないかと。また、組織再生の際のニッチ (niche) としての働きを有するのではないかとという考えもある<sup>25)</sup>。同様に線維芽細胞が筋再生の際に筋衛星細胞等のニッチとして働く可能性を示唆した報告もみられる<sup>32-34)</sup>。このような細胞は血管から組織に侵出してくると考えられ、本研究で観察された細胞と同様のものではないかと推察される。また、本研究で観察された細長い細胞体と突起を有する細胞は、形態が異なる2種類の細胞がこの細胞と融合している事が観察されたことから筋損傷再生の際にニッチとして働いている可能性も示唆された。

また、顆粒白血球系の細胞が上記2種の細胞と融合および接触していることも観察した (図3D-F, 図4A, D)。これらの細胞はヒスタミンやプロスタグランディンを産生分泌し血管形成に関与するほか、急性期の損傷部位において様々なケモカインを分泌していることも知られている<sup>13)</sup>。

本研究においてFIB-SEMで観察された細胞間の3次元ネットワークについては、これらの細胞のいずれかが組織再生のニッチとしての役割を持つ可能性があり、さらに多くの連続写真を解析すれば、細胞性の壁を形成していることも考えられる。このことは組織再生に係わる化学物質が、より効果的に作用するように細胞外でバリアを形成しているのではないかとという仮説が立てられるが、今後これらの可能性についてはさらなる検討を行って行かなければならない。いずれにしても組織再生の際に細胞間の融合像が観察されたことはこれらの細胞が相互に密な情報交換を行っており、その事が大変重要な意味を持つのではないかとということが示唆された。

## 5. 結 論

本研究は、挫滅筋損傷後2日目の筋組織間質についてFIB-SEMを用い、600枚の連続電子顕微鏡写真を取得後、コンピュータで3次元再構築をおこない、より高分解能で再生筋線維および筋組織間質細胞の相互関係を検索した。

その結果、筋線維間質に形態の異なる3種類の細胞が確認され、それぞれが融合・密接し3次元的なネットワークを形成するとともに細胞相互の密接な情報連絡の存在を示唆さえるものであった。このことはこれらの細胞のいずれかが組織再生時のニッチとして働いているのではないかとという可能性を示唆させる所見であるとともに、組織再生に伴い侵出してきた炎症性細胞から分泌される化学物質がより効果的な働きをするための構造である可能性と組織再生の際にこれらの細胞が相互に何らかの情報交換を行っており、その事が大変重要な意味を持つのではないかとということが示唆された。

本研究は、平成24年度日本体育大学学術研究補助費「骨格筋損傷回復過程における組織間質細胞の形態及び新たな機能の解明」に基づいて行われたものである。

謝辞 本研究の遂行並びに本論文をまとめるにあたり、ご協力頂いた多くの皆様に心よりお礼申し上げます。

## 6. 参考文献

- 1) Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Fukushima K, Imaizumi K, et al. Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *Am J Pathol* 2008, **173**: 781-791.
- 2) Tamaki T, Okada Y, Uchiyama Y, Tono K, Masuda M, Wada M, et al. Synchronized reconstitution of muscle fibers, peripheral nerves and blood vessels by murine skeletal muscle-derived CD34(-)/45(-) cells. *Histochem Cell Biol* 2007, **128**: 349-360.
- 3) Takayama T, Kondo T, Kobayashi M, Ohta K, Ishibashi Y, Kanemaru T, et al. Characteristic morphology and distribution of bone marrow derived cells in the cornea. *Anat Rec (Hoboken)* 2009, **292**: 756-763.
- 4) 中村桂一郎. 末梢組織に分布する骨髄由来細胞の解析 間葉系細胞ネットワーク? 久留米医学会雑誌 2006, **69**: 229-236.
- 5) 中村桂一郎. 末梢組織における骨髄由来細胞の形と分布様式. *細胞* 2007, **39**: 394-398.
- 6) 小林正利. 末梢組織に分布する骨髄由来細胞 骨格筋組織との関連について. *体力科学* 2007, **56**: 604.
- 7) 小林正利, 太田啓介, 東 龍平, 中村桂一郎, 櫻井忠義. 収束イオンビーム搭載走査型電子顕微鏡 (FIB-

- SEM) による骨格筋間質細胞の観察. 日本体育大学紀要 2012, **42**: 45–50.
- 8) Ohta K, Higashi R, Sawaguchi A, Nakamura K. Helical arrangement of filaments in microvillar actin bundles. *J Struct Biol* 2012, **177**: 513–519.
  - 9) Ohta K, Sadayama S, Togo A, Higashi R, Tanoue R, Nakamura K. Beam deceleration for block-face scanning electron microscopy of embedded biological tissue. *Micron* 2012, **43**: 612–620.
  - 10) Iwata A, Fuchioka S, Hiraoka K, Masuhara M, Kami K. Characteristics of locomotion, muscle strength, and muscle tissue in regenerating rat skeletal muscles. *Muscle Nerve* 2010, **41**: 694–701.
  - 11) Kami K, Masuhara M, Kashiba H, Kawai Y, Noguchi K, Senba E. Changes of vinculin and extracellular matrix components following blunt trauma to rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 1993, **25**: 832–840.
  - 12) Walton J. Lead aspartate, an en bloc contrast stain particularly useful for ultrastructural enzymology. *J Histochem Cytochem* 1979, **27**: 1337–1342.
  - 13) Fisher B, Rathgeber M. An Overview of Muscle Regeneration Following Acute Injury. *J Phys Ther Sci* 2006, **18**: 57–66.
  - 14) Turner NJ, Badylak SF. Regeneration of skeletal muscle. *Cell Tissue Res* 2012, **347**: 759–774.
  - 15) Turner NJ, Badylak SF. Biologic scaffolds for musculotendinous tissue repair. *Eur Cell Mater* 2013, **25**: 130–143.
  - 16) Fisher BD, Baracos VE, Shnitka TK, Mendryk SW, Reid DC. Ultrastructural events following acute muscle trauma. *Med Sci Sports Exerc* 1990, **22**: 185–193.
  - 17) Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med* 2005, **33**: 745–764.
  - 18) Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010, **298**: R1173–1187.
  - 19) Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, Arnold L, Ardjoune H, Magnan M, et al. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells* 2013, **31**: 384–396.
  - 20) Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010, **32**: 593–604.
  - 21) Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003, **3**: 23–35.
  - 22) Kami K, Morikawa Y, Sekimoto M, Senba E. Gene expression of receptors for IL-6, LIF, and CNTF in regenerating skeletal muscles. *J Histochem Cytochem* 2000, **48**: 1203–1213.
  - 23) Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2009, **18**: 482–496.
  - 24) Lolmede K, Campana L, Vezzoli M, Bosurgi L, Tonlorenzi R, Clementi E, et al. Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways. *J Leukoc Biol* 2009, **85**: 779–787.
  - 25) 中村桂一郎, 高山徹也, 田上隆一郎, 岡 毅, 石橋義広, 小林正利, et al. Circulating fibroblast!? 線維芽細胞再考. 久留米医学会雑誌 2009, **72**: 219–226.
  - 26) Komuro T. Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast-like cells. *Anat Embryol (Berl)* 1990, **182**: 103–112.
  - 27) Furuya S, Furuya K. Subepithelial fibroblasts in intestinal villi: roles in intercellular communication. *Int Rev Cytol* 2007, **264**: 165–223.
  - 28) Iino S, Horiguchi K, Horiguchi S, Nojyo Y. c-Kit-negative fibroblast-like cells express platelet-derived growth factor receptor alpha in the murine gastrointestinal musculature. *Histochem Cell Biol* 2009, **131**: 691–702.
  - 29) Langevin HM, Cornbrooks CJ, Taatjes DJ. Fibroblasts form a body-wide cellular network. *Histochem Cell Biol* 2004, **122**: 7–15.
  - 30) Bucala R. Circulating fibrocytes: cellular basis for NSF. *J Am Coll Radiol* 2008, **5**: 36–39.
  - 31) Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994, **1**: 71–81.
  - 32) Popescu LM, Manole E, Serboiu CS, Manole CG, Suciuc LC, Gherghiceanu M, et al. Identification of telocytes in skeletal muscle interstitium: implication for muscle regeneration. *J Cell Mol Med* 2011, **15**: 1379–1392.
  - 33) Mathew SJ, Hansen JM, Merrell AJ, Murphy MM, Lawson JA, Hutcheson DA, et al. Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis. *Development* 2011, **138**: 371–384.
  - 34) Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* 2011, **138**: 3625–3637.

---

<連絡先>

著者名：小林正利

住 所：東京都世田谷区深沢 7-1-1

所 属：日本体育大学健康教育学研究室

E-mail アドレス：m-kobayashi@nittai.ac.jp

