

筋損傷後の慢性的な運動刺激が筋の回復能に与える影響

佐脇 匠

Effects of chronic exercise stimulation on recovery capability from muscle injury in rat

Sho Sawaki

<背景>

競技スポーツを目指したトレーニング場面等では、ウエイトトレーニングやプライオメトリックトレーニングといった高強度筋収縮が繰り返され、トレーニングの翌日に筋痛を感じる事が多い。アスリート達は筋痛を感じながらもトレーニングを継続しており、これは損傷した筋に対して運動負荷を与えていることとなる。一方、肉離れなどの筋障害に対する代表的な治療として電気療法や運動リハビリがある。いずれの治療においても弱い筋収縮をさせ、筋の産熱を促し、末梢血流量を高めることが目的とされ、痛み感覚の減弱や関節可動域の増大から治療効果が認められている。しかし、損傷後の運動や電気による筋収縮が損傷後の筋細胞自体の再生にいかなる影響を与えているかは不明である。

筋病理学的研究からの知見として、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、休止状態であった筋芽細胞の活性化・増殖により再生回復が起こり、この時期に筋活動をした場合、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^{1,2)}。

再生時の骨格筋に協働筋切除による過負荷を与えた効果を調べた研究では、過負荷に伴う筋重量の増加、筋線維数の増加、疲労耐性の向上などが報告されているが、最大張力の低下や筋線維横断面積の低下などから筋の再生に対し回復、肥大遅延をもたらせる可能性が示されている^{3,4)}。

以上のことから、筋は高い再生能力や可変性といった特性を持っていることは、過負荷の効果として捉えられている。しかし、損傷筋の再生過程において加えられる運動負荷の影響に関する研究は少ない。

<目的>

本研究では挫滅によりラット下肢骨格筋に損傷を惹起させ、その回復過程において、協働筋切除による慢性的な運動刺激を与えることが筋の再生にどのような影響を及ぼすかを形態的特性である筋重量、筋線維幅、筋横断面積、筋衛星細胞数、核数の経時変化の測定し、再生期の運動効果を明らかにすることを目的とした。

<方法>

実験動物は生後5～6週齢のFischer344系雌性ラットを用い、被験筋はヒラメ筋(SOL)とした。完全麻酔下のもと、左脚のSOLを傷つけないよう下肢背面皮膚切開を施し筋を露出させ、先端幅2mmのピンセットでSOLの筋腹部をはさみ、5秒間強く圧迫することで挫滅損傷を惹起した。一方、反対脚下肢も同様に切開し、SOLの協働筋である足底筋と腓腹筋を電気メスによりアキレス腱側から半分以上切除した後、SOLの筋腹部を左脚同様に挫滅損傷させた。一旦通常飼育した後、被験筋の摘出は損傷3日後、5日後、10日後に行った。実験群はSOL筋腹部に損傷を与えた損傷群、SOL筋腹部の損傷と協働筋である足底筋と腓腹筋を切除した運動刺激群、脚切開のみを施した対照群に分類した。筋摘出後は筋湿重量を測定し、厚さ25 μ mの凍結縦断切片を作成し、蛍光抗体染色法を用いて分析を行った。染色方法は筋衛星細胞特有の接着タンパクであるM-cadherin、筋線維の形質膜を染色するDystrophin、核を染色するDAPI蛍光色素を用いた三重染色を行った。観察部位は損傷筋腹部と非損傷部(損傷箇所から3mm以上の遠位部)の2か所とした。観察画像は筋1本あたり4枚の画像を損傷部、非損傷部か

らそれぞれ撮影した。分析項目は核数、最大筋線維幅、算出筋横断面積、筋衛星細胞数と摘出時の筋湿重量とした。筋湿重量はSOLの筋湿重量を体重で除した値を用いた。筋線維幅は観察画像上(1040×1392 μ m)の数本の筋線維の中から最大値をもって筋線維幅とし、その値から筋横断面積を算出した。核数は観察画像上(1040×1392 μ m)の数を測定し、筋衛星細胞数は観察画像上(1040×1392 μ m)の筋線維1本あたりの数を算出した。その後、統計処理を行った。本実験における有意水準は5%と1%以下とした。

<結 果>

(I) 形態的变化

挫滅損傷はほぼ全筋線維の圧迫部を崩壊させるため、損傷後3、5日後では組織化学的観察が困難であった。そこで、10日後の体重当たりの筋湿重量、損傷部の最大筋線維幅、算出筋横断面積を三群比較した。筋湿重量は運動刺激群、損傷群、対照群間ともに有意差は認められなかった。一方、損傷部の筋線維幅、算出筋横断面積は運動刺激群が損傷群、対照群に対して有意に高値を示した。

(II) 組織化学的变化

損傷10日後の損傷部の筋線維1本あたりの筋衛星細胞数(図1)は、運動刺激群が、損傷群、対照群より有意に低値を示した。また、非損傷部の筋線維1本あたりの筋衛星細胞数の経時的变化(図2)を損傷群と運動刺激群で比較した結果では、損傷群では損傷3日後に筋衛星細胞数の有意な増加が認められた。その後、損傷5日後から10日後にかけて減少し10日後の値は対照値とほぼ同じであった。群間の差では、損傷3日後において損傷群が運動刺激群よりも有意に高値を示した。運動刺激群では損傷3日後には筋衛星細胞の増加はみられず、5日後に増加がみられた。損傷5日後から10日後にかけて減少し、対照値との間に有意差は認められなくなった。

核数をDAPI染色をもとに算出したところ、損傷部では損傷群、運動刺激群ともに、3、5日後が有意に増加した。損傷10日後では核数が損傷3、5日後に比べて有意に低値を示したが、対照値と比べると有意に高値であった。また、群間の差で

は、損傷3、5日後に損傷群が運動刺激群よりも観察される核数が有意に高値であった。非損傷部では両群ともに、損傷3、5日後の核数が対照値に比べて有意に増加した。損傷10日後では核数が3、5日後に比べて有意に減少したが、対照値と比べると有意に高値であった。

<考 察>

損傷10日後の比較において、筋湿重量、最大筋線維幅、算出筋横断面積ともに運動刺激群が損傷群、対照群よりも有意に高値を示した。この要因として、早期回復をした筋が協働筋切除による運動負荷により肥大した可能性が考えられる。逆に、協働筋切除による負荷が筋損傷を拡大させ、透過性の亢進による水の取り込みやCa²⁺の流入による膜損傷部の不可逆的な過収縮によるOpaque線維のような浮腫状態⁵⁾が観察対象であったことも考えられた。

損傷3日後に非損傷部の筋衛星細胞数は運動刺激群では損傷群よりも有意に低値であったが、5日後には増加した。このことは運動負荷による筋衛星細胞の増殖の遅延が起きた結果と考えられた。協働筋切除の慢性的な運動刺激が損傷の拡大をもたらし、マクロファージの食食期間を遅延させたことによる筋衛星細胞の活性の遅れであることが考えられた。さらに、筋衛星細胞数は損傷部では損傷10日後にCont群よりも低値であった。損傷が起きていない部分においても筋衛星細胞の活性化・増殖がおき、増殖した細胞は損傷部に移動し再生に働く。挫滅と同時に運動負荷を与えた群では、その非損傷部での筋衛星細胞増殖に遅延があり、また、5日程度で前値までの回復があった。このことから再生時の過負荷は損傷の拡大による非損傷部から増殖・遊走してくる筋衛星細胞の遅れを起こしている可能性が考えられた。一方、筋衛星細胞は筋回復にいたるため筋に融合し筋核へとなる。このため、運動刺激条件下では急速な回復が起こり筋衛星細胞の10日後の減少として現れたと考えられた。本研究において、運動刺激が筋衛星細胞の遊走速度に関わる因子は幹細胞増殖因子(HGF)が主であることが知られている⁶⁾。また、再生を促す活性因子として白血球阻止因子

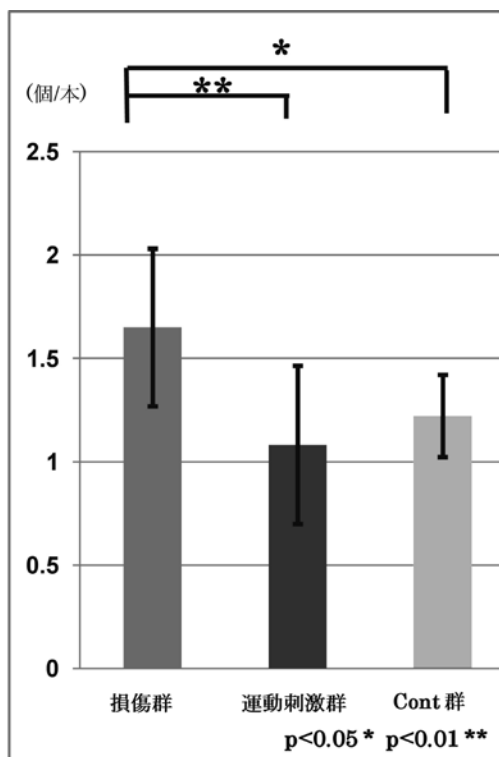


図1. 損傷10日後の筋線維1本あたりの筋衛星細胞数（損傷部）

(LIF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、インスリン様増殖因子 (IGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、腫瘍増殖因子 (TGF-β) の関与が知られており⁷⁾、運動刺激がこれらの因子の活性に働き、急速な回復の原因となったと考えられた。

核数の変化は、運動刺激群、損傷群ともに3、5日後の損傷部の核数が増加しており、これはマクロファージなどの貪食細胞などによる増加と考えられた。マクロファージは炎症性刺激により遊走、活性、増殖し、貪食後にサイトカインの放出とともに死滅し、脾臓やリンパ節に運ばれ処理される。そのため損傷10日後には核数が大幅に減少したことが考えられた。実際に控減をうけていない非損傷部においては、慢性的な運動刺激の有無に関わらず、核数が増加した。また、損傷群、運動刺激群ともに非損傷部で観察される核数はほとんど同じであったため、慢性的な運動刺激の有無が隔絶膜の形成遅延に影響するものではないと考えた。本実験においては、損傷10日後に非損

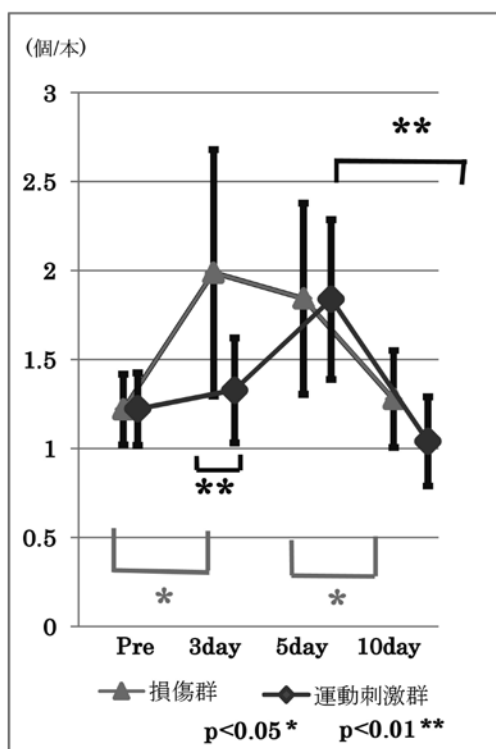


図2. 筋線維1本あたりの筋衛星細胞数の経時的変化（非損傷部）

傷部においてもマクロファージおよび中心核が観察された。このことから、非損傷部で観察されたマクロファージは筋線維間を満たす細胞外溶液により非損傷部に運ばれ浸潤した可能性が高いと考えられた。さらに、マクロファージの浸潤による過剰な貪食や損傷部の過収縮による二次的影響として非損傷部の一部でも損傷が起きていることが認められた

< 結 論 >

形態的变化から再生過程の筋に対する協働筋切除による慢性的な運動刺激の影響は代償性筋肥大をもたらし、筋湿重量や最大筋線維幅、算出横断面積の増加につながった可能性はあるものの、慢性的な運動刺激が回復を促進させるという事実は認められなかった。

組織化学的变化の分析からは、協働筋切除による運動負荷は損傷を拡大させ、マクロファージの貪食期間の遅延や筋衛星細胞の活性因子の遅れを

生じさせ、回復の遅延を起こすことが示唆された。

<参考文献>

- 1) Donovan.C.M.and Faulkner.J.A. Muscle grafts overloaded by ablation of synergistic muscle. J.Appl.Physiol (61) 288-292 1986
- 2) White.T.P.,Jhon.F.V.,Pedro.G.M.,Steven.S.S.and David.A.E. Exercise-induced adaptations of rat soleus muscle grafts.J.Appl.Physiol. (56) 1325-1334 1984
- 3) 石道峰典、平野朋枝 西沢富江、春日規克
協働筋切除に伴う過負荷が再生骨格筋の形態的、機能的特性に及ぼす影響 体力科学 Vol.52 (6) p243 ~ 248 2003
- 4) 石道峰典、平野朋枝、春日規克 筋損傷後の慢性過負荷刺激が筋再生に及ぼす影響 東海保健体育科学 Vol.22 p1 ~ 22 2000
- 5) 春日規克、石道峰典、幸篤武、西沢富江 肥大を起こした筋線維の特性 愛知教育大学研究報告書 第62輯 p27 ~ 33 2013.3
- 6) Ishido,M.and Kasuga,N. In situ real-time imaging of exogenous HGF-triggered cell migration in rat intact soleus muscles. Acta Histochem.Cytochem,45 (3):193-199. (2012)
- 7) 吉岡利忠、後藤勝正、石井直方 日本運動生理学協会 運動生理学シリーズ5 筋力をデザインする 杏林書院 p50 ~ 64 2003
(指導教員 春日 規克)