

老化促進マウス (SAMP6) 長指伸筋の収縮特性と組織化学的特性の加齢変化

鈴木 英 樹 (愛知教育大学)
藤田 慎 一 (愛知教育大学)
春日 規 克 (愛知教育大学)
辻 本 尚 弥 (久留米大学)

Age-Related Changes on Contractile and Histochemical Properties in the Extensor Digitorum Longus Muscle of Senescence Accelerated P6 Mice

Hideki SUZUKI, Shin-ichi FUJITA, Norikatsu KASUGA
(Aichi University of Education)
Hisaya TUZIMOTO (Kurume University)

Age-related Changes on contractile and histochemical properties in the extensor digitorum longus muscle were studied in 20-, 40-, 50-, and 60-week-old female senescence accelerated P6 mice (SAMP6). Though contraction time and 1/2 relaxation time did not change with aging, the tetanic tension decreased from 40-week-old for 20% over 50-week-old. In the similar period, the cross-sectional area of muscle fiber decreased, and the atrophy of this muscle fiber seemed to have caused the decrease of the tension. Fatigue resistance and succinate dehydrogenase activity did not show the change with the aging.

These results suggested that there was the relation between contractile and histochemical characteristics in the aging alternation of the skeletal muscle of SAMP6.

<緒言>

老化は加齢に伴う生理的機能の低下であり、避けることのできない不可逆的な変化である。骨格筋における老化については主に筋線維の萎縮や減少^{5) 9) 10) 21)}、筋力の低下^{14) 16)}、さらには代謝能力の低下^{2) 9) 11)}が起こるとする報告がなされている。しかしながら、それらの報告はいずれも各々なされた研究の成果であり、それらの現象を全て関連づけた研究はなされていない。そのような加齢変化に関する報告がなされていない要因は、手法もさることながら、動物実験を用いた研究であって

もサンプリングまでに長期間を要することが考えられる。

近年、京都大学胸部疾患研究所で開発された老化促進モデルマウス (Senescence Accelerated Mouse : SAM) は成熟後の老化速度が速く、ヒトの老齢期に高頻度に観察される老化病態と共通の病態を自然発症する実験動物である²⁵⁾。SAMは病態が自然発症であること、また寿命が約60~70週齢であり、比較的短期間で実験、研究を行うことができることから、「老化」のように長期の時間的な要因と深く関わっている現象のモデルとしてその有用性は大きいと考えられる。

そこで本研究は骨格筋における加齢現象のモデルとしての基礎的データをを得るために、SAMの長指伸筋の収縮特性と組織化学的特性を合わせて調べた。

<方法>

実験動物には、骨粗鬆症を誘発する系である雌性の老化促進マウス P 6 (SAMP6) を用いた。実験週齢は生後20週齢 (若齢期)、40週齢 (成熟期)、50週齢 (老齢初期)、60週齢 (老齢後期) とした。飼育用ケージは220×320×135mmで、固形飼料 (日本クレア株式会社 CE-2) 及び飲水は自由摂取とし、室温23±1℃で12時間の明暗サイクル下で飼育した。実験動物の体重は週1回測定した。

実験週齢時にマウスの体重を測定後、ペントバルビタールナトリウム溶液麻酔下にて、血流を維持した状態で被験筋である長指伸筋 (Extensor Digitorum Longus: EDL) の張力測定を行った⁴⁾。張力測定は被験筋を筋を露出させ、切断した末梢側の腱にストレインゲージ (共和電業社製: LTS-A) を取り付け、ブリッジボックスを介してプレアンプ (UNIPULSE社製: AM-30) にて張力を記録した。筋への電気刺激は電気刺激装置 [Stimulator (日本光電工業株式会社製: SEM-4101)] を用いて坐骨神経からの間接極大刺激とし、至適長にて単収縮、1/2 弛緩時間、強縮張力および疲労耐性の測定を行った。

張力測定終了後、直ちに長指伸筋を摘出、湿重量測定後、液体窒素中で冷却したイソペンタンにより瞬間凍結させ冷凍保存した。冷凍保存した組織は、筋線維の断面積、総本数及び酸化系酵素活性の変化を観察するために-20℃以下に保たれたクリオスタット (サクラ精機株式会社製: CM-3P型) 内で、筋腹部より、厚さ10 μ mの連続横断切片を作成した。連続切片はBlancoら³⁾の方法を用いて定量的Succinate dehydrogenase (SDH) 染色を行い、酵素活性の測定とともに筋線維の断面積と総本数を調べた。

統計的処理のため、各群の測定値において平均値 (Mean) と標準誤差 (Standard Error: SE) を算出した。全群間の差を一要因 (加齢変化) の分散分析 (Analysis of variance: ANOVA) 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に統計量をF(t²) とする Scheffe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。

<結果>

加齢に伴う体重、筋重量及び相対的筋重量を Table 1 に示した。体重は加齢に伴い増加する傾向にあった。筋重量は加齢に伴う変化を示さなかったが、相対的筋重量は加齢に伴い低値を示す傾向がみられた。

長指伸筋の収縮特性の結果を Table 2 に示した。単収縮時間 (Contraction Time: CT)、1/2 弛

Table 1. Body weights, tissue weights and relative tissue weights in extensor digitorum longus(EDL) muscles in each aged group

	20wk	40wk	50wk	60wk
Body weight (g)	29.8 ± 0.4	30.7 ± 1.6	32.8 ± 1.2	33.6 ± 0.7
EDL weight (mg)	10.3 ± 0.5	10.2 ± 1.3	10.3 ± 0.4	10.3 ± 0.7
Relative EDL weight (mg/100g body weight)	34.4 ± 1.3	33.2 ± 4.0	31.5 ± 1.6	30.3 ± 1.9

Values are means ± SE.

Reference : 23)

Table 2. Contractile properties of extensor digitorum longus muscles in each aged group

	20wk	40wk	50wk	60wk
Contraction time (ms)	8.3 ± 0.7	7.8 ± 0.5	6.9 ± 0.3	9.6 ± 1.0
1/2 relaxation time (ms)	6.9 ± 0.6	8.2 ± 0.6	8.9 ± 0.6	8.0 ± 0.4
Maximum tetanic tension (g/100g M.W.)	242.2 ± 20.9	265.2 ± 6.3	212.3 ± 20.0	155.1 ± 26.4
Fatigue index -2min (%)	65.6 ± 4.4	64.2 ± 6.3	70.3 ± 1.8	61.2 ± 3.7

Values are means ± SE.

Table 3. Numbers and cross-sectional areas of extensor digitorum longus muscle fiber in each aged group

	20wk	40wk	50wk	60wk
Fiber number	676 ± 84	630 ± 27	493 ± 20	569 ± 30
Cross-sectional area (μm ²)	1460 ± 28	1345 ± 33	1097 ± 17 *	1177 ± 22 *

Values are means ± SE. * Significant difference from 20weeks-old SAM (P<0.05)
Reference : 23)

Table 4. Succinate dehydrogenase(SDH) activities of extensor digitorum longus muscle fibers in each aged group

	20wk	40wk	50wk	60wk
SDH activity (ΔO.D./min × 10 ⁻²)	3.59 ± 0.32	3.50 ± 0.51	3.55 ± 0.80	3.60 ± 0.35

Values are means ± SE.

緩時間 (1/2 Relaxation Time : 1/2RT) は加齢に伴いいずれも遅延する傾向を示したが各週齢間で有意差はなかった。強縮張力 (Tetanic Tension) は40週齢から50週齢で約20%、50週齢から60週齢にかけても低下を示したが各週齢間で有意差はなかった。筋持久力の指標である疲労耐性 (Fatigue Index) は加齢に伴う変化を示さなかった。

長指伸筋の総筋線維数および筋線維横断面積を Table 3 に示した。総筋線維数は加齢に伴う減少傾向を示したが、週齢間で有意差はなかった。筋線維横断面積は20週齢群に比べて50週齢群、60週齢群で有意に低値を示し、加齢に伴う萎縮が観察された。

筋線維の酸化系能力の指標となるSDH活性の変化を Table 4 に示した。筋線維のSDH活性値は各週齢群ではほぼ一定値を示し、加齢に伴う変化は観察されなかった。

<考察>

加齢による筋機能の変化に関する先行研究では、加齢に伴い速筋のCTと1/2RTはともに遅延する⁶⁾ 15)、あるいは変化しないという報告¹¹⁾ 17) があり必ずしも一致した見解が得られていない。本研究において、SAMのEDLではCTと1/2RTの加齢による顕著な変化はみられなかった。CTと1/2RTは、myosin ATPase活性¹⁾、筋小胞体 (SR) のCa²⁺ポンプ内ATPase活性¹⁹⁾、T管、SR複合体の構造¹²⁾ 20) に依存するとされている。従ってSAMに関しては少なくとも本研究で用いた老齢期においてCTや1/2RTを左右するようなこれらの因子に関する老性の変化は観察されにくいものと考えられた。

収縮特性と密接に関係した構造タンパク質であるmyosin heavy chainの構成比は、ラットの特に速筋において老性変化が数多く報告されている¹³⁾ 20) 22)。マウスの骨格筋でmyosin heavy chainの構成比を検討した研究はなされていないが、マウスの筋はラットに比べてより速筋の特性を有している²⁶⁾ ことから、本研究においても、構造タンパク質において生化学的な老性変化が生じている可能

性も考えられた。今後、これらの特性について、機能との関係から更なる分析を進める予定である。

筋力 (発揮張力) は筋横断面積と関係があるとされている⁷⁾。筋の横断面積の加齢変化すなわち筋萎縮は筋線維の萎縮、消失あるいはその両方によるため、本研究では披験筋の筋線維の平均横断面積を計測すると共に、筋横断切片内の総筋線維数を数えた。筋線維数は加齢に伴い減少する傾向がみられたが、有意差は認められなかった。一方、筋線維横断面積は20週齢に比べて50、60週齢で有意に低値を示し、加齢に伴う筋線維の萎縮が観察された。石原ら⁸⁾ も同系のSAMの長指伸筋において筋線維の萎縮を報告していることから、この時期はSAMにおいて明らかに萎縮が進行しているものと考えられた。したがって、40週齢から50週齢にかけて観察されたおよそ20%の発揮張力の低下は、主に加齢に伴う筋線維の萎縮が原因によるものと考えられた。また、張力低下は50週齢から60週齢にかけても見られた。しかしながら、この時期は形態的变化は観察されなかったことから、収縮タンパク等の変化が起っていた可能性が考えられた。

筋持久力は加齢に伴い低下するとの報告がほとんどであるが¹⁸⁾ 24)、一方で老齢筋では持久性筋力発揮時において疲労耐性は若齢筋と差がないとする報告がある⁶⁾。本研究において、筋持久性の指標である疲労耐性は加齢に伴う低下はみられず、筋線維のSDH活性も加齢に伴う変化はみられなかった。筋持久力は様々な要因により決定されるが、本研究におけるSDH活性にみられるような酸化系能力の維持は筋持久能力の維持に貢献していることが示唆された。

以上より、SAMの長指伸筋においてはCTと1/2RTといった収縮特性は加齢に伴い変化しないが、強縮張力は筋線維の加齢に伴う変化と共に低下を示すことが示された。また、筋持久力は筋線維の酸化系の代謝能力と同様に変化しにくいことが示された。これらの結果はSAMの骨格筋において収縮特性と組織化学的特性との間に密接な関係があることを示唆していた。

本研究に用いたのは、促進老化を示すSAM-P

系である。SAMには他に正常老化を示すR系がある。P系に対する対照群としてはR系が望ましいとされていることから²⁵⁾、この2つのモデルを対比して今後検討する必要がある。さらに、SAMを老化のモデルとしての確立するためには、マウスの他の系や他の種との比較が必要である。

<謝辞>

本研究は平成10～12年度文部省科学研究費基盤研究C（課題番号10680022、研究代表者：鈴木英樹）によってなされた。

本研究の遂行に際し、京都大学石原昭彦先生の指導、協力を得た。記して感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Barany M, ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50(suppl): 197-218, 1967.
- 2) Bass A, Gutmann E and Hanzlikova V, Biochemical and histochemical changes in energy supply enzyme pattern of muscles of the rat during old age. *Gerontologia* 21:31-45, 1975.
- 3) Blanco C E, Sieck G C and Edgerton V R, Quantitative histochemical determination of succinic dehydrogenase activity in skeletal muscle fibres. *Histochemical Journal* 20: 230-234, 1988.
- 4) Close R, Dynamic properties of fast and slow skeletal muscle of the rat during development. *J Physiol* 73: 74-95, 1964.
- 5) Eddinger T J, Moss R L and Cassens R G, Fiber number and type composition in extensor digitorum longus, soleus, and diaphragm muscle with aging in Fisher 344 rats. *J Histochem Cytochem* 33(10): 1033-1041, 1985.
- 6) Fitts H R, Troup J P, Witzmann F A and Holloszy J O, The effect of ageing and exercise on skeletal muscle function. *Mech Ageing Dev* 27: 161-172, 1984.
- 7) Ikai M and Fukunaga T, Calculation of muscle strength per unit cross-sectional area of human muscle by means of ultrasonic measurements. *Int Z Angew Physiol* 26: 26-32, 1968.
- 8) Ishihara A, Itoh K, Itoh M, Okihana H, Kasuga N, Shimegi S, Hirofuji C, Suzuki H and Tsuzimoto H, Effects of exercise on fiber atrophy of the soleus muscle in SAMP6. *Proceeding of the Conference on Senescence Accelerated Mouse* 12: 23-24, 1996.
- 9) Ishihara A, Itoh K, Itoh M, Okihana H, Kasuga N, Suzuki H, Hirofuji C, Tsuzimoto H and Katsuta S, The degenerative process on skeletal muscle fiber and their spinal motoneuron in SAMP6. *Proceeding of the Conference on Senescence Accelerated Mouse* 15: 23-24, 1999.
- 10) Ishihara A and Araki H, Effect of age on the number and histochemical properties of muscle fiber and motoneurons in the rat extensor digitorum longus muscle. *Mech Ageing Dev* 45: 213-221, 1988
- 11) Klitgaard H, Marc R, Brunet A, Vandewalle H and Monod H, Contractile properties of old rat muscles: effect of increased use. *J Appl Physiol* 67(4): 1401-1408, 1989.
- 12) Kugelberge E and Thornell L E, Contraction time, histochemical type, and terminal cisternae volume of rat motor units. *Muscle and Nerve* 6: 149-153, 1983.
- 13) Larsson L, Biral D, Campione M and Schiaffino S, An age-related type IIb to IIx myosin heavy chain switching in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 147: 227-234, 1993.
- 14) Larsson L, Grimby G and Karlsson J, Muscle strength and speed of movement in relation to age and muscle morphology. *J Appl Physiol* 46(3): 451-456, 1979.
- 15) Larsson L, Li X, Teresi A and Salviati G,

- Effects of thyroid hormone on fast- and slow-twitch skeletal muscles in young and old rats. *J Physiol* 481(1): 149-161, 1994.
- 16) Larsson L and Edstrom L, Effects of age on enzyme-histochemical fiber spectra and contractile properties of fast- and slow-twitch skeletal muscles in the rat. *J Neurol Sci* 76 : 69-89, 1986.
- 17) McCarter R and McGee J, Influence of nutrition and aging on the composition and function of rat skeletal muscle. *J Gerontol* 42 : 432-441, 1987.
- 18) MacDonagh H M , White M J and Davies C T M, Different effects of aging on the mechanical properties of arm and leg muscle. *Gerontology* 30 : 49-54, 1984
- 19) Pette D and Heilmann C, Some characteristics of sarcoplasmic reticulum in fast-and slow-twitch muscles. *Biochem Soc Trans* 7 : 765-767, 1979.
- 20) Reiser P J, Moss R L, Giulian, G. G. and Greaser, M. L. Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *J Biol Chem* 260 : 9077-9080, 1985.
- 21) Richardson A and Cheung H T, The relationship between Age-related changes in gene expression, protein turnover and the responsiveness of an organism to stimuli. *Life Sciences* 31 : 605-613, 1982.
- 22) Sugiura T, Matoba H, Miyata H, Kawai Y and Murakami N, Myosin heavy chain isoform transition in ageing fast and slow muscles of the rat. *Acta Physiol Scand* 144 : 419-423, 1992.
- 23) Suzuki H, Fujita S, Kasuga N, Tuzimoto and Ishihara A, Age-related changes on Morphological and enzymatic properties in extensor digitorum longus muscle of senescence accelerated P6 mice. *The Bulletin of Aichi Univ Edu* 49 : 111-114, 2000.
- 24) 鈴木英樹, 辻本尚弥, 春日規克, 石河利寛, ラット骨格筋に対する持久性運動のトレーニング効果と加齢の影響 *体力科学*40 : 698, 1991.
- 25) 竹田俊男, 老化促進モデルマウス (SAM) の開発 *日病会誌*79(2) : 39-48, 1990.
- 26) 山内秀樹, 春日規克, 異種動物の速筋と遅筋における筋線維組成と収縮特性 *日本生理誌* 53 : 197-206, 1991.