

ラット内側腓腹筋における異なる部位の 形態的・組織化学的適応変化 —ギプス固定による骨格筋萎縮初期での検討—

鈴木 英樹* 辻本 尚弥**

*保健体育講座

**久留米大学 健康・スポーツ科学センター

Morphological and Histochemical Adaptation on Different Compartments in the Rat Medial Gastrocnemius Muscle —Examination in the Early Phase of Skeletal Muscle Atrophy Caused by Cast-immobilization—

Hideki SUZUKI* and Hisaya TSUJIMOTO**

*Department of Health and Physical Education, Aichi University of Education, Kariya 448-8542, Japan

**The Institute of Health and Sports Science, Kurume University, Kurume 839-8502, Japan

Abstract

Rat medial gastrocnemius (MG) muscle is a compartmentalized muscle: two extramuscular nerve branches innervate proximal or distal compartments. The purpose of this study was to investigate adaptive responses of different compartments on the rat MG muscle in the early phase of skeletal muscle atrophy caused by one-week cast-immobilization. Cross sectional area (CSA) of each typed fiber in individual compartments were determined. CSA of each typed fiber in both compartments were decreased by cast-immobilization. CSA of type IIa and IIc fibers in the proximal compartment were more atrophied in the distal compartment.

These results suggested that the degree of atrophy for each typed muscle fiber between different compartments was not similar in the early phase of atrophy caused by cast-immobilization.

I 緒 言

ラット内側腓腹筋には2本の運動神経枝が入り込み、それぞれの神経枝は筋内の異なる部位の筋線維を支配している。また、それらの部位は組織化学的特性や生理学的特性も異なると報告されている^{4,5,6,13)}。先に我々はこれらの異なる部位の適応変化を観察するために、ラットに持久性運動を負荷し、両部位における筋線維の組織化学的適応変化を調べた。その結果、走運動に対する適応は、組織化学的に同タイプの筋線維であっても、存在する部位の違いにより、その適応変化が異なることが観察された¹¹⁾。

実験動物に対する後肢の固定は、筋を不活動状態にして筋萎縮を引き起こす。下肢のギプス固定は後肢懸垂とならび筋萎縮モデルとして広範な研究がなされて

いる。これまで固定による萎縮率に関しては、速筋線維に比べて遅筋線維で高いとする報告が多い¹²⁾。これらの理由としては、遅筋は速筋に比べて姿勢維持など持続的に収縮活動を行っているため、不活動の影響をより強く受けるためと考えられている⁹⁾。

内側腓腹筋は典型的な速筋であるが、前述した神経由来で部位を分けた場合に、近位部では遅筋線維がみられるが遠位部にはみられない。さらに、これらの部位では運動に対する適応変化も異なる¹¹⁾。これらのことから、固定等の不活動に対する筋萎縮の変化も、内側腓腹筋の近位と遠位の両部位間では異なることが推測される。

そこで、本研究では不活動に対する内側腓腹筋における異なる部位での組織化学的筋線維タイプの適応変化を明らかにすることを目的とした。今回は、下肢の

ギプス固定を用いて、筋萎縮の顕著な不活動初期の変化を検討した。

II 方法

本実験の手順および実験動物の取り扱いについては「実験動物の飼育および保管等に関する基準」⁸⁾に沿って行った。

実験動物として14週齢のFischer 344系雌ラットを用い、飼育は室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、昼夜逆転12時間の明暗サイクルの環境下にて一週間の予備飼育を行った。飼料は固形飼料CE-2（日本クレア株式会社）を用い、飲水ともに24時間自由摂取とした。予備飼育後の15週齢時に、群間の体重の平均が等しくなるように15週齢対照群、16週齢対照群および16週齢固定群の3群（各群 $n=5$ ）に分けた。

ギプス群にはBoothとKelseo³⁾の方法に従い、一週間の後肢の固定を行った。後肢の固定は、ペントバルビタール麻酔下（50 mg/kg）にて、弛緩した状態で後肢の膝関節と足関節に包帯式ギプス（スコットキャスト：3M社）を用いて行った。対照群には固定群と同様に麻酔を施しただけで、後は通常飼育を行った。固定開始前の15週齢時に15週齢対照群を、固定一週間後の16週齢時に16週齢対照群と16週齢固定群を断頭屠殺しMGを摘出した（Fig. 1）。摘出した筋は冷却したイソペンタン中にて急速凍結し、分析まで -80°C で冷凍保存した。

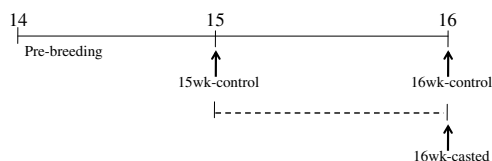
その後、MGの筋長軸の中央部より連続横断切片を作成し、組織染色を行った。染色は、連続切片にpH4.6とpH10.2のプレインキュベーションを用いたATPase染色を施し、筋線維の分析は、我々の先の報告¹¹⁾に従い、MGの神経由来の近位と遠位部にあたる部位について行った。筋線維のタイプ分類は、Gorza⁷⁾の方法に従いI、IIA、IIDおよびIIBに分類した。

各測定値は群ごとに平均値、標準偏差を求め、統計学的な検定を行った。体重、筋重量では、一要因の分散分析にて検定し、有意な差が見られた場合には統計量をt値とするRyan法を用いた。筋線維タイプごとの

* Fischer 344 female rat; 15 wk of age

* Group; 15wk-control group
16wk-control and 16wk-casted groups

* Life time (wk)



* Measurement

Fiber identification: Myosin ATPase staining (pH4.6, 10.2)
—————> Type I, IIA, IID, IIB
(Cross-sectional area)

Fig. 1. Experimental schedule

筋横断面積は、全群間の差を二要因（実験条件×部位）の分散分析にて検定した。それぞれの分散分析では、主効果が有意となった場合の多重比較と交互作用が有意となった場合の単純主効果の検定における多重比較に、統計量をt値とするRyan法を用いた。全ての検定において有意水準は5%（ $p<0.05$ ）とした¹⁰⁾。

III 結果

1. 体重および組織重量の変化

Table 1に各群の体重、筋重量および相対的筋重量を示した。一週間の不活動後、体重と筋重量は不活動開始前および同週齢の対照群に比べてそれぞれ有意に低い値を示した。相対的筋重量は不活動により低値を示したが、同週齢の対照群との間で有意差は認められなかった。

2. 筋線維横断面積の変化

Table 2に各群の筋線維横断面積を示した。不活動一週間後の近位部の筋線維横断面積は、いずれのタイプ（I, IIA, IIB, IID）の筋線維も、不活動開始前および同週齢の対照群に比べて有意に低値を示した。遠位部のタイプIIBとIIDの筋線維横断面積は、不活動一週間後タイプIIB線維のみが有意に低値を示した。

Table 1. Body weight, muscle weight and relative muscle weight in each group

	15 weeks	16 weeks	
	Control	Control	Casted
Body weight (g)	170±4	166±4	142±2 ^{ab}
MG weight (mg)	337±7	331±5	263±10 ^{ab}
Relative MG weight (mg/100g B.W.)	198±3	200±8	186±6

Values are mean ±S.E. MG: Medial gastrocnemius muscle
a; Significantly different from the 15wk-control group ($p<0.05$)
b; Significantly different from the 16wk-control group ($p<0.05$)

Table 2. Cross-sectional area in each typed fiber of medial gastrocnemius muscle

	15 weeks	16 weeks	
	Control	Control	Casted
Proximal portion			
Type I fiber	1728±76	1677±132	1205±145 ^{ab}
Type IIA fiber	1397±69	1362±25	1075±87 ^{ab}
Type IID fiber	1596±54	1558±43	1165±104 ^{ab}
Type IIB fiber	1839±99	1860±100	1226±102 ^{ab}
Distal portion			
Type IID fiber	1453±67	1462±117	1138±179
Type IIB fiber	2620±126	2816±205	1992±263 ^{ab}

Values are mean ±S.E.
a; Significantly different from the 15wk-control group ($p<0.05$)
b; Significantly different from the 16wk-control group ($p<0.05$)

IV 考察

本研究では不活動に対する内側腓腹筋における異なる部位での筋線維の適応変化を調べた。その結果、遠位部のタイプII_dを除く両部位のいずれのタイプの筋線維も萎縮が観察された。

本研究における固定群の筋重量は、同週齢の対照群に比べて20.5%の低値を示した。ラットやウサギを用いた10日間から8週間の固定実験では15から70%の筋重量の低下が報告されている¹²⁾。本研究の固定期間は一週間であるにも関わらず、それらの報告と同等の筋重量の低下が起こっていた。このことは、本研究で採用した固定方法は筋萎縮を引き起こすのに十分な条件であったと考えられた。しかし、萎縮の評価として用いられている相対的筋重量は、固定群が同週齢の対照群に比べて低値を示したものの有意差は認められなかった。これは、本研究ではペアフィーディング等の方法による摂餌量の調整を行っていない。そのため、固定群で摂餌量が少なく、体重が対照群に比べて低かったためと考えられた。

近位部のタイプII線維の筋線維横断面積は21.1から34.1%の萎縮を示した。遅筋線維であるタイプI線維の萎縮は28.1%であり、タイプII線維との違いはみられなかった。固定による筋線維の萎縮を観察した多くの研究は、速筋線維に比べて遅筋線維で萎縮の程度が大きいことを報告している¹²⁾。筋線維の萎縮の程度は固定期間、固定時の筋長、筋の種類等によって異なることから¹⁾、先の研究と本研究の結果の違いはこれらの要因によると考えられたが、その詳細は明らかではない。

本研究における近位部と遠位部のタイプII_b線維は共に萎縮したが、その萎縮の程度は遠位部に比べて近位部の筋線維が若干大きかった。MGの支配神経由来のそれぞれの部位は生理学的特性と組織化学的特性から、近位部は持続的な活動を、遠位部は相同的な活動を担っていると考えられている^{4,5)}。本研究においても、報告された生理学的特性を支持するように、遠位部に比べて近位部で持続的な収縮能力に優れたタイプの筋線維の割合が高かった。姿勢維持など持続的に張力を発揮するタイプの筋線維の方が不活動の影響を受けやすいことが知られている²⁾。このことから、本研究において、不活動によるタイプII線維の萎縮が近位部で大きかったことはそれぞれの部位の動員と関係があり、同じタイプの筋線維でも局在する部位に萎縮の程度は依存している可能性が考えられた。

以上のことから、不活動に対する内側腓腹筋の筋線維の応答は部位によって異なることが示唆された。しかしながら、本研究の固定期間は一週間と短く、さらに固定期間を延長した場合、その応答も部位によって変わることも考えられる。今後、固定期間、固定方法

を変えたさらなる研究が必要であると考えられた。

本研究は、文部科学省の研究費(基盤研究C22500660: 代表者 鈴木英樹)により行われた。

V 参考文献

- 1) Appell, H.J. (1986) Skeletal muscle atrophy during immobilization. *Int. J. Sports Med.*, 7: 1-5
- 2) Baldwin, K.M. and Haddad, F. (2002) Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, 81: S40-S50
- 3) Booth, F.W. and Kelso, J.R. (1973) Production of rat muscle atrophy by cast fixation. *J. Appl. Physiol.*, 34: 404-406
- 4) De Ruiter, C.J., De Haan, A. and Sargent, A.J. (1995) Physiological characteristics of two extreme muscle compartments in gastrocnemius medialis of the anaesthetized rat. *Acta Physiol. Scand.*, 153(4): 313-324
- 5) De Ruiter, C.J., De Haan, A. and Sargent, A.J. (1995) Repeated force production and metabolites in two medial gastrocnemius muscle compartments of the rat. *J. Appl. Physiol.*, 79 (6): 1885-1861
- 6) De Ruiter, C.J., Habets, P.E.M.H. De Haan, A. and Sargeant, A.J. (1996) In vivo IIX and IIB fiber recruitment in gastrocnemius muscle of the rat is compartment related. *J. Appl. Physiol.*, 81 (2): 933-942
- 7) Gorza, L. (1990) Identification of novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, 38 (29): 257-265
- 8) 実験動物飼育保管研究 (1980) 実験動物飼養及び保管等に関する基準の解説, 総理府内閣総理大臣官房管理室, ぎょうせい: 東京
- 9) Lieber R.L. (1992) Skeletal muscle structure 210-259: Implications for rehabilitation and sports medicine.: Williams & Wilkins: Baltimore
- 10) 森 敏昭, 吉田寿夫 (1990) 心理学のためのデータ解析テクニカルブック1版. 北大路書房: 京都
- 11) 中村和誉, 幸 篤武, 辻本尚弥, 春日規克, 鈴木英樹 (2006) 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
- 12) 大石康晴 (2000) : 不活動と筋の適応. 93-103, 勝田茂編: 運動と筋の科学. 朝倉書店: 東京
- 13) Vanden Noven, S., Gardiner, P.F. and Seburn, K.L. (1994) Motoneurons innervating two regions of rat medial gastrocnemius muscle with differing contractile and histochemical properties. *Acta Anat.*, 150: 282-293

(2011年9月16日受理)