

後肢固定期間の違いがラット内側腓腹筋の異なる部位に及ぼす影響

鈴木 英樹* 辻本 尚弥**

* 保健体育講座

** 久留米大学人間健康学部スポーツ医科学科

Effects of Different Duration of Hind-limb Immobilization on Different Compartments in The Rat Medial Gastrocnemius Muscle

Hideki SUZUKI* and Hisaya TSUJIMOTO**

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

**Department of Sports Medicine and Science, Faculty of Human Health, Kurume 839-8502, Japan

Abstract

Rat medial gastrocnemius (MG) muscle is a compartmentalized muscle: two extramuscular nerve branches innervate proximal and distal compartments. This purpose of this study was to investigate adaptive responses of different compartments in the rat MG muscle during one or three weeks of cast-immobilization. Cross sectional area (CSA) of each typed fiber in both compartments were determined. One week after cast-immobilization, CSA of each typed muscle fiber decreased greater in the proximal region than in the distal region. However, CSA of each typed muscle fiber decreased greater in the distal region than in the proximal region from one week to three weeks after cast-immobilization.

These results suggested that the degree of muscle fiber atrophy induced by hindlimb cast-immobilization differed depending on the regions within the MG muscle, and that changes in those muscle fibers were influenced by the period of inactivity.

キーワード：ギプス固定, 内側腓腹筋, 筋線維, ラット

Keywords : cast-immobilization, Medial gastrocnemius, muscle fiber, rat

I 緒言

骨格筋はその機能的役割が異なるため、筋の種類によって筋線維タイプの構成比は特異的である (Ariano et al 1973, Walmsley et al. 1978)。また同じ骨格筋内においても筋部位間の差が認められている (Punkt et al. 1998, Lexell et al. 1994)。またラット内側腓腹筋は筋内の部位により組織化学的特性や生理学的特性が異なることが報告されている (De Ruiter et al. 1995a, 1995b, 1996, Vanden Noven et al. 1994)。組織化学的研究では、筋長軸方向の異なる部位より作成した筋横断切片より、膝関節に近い部位でタイプ I, IIA, IID/X の割合が高く、足関節に近い部位ではタイプ IIB 線維の割合が高いと報告されている (De Ruiter et al. 1995a)。生理学的特性については、筋内の異なる部位を支配する運動神経枝をそれぞれ刺激する方法により、遠位部と

近位部の収縮特性に違いが報告されている (De Ruiter et al. 1995a, 1995b, Vanden Noven et al. 1994)。これらのことから、内側腓腹筋における筋線維の動員や適応変化は筋内の部位により異なると考えられている。

我々は、これら内側腓腹筋の特性から、様々な刺激に対するこの筋の応答は筋内部位で異なると推測し、ラット後肢固定による不活動初期に対する応答を、内側腓腹筋の遠位部と近位部において筋線維レベルで比較した (鈴木と辻本 2012)。その結果、比較的短期間の不活動に対する内側腓腹筋の筋線維の応答は、同じタイプの筋線維であっても部位によってその応答が異なることが明らかになった。しかしながら、不活動期間がより長くなった場合、その応答の傾向は短期間の不活動と同様であるのかについては疑問が残った。

そこで、本研究では、先行研究 (鈴木と辻本 2012) と同様の不活動モデルを用いて不活動期間を延長し

て、不活動期間の違いが内側腓腹筋の異なる部位の筋線維横断面積に対する影響を明らかにすることを目的とした。

II 方法

実験動物として14週齢のFischer344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1週間の予備飼育を行った。飼料は固形飼料(CE-2; CLEA, JAPAN)を用い、飲水ともに24時間自由摂取とした。実験の概略についてはFig.1に示した。実験手順と動物の飼育・管理は、愛知教育大学動物委員会の承諾を得て、1964年のヘルシンキ宣言にも基づく日本生理学会の生理学領域における「動物実験に関する基本指針」(日本生理学会 2002)に従って行われた。

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(15CON)群、1週間の後肢固定を行う16週齢固定(16CAST)群および3週間の後肢固定を行う18週齢固定(18CAST)群の3群(各群 $n=5$)に分けた(Fig.1)。固定群にはBooth and Kelso (1973)の方法に従い、ラット後肢の足関節と膝関節のギプス固定を施した。ギプス固定は麻酔下にて、弛緩した状態で後肢の膝関節と足関節に包帯式ギプス(スコッチキャスト3-J; 3M社)を用いて行った。固定開始前の15週齢時に15週齢対照群より、固定1週間後に16週齢固定群より、固定3週間後18週齢固定群より内側腓腹筋(Medial gastrocnemius: MG)をそれぞれ摘出した。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、内側腓腹筋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染色をそれぞれ施し、筋線維の分析は、中村ら(2006)の報告に従い、内側腓腹筋の神経由来の近

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、Gorza (1990)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、標準偏差及び標準誤差を求め、統計学的な検定を行った。体重、筋重量では全群間の差を一要因の分散分析にて検定した。筋線維タイプごとの筋横断面積は、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(永田と吉田 1997)。全ての検定において有意水準は5% ($p<0.05$)とした。

III 結果

体重および筋重量を表1に示した。体重は15CON群に比べて16CAST群で低い値を示し、16CAST群に比べて18CAST群でさらに低値を示した。内側腓腹筋の重量は15CON群に比べて16CAST群で低い値を示し、16CAST群に比べて18CAST群でさらに低値を示した。内側腓腹筋の体重100gあたりの相対的重量は15CON群と16CAST群で有意な差は見られなかったが、18CAST群の値は15CON群および16ASTと比べて低値を示した。

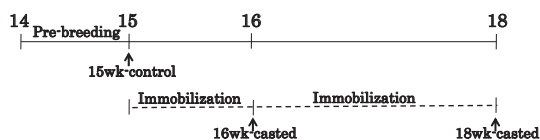
内側腓腹筋の近位部の筋線維横断面積を図2に示した。16CAST群と18CAST群の横断面積は、いずれのタイプの筋線維も15CON群に比べて低値を示し、タイプIID線維においては16CAST群に比べて18CAST群で低値を示した。

内側腓腹筋の遠位部の筋線維横断面積を図3に示した。16CAST群と18CAST群の横断面積は、いずれのタイプの筋線維も15CON群に比べて低値を示し、さらに、いずれのタイプの筋線維も16AST群に比べて18CAST群で低値を示した。

* Experimental animals: 15-week-old Fischer 344 female rat

* Group ; 15wk-control group, 16wk-casted group and 18wk-casted group

* Life time (wk)



* Analysis

Fiber identification : Myosin ATPase staining (pH4.6, 10.2)
⇒ Type I, IIA, IID, IIB

Fiber cross-sectional area : Image J (NIH)

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

	15wk-control	16wk-casted	18wk-casted
Body weight (g)	170±4	142±2 ^a	128±5 ^{a,b}
MG weight (mg)	337±7	263±10 ^a	167±3 ^{a,b}
Relative MG weight (mg/100g B.W.)	198±3	185±6	133±5 ^{a,b}

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-casted group ($p<0.05$)

Fig.1. Experimental schedule

IV 考察

本研究は後肢ギプス固定による不活動によって誘発される筋線維の萎縮が、内側腓腹筋の近位部と遠位部で固定期間によって異なるかを調べた。

固定による不活動で誘発される筋萎縮はその期間と密接に関係していることが知られており、固定期間が長くなると萎縮の程度は大きくなることが報告されている (Appell 1986a, 1986b, Wills et al. 1982)。本研究において筋重量と相対的筋重量は共に固定前に比べて、固定1週間後で低値を示し、固定3週間後でさらに低値を示した。これらの結果は先行研究と同様であり、固定期間が長くなるほど萎縮が顕著になることが

示された。

固定1週間後の筋線維横断面積は固定前に比べて、近位部と遠位部共にすべてのタイプの筋線維で低値を示した。さらに、両部位に存在するタイプIIDとIIB線維の萎縮率は、近位部でそれぞれ27.0%と33.3%だったのに対して、遠位部ではそれぞれ21.7%と24.0%だった。これらの結果は、不活動初期における固定は内側腓腹筋では遠位部に比べて近位部により影響したことを示していた。筋線維は運動強度に従って、タイプI < IIA < IIB線維の順に動員される (Walmsley et al. 1978)。これらの筋線維 (運動単位) の活動様式から、タイプI線維は姿勢維持など低強度で持続的な動員がなされるのに対して、タイプIIB線維は比較的大きな張力発

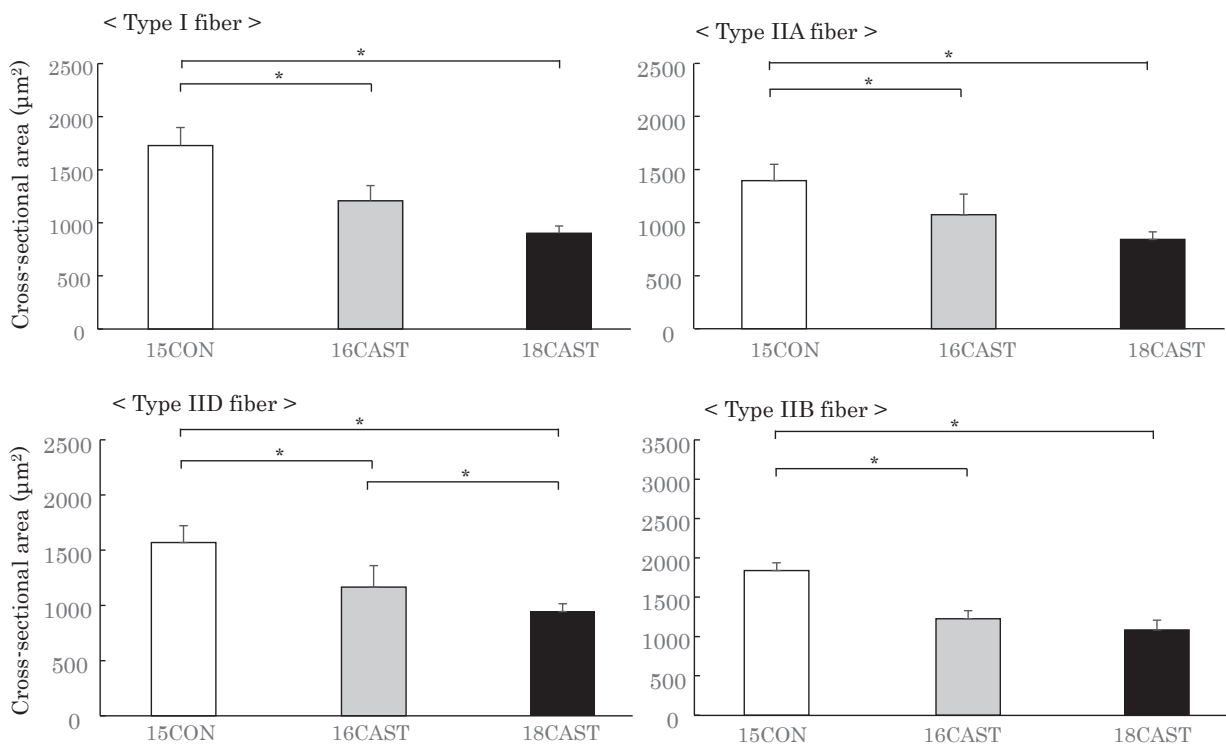


Fig.2. Cross-sectional area in each typed fiber of proximal region in medial gastrocnemius muscle.

* ; Significantly different between each (p<0.05).

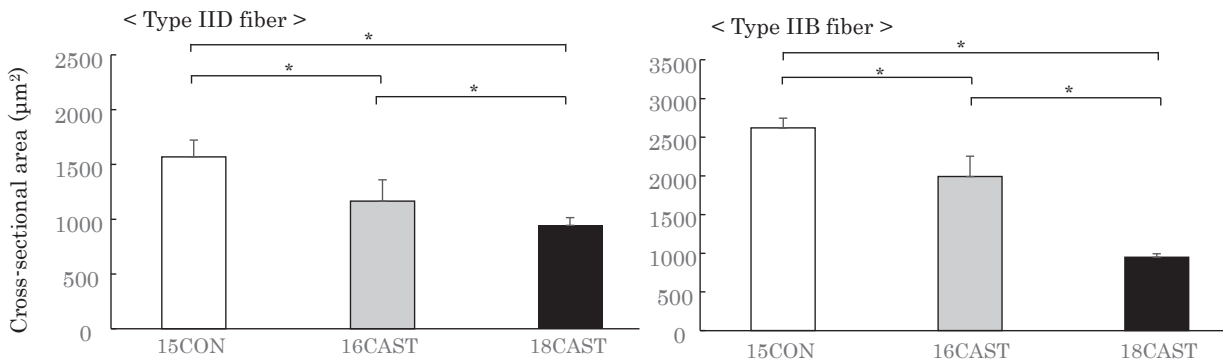


Fig.3. Cross-sectional area in each typed fiber of distal region in medial gastrocnemius muscle.

* ; Significantly different between each (p<0.05).

揮や速い収縮活動時に動員され、タイプIIA線維はそれらの中間的な動員がなされると考えられている。本研究で用いたラットの内側腓腹筋ではタイプIとIIA線維は、近位部でしか観察されなかった。さらに、De Ruiterら (1995a, 1995b) は、ラット内側腓腹筋の近位部と遠位部を支配する神経をそれぞれ電気刺激することにより収縮特性を調べて、近位部はより緊張性の、遠位部はより相動性の収縮特性を有していることを報告している。これらのことから、遠位部に比べて近位部はより姿勢維持等の持続的活動に動員されていると考えられる。したがって、固定による不活動初期の活動量の低下は、日常活動における活動頻度の高い近位部の筋線維にその影響が現れたものと考えられた。

固定1週間後の値よりさらに低値を示した固定3週間後の筋線維横断面積は、近位部ではタイプIID線維だけであったのに対して、遠位部ではタイプIIDとIIB線維が共に低値を示した。さらに、タイプIIDとIIB線維の萎縮率は、近位部でそれぞれ19.0%と11.7%だったのに対して、遠位部では29.1%と52.3%だった。これらの結果は、固定開始初期 (1週間) とは異なり、その後の筋線維の萎縮は遠位部で顕著だったことを示していた。先に我々はラットの後肢ギプス固定と後肢懸垂モデルを用いて、不活動開始1週間目と3週間目での筋重量の変化を比較検討した (鈴木と辻本, 2010)。それらの結果、ギプス固定では内側腓腹筋の重量は固定期間の延長に伴い低下するが、後肢懸垂では開始後1週間は後肢筋群の筋重量は低下するものの、開始後1週間から3週間では筋重量に変化がみられなかった。ギプス固定と後肢懸垂モデルの違いは、後肢懸垂では無負荷ではあるが後肢後方筋のアイソトニック (同張性収縮) な活動が可能であるのに対して、ギプス固定の後肢筋群ではアイソメトリック (等尺性収縮) な活動のみが可能なことである。また、筋電図を用いた研究により、固定期間中の内側腓腹筋のIEMG (Integrated electromyogram) は50%低下するものの筋活動がなされていることが確認されている (Fournier et al. 1983)。これらのことより、固定によるアイソトニックな筋活動刺激の欠如が、相同的な動員をより担っている内側腓腹筋の遠位部により影響していた可能性が考えられた。

以上のことから、後肢ギプス固定による不活動で誘発される筋線維の萎縮は、内側腓腹筋内で部位によって異なり、さらに、不活動期間によって左右されることが示唆された。

利益相反自己申告

著者全員について利益相反はない。

著者の資格と著者貢献

著者 HSと著者 HT は研究計画を立案し実行した。

著者 HS と 著者 HT はデータの採取と分析及びその解釈を担当した。著者 HS は草稿を、著者 HT は原稿の推敲を担当した。全ての著者は最終原稿を熟読し吟味した上で投稿を承認した。

V 参考文献

- Appell HJ (1986a) Skeletal muscle atrophy during immobilization. *Int. J. Sports Med.*, 7: 1-5. doi: 10.1055/s-2008-1025725.
- Appell HJ (1986b) Morphology of immobilized skeletal and effects of a pre- and post-immobilization training program. *Int. J. Sports Med.*, 7: 6-12. doi: 10.1055/s-2008-1025726.
- Ariano MA, Armstrong RB, Edgerton VR (1973) Hind-limb muscle fiber populations of five mammals. *J Histochem Cytochem.*, 21: 51-55. doi: 10.1177/21.1.51.
- Booth FW and Kelso JR (1973) Production of rat muscle atrophy by cast fixation. *J. Appl. Physiol.*, 34: 404-406. doi: 10.1152/jappl.1973.34.3.404.
- De Ruiter CJ, De Haan A and Sargent AJ (1995a) Physiological characteristics of two extreme muscle compartments in gastrocnemius medialis of the anaesthetize rat. *Acta Physiol. Scand.*, 153 (4): 313-324. doi: 10.1111/j.1748-1716.1995.tb09869.x.
- De Ruiter CJ, De Haan A and Sargent AJ (1995b) Repeated force production and metabolites in two medial gastrocnemius muscle compartments of the rat. *J. Appl. Physiol.*, 79 (6): 1885-1861. doi: 10.1152/jappl.1995.79.6.1855.
- De Ruiter CJ, Habets PEMH, De Haan A and Sargent AJ (1996) In vivo IIX and IIB fiber recruitment in gastrocnemius muscle of the rat is compartment related. *J. Appl. Physiol.*, 82 (2): 933-942. doi: 10.1152/jappl.1996.81.2.933.
- Fournier M, Roy RR, Perham H, Simard CP and Edgerton VR (1983) Is limb immobilization a model of muscle disuse? *Experimental Neurology*, 80 (1): 147-156. doi: 10.1016/0014-4886 (83) 90011-0.
- 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. doi: 10.1177/38.2.2137154.
- Lexell J, Jarvis JC, Currie J, Downham DY, Salmons D (1994) Fiber type composition of rabbit tibialis anterior and extensor digitorum longus muscles. *J Anat.*, 185: 95-101
- 永田靖, 吉田道弘. 「統計的多重比較法の基礎」, サイエンス社: 東京, 1997.
- Punkt K, Mehlhorn H, Hilbig H (1998) Region- and age-dependent variations of muscle fiber properties. *Acta Histochem.*, 100: 37-58. doi: 10.1016/S0065-1281 (98) 80005-6.
- 鈴木英樹, 辻本尚弥 (2010) ラットの後肢骨格筋における固定とサスペンションの影響. 愛知教育大学研究報告, 第59輯: 43-46.
- 鈴木英樹, 辻本尚弥 (2012) 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—。愛知教育大学研究報告, 第61輯: 37-39.
- 日本生理学会 (2002) 生理学領域における動物実験に関する基本的指針。日本生理学雑誌, 64 (7-8): 140-146.
- 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.
- Vanden Noven S, Gardiner PF and Seburn KL (1994) Motoneurons innervating two regions of rat medial gastrocnemius muscle with differing contractile and histochemical properties. *Acta Anat.*, 150: 282-293. doi: 10.1159/000147631.
- Walmsley B, Hodgson JA, Burke RE (1978) Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *J Neurophysiol.*, 41: 1203-1216. doi: 10.1152/jn.1978.41.5.1203.
- Wills CA, Caiozzo VJ, Yasukawa DI, Pretto CA, McMaster WC (1982) Effects of immobilization on human skeletal muscle. *Orthop. Rev.*, 11: 57-64.

(2022年9月12日受理)