

協働筋切除に伴う過負荷が再生時骨格筋の機能的, 形態的特性に及ぼす影響

石道峰典¹⁾ 平野朋枝²⁾ 西沢富江³⁾ 春日規克¹⁾

EFFECTS OF OVERLOAD ON CONTRACTILE AND MORPHOLOGICAL PROPERTIES IN REGENERATING MUSCLE AFTER ECCENTRIC CONTRACTION-INDUCED INJURY

MINENORI ISHIDO, TOMOE HIRANO, TOMIE NISHIZAWA and NORIKATSU KASUGA

Abstract

The contractile and morphological effects of chronic overload induced by synergist gastrocnemius and soleus ablation were studied in regenerating plantaris muscle of rats after injuries produced by eccentric exercise. Rats were randomly divided into control (C), eccentric exercise (E) synergistic ablation (S) and eccentric exercise+synergistic ablation (ES) groups. At 6 weeks after the experimental treatment, contractile or morphological muscle properties were measured. The maximum tetanic tension of ES group was significantly larger than that of S group ($p < 0.05$), although there was not significant difference between C and E groups. There was not significant difference in contraction time between S group and ES group. While there was not significant difference in mean cross-sectional area of any fiber types between C group and E group, all fiber types of ES group were significantly smaller than that of S group ($p < 0.05$). It is concluded that the overload on injured muscle by eccentric exercise may restrain muscle hypertrophy.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2003, 52 : 241~248)

key word : skeletal muscle, injury, regeneration, overload

I. 緒 言

一般にトレーニングの過程で遅発性筋痛を経験する事は珍しくない。筋痛は特に伸張性筋収縮運動などにより引き起こされ、筋損傷が発生していることが多いことが報告されている^{7,9)}。筋痛は3日ほどで軽減されるが⁷⁾、筋細胞の完全な再生には約4週間を要すると報告されている¹¹⁾。従って、筋痛を経験した後にも継続されるスポーツ活動には、損傷や再生過程の筋細胞に対して負荷が加わっているケースが多いと考えられる。

伸張性収縮による損傷や再生期の骨格筋に関しては、形態や収縮特性の面から多くの報告が見られるが^{9,11,17,19)}、再生期に運動負荷を加えた報

告は少ない。下り走による筋損傷後にトレーニングを行った場合、損傷の拡大が生じることが報告されている¹⁶⁾のみである。一方、病理学的研究として、筋移植による再生時に移植筋はいったん完全に壊死するがその後の再生回復が起り、この時期に筋活動を強要した場合、筋の形態的、機能的回復を促進させることが報告されている^{8,27)}。このように再生時における筋活動が骨格筋の回復に及ぼす影響に関しては相違が見られる。

そこで本研究では、運動誘発性の筋損傷を与え、それ以降の時期に代償性筋肥大を引き起こす慢性負荷を与えた場合、筋再生に与える影響を形態と収縮特性の面から調べることを目的とした。

¹⁾ 愛知教育大学保健体育講座
〒448-8542 刈谷市井ヶ谷町広沢1

Department of Health Sciences, Aichi University of Education

²⁾ 大阪大学大学院人間科学研究科
〒560-0043 豊中市待兼山町1-4

Department of School of Human Sciences, Osaka University

³⁾ 中京女子大学短期大学部
〒474-0011 大府市横根町名高山55

Chukyo Women's University Junior College

II. 方 法

A. 実験概略

実験動物には Fischer344 系雌ラットを用いた。実験に用いた被験筋は足底筋(以下 PLA)とした。実験動物は、飼育箱(265×425×150 mm)内に 2 匹ずつ入れ、昼夜逆転した12時間の明暗サイクルの小屋にて餌(CE-2, 日本クレア), 飲水共に自由摂取の環境下で飼育した。飼育期間は、生後7週齢から13週齢までの6週間とした。実験群は、通常飼育による対照群(control group, 以下C群, n=6), 伸張性収縮を与え6週間経過した群(eccentric contraction group, 以下E群, n=6), 協働筋切除後6週間経過した群(synergistic ablation group, 以下S群, n=6), 伸張性収縮後直ちに協働筋切除を行い6週間経過した群(eccentric contraction+synergistic ablation group, 以下ES群, n=6)の4群を設けた。なお、C群とE群、S群とES群は同一ラットの左脚と右脚とした。

ラットの生後7週齢時に被験筋に対し、伸張性収縮による筋損傷を与えた。ラットの体重測定後、腹腔内へ pentobarbital sodium (60 mg/kg body weight) を注射し麻酔した。下肢背部の脱毛した皮膚上より電気刺激として 0.1 msec 幅の矩形波極大強度刺激を頻度 140 Hz にて 1.5 秒間与え、下腿底屈筋を最大強縮させた。下腿底屈筋の収縮により足関節は 170° 程度までの底屈が起きる。そこで刺激開始から 300 msec 後にサーボモーターにより機械的に足関節角度 30° まで背屈をさせ、被験筋に対する伸張性収縮を実現した。この伸張性収縮を 1 分に 1 回、1 時間、計 60 回行った。同じ実験条件により伸張性収縮を行った場合の筋損傷量を調べた場合、一横断面からの分析結果では 25~44% の筋線維が損傷することが報告されている^{11,12)}。本実験でも全筋線維に対する損傷線維の本数比は約 30% であった。(図 2-B, 9: 膨潤し円形状となった損傷(opaque)線維)協働筋切除処置は、生後 7 週齢時に PLA の協働筋である腓腹筋、ヒラメ筋を電気メスにより 3 分の 2 以上切除した。ES 群に関しては、伸張性収縮実施後直ちに切除処置した。

B. 張力特性

再生時の過負荷が筋の収縮特性の回復に与える影響を調べるために張力測定を行った。生後13週齢時に体重を測定し、腹腔腔内への pentobarbital sodium 注入による麻酔下で、被験筋の張力特性を調べた。血流を保ち、支配神経からの 0.1 msec 矩形波の電気極大刺激により張力を得た。張力測定中、被験筋は酸素95%, 二酸化炭素5%の混合ガスで飽和され、36±1℃に保たれたリンゲル液中に浸漬された。単収縮張力の波形から収縮時間(contraction time: CT)を算出した。強縮張力は刺激頻度が 200 Hz, 刺激時間 450 msec により最大強縮張力を得た。また、50%最大強縮張力が発揮できる刺激頻度にて刺激時間 330 msec, 1.5 sec 毎の収縮を 5 分間連続した。この際に得た疲労曲線より、刺激開始直後の最大張力に対し、5 分後の張力の相対値を疲労耐性の指標とした。

C. 組織化学的分析

再生時の過負荷が筋の形態特性の回復に与える影響を調べるため各群の筋線維タイプ別横断面積を測定した。張力測定後直ちに屠殺し、速やかに被験筋を摘出し、瞬間凍結を行った。その後、筋腹から厚さ 10 μm の連続横断切片を作成し、myosin ATPase (Adenosine Triphosphatase) 染色³⁾及びSDH (Succinate dehydrogenase) 染色²⁾を行った。Myosin ATPase 染色より筋線維タイプの分類を行い、SDH 染色を行ったサンプルから NIH image ソフトを用いて各筋線維タイプの横断面積を算出した。各個体の筋線維横断面積の測定サンプル数は、無作為に一横断面あたり、各タイプにつき100本以上とした。

D. 統計処理

各測定値は実験群ごとに平均値と標準偏差値を算出し、統計学的検定を行った。同一ラットの左右脚の比較(C群 vs E群, S群 vs ES群)には paired t test を用い、C群, E群に対するS群, ES群それぞれの比較には、two sample t test を用いて検定を行った。なお、全ての検定において

有意水準は、危険率 5%とした。

Ⅲ. 結 果

表 1 には、各群の体重、絶対筋重量、相対筋重量を示した。実験期間終了時の体重では、C、E 群と S、ES 群の間には、有意差は認められなかった。被験筋である PLA の絶対筋重量、相対筋重量ともに、C 群、E 群に対し協働筋切除を行った S 群、ES 群がそれぞれ有意に高値を示した。C 群と E 群間には相対筋重量に差がない一方で、協働筋を切除した S 群とさらに伸張性収縮を伴った ES 群間の比較においては、ES 群で有意な低値が示された ($p < 0.05$)。

各群の収縮的特性を比較した結果(表 2)、いず

れの群間においても収縮時間に有意差は確認されなかった。また伸張性収縮に伴う筋損傷が疲労耐性に与える影響を C 群と E 群との間、あるいは S 群と ES 群との間で比較した場合、両群とも有意差は認められなかった。一方、慢性負荷による効果として C、E 群より S、ES 群の疲労耐性が有意に向上していた(それぞれ $p < 0.05$)。

筋腹部の横断面から測定した各群の筋線維タイプ別平均横断面積を比較検討した(図 1)。いずれの筋線維タイプも C 群と E 群間には差が見られなかった。type I、II a、II d 線維(図 1-A, B, C)では、C 群、E 群に対し協働筋切除群である S 群、ES 群がそれぞれ有意に高値を示した(それぞれ $p < 0.05$)。type II b 線維では(図 1-D)、S 群は

Table 1. Body weight and plantaris muscle weights in each group.

group(n)	BW(g)	MW(mg)	Relative MW.(mg/100gBW)
C (6)	177.50 ± 8.8	165.33 ± 9.6	93.23 ± 5.2
E (6)		170.33 ± 11.3	95.97 ± 4.8
S (6)	168.67 ± 6.5	232.50 ± 9.0 * #	138.02 ± 7.6 * #
ES (6)		209.33 ± 16.4 * # a	124.21 ± 10.1 * # a

Values are means ± S. D. BW : body weight MW : muscle weight

* significant difference from C ($p < 0.05$)

significant difference from E ($p < 0.05$)

a significant difference between S and ES ($p < 0.05$)

Table 2. Relative tetanic tension, CT, Fatigue index in each group.

group(n)	Relative tetanic tension(g/mg)	CT(msec)	Fatigue index(%)
C(6)	187.26 ± 11.6	19.08 ± 1.2	34.09 ± 3.2
E(6)	184.04 ± 22.4	18.33 ± 1.1	32.70 ± 3.8
S(6)	146.63 ± 14.6 * # †	20.50 ± 2.1	55.87 ± 8.6 * #
ES(6)	187.62 ± 20.1	19.49 ± 1.1	56.95 ± 4.2 * #

Values are means ± S. D.

Relative tetanic tension : maximum tetanic tension (g)/100 mg muscle weight

CT : Contraction Time

Fatigue index : the tension developed after 5 min of stimulation relative to the maximum tension developed during the fatigue test.

* significant difference from C ($p < 0.05$)

significant difference from E ($p < 0.05$)

† significant difference from ES ($p < 0.05$)

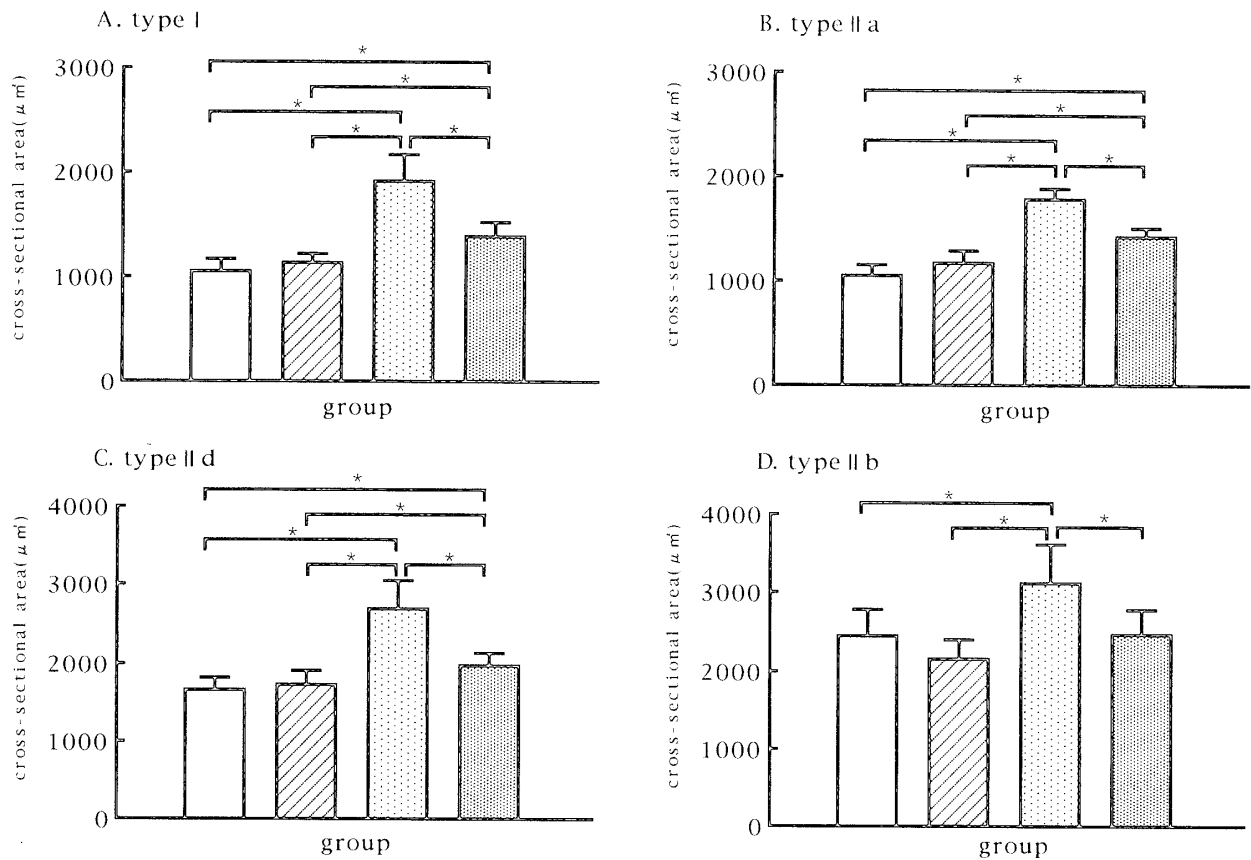


Fig. 1. Mean fiber cross-sectional areas in each group.

Values are means \pm S.D.★ $p < 0.05$

□ C ▨ E ▩ S ▪ ES

C群, E群に対しそれぞれ有意に高値を示した(それぞれ $p < 0.05$)が, ES群では有意差は確認されなかった. 全ての筋線維タイプにおいてS群に対しES群は有意な低値を示した($p < 0.05$).

表3には筋線維タイプ別の細い筋線維の本数比を示した. この細い筋線維の算出には, 各タイプ別にC群で観察できた最小横断面積よりさらに低値を示した筋線維数をカウントし, 全本数に対する比で示した. C群のtype I, II a, II d, II b 線維それぞれの最小横断面積値は, $429.73 \mu\text{m}^2$,

$547.65 \mu\text{m}^2$, $866.45 \mu\text{m}^2$, $893.53 \mu\text{m}^2$ であった.

S群ではC群よりも細いタイプ筋線維は見られなかったが, 伸張性収縮を行ったE群では全ての筋線維タイプで, ES群ではtype II d, II b 線維で確認された. 特にE, ES群共にtype II b 線維の割合が, 他のタイプに対し有意に高い出現率を示した(それぞれ $p < 0.05$). またE群とES群間では, 細いtype II b 線維の出現率には違いが見られなかった(表3). 図2には対照群(A)の伸張性収縮3日後(B)の損傷像に加えて, 伸張性収縮6

Table 3. The appearance ratio of smaller fiber in E, S and ES group.

	E group	S group	ES group
type I	0.16 ± 0.39	0.00	0.00
type II a	0.23 ± 0.57	0.00	0.00
type II d	1.12 ± 1.17	0.00	0.87 ± 0.93
type II b	$3.73 \pm 2.37^*$	0.00	$2.87 \pm 1.78^*$

means \pm S.D. unit: %* significant difference from type I, II a, and II d fiber ($p < 0.05$)

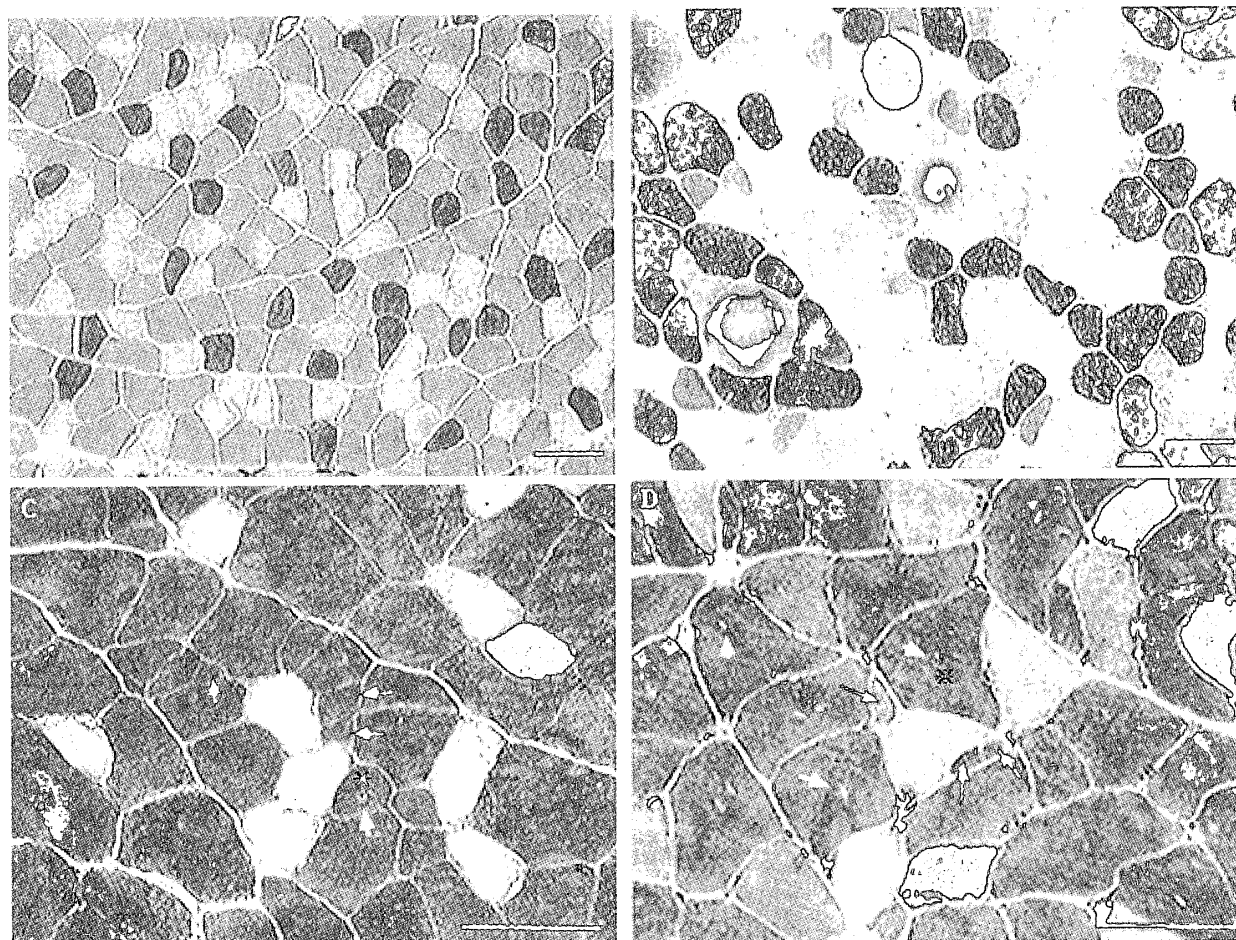


Fig. 2. Cross-sections of C group (A), injured muscle by eccentric contraction (B), E group (C) and ES group (D) plantaris muscle stained by ATPase (pH 4.6). The myofibers in smaller diameters were observed in E and ES group (black arrows).

Bar=100 μ m A, B \times 100 C, D \times 200

* : regenerated normal fiber ※ : regenerated and hypertrophied fiber white arrows : central nuclei

週間後のE群(C), ES群(D)の筋横断ATPase染色像を示した。表3で示す細い線維は、図2-CとDに黒矢印で示し、中心核を持つ再生線維は白矢印で示した。

IV. 考 察

伸張性収縮によりダメージを受けた筋線維では壊死が生じ、収縮蛋白質や構造蛋白質の分解が起こる。その際、壊死や部分的な過収縮により筋線維毎の横断面積の増減が生じ、それ以降、衛星細胞の活性化により再生が進行し、約4週間後には完全に再生すると報告されている^{9-11,17,19,20}。また張力特性を調べた報告では、伸張性収縮実施直後から最大発揮張力は一過性に低下し、約4週

間ほどで回復することが報告されている^{7,9,11,17,19}。本研究において筋重量、筋線維横断面積といった形態面及び発揮張力といった機能面共にC群とE群の両群間にほぼ同様の値が認められたことから、筋損傷を生じたE群は6週間で十分な再生がなされたと考えられる。

通常負荷であったC群、E群に対し、協働筋切除による過負荷刺激を与えたS群に見られる相対筋重量、筋線維平均横断面積の有意な増加は、過去の研究報告^{22,28}と同様であり、本実験で行った協働筋切除は被験筋の代償性肥大変化を引き起こすに十分な刺激であったと考えられる。また、協働筋切除に伴う慢性負荷により疲労耐性が有意に高まり、この結果は、協働筋切除による筋線維

タイプ構成比の遅筋化や毛細血管網の発達に関与を示唆する先行研究と一致した^{22, 24, 25, 28}).

S群でCTの変化が生じなかったという本結果は、過負荷によりATPase活性に変化が生じないとする先行研究⁶)を支持するものであった。一方、S群の相対張力は他群と比べ有意に低値を示した。協働筋切除に伴い代償性肥大した筋において、筋重量当たりの最大強縮張力が低くなることが報告されている²²)。これは協働筋切除処置の影響であるが、処置後約30日で蛋白量が対照筋と差が無くなった以降でも相対張力が一定値を低く維持されている事、さらに代償性肥大を起こした筋から得られた skinned fiber (単一線維)の相対張力が全筋ほど低下率が大きくない点から、肥大筋の相対張力の低下には、興奮収縮連関、特にCa²⁺ delivery や感受性の変化が原因の一つと考えられている^{13~15})。

筋損傷が生じたE群及びES群では、C群では見られない極めて細い筋線維の存在が確認できた。先行研究でも筋損傷によって径の細い筋線維が出現することが報告されている²⁶)。特にE、ES両群共にtype II bにおいて細い筋線維の出現が顕著であり(表3)、伸張性収縮により選択的にtype II b線維が損傷するという先行研究の結果^{9, 11, 12})と関連することが考えられた。一方、E群とES群に組織染色結果から考えられるtype II b線維が出現した事から、損傷後の筋の再生メカニズムに関してはさらに検討が必要であると思われた。なお、type II b線維である細い線維の出現率は3%程度であるが、これは一横断面のみの観察結果である。形態的に細長い筋線維では、筋線維全体というよりはむしろ長軸上の一部に損傷が生じ、これはsegmental necrosisとして知られている^{10, 11, 21})。このため、他の部位での横断面では異なる筋線維に損傷が見つかる場合が多く¹¹)、筋の全体数で見た細い線維の出現率は3%より増えることが予想される。

一方、協働筋切除を行った2群間の平均横断面積を見た場合、ES群の全ての筋線維タイプにおいてもS群に対し平均横断面積が有意に肥大抑制されていた。易損性の高いtype II b線維だけで

なく、他のタイプ線維においても肥大抑制が生じたことは、光学顕微鏡による観察では細胞内部の損傷を全て見いだせなかった線維が多く、これらに対しても非特異的に過負荷の影響が及んでいたと考えられる。損傷筋にはカルパインなどの蛋白分解酵素が活性化し、マクロファージが浸潤する^{1, 20})。マクロファージは、損傷直後から再生開始の引き金となる一方、筋肥大時に活性化され筋細胞となる筋芽細胞(衛星細胞)²³)からの筋形成を抑制する液性因子を放出する^{4, 18})。このためにES群の多くの筋線維に肥大抑制が生じたと考えられる。

伸張性収縮による損傷とそれに続く再生時の骨格筋に過負荷を加えた場合、張力特性に著しい変化は生じなかった。しかし、筋損傷後の過負荷刺激により筋線維全体の肥大抑制が確認され、適応変化に対し抑制を受ける可能性が示された。

V. 結 語

本研究では、伸張性収縮による損傷、再生時の骨格筋に協働筋切除という過負荷を与え、収縮特性及び形態特性の変化を検討した。実験期間を6週間とし、対照群としたC群、伸張性収縮により筋損傷を与えたE群、過負荷刺激を与えたS群、損傷を与え、同時に過負荷刺激を与えたES群を設定した。実験の結果、以下の点が確認された。

- 1) 伸張性収縮を行ったE、ES両群ともにC、S群に対して収縮時間に有意差は認められなかった。
- 2) 協働筋切除によりS、ES群共に疲労耐性は向上した。
- 3) 筋重量当たりの最大張力を各群間で比較した場合、S群が全ての群より有意に低値を示した。
- 4) 各群の筋重量を比較した結果、協働筋切除によりS群とES群には肥大が見られるが、伸張性収縮を行ったES群はS群よりも低重量であり、また全てのタイプの筋線維横断面積も有意に低値を示した。

以上のことから、筋損傷から回復期における運動刺激は、筋の再生に対し回復、肥大遅延をもた

らす可能性が示された。

(受理日 平成15年2月25日)

参 考 文 献

- 1) Belcastro, A. N. Skeletal muscle calcium-activated neutral protease (calpain) with exercise. *J. Appl. Physiol.*, (1993), **74**, 1381-1386.
- 2) Blanco, C. E., Sieck, G. C. & Edgerton, V. R. Quantitative histochemical determination of succinic dehydrogenase activity in skeletal muscle fibers. *Histochem. J.*, (1988), **20**, 230-243.
- 3) Brooke, M. H. & Kaiser, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.*, (1970), **23**, 369-379.
- 4) Cantini, M. & Carraro, U. Macrophage-released factor stimulates selectively myogenic cells in primary muscle culture. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, (1995), **54**, 121-128.
- 5) Carpenter, S. & Karpati, G. Segmental necrosis and its demarcation in experimental micropuncture injury of skeletal muscle fibers. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, (1989), **48**, 154-170.
- 6) Chalmers, G. R., Roy, R. R. & Edgerton, V. R. Variation and limitations in fiber enzymatic and size responses in hypertrophied muscle. *J. Appl. Physiol.*, (1992), **73**, 631-641.
- 7) Carlson, P. M., Nosaka, K. & Braun, B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med. Sci. Sports Exerc.*, (1992), **24**, 512-520.
- 8) Donovan, C. M. & Faulkner, J. A. Muscle grafts overloaded by ablation of synergistic muscles. *J. Appl. Physiol.*, (1986), **61**, 288-292.
- 9) Friden, J. & Lieber, R. L. Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.*, (1992), **24**, 521-530.
- 10) Friden, J. & Lieber, R. L. Segmental muscle fiber lesions after repetitive eccentric contractions. *Cell Tissue Res.*, (1998), **293**, 165-171.
- 11) 平野朋枝, 西沢富江, 小笠原仁美, 春日規克, 伸張性収縮により引き起こされる筋線維の損傷—骨格筋の構造及び筋線維タイプとの関係から—, 岡崎女子短期大学研究紀要(2000), **33**, 143-150.
- 12) 平野朋枝, 山下 晋, 鈴木英樹, 春日規克, 伸張性収縮後の筋損傷における筋構造の部位別の差違, 体力科学, (1998), **47**, 750.
- 13) Kandarian, S. C. & White, T. P. Force deficit during the onset of muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.*, (1989), **67**, 2600-2607.
- 14) Kandarian, S. C. & White, T. P. Mechanical deficit persists during long-term muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.*, (1990), **69**, 861-867.
- 15) Kandarian, S. C. & Williams, H. Contractile properties of skinned fibers from hypertrophied skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.*, (1993), **25**, 999-1004.
- 16) 春日規克, 小坂井留美, 西沢富江, 鈴木英樹, 骨格筋再生時の運動負荷と神経筋接合部の変化, 体力科学, (1995), **44**, 640.
- 17) Lieber, R. L., Thormell, L. E. & Friden, J. Muscle cytoskeletal disruption occurs within the first 15 min of cyclic eccentric contraction. *J. Appl. Physiol.*, (1996), **80**, 278-284.
- 18) Merly, F., Lescaudron, L., Rouaud, T., Crossin, F. & Gardahaut, F. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve*, (1999), **22**, 724-732.
- 19) MuCully, K. K. & Faulkner, J. A. Injury to skeletal muscle fibers of mice following lengthening contractions. *J. Appl. Physiol.*, (1985), **59**, 119-126.
- 20) 埜中征哉, 筋損傷から修復のしくみ, 臨床スポーツ医学, (1991), **8**, 779-783.
- 21) 岡 和之, 石川文雄, 只野ちがや, 室 増男, 筋線維の再生と核 DNA 崩壊, 体力科学, (1995), **44**, 637.
- 22) Pyley, M. J., Bardara, J. O. & Noble, E. G. Time course of changes in capillarization in hypertrophied rat plantaris muscle. *J. Appl. Physiol.*, (1998), **84**, 902-907.
- 23) Rosenblatt, J. D., Yong, D. & Parry, D. J. Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. *Muscle Nerve*, (1994), **17**, 608-613.
- 24) Roy, R. R., Baldwin, K. M., Martin, T. P., Chimarusti, S. T. & Edgerton, V. R. Biochemical and physiological changes in overloaded rat fast- and slow-twitch ankle extensors. *J. Appl. Physiol.*, (1985), **59**, 639-646.
- 25) Roy, R. R., Meadows, I. D., Baldwin, K. M. & Edgerton, V. R. Functional significance of compensatory overloaded rat fast muscle. *J. Appl. Physiol.*, (1982), **52**, 473-478.
- 26) Tamaki, T. & Akatsuka, A. Appearance of complex branched fiber following repetitive muscle trauma in normal rat skeletal muscle. *Anat. Rec.*, (1994), **240**, 217-224.
- 27) White, T. P., John, F. V., Pedro, G. M., Steven, S. S. & David, A. E. Exercise-induced adaptations of rat soleus muscle grafts. *J. Appl. Physiol.*, (1984), **56**, 1325-1334.
- 28) 山内秀樹, 辻本尚弥, 米本恭三, 慢性的な過負荷に伴う骨格筋の収縮特性, 筋線維タイプミオシン重鎖アイソフォーム組成の変化, 体力科学, (1996), **45**, 199-208.