

## 筋萎縮からの回復におけるクレンブテロール投与の影響

吉川 侑希

## Effects of clenbuterol on the recovery from muscle atrophy

Yuki YOSHIKAWA

## 1. はじめに

骨格筋は可塑性に優れており、筋力トレーニングなどにより筋肥大を起こし、不使用や、加齢により筋萎縮を引き起こす<sup>1) 2)</sup>。特に抗重力筋である下肢の骨格筋は、不使用による影響が大きいことが報告されている<sup>3)</sup>。また、その高い可塑性により、萎縮した筋は再負荷により元の状態に戻ろうとする<sup>4)</sup>。怪我等の治療のためのギプス固定による不使用状態で萎縮した筋は、再び運動を始めようとした場合、筋力が低下しているため復帰に時間を要する。また、早く日常生活に復帰するためにも、萎縮した骨格筋の早期回復が望まれる。

骨格筋は持久性の高いタイプⅠ線維、瞬間的なパワー発揮をするタイプⅡ線維、それらの特徴を合わせもつⅠ+Ⅱ線維に大分され、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。また、筋線維の周りには多くの核が存在している。核は速筋線維よりも遅筋線維に多く存在し<sup>5)</sup>、骨格筋の肥大や萎縮により数が増減するとの報告がなされている<sup>6)</sup>。その筋肥大時の核の増加に寄与しているのが衛星細胞である<sup>7)</sup>。したがって、筋萎縮からの回復を考えた場合、筋線維の太さだけでなく、核も併せて検討する必要がある。

クレンブテロール (CLE) は喘息薬として使用されているが、同時に筋肥大を誘発することからドーピング剤として指定されている。肥大効果は速筋に強く作用するという報告が多く<sup>8) 9)</sup>、ギプス固定中の CLE 投与の筋萎縮の抑制効果も速筋に選択的に作用することと、筋線維のタイプによって異なることが先行研究により示されている<sup>10)</sup>。

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、萎縮させた後の回復期間に CLE の投与をおこなうことで、回復にどのような作用

があるのかを明らかにすることを目的とした。また、筋核数と衛星細胞の観察をおこない、骨格筋の再生にどのような影響をもたらしているのかも合わせて検討した。

## 2. 方法

## (1) ギプス固定, CLE 投与方法

実験には7週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用し、1週間の予備飼育後、足関節が底屈20度になるように包帯式ギプスを用いて固定した。ギプス固定を行わず、固定期間終了後に筋を摘出する対照群 (CON)、ギプス固定終了後に筋を摘出するギプス固定群 (IMM)、ギプス開放後14日間の回復期間に生理食塩水を投与する回復対照群 (R-CON)、ギプス開放後14日間の回復期間に CLE を投与する R-CLE 群に分けた。R-CON 群と R-CLE 群は、回復期間終了後に筋を摘出した (図1)。CLE は 1.0mg/kg/day で皮下投与を行い、生理食塩水の投与は CLE と等量になるようにした。被験筋はヒラメ筋 (SOL) と足底筋 (PLA) とした。ラットは体重測定後、麻酔科にて断頭屠殺し、筋を摘出した。筋は筋湿重量を秤量し、液体窒素にて瞬間凍結させ、分析まで -80℃ で保存した。

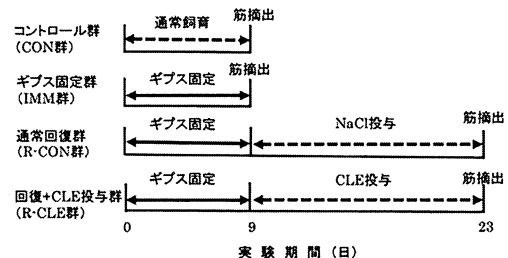


図1 実験期間と群分け

## (2) 免疫組織化学分析

SOL と PLA の筋腹部から厚さ 12  $\mu$  m の連続

切片を作成し、筋線維タイプを同定するために、Slow myosin と Fast myosin の抗体を用いて組織化学的染色を行った。1枚の横断面の深層部と表層部の2ヶ所の染色画像を、顕微鏡を介したCCDカメラを介して、コンピューターに取り込んだ。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、横断面積を測定した。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、 $\mu\text{m}^2$  に換算した。

筋の核数と衛星細胞の数を観察するため、衛星細胞のマーカーとしてM-cad, 筋形質膜のマーカーとしてDystrophin, 核のマーカーとしてDAPI 蛍光色素を用いて三重染色を行った。横断面積の測定と同じ、深層部と表層部の2ヶ所の画像を取り込み、印刷して核数を数えた。

(3) 統計処理

測定した数値は、分散分析を行った後、Tukey-Kramer 法を用いて多重比較を行った。全ての検定において、有意水準は5%未満 ( $P < 0.05$ ) とした。

3. 結果および考察

(1) 筋重量および相対的筋重量

ギプス固定により両筋において、筋重量および相対的筋重量は有意に低下したが、その低下はSOLで大きかった。これは、不活動によりSOLで顕著な萎縮が起こるという先行研究と同様の結果であった<sup>3)</sup>。筋萎縮後の回復率はPLAに比べてSOLで高く、速筋に比べて遅筋で代謝回転が速いとする過去の報告と一致していた<sup>11)</sup>。また、

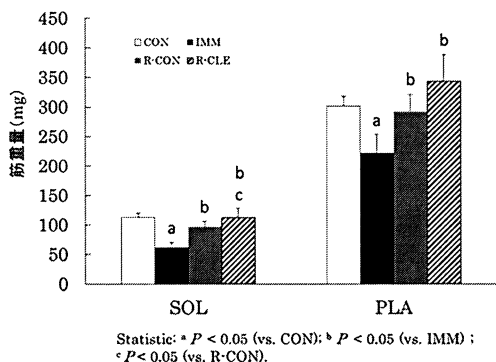


図2 ヒラメ筋と足底筋の筋重量

R-CLE群の回復率もPLAに比べてSOLで高かった。このことからCLEは遅筋であるSOLにも作用するという結果が得られた。ギプス固定により萎縮した遅筋では $\beta_2$ -アドレナリン受容体の感受性が変化し、CLEの効果が顕著にあらわれる可能性があるとの報告がある<sup>17)</sup>。したがって、固定の解放によりSOLにおいて高まったアドレナリン受容体の感受性が、同化作用を促進させた可能性が考えられた。(図2)。

(2) 筋線維横断面積 (CSA)

両筋においてCSAはいずれのタイプの筋線維で、固定により萎縮がみられたが、その萎縮はSOLで顕著だった。また、SOLのCSAはタイプII MHCを含む線維の回復が顕著であり、PLAにおいてもタイプII MHCを含む線維で有意な回復が観察された。筋線維は運動強度によりタイプI → I + II → IIの順に動員される<sup>12)</sup>とされており、このことから固定の解放による急激な加負荷により、大きな張力発揮を有するタイプII線維の動員が優先的に起こった可能性が考えられた。CLEを投与した場合、SOLのCSAはすべてのタイプの筋線維で顕著な回復を示し、R-CON群に

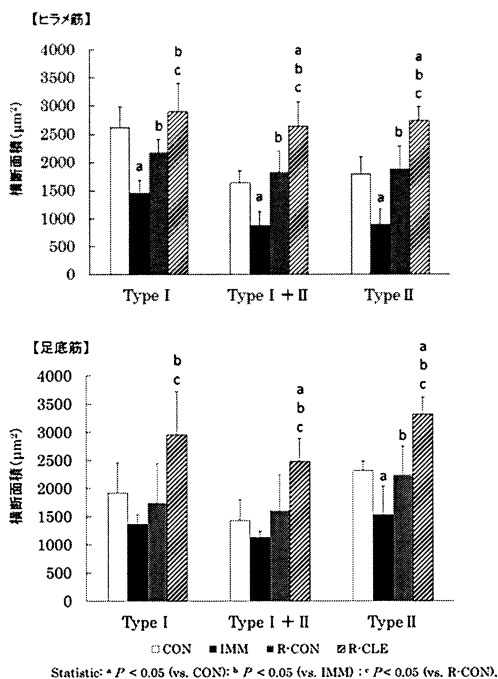


図3 タイプ別の筋横断面積

比べても有意に高値を示していた。PLAにおいてもCLE投与により同様な変化を示した。これらのことから、骨格筋のタイプに関わらずCLEには筋萎縮からの回復を促進させる作用があることが示された。(図3)

### (3) 筋核数および筋の支配領域

SOLの筋核数はいずれのタイプの筋線維で変化がなく、筋萎縮や筋肥大に伴って筋核は増減するとして先の報告と異なっていた<sup>6) 13)</sup>。核あたりの支配領域は筋線維の萎縮と回復に伴い変化していた。スペースフライトや後肢懸垂では、後肢筋を動かすことは可能であるが筋に負荷がかからない。ギプス固定はヒラメ筋の等尺性収縮が可能であるために、筋に多少の負荷がかかる。本研究で筋核の減少が観察されなかったことは、筋にかかる負荷が完全に消失していなかったことが関係している可能性が考えられた。PLAでは萎縮と回復に伴い筋核が増減しており、これは、不活動による筋萎縮は筋核の減少を伴うとした報告と一致していた<sup>5) 14) 15)</sup>。核の支配領域は筋萎縮と筋肥大に伴い筋核数も増減したため、ほとんど違いが

みられなかった。このように萎縮と回復において、SOLとPLA間で核数の変化の違いがみられた。速筋に比べて遅筋のタンパクの代謝回転が速いという報告から<sup>11)</sup>、その代謝回転に相応した遺伝子情報の提供を補償するためにも、遅筋のSOLでは特に筋核の減少がみられなかった可能性が考えられた。CLEを投与した場合、R-CON群に比べて筋核が増加したのはPLAだけであった。遅筋線維は遅筋線維に比べて $\beta_2$ 作動薬に対する感受性が高く、同様に細胞内RNA量も増加することが報告されている<sup>15)</sup>。したがって、これらの違いが両筋での核数の変化に違いをもたらした可能性が考えられた。(図4)

### (4) 衛星細胞

本研究で衛星細胞が観察されたのは、遅筋線維であるPLAのR-CLE群で数個あった。他の群で衛星細胞が観察されなかった理由として、萎縮による消失や再負荷での筋線維との融合などが考えられたが、それらを解明するためには、今後更なる研究が必要であると思われる。また、衛星細胞は筋線維横断切片では観察される核の数%と少ないため<sup>16)</sup>、縦断切片や全筋染色を行い、広い範囲で観察を行う必要があったと考えられた。

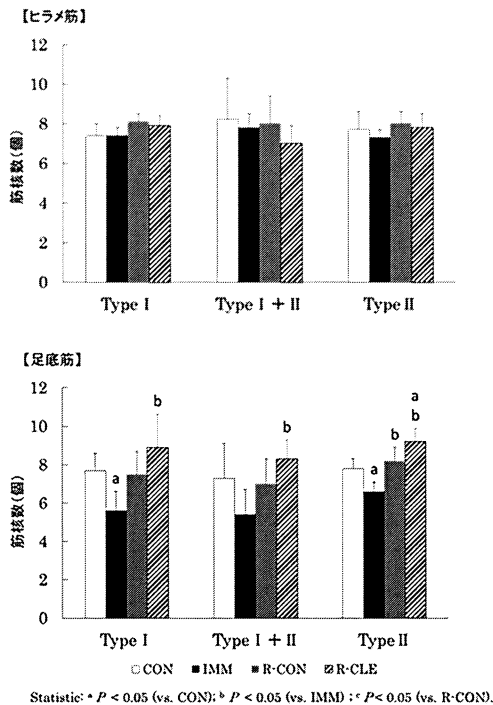


図4 タイプ別の筋核数

### 参考文献

- 1) 山田茂 (1999) : 骨格筋細胞の適応. 森谷敏夫編著, 運動と生体諸機能. ナップ: 東京, pp.2-18.
- 2) 久野譜也 (1997) : 生化学から筋力のエイジングの機構を探る. 山田茂, 福永哲夫編著, 骨格筋. ナップ: 東京, pp.172-188.
- 3) Oishi Y, Ogata T, Yamamoto K-I, Terada M, Ohira T, Taniguchi K, Roy RR. (2008) Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading. *Acta Physiol*, 192 (3) : 381-395.
- 4) Fujita N, Arakawa T, Matsubara T, Ando H, Miki A. (2009) 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.

- 5) Allen DL, Yasui W, Tanaka T, Ohira Y, Nagaoka S, Sekiguchi C, Hinds WE, Roy RR, Edgerton VR. (1996) Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol*, 81 (1) :145-151.
- 6) Allen DL, Monke SR, Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. (1995) Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol*, 78 (5) :1969-1976.
- 7) Allen DL, Roy RR, Edgerton VR. (1999) Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve*, 22 (10) :1350-1360.
- 8) 北浦孝. (2005) 骨格筋肥大と  $\beta_2$ -agonist との関連. *体力科学*, 54 (1) :57-58.
- 9) 松本健太郎, 北浦孝. (2005) クレブテロール投与のラット骨格筋における myogenin 発現への影響. *体力科学*, 54 (6) :468.
- 10) Suzuki H, Kitaura T. (2015) Attenuating effects of clenbuterol,  $\beta_2$ -agonist, on immobilization-induced atrophy of rat hindlimb muscle fibers. *J Phys Fitness Sport Med*, 4 (5) :363-367.
- 11) Hayase K, Yokogoshi H. (1991) Effect of suspension hypokinesia/hypodynamia on tissue protein turnover in rat. *Jap J Physiol*, 41 (3) :473-482.
- 12) Sale DG. (1987) Influence of exercise and training on motor unit activation. *Exerc Sport Sci Rev*, 15:95-151.
- 13) Mozdziak PE, Pulvermacher PM, (2001) Schultz E. Muscle regeneration during hindlimb unloading results on a reduction in muscle size after reloading. *J Appl Physiol*, 91 (1) :183-190.
- 14) Hikida RS, Nostran SV, Murray JD, Staron RS, Gordon SE, Kraemer WJ. (1997) Myonuclear Loss in Atrophied Soleus Muscle Fibers. *Anat Rec*, 247 (3) :350-354.
- 15) Kim YS, Sainz RD. (1992)  $\beta$ -adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. *Life Sci*, 50 (6) :397-407.
- 16) Schmalbruch H, Hellhammer U. (1997) The number of nuclei in adult rat muscles with special referenceto satellite cells. *Anat Rec*,189 (2) :169-176.
- 17) 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 (2008)  $\beta_2$ -アルゴニスト・クレブテロールによるラット骨格筋・心筋における  $\beta_2$  アドレナリン受容体 mRNA 発現への影響. *体力科学*, 57 (6) :974.

(指導教員 鈴木 英樹)