

〔原著〕

筋力トレーニングによる筋萎縮からの回復促進効果に関する研究

伊 東 佑 太¹, 小 倉 峻²
水 谷 健 悟³, 磯 野 真⁴

要 旨

筋力トレーニングによる廃用性筋萎縮からの回復促進には、筋衛星細胞の活性化とその後の融合による筋線維核数の大幅な増加が関わっていると考えられるが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究は、この筋力トレーニングによる筋線維核数の増加に、筋損傷とそれに続く炎症反応が関わっているとの仮説を立てて実験的に検証した。尾部懸垂による筋萎縮モデルマウスに2日間筋力トレーニングを行わせると、ヒラメ筋の筋線維核数が増加する時期に先行して、小範囲の筋線維の損傷が観察された。また、トレーニング開始から2～3日目には同筋に炎症反応としてマクロファージの凝集がみられた。しかし、これらの炎症反応は、尾部懸垂後にトレーニングを行わず飼育したマウスにも観察され、筋萎縮からの回復促進を促すトレーニングに特異的でないことが分かった。以上のことから、筋力トレーニングによる筋萎縮からの回復促進に、筋損傷や炎症反応の出現は特異的ではないと考えられる。

キーワード：筋力トレーニング、筋萎縮、筋損傷、炎症反応、マウス

廃用性筋萎縮は筋力低下を招き、日常生活活動能力を低下させる。そのため、リハビリテーションにおいては廃用性筋萎縮の早期回復が重要である。この手段として一般に筋力トレーニングが行われる。スポーツ科学分野では1-repetition maximum (RM) の60～80%の運

動強度で1セット8～12回を1～3セット、週に2～3回行う筋力トレーニングが、健常筋の肥大を促すために有用であるとされる [2]。一方、National Institute on Agingのガイドライン [17] によると、萎縮筋のサイズを増大させるための方法としても、1-RMの75～80%

1 名古屋学院大学 リハビリテーション学部

2 珪山会 鶴飼リハビリテーション病院

3 蘇西厚生会 松波総合病院

4 名南会 名南介護老人保健施設かたらいの里

Received 7 November, 2016

Revised 5 December, 2016

Accepted 9 December, 2016

Correspondence to: Yuta Itoh

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

程度の運動強度で1セット8～15回を2セット、週に2回行うことが推奨されている。このように、筋萎縮からの回復を促す方法には健常筋の肥大を促す方法が適用されており、萎縮筋を対象としてその効果的な方法を検証した報告はない。

萎縮筋と健常筋の性質に焦点を絞ると、両者の中で運動刺激に対する反応性が異なることを示唆する報告が多くある。例えば、尾部懸垂による足関節底屈筋群の筋萎縮モデルマウスに対して、自重を負荷とする立ち上がり運動を1セット50回、1日2セット行わせると、普通飼育のみの場合よりも早く、わずか1週間で正常な筋線維の太さまで増大することが報告されている [11]。一方で、健常な足関節底屈筋群を持つラットにレバー持ち上げ運動による筋力トレーニングを行わせても、筋線維の肥大が検出されるまでに36週間を要するとされる [12]。これらのことは、筋力トレーニングによって萎縮筋の筋線維サイズが増大するまでの期間は、健常筋の筋線維サイズに肥大がみられるまでの期間に比べて明らかに短く、萎縮筋と健常筋では筋力トレーニングに対する反応性が異なることを示唆している。萎縮筋と健常筋で反応性が異なることを考慮すると、健常筋の肥大に有効な筋力増強運動の条件をそのまま萎縮筋の回復促進に適用することは好ましくないと考えられる。しかし、どのような方法、理学療法的介入が筋萎縮の回復促進に最も有効であるか確立されていない。

筋線維の太さは、筋線維核数と強い相関があるとされ、筋線維核数が増加すると筋線維の太さも増大する [20]。この筋線維核数の増加は、筋線維基底膜上に存在する筋衛星細胞が既存の筋線維と融合することで生じると考えられている [3, 11]。一方、筋損傷後に再生が起きる

ときにも筋衛星細胞の活性化が関与している。筋衛星細胞は、筋線維の損傷が生じると、筋芽細胞に分化し、筋芽細胞同士が融合して新たな筋線維となる。このとき、筋損傷に続く炎症反応によって凝集したマクロファージから産生される Interleukin (IL)-6 や IL-10 などのサイトカインが筋衛星細胞の活性化を促進することが報告されている [22, 23, 25]。以上のことから我々は、萎縮筋特有に早く起こる筋線維サイズの増大のメカニズムには、筋損傷に伴って炎症反応が起こり、これによって活性化された筋衛星細胞が関与しているとの仮説を立てた。そして、尾部懸垂による筋萎縮モデルマウスに対して、筋萎縮からの回復促進を促す筋力トレーニングを行わせ、その回復促進過程において、筋線維の損傷が生じているかどうか、生じていれば炎症反応が起きているかどうかを組織学的ならびに免疫組織化学的に検証した。

材料と方法

動物

ICR 雄性マウス (n = 38, Slc:ICR) を用いた。マウスは実験期間中 25°C に設定した室内で飼育し、餌や水は自由に与えた。本研究のすべての実験は、名古屋学院大学動物実験委員会に諮り、承認を得た後行った (承認番号: 2007-007)。

実験プロトコル

まず、すべてのマウスに自発的な立ち上がり運動を学習させるためにオペラント学習を7日間施した (Fig. 1)。その後、後肢の筋を萎縮させるために尾部懸垂を14日間行った。尾部懸垂後、あらかじめ学習させた立ち上がり運動を筋力トレーニングとして行わせた。これらの

筋力トレーニングによる筋萎縮からの回復促進効果に関する研究

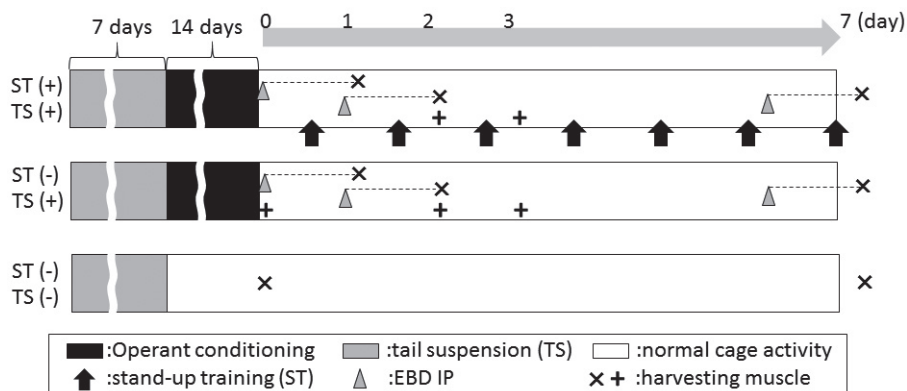


Fig. 1 実験スケジュール

すべてのマウスに立ち上がり運動のオペラント学習を1週間行わせた。その後、尾部懸垂 (TS) を2週間施した。尾部懸垂後普通飼育に戻し、1日1回立ち上がり運動を筋力トレーニング (ST) として行わせた。運動開始1・2・3・7日目にサンプルとして各々ヒラメ筋を採取した。筋損傷を評価するためのサンプルは、採取の24時間前にEBDを腹腔内投与した。対象群として尾部懸垂後に筋力トレーニングを行わない群、尾部懸垂も筋力トレーニングも行わない群も作製した。

マウスにおける筋損傷の有無を評価するため、筋力トレーニングを開始して1日目 (Td1群, n=6), 2日目 (Td2群, n=6), 7日目 (Td7群, n=6) のマウスからヒラメ筋を採取した。すべてのマウスの筋採取24時間前に、evans blue dye (EBD) を投与し、この間に損傷した筋線維数を測定した。また、炎症反応の有無を評価するため、トレーニング開始2日目 (Td2群, n=5), 3日目 (Td3群, n=5) のマウスからヒラメ筋を採取し、免疫組織化学染色を施した。

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 [11] を用いて、オペラント学習法による立ち上がり運動を1週間学習させた。具体的には、ゲージの側壁にあるスピーカーと電灯から発する3秒間の音・光刺激によって自発的に立ち上がり、壁面の高い位置にあるスイッチレバーを押す行為を学習させた。なお、スイッチレバーの高さは可変であり、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

後肢筋を萎縮させるため、Moreyら [16] の方法を改変し尾部懸垂を14日間施した。尾部懸垂は、後肢が床面に接地しないように粘着テープで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、接地した前肢により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高さを調整した。またこの方法で14日間尾部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 [11]。

筋力トレーニング

オペラント学習から2週間後、筋力増強運動としてあらかじ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。このとき、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ときに、

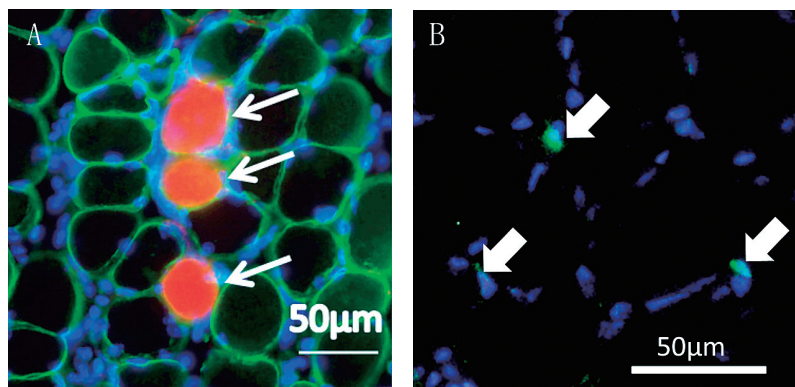


Fig. 2 損傷した筋線維 (A) やマクロファージ (B) の判別

(A) 抗 dystrophin 抗体を用いた代表的な染色像。液体循環した EBD は赤色に描出される。青：DAPI，緑：dystrophin。dystrophin に囲まれた筋線維のうち内側が赤色に染まった線維 (EBD 陽性筋線維；←) の数を測定した。(B) 抗 F4/80 抗体を用いた代表的な染色像。青：DAPI，緑：F4/80。F4/80 と核が共染された像をマクロファージ (↔) として測定した。

踵部が電流刺激グリッドから離れる高さに設定した。また、この運動は水泳運動 [10] やトレッドミル走行 [19] よりも負荷量が高いと考えられ、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る。

損傷筋線維の評価

損傷した筋線維を検出するため、筋を採取する 24 時間前に 1% EBD 溶液 (0.01 ml/BWg；Sigma-Aldrich) を腹腔内投与した。EBD は半減期が約 48 時間の蛍光物質であり、投与後に血清アルブミンに結合し、損傷した筋線維にアルブミンとともに取り込まれるため筋線維の損傷を検出することができる (Fig. 2A)。

実験期間終了後、EBD を投与したすべてのマウスからヒラメ筋を採取し、液体窒素で冷却した isopentane 内で急速凍結させた。凍結サンプルから厚さ 5 μ m の凍結横断切片を作製し、筋形質膜の位置を同定するために筋形質膜に局在する 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 0.1M phosphate buffered saline (PBS) にて 12 分間固定し、PBS で洗浄 (3 分を 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 PBS で洗浄し (3 分を 5 回)、一次抗体として rabbit anti-human dystrophin polyclonal antibody (1 : 400, Santa Cruz) をのせ、37°C に設定したインキュベーター内で 60 分間反応させた。PBS で洗浄後 (3 分を 5 回)、二次抗体として Alexa Fluor 488[®] goat anti-rabbit IgG antibody (1 : 400, Molecular Probes) と DAPI (1 : 10000, Sigma) の混合液をのせ、遮光して 37°C に設定したインキュベーター内で 45 分間反応させた。PBS で洗浄後 (3 分を 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。これらの画像は、画像解析ソフト (Image J) を用いて、dystrophin 染色像を指標に EBD 陽性の筋線維数を測定、群間で比較した。なお、筋力トレーニングによる筋萎縮からの回復促進効果を確認するため、同じ染色像か

ら筋線維横断面積や筋線維核数も測定した。

マクロファージ凝集の評価

尾部懸垂から解放後2, 3日目の各群のマウスから、損傷筋線維の評価と同様にヒラメ筋を採取し、凍結横断切片を作製した。作製した切片は、前項と同じく固定、ブロッキング処理し、マクロファージの位置を同定するため抗F4/80抗体を用いた免疫組織化学染色を以下の手順で行った。ブロッキング処理後の薄切切片に一次抗体としてrat anti-mouse F4/80 antibody (1:10, Santa Cruz) をのせ、37°Cに設定したインキュベーター内で60分間反応させた。PBSで洗浄後(3分を3回)、二次抗体であるAlexa Fluor 488® anti-rat IgG antibody (1:400, Thermo Fisher) とDAPIの混合液をのせ、遮光して37°Cに設定したインキュベーター内で60分間反応させた。洗浄、封入後、蛍光顕微鏡下で撮影した。F4/80陽性で核染色された細胞をマクロファージと同定し (Fig. 2B), その数をImage Jを用いて測定した。測定エリアは切片の筋腹全体とし、計測したマクロファージの数を筋腹の横断面積で除して、密度を算出、群間で比較した。

統計処理

多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。2群間の比較にはstudent-t検定を用いた。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

萎縮筋に対する筋力トレーニング効果の確認 (Fig. 3)

尾部懸垂後筋力トレーニングを開始して7日目 (Td7群) の筋の筋線維横断面積は、 $1676 \pm 160 \mu\text{m}^2$ であり、尾部懸垂直後の面積 ($903 \pm 111 \mu\text{m}^2$) と比べ有意に大きく、また、トレーニングを行わず飼育した場合 ($1195 \pm 103 \mu\text{m}^2$) よりも有意に大きかった。すなわち、これまでの報告 [11] と同様に筋線維横断面積の早い時期の増加が認められた。Td1群とTd2群の筋線維横断面積は各々 $1013 \pm 579 \mu\text{m}^2$, $1054 \pm 471 \mu\text{m}^2$ であり、ともにTd7群の面積と比べて有意に小さく、Td1群の面積とTd2群の面積との間には有意な差はみられなかった。

Td7群の筋線維1本あたりの筋線維核数は

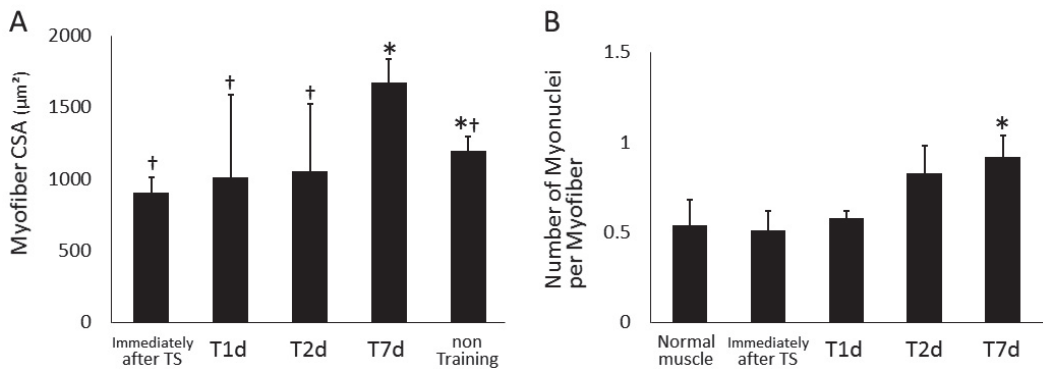


Fig. 3 筋力トレーニングによる萎縮筋の筋線維横断面積や筋線維核数に対する効果

(A) 筋線維横断面積の平均値を示す。尾部懸垂直後の面積に比べ、T7d群の面積は有意に大きかった。T1d, T2d群の面積は、T7d群の面積と比べ有意に小さかった。*p < 0.05 vs. Immediately after TS, †p < 0.05 vs. T7d. (B) 筋線維あたりの筋線維核数を示す。T7d群の筋線維核数にのみ、正常な筋の数との間に有意な差があった。*p < 0.05 vs. Normal muscle.

0.92 ± 0.12であり、これもこれまでの報告と同じように、筋萎縮を起こしていない正常な筋の数 (0.54 ± 0.14) と比べて有意に多かった。Td1群とTd2群の筋線維1本あたりの筋線維核数は各々 0.58 ± 0.04, 0.83 ± 0.15であり、Td1群の数とTd2群、Td7群の数と比べ有意に少なかった。

筋力トレーニングによる萎縮筋の損傷；全筋線維に占めるEBD陽性筋線維数 (Fig. 4)

尾部懸垂後2日間の筋力トレーニングを行ったTd2群のEBD陽性筋線維数 (0.0080 ± 0.0012) は、7日間行ったTd7群の数 (0.0017 ± 0.0012) と比べて有意に多かった。尾部懸垂後筋力トレーニングを開始して1日目のTd1群のEBD陽性筋線維数 (0.0019 ± 0.0013) は、Td7群の数との間にも有意な差はなかった。

筋力トレーニングによる萎縮筋の炎症反応；筋腹面積あたりのマクロファージ数 (Fig. 5)

尾部懸垂後3日間の筋力トレーニングを行ったTd3群の筋腹面積あたりのマクロファージ数は 294.08 ± 37.57/mm²であり、Td2群のマ

クロファージ数 (106.84 ± 18.60/mm²) に比べ有意に多かった。しかし、Td3群の筋腹面積あたりのマクロファージ数は、尾部懸垂後トレーニングを行わず普通飼育をしたマウスの数 (249.04 ± 60.77/mm²) との間に有意な差がなかった。

考察

萎縮筋に負荷がかかると微細な筋線維損傷が起こる

14日間の尾部懸垂によって約半分に萎縮した筋に対して、筋力トレーニングを7日間行った結果、筋線維横断面積の増加に伴って筋線維核数の大幅な増加が認められ、筋萎縮からの回復促進効果を確認した。この筋線維核数の増加のためには、筋線維基底膜に局在する筋衛星細胞の活性化、増殖、分化、融合が関与すると考えられている [1]。実際に、萎縮筋に対して筋力増強運動を行った先行研究では、トレーニング開始数日のうちに増加した筋線維外の核が、4日目には筋線維内に確認されている [11]。筋衛星細胞の活性化には、運動刺激によって筋

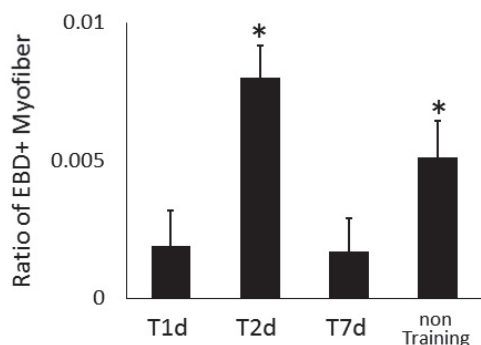


Fig. 4 萎縮筋に筋力トレーニングを行ったときのEBD陽性筋線維の割合

T7d群のEBD陽性である筋線維の割合に比べ、T2d群の割合は有意に多かった。7日間トレーニングを行わなかった筋のEBD陽性筋線維の割合は、T7d群に比べ有意に多かった。*p < 0.05 vs. T7d.

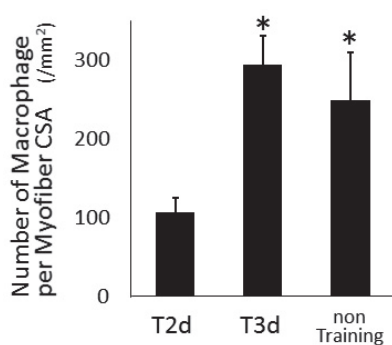


Fig. 5 萎縮筋に筋力トレーニングを行ったときのマクロファージの凝集

Td3群の筋腹の面積あたりのマクロファージ数はTd2群と比べ、有意に多かった。Td3群の数と同週齢のトレーニングをしていないマウスの数との間に有意な差はなかった。*p < 0.05 vs. T2d.

の自己発現が高められたIGF-1やTGF- β などの成長因子 [9, 13] や筋の損傷後の炎症反応時にマクロファージから分泌されるサイトカイン[25]が関与しているといわれている。一方、筋萎縮を起こした筋は、損傷を起こしやすいといわれている [8, 26]。そのため我々はまず、筋線維核数の増加に関わるメカニズムとして、筋線維の損傷に着目した。

今回の筋力トレーニングによる筋萎縮からの回復促進モデルにおいて、トレーニング開始2日目の筋にEBD陽性である損傷した筋線維が0.8%の割合で観察された。この時期は、Tidbellら [23, 25] の研究で、尾部懸垂後の再荷重により生じた筋損傷からの再生過程においてマクロファージが凝集してくる時期と一致する。一方、トレーニング開始1日目の筋では、EBD陽性筋線維が0.02%しか観察されなかった。EBD陽性筋線維がわずかしか観察されなかった理由として、微小血管の血流障害が考えられる。本研究のTd1群は尾部懸垂中にEBDを投与した。廃用性筋萎縮を生じた筋においては、微小血管機能の変化がみられるといわれている [18]。特に毛細血管が発達しているヒラメ筋などの抗重力筋は、血流減少の影響を大きく受けると考えられる。EBDは血中のアルブミンと結合することで体液循環し、細胞膜が壊れた筋線維に取り込まれるため、尾部懸垂中の投与ではヒラメ筋内の細胞膜が損傷した筋線維まで行き着かなかった可能性がある。一方、Td2群のEBD陽性筋線維においては、尾部懸垂から解放して筋力トレーニングを2日間行っているため、筋ポンプ作用により毛細血管部への血流が回復し、十分なEBDが筋線維損傷部まで循環したと考えられる。トレーニング開始2日目に0.8%の割合で観察されたEBD陽性筋線維は、7日目には0.02%まで少なくなっ

た。トレーニングを行っていない同時期の筋には、これよりも多いEBD陽性筋線維が観察されていることから、この期間内で損傷した筋線維の貪食や新たな細胞の新生が起こっていると考えられる。以上のように、筋萎縮を起こした筋に対して筋力トレーニングを行い、その太さの回復が促進されるときには、トレーニング開始数日以内の初期に極小さい範囲で筋損傷が起こり、7日以内に治まっている可能性が示唆される。

筋萎縮からの回復促進に効果的な筋力トレーニングは炎症反応を誘起しない

筋損傷に続く炎症反応としてマクロファージが凝集する [3, 25]。凝集したマクロファージのうち、M1マクロファージはInterleukin (IL)-6やIL-18を産生し、これらは筋衛星細胞の増殖を促進する [14, 25]。また、炎症後期に出現するM2マクロファージは、IL-10やTGF- β を産生し、これらは筋衛星細胞の分化を促す [14]。すなわち、炎症反応は筋衛星細胞の活性化から分化までを促進する。

本研究において萎縮筋に筋力トレーニングを行うと、3日目の筋にマクロファージの凝集が確認された。しかし、トレーニングをしていないマウスにも同時期にマクロファージの凝集が確認された。また、マウスを後肢懸垂後にトレーニング負荷を行わず再荷重した場合には、2日目にマクロファージの数が増加するという報告がある [6, 24]。本研究でも同じ時期に炎症反応が観察されていることから、トレーニングの有無に関りなく生じる現象と解釈でき、萎縮筋に筋力トレーニングを行ったときに特異的なものではないと考えられる。ただし、本研究ではマクロファージの数は測定したが、そこから産生されるサイトカインは定量的に測定できて

いない。凝集したマクロファージの量が多くても、産生されるサイトカインの量には違いがあり、筋衛星細胞に与える影響が異なるかもしれない。以上のことから、萎縮筋に筋力増強運動を行っても、行わない場合に比べて、炎症反応が多く起こるわけではなく、また、筋力トレーニングによる筋線維サイズの回復促進効果に、炎症反応は関与していないと考えられる。

筋損傷を起こすと炎症反応により筋衛星細胞が活性化され、筋衛星細胞から分化した筋芽細胞同士が融合して新たな筋線維となる [3]。一方で活性化した筋衛星細胞は、既存の筋線維にも融合し核を増やすことで筋線維の肥大・回復にも働く [3, 11]。この2つの現象に増殖した筋衛星細胞が関与すると考えると、筋損傷が多く起こっている環境下では、筋衛星細胞が再生に多く動員されるので、筋線維の肥大・回復に働く筋衛星細胞の数が十分ではないのかもしれない。筋損傷により筋衛星細胞の活性化が起こっても、必ずしも筋線維の肥大・回復には繋がらず、むしろ筋損傷の発生は回復を遅延させるとも考えられる。

筋衛星細胞を活性化させる因子には炎症性サイトカインの他にも多数報告されている。例えば、機械刺激によって肝臓や骨格筋から自己分泌、あるいは傍分泌されるIGF-1は、タンパク質の合成、筋肥大に働くと報告されている [5, 15, 21]。またconnectinをはじめとした膜タンパクや接着斑など細胞の力学受容に関わる因子もタンパク質の合成促進に関与する可能性がある [4, 7]。このように炎症反応以外のメカニズムが筋力増強運動による筋萎縮からの回復促進効果に関与している可能性が考えられ、今後の検討課題である。

文献

- [1] Ambrosio F, Kadi F, Lexell J, et al. (2009) The effect of muscle loading on skeletal muscle regenerative potential: an update of current research findings relating to aging and neuromuscular pathology. *Am J Phys Med Rehabil.* 88: 145-155.
- [2] American College of Sports Medicine. ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription 9th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
- [3] Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. (2012) Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:
- [4] Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, et al. (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18: 637-706.
- [5] Delbono O, Renganathan M, Messi ML. (1997) Regulation of mouse skeletal muscle L-type Ca^{2+} channel by activation of the insulin-like growth factor-1 receptor. *J Neurosci.* 17: 6918-6928.
- [6] Dumont N, Frenette J. (2010) Macrophages protect against muscle atrophy and promote muscle recovery *in vivo* and *in vitro*: a mechanism partly dependent on the insulin-like growth factor-1 signaling molecule. *Am J Pathol.* 176: 2228-2235.
- [7] Helmes M, Lim CC, Liao R, et al. (2003) Titin determines the Frank-Starling relation in early diastole. *J Gen Physiol.* 121: 97-110.
- [8] Highman B, Altland PD. (1963) Effects of exercise and training on serum enzyme and tissue changes in rats. *Am J Physiol.* 205: 162-166.
- [9] Hill M, Goldspink G. (2003) Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated

- with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J Physiol.* 549: 409–418.
- [10] 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.
- [11] 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: DOI: 10.14814/phy2.12185
- [12] Klitgaard H. (1988) A model for quantitative strength training of hindlimb muscles of the rat. *J Appl Physiol.* 64: 1740–1745.
- [13] Le Grand F, Rudnicki M. (2007) Satellite and stem cells in muscle growth and repair. *Development.* 134: 3953–3957.
- [14] Martinez FO, Gordon S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6: 13.
- [15] Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, et al. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 93: 215–228.
- [16] Morey-Holton ER, Globus RK. (1998) Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. *Bone.* 22: 83S–88S.
- [17] National Strength & Conditioning Association. *Essentials of Strength Training and Conditioning.* 3rd ed: Human Kinetics; 2008.
- [18] Oki S, Desaki J, Matsuda Y, et al. (1995) Capillaries with fenestrae in the rat soleus muscle after experimental limb immobilization. *J Electron Microsc (Tokyo).* 44: 307–310.
- [19] 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.
- [20] Roy RR, Monke SR, Allen DL, et al. (1999) Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. *Journal of applied physiology.* 87: 634–642.
- [21] Semsarian C, Wu MJ, Ju YK, et al. (1999) Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca^{2+} -dependent calcineurin signalling pathway. *Nature.* 400: 576–581.
- [22] Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, et al. (1998) HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol.* 194: 114–128.
- [23] Tidball JG. (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology.* 288: R345–353.
- [24] Tidball JG, Berchenko E, Frenette J. (1999) Macrophage invasion does not contribute to muscle membrane injury during inflammation. *J Leukoc Biol.* 65: 492–498.
- [25] Tidball JG, Villalta SA. (2010) Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology.* 298: R1173–1187.
- [26] Wanek LJ, Snow MH. (1995) Presence of embryonic myosin in normal postural muscles of the adult rat. *Cell Tissue Res.* 280: 541–548.

[Original Article]

Recovery from Muscle Atrophy is Facilitated by Stand-up Exercise Training without Muscle Inflammation Responses

Yuta Itoh¹, Ryo Ogura²
Kengo Mizutani³, Shin Isono⁴

Abstract

The increase in the number of myonuclei involved myogenic satellite cells is important in the mechanism of facilitating recovery from atrophied muscle by exercise training. However, it has not been elucidated in detail. We hypothesized that muscle damage and inflammatory response are involved to the increase of myonuclei due to exercise training. To clarify this hypothesis, the stand-up training was applied to the mice after two weeks of tail suspension, and we histologically analyzed the occurrence of injured myofibers and macrophage aggregation. As a result, with EBD labeling of muscle on 2 days independent of training, the injured myofibers were observed prior to the increase of myonuclei. Moreover, macrophage aggregation was observed in the muscle on 2-3 days independent of training. However, inflammatory responses also observed in the mice fed without training after tail suspension. Therefore, the inflammatory responses seem to be not specifically occurred on the facilitating recovery phase of muscle atrophy by exercise training.

Keywords: stand-up exercises; muscle atrophy; muscle damage; inflammatory response; mice

1 Factory of Rehabilitation Science, Nagoya Gakuin University
2 Ukai Rehabilitation Hospital
3 Matsunami General Hospital
4 Meinan Fureai-Hospital