

ラット骨格筋線維のトレーニング効果に関する研究
—組織化学的, 生化学的手法を用いての検討—

竹倉宏明* 田中弘之* 小野三嗣* 春日規克**

HISTOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES ON THE
EFFECT OF EXERCISE ON THE SKELETAL
MUSCLE FIBERS IN RATS

HIROAKI TAKEKURA, HIROYUKI TANAKA, MITSUTSUGU ONO
and NORIKATSU KASUGA

Abstract

The inter of this study was to observe the effects of training on histochemical and biochemical properties in the skeletal muscle fibers.

Wistar strain albino rats were assigned to endurance (E), sprint (S) and control (C) group at 4 weeks old. Animals of trained groups were trained by treadmill for 12 weeks. After training, all animals were sacrificed and M. Soleus(SOL)and M. Extensor Digitorum Longus (EDL) were taken out.

Using histochemical staining methods for Hematoxylin and Eosin, Actomyosin ATPase and Succinate Dehydrogenase (SDH), area and composition of the three muscle fiber types were examined. Furthermore, the chemical properties of glycolytic and oxidative enzyme activities were examined.

The results obtained were as follows :

1. The E and S trained groups, respectively, showed lower increase of body weight than the control group.
2. Hypertrophy of all fiber types in EDL were observed in the both trained groups. Area of SO fibers in SOL were also increased in the E group as compared to the C group.
3. The differences observed for fiber composition among the three groups. The rate of FOG fiber in SOL decreased significantly in the both trained groups as compared to the C group. The rate of SO fiber in both muscles were slightly higer for the E group relative to the C Group, but these differences were no significant. However, in the E group significant increase was observed for oxidative enzyme activity. The Phosphofructokinase activity in EDL of the S group was significantly higher in comparison to the other groups.

These results suggested that there is the discrepancy between histochemical properties and biochemical properties in the effects of training on skeletal muscle fibers and that the necessity of histochemical and biochemical analysis.

(J. Physical Fitness Japan 1985, 34 : 276~283)

key words : Skeletal muscle fiber, Fiber type composition, Enzyme activity

I. 緒 言

トレーニングにともなう骨格筋線維の変化に関しては過去に多くの報告がみられる⁶⁾¹⁰⁾¹⁴⁾. 組織

化学的見地では, Edgerton et al.⁵⁾ がラットに遊泳トレーニングを行なわせた結果, 筋線維タイプ構成比率が有意に変化したと報告している. しかし, 異なる強度の走行トレーニングを行なわせた

* 東京学芸大学運動生理学教室 Tokyo Gakugei Univ.

〒184 小金井市貫井北町4-1-1

** 愛知教育大学

Aichi Univ. of Education

〒448 刈谷市井ヶ谷町広沢1

際、筋線維に若干の肥大は認められるが、筋線維タイプ構成比率には著変は認められなかったという報告²¹⁾もある。

生化学的知見によれば、全般的には瞬発的トレーニングにより解糖系酵素活性値が、持久的トレーニングにより TCA 回路系酵素活性値がそれぞれ上昇することが知られている⁹⁾¹⁰⁾¹⁵⁾。

しかし、組織化学・生化学両報告において必ずしもトレーニング種類によって期待されるべき変化がすべての骨格筋の代謝特性に表われているとは考えがたい。これは、組織化学による染色方法では分類される同じタイプの筋線維において、一定値以上の酵素活性値の高低を知ることはできないこと、また生化学的方法では、トレーニング方法により特異的に変化するタイプの筋線維とそうでない異なるタイプの筋線維が混在したものを測定しているという測定上の短所がその理由であるためと考えられる。

そこで本研究では、組織化学・生化学両手法を用い測定分析することにより、さらに明確に走行トレーニングの骨格筋代謝特性に与える影響を検討するものである。

II. 実験方法

A. 対象ならびにトレーニングプログラム

実験動物には Wistar 系雄性ラット15匹を用いた。ラットは生後3週齢より飼育を開始し、小動物用トレッドミル(トキワ科学社製)を用いて、30 m/min. の速度で10分間の連続走行を1週間行なわせた予備トレーニング後、各群の体重が等しくなるように Control (以下 C, n=5) 群, Sprint (以下 S, n=5) 群, Endurance (以下 E, n=5) 群に分類した。走行トレーニングは生後5週齢より開始した。S群, E群ともに走行速度, 走行時間を10週齢まで段階的に漸増し, 以後16週齢に至るまで一定に保った(Table 1)。すなわち, S群は速度 80 m/min., 傾斜 0 度で1分間の走行を2分間隔で10回繰り返すことを一定負荷とした。E群は速度 40 m/min., 傾斜 0 度で120分間の連続走行を一定負荷とした。トレーニングは1日1回, 週5回の頻度とした。水ならびに飼料は24時間自由摂取とした。

B. 分析方法

最終トレーニング終了24時間後, Sodium-Pentobarbital 麻酔下にて両下肢の M. Soleus (以下 SOL), M. Extensor Digitorum Longus (以下

Table 1. Progressive endurance- and sprint-training programs.

Week	3	4	5	6	7	8	9	10	16
Sprint	speed (m/min.)	30	40	50	60	70	70	80	80
	time (min.)	10	1	1	1	1	1	1	1
	bouts/day	1	10	10	10	7	10	7	10
← Interval 2min. →									
Endurance	speed (m/min.)	30	30	40	40	40	40	40	40
	time (min.)	10	60	30	30	45	60	90	120
	bouts/day	1	1	1	1	1	1	1	1

Sessions: 5days/week

EDL)を摘出し, 右脚の筋は組織化学的分析を, 左脚の筋は生化学的分析を行なった.

1. 組織化学的分析方法

両筋を OCT-compound (Ames 社製) で包埋し, アセトンドライアイスで凍結後, クリオスタット (Bright 社製) を用い, 筋腹部を横断面に約 $10\ \mu\text{m}$ に薄切し, ヘマトキシリン・エオジン染色²⁾, コハク酸脱水素酵素染色¹⁶⁾, およびアクトミオシン ATPase 染色⁸⁾ を施した. 得られた標本の顕微鏡写真を撮影し, Peter et al.¹⁷⁾ の方法に基づき各線維を SO, FOG, FG 線維に分類した. ほぼ筋全体の組織を反映するように, 1mm 四方, 10箇所を選び, 部位ごとの筋線維数, 筋線維平均横断面積, 筋線維タイプ別構成比率を算出した.

2. 生化学的分析方法

クレアチンキナーゼ, 乳酸脱水素酵素, リンゴ酸脱水素酵素 (以下 CK, LDH, MDH) の各酵素活性値の測定は Suominen and Heikkinen の方法²⁰⁾ により行なった. ホスホフルクトキナーゼ活

性値 (以下 PFK) は Shonk and Boxer の方法により¹⁹⁾, コハク酸脱水素酵素活性値 (以下 SDH) の測定は, Cooperstein et al. の方法³⁾ に基づき行なった. 筋を摘出後即座に横断方向に切断し, 完全にホモジナイズした. 次に冷却遠心を行ない, 得られた上清を各方法で測定した. また上清蛋白質の定量は, Lowry et al. の方法¹³⁾ に基づく Eggstein and Kreutz の改良法⁷⁾ により行なった.

III. 実験結果

A. 体重

各群の体重はトレーニング開始1週間後 (5週齢) から E, S群とC群の間に有意な差 ($p < 0.05$) が生じ, この傾向はトレーニング終了時まで継続した (Fig. 1).

B. 筋線維数

トレーニング終了の16週齢の時点において各群の筋線維数を比較した. SOLの筋線維数はC群に比してS群, E群ともに低値を示し ($p < 0.01$),

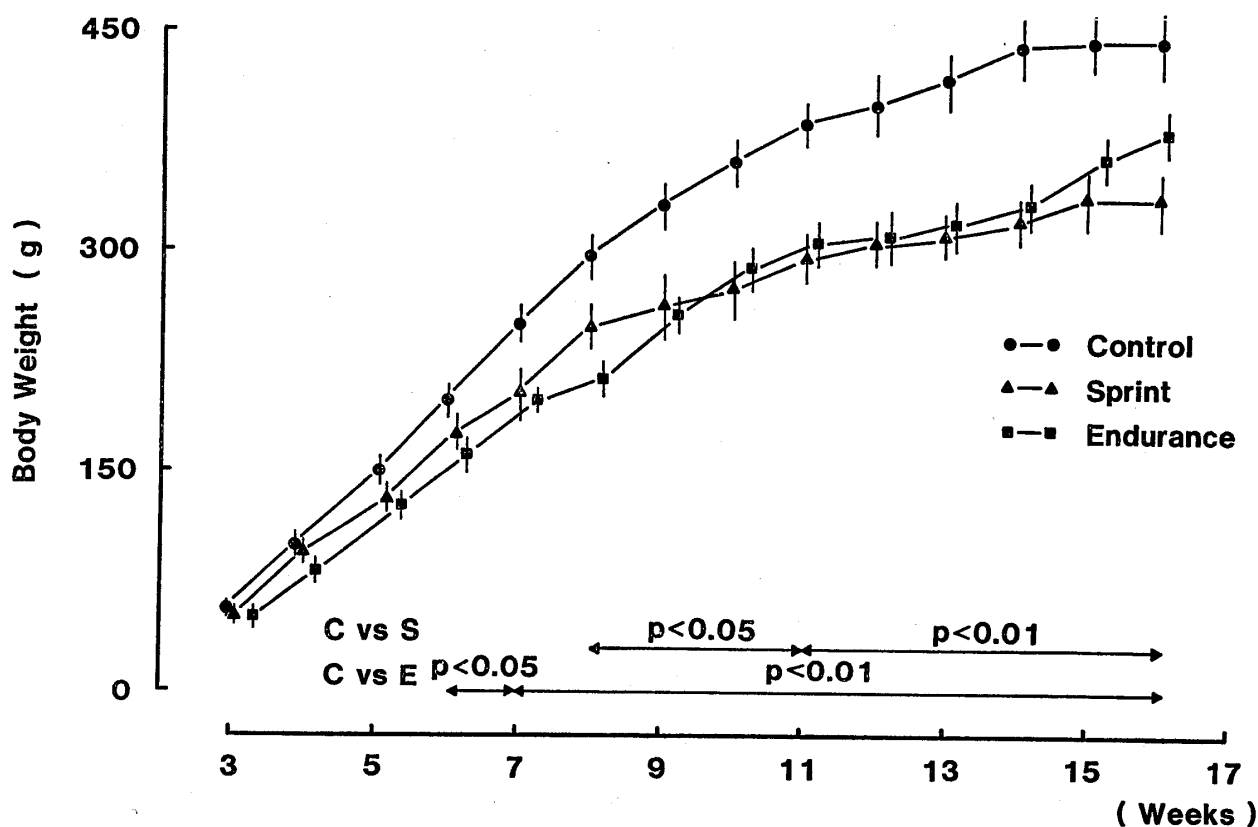


Fig. 1. Development of body weight in endurance, sprint and control groups. Given are means \pm standard deviation.

Table 2. (A) : Comparison of number of muscle fibers (N/mm²) in the Soleus (SOL) and Extensor Digitorum Longus (EDL) muscles. (B) : Comparison of muscle fiber area of each fiber type in the Soleus (SOL) and Extensor Digitorum Longus (EDL) muscles. Given are means±standard deviation.

		Number of muscle fibers (N/mm ²)				
		SOL		EDL		
A	Control	3076±264		3088±140		
	Sprint	2512±216		2588±332		
	Endurance	2440±368		2712±588		
		Muscle fiber cross-sectional area (μm ²)				
		SOL		EDL		
		SO	FOG	SO	FOG	FG
B	Control	931.6 239.4	1188.2 378.8	509.7 173.2	903.5 150.6	989.9 310.2
	Sprint	892.5 245.2	1127.2 402.9	414.9 86.8	1010.4 126.4	1282.4 312.8
	Endurance	1036.5 287.0	1020.6 221.7	548.2 194.6	1304.4 520.4	1703.3 437.5

*p < 0.05
**p < 0.01

EDL においては S 群が C 群に比して有意に低値を示した (p < 0.01). (Table 2, A)

C. 筋線維平均断面積

筋線維平均断面積は、筋線維数と同様 10 箇所 の部位内の線維の平均として Table 2, B に示した。SOL, EDL 両筋とも C 群に比して S, E 群の断面積はすべてのタイプの線維で有意に高値を示した (p < 0.01)。

筋線維タイプ別に比較した場合、SOL の SO 線維、EDL の FG 線維は E 群が他の 2 群に比して有意に高値を示した (p < 0.05, p < 0.01)。EDL の SO 線維においては S 群が他の 2 群に比して有意に低値を示した (p < 0.05)。

D. 筋線維タイプ構成比率

Fig. 2 に SOL, EDL 両筋の各群別筋線維構成比率を示した。SOL では C 群に比して S 群、E 群ともに FOG 線維の構成比率が有意に低値を示した (p < 0.05, p < 0.01)。EDL においては、C 群に比して S 群の FOG 線維が有意に高値を示した

(p < 0.05) のに対し、FG 線維は有意に低値を示した (p < 0.01)。C 群に比して E 群の SO, FOG 線維が高値を示したが、その差は有意なものではなかった。

E. 生化学的分析結果

Fig. 3 に各酵素活性値の動態を各群別に示した。CK は SOL において S 群が他の 2 群に比して有意に低値を示した (p < 0.05)。LDH は SOL において E 群が C, S 群に比して有意に高値を示した (p < 0.05)。PFK は EDL において S 群が、C 群、E 群に比して有意に高値を示した (p < 0.01, p < 0.05)。TCA 回路系酵素の SDH, MDH については E 群の両筋において他の 2 群に比して高値を示した。SDH では、両筋において E, S, C 群の順に高値を示し、MDH は E 群における SOL が C 群、S 群に比して有意に高値を示した (p < 0.05, p < 0.01)。

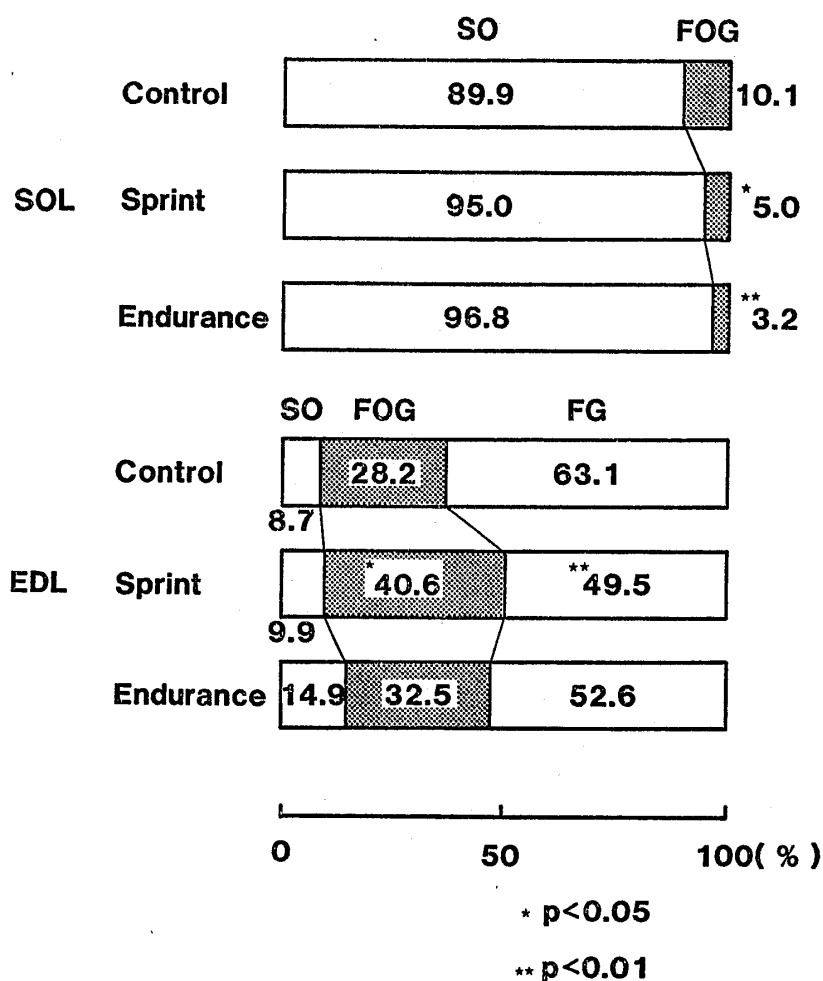


Fig. 2. Percentage of the composition of each fiber type in the Soleus (SOL) and Extensor Digitorum Longus (EDL) muscles. Significant differences from control group values are indicated.

IV. 考 察

トレーニング群において認められた骨格筋線維の肥大傾向は筋線維タイプ別にみて必ずしも一様のもではなかった。しかし、E群の SOL では持久的運動に適している SO 線維が、また S群の EDL では瞬発的運動に適している FG 線維がそれぞれ C群に比して有意な肥大を示した。これは Edgerton et al.⁵⁾⁶⁾ が報告しているようにトレーニングの種類・強度の相違に基づく骨格筋線維の選択的利用の可能性を示唆するものである。

骨格筋線維タイプの移行に関しては過去に多くの研究報告がなされている⁴⁾¹²⁾¹⁸⁾。

Luginbuhl et al.¹⁴⁾ は強度の異なる走行トレーニングをラットに行なわせた結果、下肢骨格筋線

維タイプ構成比率に顕著な変化が認められたことより、筋線維タイプ移行の可能性が示唆されたことと報告している。本研究においても、走行トレーニングにより下肢骨格筋の筋線維タイプ構成比率が有意に変化した。

しかし過去の多くの研究と同様にその分析法上、トレーニング期間のある一時点の筋線維タイプ構成比率の変化から、すべての筋線維が Jansson et al.¹¹⁾ の提唱する筋線維タイプ移行モデルの一過程にあると判断することは問題点が多いと思われる。

Benzi et al.¹⁾ は骨格筋線維のトレーニングに対する適応の過程を細胞内のミトコンドリア内酵素の動態から三段階に分類し報告している。その最終段階においては、ミトコンドリア内酵素である

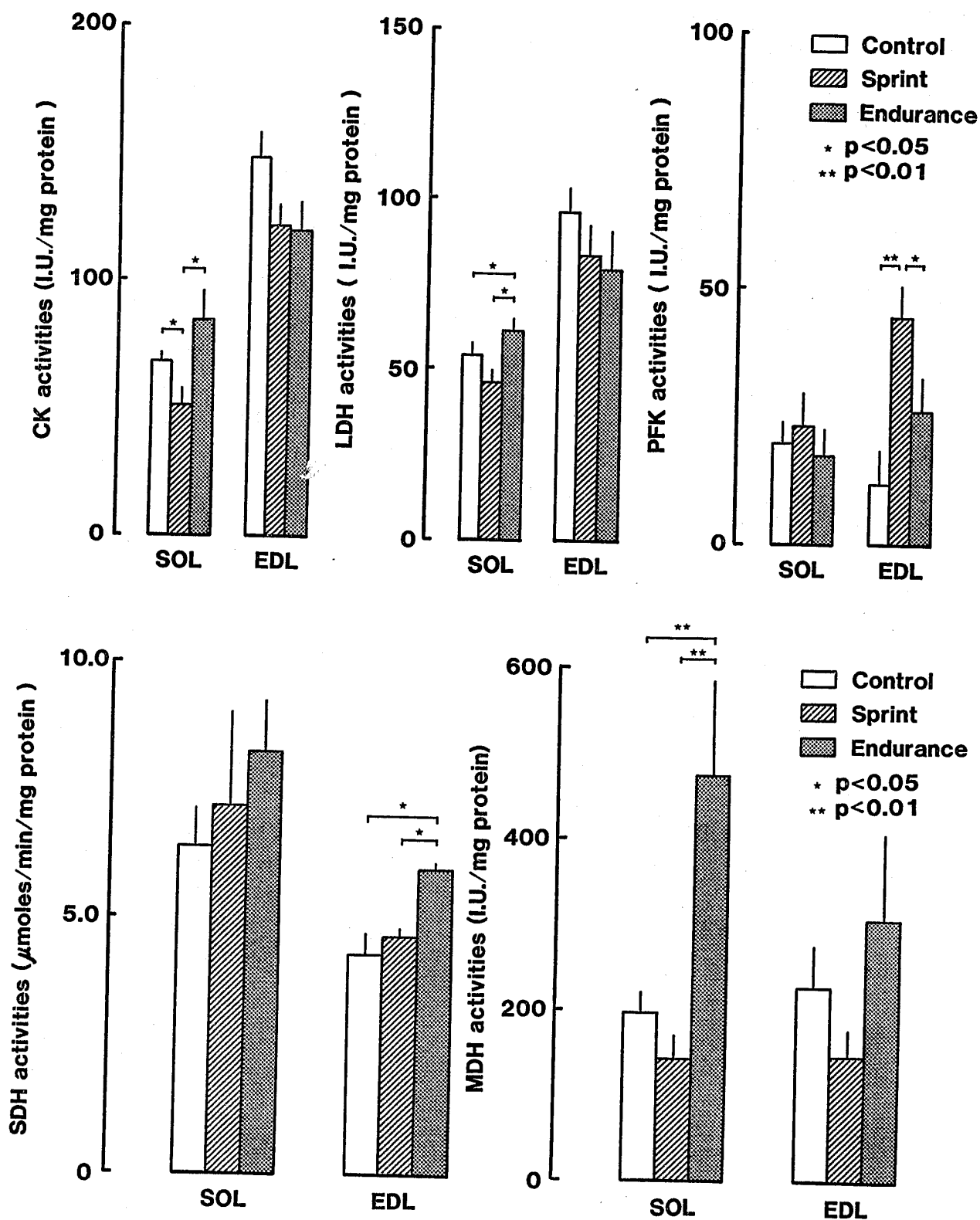


Fig. 3. Comparison of glycolytic and oxidative enzyme activities in the Soleus (SOL) and Extensor Digitorum Longus (EDL) muscles. Activities are given as means with standard deviation.

TCA 関連酵素がトレーニング前に比して有意に高いレベルで定常状態を示し, 解糖系酵素である LDH は有意に低値を示すとしている. この理由として, 細胞内ピルビン酸の蓄積によりグルタミン酸-ピルビン酸変換酵素が活性化され, さらに 2-ケトグルタル酸を生成し, これが 2-ケトグルタル酸脱水素酵素により代謝される結果であろうと説明している. 本研究でのトレーニング群における LDH の低下も同様の機序によるものと考えられる. 解糖系律速酵素である PFK は S 群に, TCA 回路系酵素である SDH, MDH は E 群にそれぞれ高値が認められた. 生化学的見地に立てば SOL, EDL 両筋ともに分回のトレーニングに適応した状態であると考えられる.

収縮エネルギー獲得反応を触媒する酵素活性値と筋線維タイプ構成比率の両面から今回の結果を検討した場合, S 群においては速筋線維タイプの構成比率増加が期待される SOL の筋線維タイプ構成比率では必ずしも FOG 線維の構成比率増加は認められなかった. しかし酵素活性値の動態からは, LDH の減少, PFK の上昇にトレーニングの効果が認められた. EDL の構成比率では FOG 線維の比率が増加し, PFK の有意な上昇が認められた. E 群においては遅筋線維タイプの構成比増加が期待されるが, SOL で SO 線維に有意な増加が認められた. EDL においても SO, FOG 線維に増加が認められたが, その差は有意ではなかった. しかし生化学的には SDH, MDH の顕著な増大が認められた.

酵素活性の動態に依存する組織染色法においては, 酵素が反応する一定閾値以下あるいは以上の酵素活性値の高低の判別は不可能である. またタイプの異なる線維をまとめて分析する生化学的分析法は, トレーニングにより異なる酵素活性の動態を示すであろう個々の筋線維をその総和としてしか測定することができない. しかしそれぞれの方法の問題点は両方法を同時に行なうことによりおぎなえとえられる.

組織染色法による線維数, 筋線維タイプ別平均横断面積, 構成比率から見るとトレーニング強度に伴うタイプ別の特異的变化を知ることがで

き, 酵素活性の動態からは筋の全般的なトレーニングの影響であり, 染色法で判別不可能な内在的变化を知ることができたと考える.

以上, 組織化学, 生化学的両方法による測定結果の相互関係の検討はトレーニング効果を検討する上で有効な手段であると考えられる.

V. 結 語

組織化学, 生化学的方法を用い骨格筋線維のトレーニングによる変化を検討した.

Wistar 系雄性ラットを対象とし Sprint トレーニングおよび Endurance トレーニングを行なわせ, SOL ならびに EDL を被検筋とし筋線維タイプ構成比率の変化, 酵素活性値の測定を行ない以下に示す知見を得た.

1. 筋線維平均断面積はコントロール群に比してトレーニング群で有意に高値を示した.

筋線維タイプ別に見た場合, E 群の SOL 中の SO 線維に他の 2 群に比して有意な増加が, S 群の EDL 中の SO 線維に有意な低下が認められた.

2. 筋線維タイプ別構成比率は SOL の FOG 線維が C, S, E 群の順に高値を示した.

EDL の FOG 線維が C 群に比して S 群で高値を示したが, FG 線維は低値を示した.

3. 酵素活性の動態では, EDL, SOL 両筋ともに S 群において解糖系酵素である PFK に, E 群において TCA 回路系酵素である SDH, MDH に C 群と比して有意な増大が認められた.

以上のような結果より, 組織染色により得られた筋線維構成比率からは筋線維タイプ別のトレーニングの影響を知ることができ, さらに生化学的方法により得られた酵素活性値の動態からは筋全般的かつ内在的なトレーニングの影響を知ることができた.

(受付 昭和60年4月2日)

文 献

- 1) Benzi, G., Panceri, P., Bernadi, M. D., Villa, R., Arcelli, E., D'Angelo, L., Arrigoni, E. and Berte, F. (1975): Mitochondrial enzymatic adaptation of skeletal muscle to endurance training. *J. Appl.*

- Physiol., **38**, 565-569.
- 2) Brumback, R. A. and Leach, R. W.(1984) : Color atlas of muscle histochemistry. PSG Publishing Company, INC., Littleton, Masachusetts, **13**.
 - 3) Cooperstein, S. T., Lazorow, A. and Kurfess, N. J. (1950) : A microspectrophotometric method for determination of succinate dehydrogenase. J. Biol. Chem., **186**, 129-139.
 - 4) Dhoot, G. K., Perry, S. V. and Vrvova, G.(1981) : Changes in the distribution of the components of the troponin complex in muscle fibers after cross-innervation. Exp. Neurol., **72**, 510-513.
 - 5) Edgerton, V. R. (1970) : Morphology and histochemistry of the soleus muscle from normal and exercised rat's. Am. J. Anat., **127**, 81-88.
 - 6) Edgerton, V. R., Gerchman, L. and Carrow, R. (1969) : Histochemical changes in rat skeletal muscle after exercise. Exp. Neurol., **24**, 110-123.
 - 7) Eggstein, M. and Kreutz, F. H.(1955) : Vergeleichende Untersuchungen zur Quantitativen Eiweissleistung im Liquor und Eiweissarmen Lösungen. Klin. Wochschr., **33**, 879-884.
 - 8) Guth, L. and Samaha, F. J.(1970) : Procedure for the Histochemical demonstration of actomyosin ATPase. Exp. Neurol., **28**, 365-367.
 - 9) Holloszy, J. O. and Booth, F. W.(1976) : Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. Annu. Rev. Physiol., **38**, 273-291.
 - 10) Holloszy, J. O. and Oscai, L. B.(1969) : Effects of exercise on α -glycerophosphate dehydrogenase activity in skeletal muscle. Arch. Biochem. Biophys., **130**, 653-656.
 - 11) Jansson, E., Sjodin, B. and Tesch, P. (1978) : Changes in muscle fiber type distribution in man after physical training. A sign of fiber type transformation? Acta Physiol. Scand., **104**, 235-237.
 - 12) Jolestz, F. and Srater, F. A. (1981) : Development, innervation and activity pattern induced changes in skeletal muscle. Nature, **247**, 135-139.
 - 13) Lowry, O. H., Rowebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.(1951) : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
 - 14) Luginbuhl, A. J., Dubley, G. A. and Staron, R. S. (1984) : Fiber type changes in rat skeletal muscle after intense interval training. Histochem., **81**, 55-58.
 - 15) Muttér, D. O., Priest, R. E. and Fuller, E. O. (1981) : Endurance training in the rat I. Myocardial mechanism and biochemistry. J. Appl. Physiol., **51**, 934-940.
 - 16) Nachlas, M. M., Tsou, K. C., Souza, E. D., Cheng, C. S. and Seligman, A. M.(1957) : Cytochemical demonstration of succinate dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substitute diterrazole. J. Histochem. Cytochem., **5**, 420-436.
 - 17) Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A. and Stempel, K. E. (1972) : Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle guinea pig and rabbits. Biochemistry, **11**, 2627-2633.
 - 18) Riedy, M., MatobaH., Vollestad, N. K., Pakley, C. R., Blank, S., Hermansen, L. and Gollnick, P. D. (1984) : Influence of exercise on the fiber composition of skeletal muscle. Histochemistry, **80**, 553-557.
 - 19) Shock, C. E. and Boxer, G. E. (1950) : Enzyme patterns in human tissue I. Methods of the determination of glycolytic enzymes. Cancer Res., **24**, 709-721.
 - 20) Suominen, H. and Heikkinen, E.(1975) : Enzyme activities in muscle and connective tissue of M. Vastus Lateralis in habitually and sedentary 33 to 70-year-old men. Eur. J. Appl. Physiol. **34**, 249-254.
 - 21) Thorstensson, A., Sjodin, B. and Korlsson, J. (1975) : Enzyme activities and muscle strength after sprint training in man. Physiol. Scand., **94**, 313-318.