

クレンブテロール投与が内側腓腹筋の萎縮からの回復に及ぼす影響

木村 颯

Effect of clenbuterol administration on recovery of atrophied medial gastrocnemius muscle

Hayate KIMURA

I 緒言

骨格筋は可塑性に優れ、筋力トレーニングなどの刺激に応答して肥大する一方で、ギプス固定などの筋活動量の低下に応答して短期間で萎縮が生じる¹⁾。特に抗重力筋である下肢の骨格筋は、寝たきりや固定などの筋の不使用による影響を大きく受けやすい²⁾。また、萎縮した筋は、その高い可塑性により再負荷により元に戻ろうとする³⁾。怪我などの臨床的治療として行われるギプス固定は筋萎縮を生じさせ、ギプス解放後に筋が元に戻ろうとするのは、その例であるが、治療後に早期にスポーツ現場や社会復帰するためには、より早い回復が望まれる。

骨格筋は、筋収縮速度は遅いが酸化系能力に優れたタイプ I 線維、筋収縮速度は速く、解糖系能力に優れるが疲労しやすいタイプ II 線維、そして、それらの中間型であるタイプ I + II 線維に分類される。さらに、どのタイプの筋線維がその筋を構成するかにより遅筋か速筋かが決定される。一方で、不活動などによる筋線維の萎縮の程度はタイプ II 線維に比べタイプ I 線維で大きいこと⁴⁾、慢性的な筋萎縮は酸化系酵素活性を低下させることが報告されている⁵⁾⁶⁾。したがって、筋萎縮やその後の回復を考える際、その機能回復の観点から筋線維横断面積だけではなく、代謝の変化も併せて検討する必要がある。

クレンブテロール(CLE)は、喘息薬として臨床的に使用されている β_2 -アゴニストであり、筋タンパク質合成の亢進および分解の抑制により骨格筋の肥大を誘発する筋肉増強剤でもある⁷⁾。また、その肥大効果は速筋に選択的に作用すること⁸⁾、さらに、ギプス固定中の CLE 投与による筋萎縮の抑制効果は筋線維タイプによって異なることが報告されている⁹⁾。

そこで、本研究ではラットの後肢骨格筋にギプス固定を施し、萎縮後の骨格筋の回復時に CLE 投与を行った場合、回復にどのような作用を及ぼすのかを

筋線維の横断面積と代謝酵素活性について検討した。

II 方法

(1) ギプス固定, CLE 投与方法

実験には生後 7 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットを 28 匹使用した。ラットは 1 週間の予備飼育後、9 日間のギプス固定を行うギプス固定群(IMM 群)、その対照群(CON 群)、ギプス固定後に 14 日間の通常飼育を行う回復群(R-CON 群)、同じく続く 14 日間の回復期間に CLE を投与する回復群(R-CLE 群)の 4 群に分けた。ギプス固定は足関節角度が底屈 0 度になるように包帯式ギプスを用いて固定した。CLE は 1.0mg/kg/day で皮下投与を行い、R-CON 群には CLE と等量の生理食塩水を投与した。IMM 群は 9 日間の固定期間後に CON 群と共に筋を摘出し、R-CON 群と R-CLE 群は回復期間後に筋を摘出した(図 1)。被験筋は内側腓腹筋(MG)とした。ラットは体重測定後、麻酔下にて断頭屠殺し筋を摘出した。筋は筋湿重量を秤量後、液体窒素で冷却し

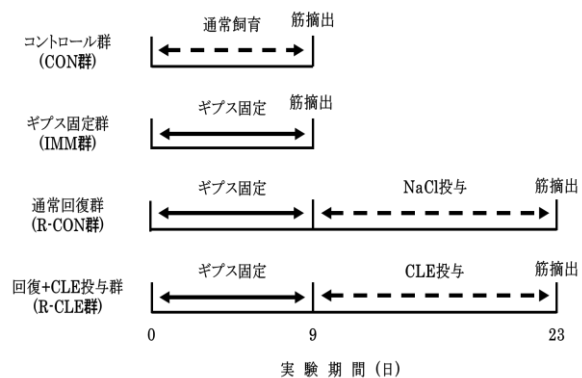


図 1 実験期間と群分け

たインペンタン中にて急速凍結し、組織化学的分析を行うまで -80°C で保存した。

(2) 組織化学染色

MG の筋腹部から厚さ $10\mu\text{m}$ の連続切片を作成し、免疫抗体染色、コハク酸脱水素酵素(SDH:酸化系能力の指標)染色、グリセロリン酸脱水素酵素(GPD:解糖系能力の指標)染色を行った。それぞれの染色

標本は光学顕微鏡で 400 倍に拡大し、画像を接続した CCD カメラを介してパソコンに取り込んだ。タイプ分類は、中村ら¹⁰⁾の方法に従い、内側腓腹筋の近位部(proximal)と遠位部(distal)に相当するそれぞれの部位において、隣接した少なくとも 150 本以上の筋線維について行った。筋線維のタイプ分けは、抗 slow myosin に陽性反応を示すタイプ I 線維、抗 fast myosin に陽性反応を示すタイプ II 線維、抗 slow myosin と抗 fast myosin の双方に陽性反応を示すタイプ I + II 線維に分類した。染色画像は、画像処理ソフト(ImageJ ; NIH)を用いて筋線維の外周を囲み、筋線維横断面積を計測した。筋線維の横断面積は同時に取り込んだマイクロスケールを用いて μm^2 に換算した。筋線維の SDH 活性と GPD 活性は、染色画像と同時に取り込んだステップタブレット(Kodak ; 405ST146)の濃度を用いて、平均染色濃度を光学的濃度値(O.D.)に変換した。

(3) 統計処理

各群の測定値の平均と標準偏差を算出し、多重比較には Fisher's PLSD 法を用いた。なお、全ての検定において有意水準は 5%未満($p < 0.05$)とした。

III 結果および考察

(1) 筋重量および相対的筋重量(図 2)

ギプス固定により筋重量および相対的筋重量は有意に低下した。これは、固定による筋萎縮を報告している先の研究と同様の結果であった¹¹⁾。この筋萎縮は不活動による筋タンパク質合成の低下、筋タンパク質分解の亢進によるものと考えられた⁷⁾¹²⁾。

ギプス解放後 14 日目の R-CON 群の筋重量は IMM 群に比べて有意に高値を示し、不活動状態による筋萎縮後の再負荷での回復が観察された。しかし、相対的筋重量において CON 群に比べて有意に低値を示したことから、ギプス固定による筋萎縮は 14 日間の回復期間では十分な筋タンパク質の回復には至っていない可能性が考えられた。

R-CLE 群の筋重量は、R-CON 群より高値を示し、CLE 投与による回復促進作用が認められた。CLE は遅筋に比べて速筋に選択的に作用すると報告されており⁷⁾、被験筋である MG も速筋であることから、CLE の同化作用がこの筋に回復促進の作用を及ぼ

したと考えられた。さらに、相対的筋重量において CON 群との違いがなかったことから、明らかに筋タ

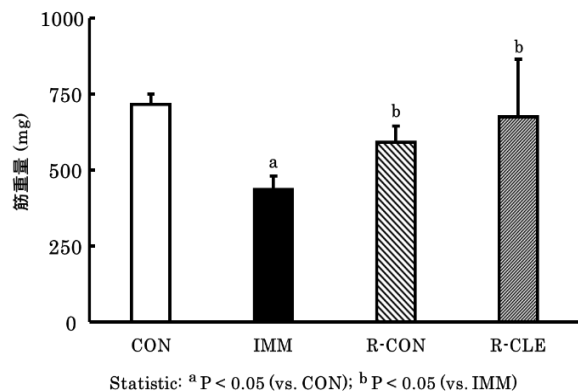


図 2 MG の筋重量

ンパク質合成の亢進にともなう回復の促進作用があったと考えられた。

(2) 筋線維横断面積(図 3)

ギプス固定により CON 群に比べて近位部のタイプ I 線維およびタイプ I + II 線維が有意に低値を示したが、タイプ II 線維では違いはなく、固定による不活動の影響は slow myosin を含む遅筋線維で大きかった。通常状態では抗重量筋としての貢献が速筋線維に比べて遅筋線維でより高いため⁵⁾⁶⁾¹³⁾、その負荷が失われたために slow myosin を含む遅筋線維でその影響がより大きく現れたと考えられた。また、遠位部ではタイプ II 線維が有意に低値を示した。これは固定時の筋の状態が関係していた可能性がある。一般的に短縮位での筋の固定は伸長位での固定に比べて筋萎縮の程度が大きいことが報告されており¹⁷⁾、本研究で用いた固定方法では近位部と比べて遠位部がより短縮された状態で固定されていた可能性が考えられた。

14 日間の回復期間後の近位部において、タイプ I 線維は CON 群に比べて有意に低値を示したままだったが、タイプ I + II 線維およびタイプ II 線維では CON 群と同等の値を示した。また、遠位部のタイプ II 線維でも同様の変化がみられた。これは固定により萎縮した筋では、不活動からの急激な再負荷が過負荷になり、タイプ I 線維に比べてより大きな張力発揮を有するタイプ I + II 線維およびタイプ II 線維の動員が優先的に行われた可能性があることが考えられた。

回復期に CLE を投与した場合、近位部の筋線維

はすべてのタイプで IMM 群に比べて有意に高値を示し、また R-CON 群に比べても高値を示した。これらは、CLE による回復促進作用を示していた。しかし、これらの結果は、CLE は速筋線維に選択的に作用するという先行研究とは異なり、遅筋線維にも作用していた。後肢懸垂での無負荷により、萎縮した主にタイプ I 線維で構成されているヒラメ筋のアドレナリン受容体の感受性が高まるという報告がされている¹⁴⁾。本研究においても先の研究と同様にギプス固定によりタイプ I 線維でアドレナリン受容体の感受性が亢進し、CLE の同化作用が現れ、回復が促進された可能性が考えられた。しかしながら、遠位部のタイプ II 線維では CLE の回復促進作用がみられなかった。この理由は明らかではないが、同じタイプ II 線維でも、アドレナリン受容体の密度が異なっていたり、負荷刺激に対する受容体の感受性応答も異なる可能性が考えられた。

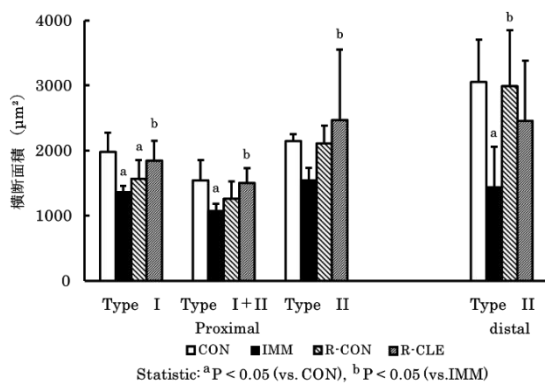


図 3 タイプ別の筋線維横断面積

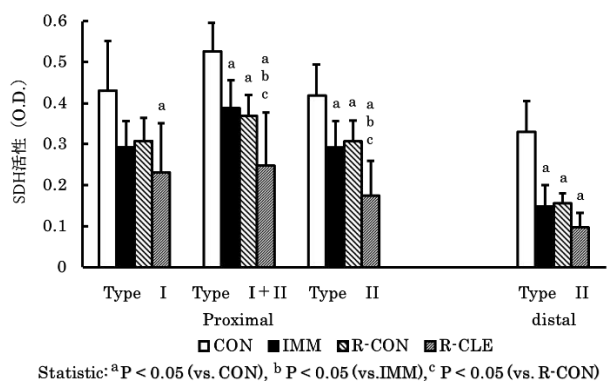
(3) 筋線維 SDH 活性(図 4)

ギプス固定により近位部と遠位部のすべてのタイプの筋線維の SDH 活性は CON 群に比べて低値を示した。これは不活動は骨格筋細胞の代謝活性を変化させ、酸化系酵素活性の低下を起こすという先の研究と同様であった⁵⁾¹⁵⁾。

ギプス解放後の回復期間で近位部と遠位部のすべてのタイプの筋線維の SDH 活性は IMM 群と変わりがなく、再負荷が筋線維の酸化系代謝をあまり刺激していないことが考えられた。これは再負荷が通常状態と異なり筋にとって高負荷の刺激になったことで代謝が解糖系依存となり酸化系代謝が刺激されなかった可能性が考えられた。また、本研究で採用した 2 週間の回復期間は、筋線維の酸化系能力

の回復を捉えるのには短かった可能性も考えられた。

回復期に CLE を投与した場合、近位部と遠位部のすべてのタイプの筋線維の SDH 活性は R-CON 群より低値を示した。CLE は筋を速筋化すると報告されており¹⁶⁾、そのために酸化系の代謝が抑制された可能性が考えられた。遠位部のタイプ II 線維の SDH 活性は、近位部のタイプ II 線維とほぼ同様の傾向を示したが、全体的に低値を示した。これは遠位部の筋線維の GPD 活性が近位部に比べて高かったことに関係していると考えられた。



(4) 筋線維 GPD 活性(図 5)

図 4 筋線維タイプ別の SDH 活性

近位部の筋線維の GPD 活性はすべてのタイプで固定、回復、CLE 投与による変化は観察されなかった。また、遠位部のタイプ II 線維の GPD 活性は CLE 投与により CON 群より低値を示したが、ほぼ近位部の筋線維 GPD 活性とほぼ同様だった。これらの結果から解糖系の代謝能力は、酸化系の代謝能力に比べて活動の変化や CLE の影響を受けにくいと考えられた。

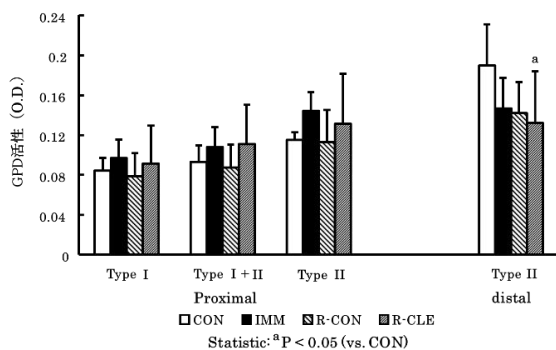


図 5 筋線維タイプ別の GPD 活性

以上から、CLE 投与は萎縮した内側腓腹筋の回復を促進することが明らかとなった。しかしながら、

回復の促進作用は同じ筋線維であっても筋内部位で異なることが示唆された。

参考文献

- 1) 河合美菜子, 宮田浩文. 骨格筋の可塑性と筋核ドメインの多様. 体力科学 62(3):189-198, 2013
- 2) Oishi Y, Ogata T, Yamamoto K-I, Terada M, Ohira T, Taniguchi K, Ryo RR. Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading. Acta Physiol. 192(3):381-395, 2008
- 3) Fujita N, Arakawa T, Matsubara T, Ando H, Miki A. Influence of fixed muscle length and contractile properties on atrophy and subsequent recovery in the soleus and plantaris muscle. Arch Histol Cytol. 72(3):151-163, 2009
- 4) 大石康晴. 不活動と筋の適応;運動と筋の化学: 93-103, 2000
- 5) Ishihara A, Oishi Y, Roy RR, Edgerton VR. Influence of two weeks of non-weight bearing on rat soleus motoneurons and muscle fibers. Aviat. Space Environ. Med. 68:421-425, 1997
- 6) Ishihara A, Kawano F, Ishioka N, Oishi H, Higasibata A, Shimazu T, Ohira Y. Effects of running exercise during recovery from hindlimb unloading on soleus muscle fibers and their spinal motoneurons in rat. Neurosci. Res. 48:119-127, 2004
- 7) Lynch GS, Ryall JG. Role of β -adrenoceptor signaling in skeletal muscle; implications for muscle wasting and disease. Physiol. Rev. 88:729-767, 2008
- 8) 北浦孝. 骨格筋肥大と β 2-agonistとの関連, 体力科学 54:57-58, 2005
- 9) 竹村康, 伊藤大悟. ラット後肢骨格筋の萎縮回復時におけるクレンブテロール投与の影響. 愛知教育大学卒業論文, 2015
- 10) 中村和誉, 幸篤武, 辻本直弥, 春日規克, 鈴木英樹. ラット内側腓腹筋における異なる部位での形態および組織化学的酵素活性の適応変化. 東海保健体育科学. 28:11-19, 2006
- 11) Emilie V, Audrey C, Agnes C, Julien A, Anne L, Daniel B, Daniel T, Dominique D, Didier A, Lydie C. The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. Am J Physiol Endocrinol Metab. 295:1181-1190, 2008
- 12) Sato S, Suzuki H, Tsujimoto H, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Casted-immobilization downregulates glucocorticoid receptor expression in rat slow-twitch soleus muscle. Life Sciences. 89:962-967, 2011
- 13) 河野史倫, 増澤諒. 宇宙医学から学ぶ抗重力筋の重要性. 整形・災害外科. 62(6):757-761, 2019
- 14) 佐藤章悟, 野村幸子, 河野風云, 谷端淳, 立屋敷かおる, 今泉和彦. β 2-アゴニスト・クレンブテロールによるラット骨格筋・心筋における β -アドレナリン受容体 mRNA 発現への影響. 体力科学. 57(6):974, 2008
- 15) 藤野英己, 上月久治, 武田功, 笹井宣昌, 村上慎一郎, 村田伸, 石井禎基, 松永秀俊, 石原昭彦, 梶谷文彦. 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. 23(2):203-208, 2008
- 16) Dodd SL, Power SK, Vrabas IS, Criswell D, Stetson S, Hussain R. Effect of clenbuterol on contractile and biochemical properties of skeletal muscle. Med. Sci. Sports Exerc. 28:669-676, 1996
- 17) Jarvinen MJ, Einola SA, Virtanen EO. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle. Arch Phys Med Rehabil. 73(3):253-257, 1992

(指導教員 鈴木 英樹)