

伸張性収縮による筋損傷・回復期の機能と形態変化

春日規克*・平野朋枝¹・西沢富江**・竹倉宏明***

*保健体育講座 (生理学)

**鳥取大学医学部運動療法講座

***鹿屋体育大学体力科学講座

Muscular injury and recovery as myofiber structures and contractile properties following eccentric contraction in rat.

Norikatsu KASUGA*, Tomoe HIRANO¹, Tomie NISHIZAWA** and Hiroaki TAKEKURA

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

**Department of Sports Medicine and Science, Tottori University, Tottori, Tottori 680-8550 Japan

***Department of Physiology and Biomechanics, National Institute of Fitness and Sports, Kanoya, Kagoshima 981-2393 Japan

第1章 序 論

過度なあるいは不慣れな運動の1-3日後に起こる筋痛は、痛覚を持たない筋細胞や乳酸性の代謝要因ではなく、筋を包む結合組織上の痛覚刺激により発生する²¹⁾。この痛みの根元に関する詳細は不明であるが、筋組織の損傷と関係するようである²⁾。

筋痛は特に伸張性収縮を繰り返すことにより発生する。下り走やジャンプの着地時、あるいは腕立て伏せなどの抗重力的運動を行う際には、拮抗筋は伸張性収縮を強いられている。この伸張性収縮後の痛みに平衡して、その筋が司る関節の可動範囲の減少・筋力の低下・浮腫発生¹⁷⁾、あるいは血液性状からみた筋細胞特有の逸脱酵素増加¹⁾などが発生することが確かめられている。実験動物をもちいて下り走などの伸張性収縮運動を課し、筋の損傷程度や生理的な特性の変化を調べた研究は多くみられる¹⁷⁾¹⁸⁾。筋損傷は筋細胞の壊死あるいは部分的変性、支配神経との連絡遮断などにより機能低下として現れる¹⁰⁾。筋の損傷は筋線維の壊死に至り、続いて速やかに再生が開始される。その再生は胎児期の筋発生と同様の変化要素を多く含み、また、サイトカインなど免疫系の多要素により補償される⁹⁾など特有の変化を示す。遮断された神経と筋は個々に修復が進み⁹⁾、神経終末の軸索での発芽は損傷前の痕跡等が影響する。支配神経を失った成熟した筋線維は、広くその線維上にアセチルコリン感受性が高め、神経

終末の発芽結合を容易にする³⁾。また、損傷した筋は約1カ月程度で形態的にも回復する事が報告されている¹³⁾。一方、筋の本来の役割である収縮機能がこの急速な変化を引き起こす損傷と回復過程において、いかに変化するかは報告されていない。

本研究では、筋に伸張性収縮を行わせ損傷を引き起こした際の筋縦横断面の形態変化と収縮機能変化と回復期の変化を経時的に観察し、筋損傷から回復過程の機能との関係を検討した。

第2章 方 法

実験動物として生後8から10週齢のFischer 344系雌ラットを用いた。また、被験筋は足底筋(PLA)とした。PLAは下腿の足関節背屈動作に関わる筋であり、また腓腹筋・ヒラメ筋の協同筋として働く速筋である。

ラットにペントバルビタールナトリウム(50mg; body weight)を腹腔内より注入し麻酔した。ラットの下腿背部を脱毛し、皮膚上に筋電導出用の直径5mmの銀電極を刺激電極として装着した。ラットは伏臥位でステージ上に固定し、足部は回転軸となるバーの付いたプレート上に足先から踵まで収まるようにゴムバンドで固定した。電気刺激は皮膚および下腿背部表層筋である腓腹筋を通して、足底筋の収縮が最大となるよう極大強度により刺激した。また電気刺激は、持続時間0.5msの矩形波を頻度7msにて1.4秒間継続し足底筋を完全強縮させた。刺激開始から、0.3秒後にサーボモーターにより足関節を1.2秒間で120度屈曲さ

1 愛知教育大学非常勤講師 (Part-time teacher, Aichi University of Education)

せた。このような伸張性収縮を30秒ごとに1回の割合で30分間の計60回繰り返すことで筋損傷を誘発させた。

この機械的伸張性収縮後の1, 3, 5, 7, 14, 21日目に張力特性と組織化学的特性を調べた。その他に対照群 (Pre) を含め各群5匹ずつを実験に供した。

張力の測定はラットが十分なペントバルビタールナトリウム麻酔下にて行った。足底筋を露出させ、血流維持の状態を保ち、末梢側腱を切断し歪み計に連絡させることで張力を測定した。この際の被験筋に対する電気刺激は、支配神経である腓骨神経からの間接刺激あるいは、筋への直接刺激の両方法にて行い張力を測定した。張力測定時には、ラットをアクリル樹脂製のチャンバー内に固定し、被験筋はラット下腿部とともにリングロック液に浸漬された。ロック液温は $36 \pm 0.5^\circ\text{C}$ を保ち、溶液は毎分約20mlの割合で交換した。腓骨神経からの間接刺激またはPLAへの直接刺激は、持続時間は0.1msecの矩形波による極大電気刺激とした。また、筋長は最大張力が得られるよう至適長に調整し、異なる刺激頻度による強縮張力と最大強縮張力、疲労耐性を調べた。疲労耐性の測定は、種々の刺激頻度(45~5ms)にて測定した発揮張力高から、最大強縮張力の50%高が得られる刺激頻度を決定し、1.5sec毎に450ms間の不完全強縮刺激を起こさせた。この刺激条件を5分間継続し、得られた疲労曲線から疲労耐性を求めた。

張力測定終了後、直ちに筋を摘出し湿重量を測定した。次に、液体窒素で冷却したイソペンタン中にて急速凍結し、組織化学的分析のために厚さ10 μm の連続横断切片を作成した。組織化学染色は筋損傷から崩壊の過程を観察するためのH&E (Hematoxylin and Eosin) 染色とした。また、筋の一部は3.5%グルタルアルデヒドにて固定後、さらに2%オスミウムにより後固定を2時間行い、飽和酢酸ウラニル水溶液にて染色した。次にエポキシ包埋を行い、24時間の重合乾燥後に45nmの縦断切片を作成した。切片に酢酸ウラニル・混合鉛にて二重染色を施し電子顕微鏡観察を行った。

飼育期間中のラットは、室温を23~25 $^\circ\text{C}$ を保ち、常に換気された小屋にて、ゲージ(265 \times 425 \times 150mm)内で飼育した。餌は固形飼料(日本クレア株式会社製CE-2)とし、飲水とあわせて24時間自由摂取とした。

全ての実験は、実験動物の扱いについては「実験動物の飼育及び保管等の基準」に基づいて行った。

第3章 結 果

機械的伸張性収縮により引き起こされた筋損傷と、それに続く再生過程の構造的変化を知るためにH&E染色をおこなった。図1には対照筋(a)と筋損傷から3・7・21日後の筋横断面像(b, c, d)を示し

た。伸張性収縮にともなう筋損傷の程度は、個体差や筋の部位による違いが大きくみられる。図1には最も特徴的であり顕著な崩壊の様相を示した部分像を選択し示した。H&E染色は全ての蛋白に陽性であり、対照筋において筋線維毎にH&E染色強度が異なってみられる。これは細胞内膜構造やミトコンドリアの多く含まれるtype Iやtype II a線維ほど濃く染められるためと考えられる。3日後(b)の断面像には、膨潤した丸みのある線維が全体を占め、また過収縮状態を示すopaque線維(→)や蛋白が希薄な筋線維(⇨)がみられる。また、細胞外溶液が増えたため、線維間に広い隙間がみられる。7日後(c)には損傷筋線維部にマクロファージが浸潤し(→)、貪食活動が進行している。一方、再生を示す衛星細胞の活性化した線維もみられる(⇨)。21日後(d)には、まだ丸みのある線維が全体を占めている。細い未発達な線維もみられるが(⇨)、損傷線維やマクロファージの浸潤は見られず、ほぼ全域にわたり回復した像が得られた。また、再生筋線維を表す中心核線維も見られる(→)。

筋の全横断面像より正常な筋線維と損傷した筋線維数を算出し図2に示した。対照筋はpreとして表した。伸張性収縮から3日後の損傷筋線維は全体の60.98%を占め、損傷範囲も広く見られた。3日目以降は損傷線維数が減少し、7日後には損傷線維の割合は10%以下となった。しかし、5から7日後にかけては、貪食処理され消失した壊死線維の部位と細胞外溶液やマクロファージの浸潤部位との区別を行うことが困難であった。このため、損傷線維比の減少が、そのまま再生進行を示してはいない可能性がある。伸張性収縮から21日後には98.6%が正常線維であった。尚、伸張性収縮1日後に関しては、分析数が少ないために結果から削除した。

機械的伸張性収縮により引き起こされた筋損傷・再生過程の張力特性の変化を図3に示した。図上段は白丸にて最大強縮張力を示した。伸張性収縮の3日後にはpreの約60%まで最大強縮張力は減少し、測定した全期間の最小値を示した。強縮張力はそれ以降は増加を示し、14日後にはpre値の約90%まで回復した。中段黒丸により示した直接刺激張力に対する間接刺激最大強縮張力の比は、5日後に最低値を示した。このときの相対値は68%まで低下し、それ以降は回復傾向がみられた。14日後にはほぼ100%に回復した。下段のシナプス遅延時間は、pre値が約0.5msあった。遅延時間は筋損傷にともない5日後までに2倍以上に延長した。7日後にはpre値と同様の値を示した。

最後に、損傷の最も顕著であった伸張性収縮3日後の筋線維に関して、特に運動終板上の神経筋接合部を電子顕微鏡像から観察した。対照筋(a)と損傷3日目(b)の神経筋接合部の電顕像を図4に示した。対照筋では筋のミオシン(M)・アクチンフィラメント

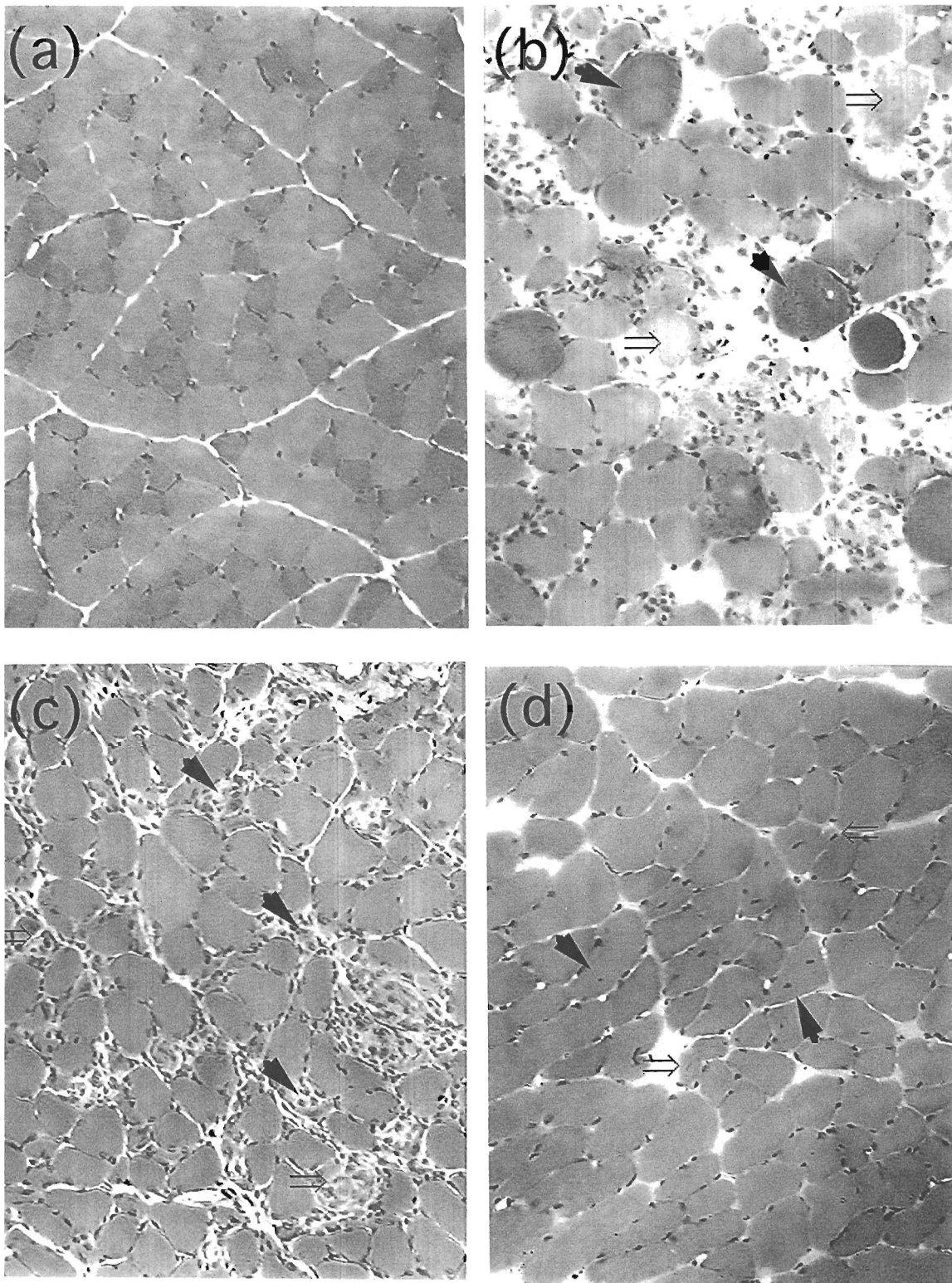


図1 伸張性収縮前 (a), 3日後 (b), 7日後 (c), 21日後 (d) の筋横断面ヘマトキシリン&エオジン染色像

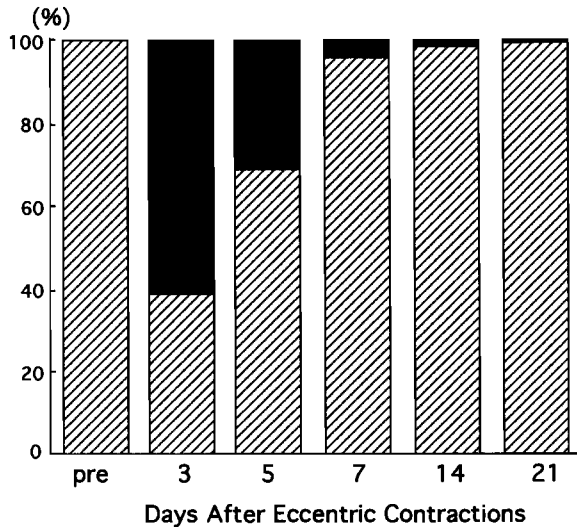


図2 伸張性収縮後の正常筋線維と損傷線維の比率変化

▨ normal fiber ■ injured fiber

(A)が形成する規則構造が明らかにみられ、核(N)や形質膜(S)なども観察できる。また、神経末端部も軸索終末の膜構造(n)や中のシナプス小胞(Sb)が見られる。一方、3日後には筋のZ膜(Z)に乱れが生じ、フィメント構造の不均一化(→)が起こっていると同時に、筋線維-神経軸索間隙の膜構造にも損傷が起こっていることが観察された(※)。

第4章 考 察

本研究では伸張性収縮にともなう筋損傷から再生回復に至るまでの変化を観察し、筋の形態と機能回復の関係を検討した。

筋の損傷は伸張性収縮時の物理的衝撃が直接原因であったり、過度の収縮にともなう細胞環境の変化による化学的要因により発生すると考えられている¹⁶⁾。本研究において同じ筋内の損傷部位を筋幅部遠位・近位部別に観察したところ、近位部での損傷が多いこと、同じ横断面でも表層部に損傷筋が散在すること、速筋タイプである type II b 線維が明らかに損傷率が高いこと⁸⁾¹¹⁾などの結果が得られた。これらの結果は、筋損傷が細胞単位で発生することを示していた。筋損傷は細胞膜が壊れ筋線維に細胞外液が流入することで認められる。細胞外液には高濃度の Ca^{2+} が含まれており、細胞内に流入すると筋原線維は不可逆的過収縮を起こす。過収縮を起こした部位は図1(b)の横断面像に見られるような opaque 線維として観察できる。過収縮を起こし筋の規則構造を失い、丸く膨れ上がった筋細胞である opaque 線維は損傷の指標として用いられる⁷⁾。線維内に流入した Ca^{2+} により蛋白分解酵素(CANP; calcium activated neutral protease)が活性化され、自己消化へと損傷は発展する。分解酵素は最初に α -アクチニンを分解し、結果としてZ線が大き

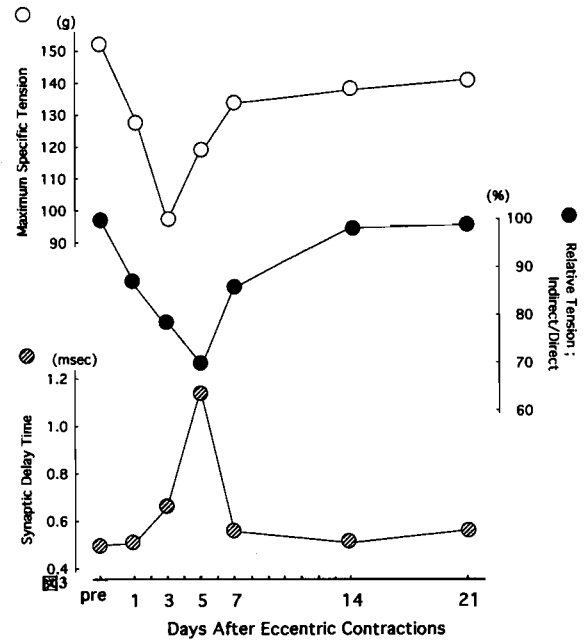


図3 伸張性収縮後の最大強縮張力、間接/直接電気刺激発揮張力比、シナプス遅延時間の変化

く乱れ、また消失する現象が起きる(図4-b)。筋原線維の消化が進行し、筋線維には断裂・空洞化・壊死といった崩壊現象が見られる。崩壊部への貪食作用としてマクロファージが侵入し(図1-c)、線維間には単核細胞で満たされる。このような筋線維の崩壊は、筋線維の全長にわたり起こるものではなく、一部で再生されることが報告されている⁴⁾。食作用により筋線維内の崩壊した部分は清掃されるが、このような筋細胞損傷過程は同時に再生の進行を含んでいる¹⁶⁾。

筋線維の崩壊から再生する過程は筋の発成長過程を再現したものである。筋の発生時には単核の筋芽細胞が融合し、多核の細胞としての筋管細胞となり筋原線維が形成される。さらに神経支配を受けて成熟した筋線維へと急速に分化していく¹⁶⁾。筋崩壊からの再生時に現れる筋芽細胞は、筋鞘と基底膜の間に存在する衛星細胞である²⁰⁾。本結果における筋横断切片像の経時的観察から、損傷が進行しマクロファージの浸潤段階において衛星細胞の活性化にともなう再生の開始が確認された(図1-c)。衛星細胞は活性化・分裂・融合を繰り返して再生筋線維を形成する。21日後の横断面像には、マクロファージの浸潤もほとんど見られない一方、小径線維や中心核線維などの再生結果を示す線維が多く観察された(図1-d)。図2に示されるように、損傷した筋線維の割合は3日後には約6割に達するが、14日後には正常な筋線維が9割以上を占め、再生線維の形成が急速に進行することも示めされた。

直接刺激により得られた最大強縮張力(図3上段)は、組織像でみられた筋の損傷量の増加にともない変化し、3日後に最低値を示した。3日目以降は正常線

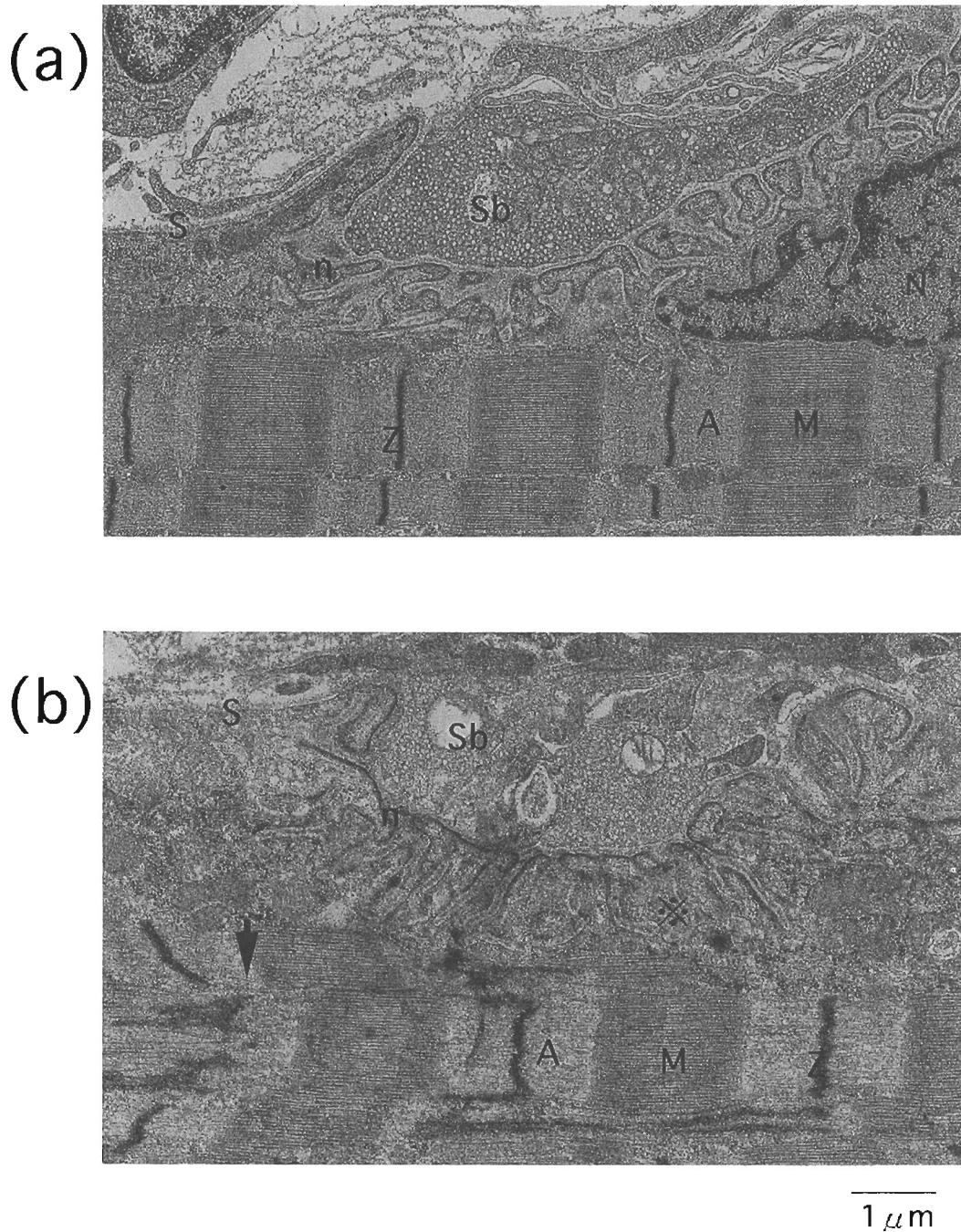


図4 伸張性収縮後の神経-筋接合部の電子顕微鏡像

維の増加にともない張力にも回復がみられた。しかし、正常線維占有率と最大張力からみた機能変化に数値的一致はみられない。伸張性収縮3日後の強縮張力はpre値の64%であったのに対し、正常筋は40%を占めるのみであり、両者に大きな違いがあった。さらに、損傷は筋線維の一部で起こるため、本研究で行った一横断面像のみから形態観察結果では損傷量を少なく見積もる可能性がある。この形態から見た損傷量の大きさに比べ機能的低下が小さかった理由としては、筋線維の一部の損傷であっても収縮機能は完全に失われて

いない可能性が考えられた。また、形態的回復が14・21日後にはほぼ完了していたのに対し、最大強縮張力では90%までしか回復していなかった。この理由として、14日以降の線維に極端な損傷は見られないが、丸みを帯びた膨潤状態が残っていることが考えられた。これは細胞内水溶液が貯留していることを意味し、フィラメント間距離（格子間隔）の拡大が続いていた可能性が考えられた¹⁹⁾。

図3の中段に示した直接刺激により発揮される最大張力に対する間接刺激最大張力比の低下は、筋損傷の

影響により神経筋接合部における情報遮断, つまり脱神経が起きていたと考えられる¹⁵⁾¹⁹⁾。この比は伸張性収縮3日後に76%を示し, 同時に測定した直接刺激最大張力に乘じた値は71.4gであった。これは間接刺激で発揮される張力を示し, pre 値の47%であった。先に示した3日後の正常筋線維比は40%であり, 間接刺激による発揮張力と近い値が得られた。神経筋接合部の損傷による機能的低下は形態からの損傷量の大きさにも反映すると考えられた。一方, 5日後の間接刺激と直接刺激の比は最低値を示し, またシナプス遅延時間も最大値が5日後に見られた。これらの結果から, シナプスにおける刺激伝達系にも損傷があったと考えられた。さらに, 形態的損傷と最大強縮張力の低下は3日後に大きく現れたのに対し, 張力比とシナプス遅延という神経筋接合部の機能は5日後に遅れて低下した。筋細胞の損傷による膜透過性の変化やイオン組成の変化が, 神経筋接合部の微細構造や機能に影響し, シナプス遅延時間の延長や神経筋の離脱を引き起こしたと考えられた。図4に示した電顕像においても筋原線維構造の乱れと共に, 間隙膜構造の消失した神経筋接合部が観察され, 微細構造の変化と機能低下との関係が示された。神経-筋接合部の機能を示すシナプス遅延時間は5から7日後には回復した。

筋線維の構造が反映する最大強縮張力の回復に比べ, 接合部の修復は早急に完了し, 筋線維の損傷により引き起こされる神経-筋接合部の損傷が, 再生過程の最も初期に回復する¹⁴⁾ことは, 刺激伝達系を安定させることにより筋線維の回復を補償する生理的機構と考えられた。

第5章 ま と め

伸張性収縮より引き起こされる筋損傷から再生過程における, 骨格筋の構造と機能変化を調べた。成熟初期である, 生後9週齢の雌ラット足底筋を電気刺激により収縮させ, 同時に機械的に伸張を起こすことで筋損傷を誘発した。伸張性収縮を行った1日後から21日後までの筋線維横断像と張力特性を観察した。横断切片のH&E染色像から3日後には, 明らかな損傷線維が多数観察された。7日後には回復が始まる一方, 損傷を起こし線維周辺にマクロファージの浸潤が見られた。21日後にはほぼ回復が終了し, 再生線維が多数みられた。一方, 3日後までに筋損傷の影響である直接刺激強縮張力の低下が現れた。また, 直接刺激に対する間接刺激強縮張力比も低下し, 5日後に最低値を示した。シナプス遅延時間にも同時期に延長が認められた。これは筋損傷が神経筋接合部に起こっていたことを示す結果と考えられた。神経筋接合部の電顕像からも, 筋損傷による神経筋の解離が起こる可能性も示された。伸張性収縮による筋損傷は比較的早期回復するが, 神経筋の刺激伝達系の回復はさらに速く進行し,

筋組織の修復を促すことが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Armstrong, R. B., R. W. Ogilvie, and J. A. Schwane. Eccentric exercise induced injury to rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 54: 80-93, 1983.
- 2) Armstrong, R. B. Muscle damage and endurance events. *Sports Med.* 3: 370-381, 1986.
- 3) Axelsson, J. and S. Thesleff. A study of supersensitivity in denervated mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 147: 178-193, 1959.
- 4) Baker, J. H. and C. E. Poindexter. Muscle regeneration following segmental necrosis in tenotomized muscle fibers. *Muscle & Nerve* 14: 348-357, 1991.
- 5) Friden, J., U. Kjorell, and L. E. Thornell. Delayed muscle soreness and cytoskeletal alterations: an immunocytological study in man. *Int. J. Sports Med.* 5: 15-18, 1984.
- 6) Gutmann, E. and J. Z. Young. The reinnervation of muscle after various periods of atrophy. *J. Anat.* 78: 15-43, 1944.
- 7) 桒澤一夫, 桒中征哉, 小沢英二郎編. 筋病理学; 筋再生. 文光堂, 1989.
- 8) 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一. 岡崎女子短期大学紀要 33: 143-150, 2000.
- 9) Kami, K. K., Noguchi, and E. Snba. Localization of myogenin, c-fos, c-jun, and muscle-specific gen mRNAs in regenerating rat skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* 280: 11-19, 1995.
- 10) Kasuga, N., T. Nishizawa, R. Kozakai, Y. Suzuki, H. Tsuzimoto, and H. Suzuki. Contractile properties and Histochemical study of Suited training for skeletal muscle. *Jpn. J. Biochem. Exec.* 7: 6-14, 1994.
- 11) 春日規克, 平野朋枝, 鈴木英樹, 小笠原仁美. 伸張性収縮にともなう筋線維タイプ別の損傷. 体力科学. 48: 729, 1999.
- 12) Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 493-495, 1961.
- 13) McCully, K. K. and J. A. Faulkner. Injury to skeletal muscle fibers of mice following lengthening contraction. *J. Appl. Physiol.* 59: 119-126, 1985.
- 14) Miledi, R. Properties of regenerating neuromuscular synapses in the frog. *J. Physiol.* 154: 190-205, 1960.
- 15) 西沢富江, 竹倉宏明, 小笠原仁美, 春日規克. 筋損傷後の運動神経終末の形態変化と筋発揮張力. 体力科学. 46: 623, 1997.
- 16) 桒中征哉; 臨床のための筋病理学入門 第1刷, 日本医事新報社出版局, 1987.
- 17) Nosaka, K. and P.M. Clarkson. Muscle damage following repeated bouts of high force eccentric exercise. *Med. Scie. Sports Exerc.* 27: 1263-1269, 1995.
- 18) Ogilvie, R. W., R. B. Armstrong, K. E. Baird, and C. L. Bottoms. Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically biased exercise. *Am. J. Anat.* 182: 335-346, 1988.
- 19) Schoenberg, M. Geometrical factors influencing muscle force development. The effect of filament spacing upon

- axial force. *Biophys. J.* 30: 51-68, 1980.
- 20) Schultz, E., D. L. Jaryszak, C. R. Villiere. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle & Nerve* 8: 217-222, 1985.
- 21) Smith, L. L. Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? *Med. Scie. Sports Exerc.* 23: 542-551, 1991.

(平成12年 9 月 8 日受理)