

〔原著〕

筋力増強運動の効果が出現するまでの期間は 萎縮筋と健常筋とで異なる

伊 東 佑 太¹, 梶 田 知 沙², 粥 川 愛 里³, 日 紫 喜 雄 斗⁴

要 旨

本研究では、健常な筋と萎縮した筋とで、筋力増強運動に対する反応性が異なるかどうかを検証した。足関節底屈筋が健常なマウスと萎縮を起こしたマウスに対して、同じ条件の筋力増強運動を1週間行わせた（各々健常筋群、萎縮筋群）。1週間の運動施行後、マウスからヒラメ筋を採取し、組織学的に解析した筋線維横断面積や筋線維核数の変化を指標に筋力増強運動の効果を評価した。その結果、萎縮筋群では筋線維横断面積の増大や筋線維核数の増加を認めた。しかし、同じ条件下の運動を行った健常筋群の筋線維横断面積や筋線維核数には変化がみられなかった。以上のことから、健常筋と萎縮筋とでは筋力増強運動に対する異なる反応性が存在すると考えられた。従って、筋萎縮の回復を目的とするリハビリテーションでは、健常筋の肥大に効果的な運動条件ではなく、萎縮筋の回復に適した運動条件を取り入れるべきである。

キーワード：筋力増強運動，筋線維横断面積，筋線維核，健常筋，萎縮筋

骨格筋の大きさを変化させる目的で筋力増強運動が行われているが、その効果の評価は研究分野によって様々に異なる。リハビリテーションの分野において、その対象となる骨格筋は筋萎縮を起こしている場合が多い。これまでに我々は、後肢に筋萎縮を起こしたマウスに対し、筋力増強運動を1週間行くと、単に再荷重するよりも早期に筋線維横断面積が回復することを報告している [9]。一方でスポーツの分

野で報告されている健常筋を対象とした研究では、筋の大きさの変化をとらえるまでに数週間以上要するとされる。Kadiら [10] は、健常女性を対象に10週間の筋力増強運動を行うと、筋横断面積が36%増加していると報告している。また、Klitgaard [11] は、ラット後肢に筋力増強運動を36週間実施し、ヒラメ筋、足底筋の筋湿重量の増加を報告している。以上のことから、筋力増強運動を行い筋の大きさに変

1 名古屋学院大学 リハビリテーション学部

2 JA岐阜厚生連 東濃厚生病院

3 医療法人羊蹄会 リハビリセンター

4 医療法人名南会 名南ふれあい病院

Correspondence to: Yuta Itoh

E-mail: yuta.i@ngu.ac.jp

Received 3 July, 2015

Revised 23 July, 2015

Accepted 3 August, 2015

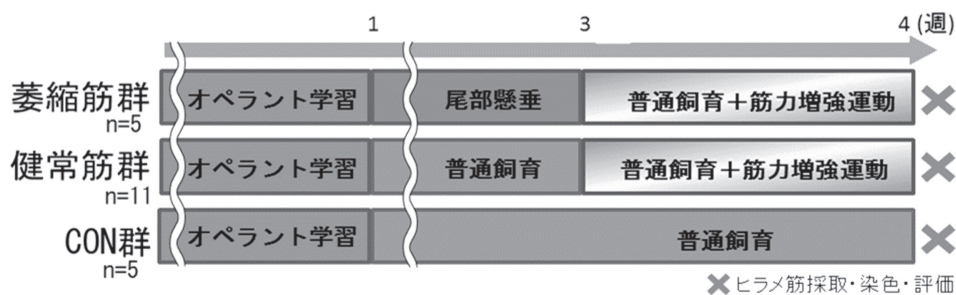


Fig. 1 実験スケジュールと群分け

すべての群に立ち上がり運動のオペラント学習を1週間行った。その後、2週間の尾部懸垂と1週間の筋力増強運動を行う萎縮筋群、尾部懸垂を行わず2週間の普通飼育後に筋力増強運動を1週間行う健常筋群、3週間尾部懸垂も筋力増強運動も行わないCON群を作製した。

化が現れるまでの期間は、健常筋を対象とした場合よりも、萎縮筋を対象とした場合の方が短く、筋のおかれたコンディションによって、筋の大きさの変化に必要な期間が異なると考えられる。すなわち、萎縮筋と健常筋とでは筋力増強運動に対して異なる反応メカニズムが生じていると考えられる。しかし、これまでの報告では、萎縮筋を対象にしたものと健常筋を対象にしたものとで、動物種や年齢、あるいは筋力増強運動の方法などが異なり、健常筋と萎縮筋との両方を対象に、同じ動物種で、かつ同じ条件の運動刺激を加えて、筋の大きさの変化の違いを検証した報告はない。そこで、本研究では、マウス萎縮筋と健常筋の両方を対象に、同条件の筋力増強運動を行わせ、筋線維横断面積や筋線維核数の変化を指標に、健常筋と萎縮筋における筋力増強運動の影響を比較した。

材料と方法

マウスにオペラント学習法を用いた筋力増強運動を行わせ、筋線維横断面積、筋線維核数の変化を健常筋と萎縮筋とで比較した。本研究のすべての実験は、研究機関等における動物実験

等の実施に関する基本指針（平成18年文部科学省告示第71号）に従い、名古屋学院大学動物実験委員会に諮り、承認を得た後に行った（承認番号：2007-007）。

対象と群分け

ICR雄性マウス（Slc：ICR）21匹を実験に供した。マウスは、1週間のオペラント学習後、尾部懸垂を行う群（萎縮筋群、n=5）と普通飼育を行う群（健常筋群、n=11）に分け、2週間後、筋力増強運動を1週間行わせた（Fig. 1）。比較対象として、尾部懸垂も筋力増強運動も行わず、普通飼育のみを行ったコントロール群（CON群、n=5）を設けた。マウスは、実験期間中、25℃に設定した室内で飼育し、餌や水は自由に与えた。

立ち上がり運動のオペラント学習

自発的な筋力増強運動を行わせるため、これまでに確立した方法 [9] を用いて、オペラント学習法による立ち上がり運動を学習させた。本学習にはオペラント学習装置を用いた（バイオリサーチセンター）。オペラント学習装置は、オペラントゲージとショッカープログラマーか

筋力増強運動の効果が出現するまでの期間は萎縮筋と健常筋とで異なる

ら構成される。まず、ゲージの側壁にあるスピーカーと電灯から3秒間の音・光刺激が生じ、床面を構成するグリッドから電流刺激が生じる。電流刺激は、ゲージの側面に設置してあるスイッチレバーを押すと止まるようにプログラムされている。マウスをゲージに入れ、このプログラムを1日100回、1週間繰り返して行った。1週間後のマウスは、80%以上の確率で音・光刺激3秒間以内に自発的に立ち上がり、電流刺激にさらされずにスイッチレバーを押す行為を学習した。なお、スイッチレバーの高さは可変であり、この学習期間中はマウス後肢に普通飼育以上の負荷がかからないよう、高さを低く設定した。

尾部懸垂

萎縮筋群のマウスには、オペラント学習後、後肢筋を萎縮させるため2週間の尾部懸垂を施した。尾部懸垂はMoreyらの方法 [13] を改良して施した。尾部を粘着テープで固定し、後肢が床面に接地しないように固定した尾部をゲージ天井から懸垂することで行った。尾部の固定処置はisoflurane (1.0%, ISOFLU®, Abbott) 吸入麻酔下で行い、舌根沈下による窒息死を避けるため、麻酔からの覚醒を確認した後に懸垂を開始した。なお、尾部懸垂期間中接地した前肢でゲージ内の移動は可能で、餌や水が自由に摂取できるように懸垂の高さを調整した。またこの方法で2週間懸垂することにより、マウスヒラメ筋の筋線維横断面積が、健常筋の1/2程度まで萎縮することを確認している [9]。

筋力増強運動

オペラント学習から2週間後、筋力増強運動として予め学習させた立ち上がり運動を1セット50回、1日2セット、1週間毎日行わせた。

この時、足関節底屈筋に負荷がかかるよう、マウスがスイッチレバーを押した時に、踵部が電流刺激グリッドから離れる高さ(大腿骨と下腿骨がなす角度が約80°, 下腿と足底がなす角度が約100°の肢位)に設定した。また、この運動は尾部懸垂による筋萎縮後、約50回施行するとそれ以上継続ができなくなる程度の負荷量であり、持久性運動である水泳運動 [8] やトレッドミル走行 [15] の負荷量と比べ高い。

組織学的評価

実験終了後の各々のマウスからヒラメ筋を採取した。採取はpentobarbital sodium (ソムノペンチル, 共立製薬) 麻酔下で行った。採取した筋はトラガカントガムで1cm四方のコルクに垂直に付着させ、液体窒素で冷やしたイソペンタン内で急速凍結させた。凍結サンプルは解析まで-80°Cで保管した。サンプルは、庫内を-20°Cに設定したクライオスタッド (CM1850, LEICA) を用いて、厚さ5µmの凍結横断切片を作製した。切片は、ヒラメ筋の全長のうち、最も筋腹が太い領域(筋腹遠位から3mmの高さから5mmの高さの間)から作製した。作製した凍結横断切片は、筋形質膜の位置を同定するために筋線維細胞膜に局在するdystrophinの抗体を用いた免疫組織化学染色、および核の位置を同定するため4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた染色を以下の手順で施した。切片を4% paraformaldehyde in リン酸緩衝液 (PBS) にて12分間固定し、PBSで洗浄 (3分間を5回)、3% bovine serum albumin in PBSで一晩ブロッキング処理した。ブロッキング後、1次抗体であるrabbit anti-dystrophin polyclonal antibody (1:400, Santa Cruz) 溶液をのせ、37°Cに設定したインキュベーター内で60分間インキュベートし

た。PBSで洗浄後（3分間を5回）、2次抗体であるAlexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG antibody（1:400 Molecular Probes）とDAPI（1:10000, SIGMA）溶液をのせ、遮光した上、37°Cに設定したインキュベーター内で45分間インキュベートした。PBSで洗浄後（3分間を5回）、90% glycerolで封入した。

この染色したサンプルは蛍光顕微鏡（BX51, OLYMPUS）に付帯したカメラシステム（DP71, OLYMPUS）で観察、撮影し、デジタルデータとしてPCに取り込んだ。これらの画像から、画像解析ソフト（Image J）を用いて、筋線維横断面積と筋線維核数を測定した。筋線維核数はdystrophin染色像を指標に、その内側に存在するDAPI陽性核を測定し、筋線維1本あたりの数を算出した。

統計処理

群間の比較には一元配置分散分析を用いた。有意差が認められた場合、多重比較にTukey法を用いた。いずれも有意水準は5%未満とした。結果はmean±SEMで示す。

結果

筋線維横断面積に対する筋力増強運動効果の違い

健常筋群の筋線維横断面積は $1948.76 \pm 895.55 \mu\text{m}^2$ であり、CON群との面積（ $2005.45 \pm 196.71 \mu\text{m}^2$ ）と有意な差はなかった（Fig. 2）。健常筋群のマウスのうち、筋線維横断面積の平均値が最も大きかったマウスの値は $4730.31 \mu\text{m}^2$ であり、最も小さかったマウスの値は $1773.39 \mu\text{m}^2$ であった。萎縮筋群の筋線維

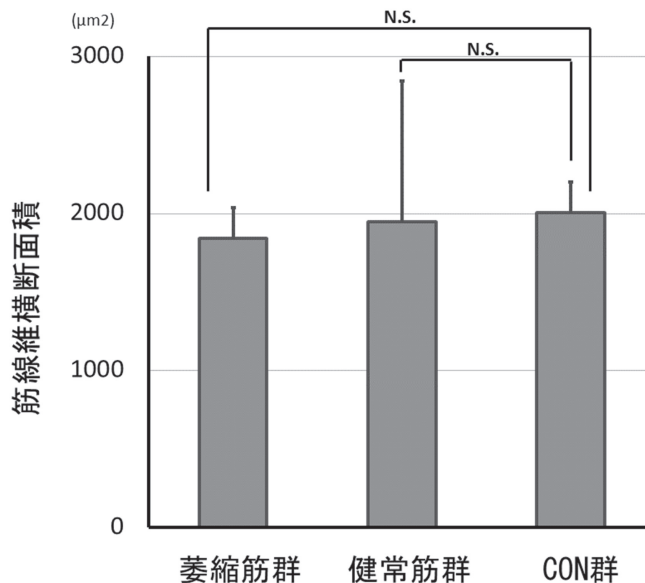


Fig. 2 筋線維横断面積に対する筋力増強運動効果の違い
健常筋群の筋線維横断面積は、CON群と面積との間に有意な差がなかった（ $p=0.98$ ）。萎縮筋群の筋線維横断面積は、CON群の面積との間に有意な差がなかった（ $p=0.91$ ）。mean±SEM。
^{n.s.} $p > 0.05$ 。

筋力増強運動の効果が出現するまでの期間は萎縮筋と健常筋とで異なる

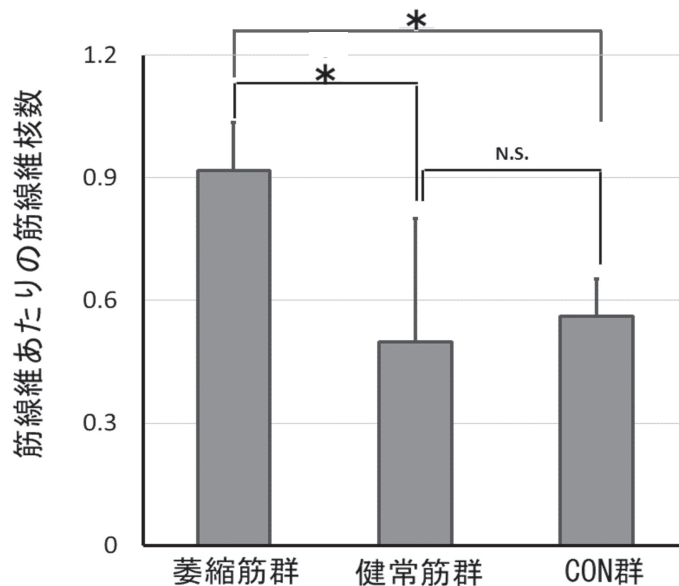


Fig. 3 筋線維あたりの筋線維核数に対する筋力増強運動効果の違い
健常筋群の筋線維1本あたりの筋線維核数は、CON群の核数との間に有意な差はなかった ($p=0.88$)。萎縮筋群の筋線維核数は、健常筋群やCON群の核数と比べて有意に多かった。mean±SEM。* $p < 0.05$, ^{n.s.} $p > 0.05$ 。

横断面積は $1843.45 \pm 194.71 \mu\text{m}^2$ であり、CON群の面積との間に有意な差がなかった。

筋線維核数に対する筋力増強運動効果の違い

健常筋群の筋線維1本あたりの筋線維核数は 0.50 ± 0.30 であり、CON群の筋線維核数(0.56 ± 0.09)との間に有意な差はなかった (Fig. 3)。萎縮筋群の筋線維1本あたりの筋線維核数は 0.92 ± 0.13 であり、健常筋群およびCON群の筋線維核数と比べて有意に多かった。

考察

筋力増強運動による筋肥大効果は健常筋と萎縮筋とで異なる

筋力増強運動によって筋の大きさが変化する期間が、健常な筋と萎縮した筋とで異なるかど

うかを検証した。後肢筋を萎縮させたマウスに筋力増強運動を行わせたところ、1週間で運動をさせていない正常なマウスと同程度の筋線維横断面積となった (Fig. 2)。この結果は以前の報告 [9] と同様の結果である。2週間の尾部懸垂を施した筋は、筋線維横断面積が約1/2まで萎縮する [3, 9, 12]。従って、萎縮筋に対する筋力増強運動は、わずか1週間で、筋線維横断面積の約半分を増大させる効果があると考えられた。一方、尾部懸垂を行わず、筋が萎縮していない健常な筋に筋力増強運動を1週間行っても、筋線維横断面積が筋力増強運動を行っていないマウスの筋と変わらなかった。また、健常筋に対する筋力増強運動の筋肥大効果をみた他の研究では、筋肥大が観察されるまでに8~16週間を要するとされる [4, 11, 14, 16]。つまり、健常筋に筋力増強運動を行って

も、1週間では筋線維横断面積に変化を起こすことができないと考えられた。ただし、健常筋群に筋力増強運動を行った時の筋線維横断面積は個体間でばらつきが大きく、一部個体には運動の効果があつたかもしれない。実際に、健常筋群のうち最も筋線維横断面積が大きかった個体は、CON群の平均値よりも58%大きかった。このような結果となった理由として以下のことが考えられる。1つ目には、本研究で用いた筋力増強運動はオペラント学習法により学習させたものであるため、マウスにストレス性の萎縮変化が起こっていたことである。健常筋群の筋が萎縮変化を起こし、筋の性質が変わっていたとしたら比較対象としてはそぐわないかもしれない。しかしながら、実験期間中、すべてのマウスにおいてストレスの指標となる体重に過剰な変化はみられなかったことから（結果省略）、その可能性は薄いと考えられる。2つ目は、本研究が横断切片による組織学的評価を用いたことがあげられる。対象としたヒラメ筋は羽状筋であり、筋線維は外側から中心部の停止腱に向かい走向する。そのため、横断切片では筋線維が必ずしも垂直に薄切されるわけではない。また、成熟した筋の長軸長に変化は起こらないため、筋自体の太さが太いほど、外側にある筋線維が中心部にある停止腱に大きな角度をもって走行すると考えられる。つまり、萎縮筋に比べ筋腹の太い健常筋では、一部の筋線維が斜断、縦断に近い角度で薄切され、筋線維横断面積の測定値のバイアスが大きく現れたと考えられる。今後、詳細に検討するには生化学的手法や単離筋線維などを用いて評価する必要があるかもしれない。いずれにしても、萎縮筋に1週間という短い期間で生じた筋線維横断面積の変化は、健常筋の変化に比べて極めて大きかった。運動開始初期であれば、健常筋と萎縮筋で

筋力増強運動に対する反応性が異なり、同じ方法の運動であっても筋を変化させる時期に差が生じたものと考えられた。萎縮した筋は負荷に対して脆いといわれている [7]。健常な筋と萎縮した筋とでは単純な大きさの差だけでなく、その性質に差があり、運動に対する異なるメカニズムがあるのかもしれない。

健常筋と萎縮筋とで筋力増強運動の効果に違いが生じるメカニズム

筋力増強運動による筋線維横断面積の肥大効果が健常筋には現れず、萎縮筋には現れたメカニズムの一部として、筋線維核数の変化が考えられる。一般に、筋構成タンパク質は核を中心とするセントラルドグマで合成されるため、筋線維の大きさと筋線維核数とに正の相関があるといわれている [2, 5, 6]。つまり、筋線維核数の増加は個々の筋線維の大きさの増大に結びつくという考え方である。本研究結果から、萎縮筋に対して筋力増強運動を行うと筋線維核の数が、尾部懸垂も運動もしていないマウスよりも大幅に増加していた (Fig. 3)。一方で健常筋に運動を行っても、萎縮筋にみられたような筋線維核数の大幅な増加はみられなかった。本研究にみられた筋力増強運動効果の出現時期が、健常筋と萎縮筋とで異なる理由の1つにはこの筋線維核数の変化の違いが関与していると考えられる。

筋線維核数が増加するには、筋基底膜に局在する筋衛星細胞などの未分化な細胞が分化し新生された筋芽細胞が、既存の筋線維に融合することが関与するという報告がある [1, 17]。実際にこれまで我々は、萎縮筋に対して筋力増強運動を行うと、運動開始数日のうちに新生した核が、運動開始4日目には筋線維内にみられることを確認している [9]。本研究において、

健常筋と萎縮筋の筋線維核数の変化、筋線維横断面積の変化にみられた違いは、筋力増強運動による刺激が引き金となり、筋衛星細胞を活性化、既存筋線維へと融合させるコンディションにあるかないかが関わっているかもしれない。このことについては今後更に詳細な検討をする必要がある。

リハビリテーション分野における筋萎縮の回復促進を目的とした筋力増強運動は、健常筋を対象としたスポーツ分野における研究報告を礎にして行われている現状がある。本研究により、健常な筋と萎縮した筋とでは筋力増強運動に対する反応性が異なることが示唆された。今後臨床における病態筋への筋力増強運動は、その対象に合わせて方法を設定する必要があると考えられる。

文献

- [1] Adams GR, Haddad F. (1996) The relationships among IGF-1, DNA content, and protein accumulation during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol.* 81: 2509-2516.
- [2] Cavalier-Smith T. (1978) Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J Cell Sci.* 34: 247-278.
- [3] Eash J, Olsen A, Breur G, et al. (2007) FGFR1 inhibits skeletal muscle atrophy associated with hindlimb suspension. *BMC musculoskeletal disorders.* 8: 32.
- [4] Gonyea WJ. (1980) Role of exercise in inducing increases in skeletal muscle fiber number. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology.* 48: 421-426.
- [5] Gregory TR. (2001) Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 76: 65-101.
- [6] Hall ZW, Ralston E. (1989) Nuclear domains in muscle cells. *Cell.* 59: 771-772.
- [7] Higbie EJ, Cureton KJ, Warren GL, 3rd, et al. (1996) Effects of concentric and eccentric training on muscle strength, cross-sectional area, and neural activation. *Journal of applied physiology.* 81: 2173-2181.
- [8] Ishihara A, Kawano F, Ishioka N, et al. (2004) Effects of running exercise during recovery from hindlimb unloading on soleus muscle fibers and their spinal motoneurons in rats. *Neuroscience research.* 48: 119-127.
- [9] Itoh Y, Hayakawa K, Mori T, et al. (2014) Stand-up exercise training facilitates muscle recovery from disuse atrophy by stimulating myogenic satellite cell proliferation in mice. *Physiological reports.* 2(11): e12185
- [10] Kadi F, Thornell LE. (2000) Concomitant increases in myonuclear and satellite cell content in female trapezius muscle following strength training. *Histochem Cell Biol.* 113: 99-103.
- [11] Klitgaard H. (1988) A model for quantitative strength training of hindlimb muscles of the rat. *Journal of applied physiology.* 64: 1740-1745.
- [12] Knox M, Fluckey JD, Bennett P, et al. (2004) Hindlimb unloading in adult rats using an alternative tail harness design. *Aviation, space, and environmental medicine.* 75: 692-696.
- [13] Morey-Holton ER, Globus RK. (1998) Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. *Bone.* 22: 83S-88S.
- [14] Narici MV, Roi GS, Landoni L, et al. (1989)

- Changes in force, cross-sectional area and neural activation during strength training and detraining of the human quadriceps. *European journal of applied physiology and occupational physiology.* 59: 310-319.
- [15] Park SC, Kim WH, Lee MC, et al. (1994) Modulation of transglutaminase expression in rat skeletal muscle by induction of atrophy and endurance training. *Journal of Korean medical science.* 9: 490-496.
- [16] Ploutz LL, Tesch PA, Biro RL, et al. (1994) Effect of resistance training on muscle use during exercise. *Journal of applied physiology.* 76: 1675-1681.
- [17] Rosenblatt JD, Yong D, Parry DJ. (1994) Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. *Muscle & nerve.* 17: 608-613.

[Original Article]

Exercise Training Effects Appear to Differ between Normal and Atrophied Muscles in Mice

Yuta Itoh¹, Chisa Kajita², Airi Kayukawa³, Yuto Hishiki⁴

Abstract

The aim of this study is to elucidate the differences in responses to exercise training between normal muscles or atrophied muscles. We divided the mice into the following two groups: a test group (A group) in which the muscles were atrophied by tail suspension and a normal control group (N group) in which the mice were not subjected to tail suspension. The mice in both the groups underwent the same exercise training regimen for 1 week. After 1 week of following the regimen, the average myofiber cross-sectional area (CSA) and the number of myonuclei per myofiber of the soleus muscles were histologically measured in both the groups. The results demonstrated an increase in the average myofiber CSA and in the number of myonuclei per myofiber in the A group. However, no increases were observed in the average myofiber CSA and in the number of myonuclei in the N group. These results suggest that atrophied muscles and normal muscles exhibit different responses to the same exercise training. Therefore, we conclude that atrophied muscles require a different and more appropriate method of exercise training regimen for rehabilitation as compared with the training that is required by normal muscles.

Keywords: resistance training, myofiber CSA, myonuclei, skeletal muscle, atrophy

1 Faculty of Rehabilitation Science, Nagoya Gakuin Univ.

2 JA Gifu Koseiren Tonokosei Hospital

3 Youteikai Rehabilitation center

4 Meinankai Meinan Fureai-Hospital