

Age-related differences in the atrophy for the rat soleus muscle subjected to hindlimb suspension: Comparison of the pattern of frequency distributions of muscle fiber c ross-sectional area

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7117

後肢懸垂ラットヒラメ筋における 筋萎縮経過の加齢による差異

— 筋線維横断面積の平均値および度数分布の形状比較による検討 —

横川 正美 井上 克己 山崎 俊明 森川 恵子* 立野 勝彦

要 旨

【目的】 不活動状態での筋萎縮経過における加齢の影響を調べるため、ラットヒラメ筋の筋線維横断面積 (MCSA) を、平均値比較と度数分布の形状比較という 2 種類の統計学的分析により検討を行った。

【方法】 対象は 3 ヶ月齢と 8 ヶ月齢の雄ラットで、月齢ごとに 4 週間通常飼育した対照群 (CON)、後肢懸垂下で 1、2、4 週間飼育した群 (それぞれ HS 1、HS 2、HS 4) の 4 群を設定した。3 ヶ月齢は各群 3 匹ずつ、8 ヶ月齢は HS 4 が 3 匹、他の 3 群は各 2 匹であった。対象ごとに 200 本以上の右ヒラメ筋 MCSA を測定し、その中から筋線維タイプ別に平均値比較では各群 10 本、度数分布の形状比較では各群 50 本を無作為に抽出し、分析した。

【結果】 不活動状態による筋萎縮経過は、3 ヶ月齢と 8 ヶ月齢で違いがあることが示された。また、その経過は筋線維タイプによっても異なっていた。タイプ I 線維では、8 ヶ月齢の MCSA 減少は 3 ヶ月齢に比べて緩やかであった。懸垂期間 4 週間では、8 ヶ月齢も他のどの群と比べても MCSA は有意に減少し、度数分布の形状は萎縮方向へと変化した。タイプ II 線維は度数分布の形状比較の結果から、8 ヶ月齢は 3 ヶ月齢に比べて HS 2-HS 4 間の萎縮が大きいことが示唆された。

【結論】 高齢者が疾病発症などで不活動状態となり、早期に十分な負荷を与えられない場合でも、短期的には MCSA は維持される可能性がある。不活動期間が長期に渡ることが予想される場合、高齢者に対する廃用予防の取り組みが重要である。

Key words

Disuse atrophy, Aging, Muscle fiber, Cross-sectional area, Kolmogorov-Smirnov test

はじめに

高齢者では加齢に伴う筋量の減少と付随する筋力低下が起こり、Sarcopenia と呼ばれる¹⁾。さらに高齢者は疾病や外傷を契機として、不動の状態に陥りやすく、結果として生じた身体機能の障害によって活動性が低下し、筋萎縮が急速に進行するケースが多い²⁾とされている。しかし、不活動状態が発生した後の筋萎縮経過において、加齢による差異を比較検討した報告はなく、高齢者が不活動状態に陥った時に筋萎縮が急速に進行するか否かは必ずしも明らかではないと思われる。

いわゆる寝たきりを含めた全身的な不活動状態の

研究では、動物モデルとして、ラットの後肢懸垂法が用いられてきた。Thomason³⁾は、6-8 週齢程度の後肢懸垂ラットでの筋萎縮率について、不活動初期の 2 週間で萎縮が急速に起こると述べている。後肢懸垂での骨格筋反応における加齢の影響は、高齢と成熟ラットで同様⁴⁾、高齢のほうが若年よりも収縮性の変化が大きい⁵⁾、形態学的あるいは組織化学的レベルでは若年のほうが高齢よりも萎縮の程度は大きい^{6,7)}、など一致した結果は得られていない。最近の研究では不活動に対する骨格筋反応は加齢に伴い、減弱することが示唆されている^{8,9)}。これらから後肢懸垂中の筋萎縮について考えると、不活動後の

金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻
* 公立甲賀病院

表 1. ラットの体重変化

	3ヶ月齢				8ヶ月齢			
	CON (n=3)	HS1 (n=3)	HS2 (n=3)	HS4 (n=3)	CON (n=2)	HS1 (n=2)	HS2 (n=2)	HS4 (n=3)
開始時 (g)	259.3±5.0	240.7±1.2	239.3±1.2	258.0±3.5	387.0±9.9	380.0±28.3	369.0±26.9	385.3±18.0
終了時 (g)	288.7±16.3	199.0±1.7	188.7±6.1	172.0±19.3	415.0±4.2	305.0±4.2	265.0±32.5	249.3±16.2
変化率 (%)	11.4±7.2	-17.3±1.1	-21.2±2.2	-33.4±6.6	7.3±1.6	-19.6±4.9	-28.3±3.6	-35.3±2.0

平均値±標準偏差。

CON: 対照群; HS1: 懸垂 1 週群; HS2: 懸垂 2 週群; HS4: 懸垂 4 週群。

変化率 (%) = {(終了時 - 開始時) / 開始時} × 100。

加齢の筋組織が収縮機能に有効に作用するかどうかは不確定であるが、より加齢の群で経過中に筋萎縮が急速に進む可能性は少ないことが考えられる。

そこで本研究ではラット後肢懸垂法によるヒラメ筋を用いて、筋線維横断面積 (muscle fiber cross-sectional area; MCSA) の変化から、4 週間の不活動状態下での筋萎縮経過と加齢との関係を検討した。筋力の決定要因は、①筋サイズ、②運動単位の動員と活動、③筋線維の収縮特性とされ¹⁰⁾、MCSAはこれの中で要因①を評価する方法の一つである。筋力は日常生活活動の遂行に欠くことのできない要素であり、不活動状態の時に筋萎縮を予防することは重要である。高齢者の骨格筋組織の反応が若年者と異なるのであれば、不活動期間中の運動療法も高齢者により適した方法を検討する必要がある。本研究の結果は、高齢者に対して廃用予防の運動療法を行う前段階として、不活動状態での筋萎縮経過における加齢の影響を理解するための基礎的資料となると考える。

本研究ではMCSAの分析方法として、平均値比較と度数分布の形状比較を併用した。平均値による比較は統計学的分析の中で最も一般的な方法であり、量的な違いを検定する。これまでラットヒラメ筋のMCSAを調べた研究では、平均値比較とともに各筋線維のMCSAや線維径の変化をヒストグラムで示すことが行われてきた¹¹⁻¹³⁾。しかし、度数分布の形状比較・分析を統計学的手法を用いて行った報告は非常に少ない¹⁴⁾。MCSAを比較検討する際には、通常、1 標本あたり50本以上の筋線維を測定している^{6,15-17)}。MCSAの分布は広範囲であり、懸垂後はMCSAの分布状態も変化することが予想されるが、平均値比較のみでは分布の変化が一面的にしか把握できない可能性がある。度数分布の形状比較の併用は、MCSAの変化の特徴を多面的に明らかにするために有用と考える。

方 法

1. 対 象

対象はFischer 344雄ラット (Charles River Japan, Atsugi, Japan) で、3ヶ月齢12匹 (体重: 238-264g)、8ヶ月齢9匹 (体重: 360-404g) であった。ラットの月齢は、いずれも実験開始時点での月齢である。実験は1週間の予備飼育後に開始し、月齢ごとにラットを次の4群に分けた; 対照群 (CON): 4週間通常飼育する、懸垂1週群 (HS1): 後肢懸垂下で1週間飼育する、懸垂2週群 (HS2): 後肢懸垂下で2週間飼育する、懸垂4週群 (HS4): 後肢懸垂下で4週間飼育する。各群の例数は3ヶ月齢が4群全て3匹ずつ、8ヶ月齢は懸垂4週群が3匹で他の3群は2匹ずつであった。ラットは実験前後に体重を測定した (表1)。

対象としたラットの月齢に関して、げっ歯類のヒラメ筋の分化は生後8-14週で完了し、後肢筋の重量および筋線維径は20-30週で最大になるとされている¹⁸⁾。本研究の3ヶ月齢ラットはヒラメ筋の分化がほぼ完了したと考えられる月齢であり、8ヶ月齢ラットは後肢筋の筋線維径がほぼ最大となる月齢に相当する。

2. 実験手順

ラットは室温21-26°C、明暗周期12時間 (明期: 8:00-20:00) に管理された部屋で個別にケージ (280×440×180mm) 内で飼育した。本研究は金沢大学宝町地区動物実験委員会の承認を得て行い、動物の取扱いは同委員会の実験指針に準じた (承認番号: 031671)。

後肢懸垂下で飼育した3群は、実験開始時にジエチルエーテルによる麻酔下でジャケットを装着させた。ジャケット装着および後肢懸垂下で飼育するためのケージ設営方法はYamazakiら¹⁵⁾の報告に準じて行った。ジャケット装着後のラットは、前肢でケージ長軸の前後方向と360°の回転による移動が可能であり、餌、水は自由に摂取させた。後肢は、自

表2. ヒラメ筋湿重量と相対重量比

	CON	HS1	HS2	HS4
筋湿重量 (mg)				
3ヶ月齢	114.7±12.2	79.3±4.2	51.7±24.8	58.0±17.6
8ヶ月齢	195.5±17.7	145.0±31.1	106.0±12.7	97.3±27.5
相対重量比				
3ヶ月齢	0.40±0.03	0.40±0.02	0.28±0.13	0.34±0.12
8ヶ月齢	0.47±0.05	0.47±0.10	0.41±0.10	0.39±0.08

平均値±標準偏差.

CON: 対照群; HS1: 懸垂1週群; HS2: 懸垂2週群; HS4: 懸垂4週群.

動運動は可能であったが足底が床面に接触することはなかった。

本研究での被験筋は右ヒラメ筋とした。筋は実験終了時にペントバルビタールナトリウム (50mg/体重1kg) 麻酔下で採取した。採取した筋はただちに湿重量を測定し、その後、筋腹中央より5mm長に切離してコルク片に固定した。固定した筋切片は液体窒素で冷却したイソペンタン内で瞬間凍結させ、分析まで-70℃で保存した。各群のヒラメ筋湿重量と、筋湿重量を体重で除した相対重量比を表2に示す。

作成した凍結切片は、-25℃のクライオスタット内で10μmの厚さに薄切し、ATPase染色¹⁹⁾(pH10.6)を行った。染色した切片は光学顕微鏡(OLYMPUS, BX50)で観察してデジタルカメラで撮影後、コンピュータに取り込んだ。コンピュータに取り込んだ切片の画像は、NIH image1.62を用いてタイプI線維とタイプII線維に分別し、切片ごとに合計200本以上のMCSAを測定した。表3は、測定した全筋線維数に対するタイプI線維、またはタイプII線維の

表3. ヒラメ筋線維タイプ構成比率

	Type I 線維 (%)	Type II 線維 (%)
3ヶ月齢		
CON	77.2±7.5	22.8±7.5
HS1	73.0±4.7	27.0±4.7
HS2	69.6±4.3	30.4±4.3
HS4	72.3±7.9	27.7±7.9
8ヶ月齢		
CON	82.1±2.1	17.9±2.1
HS1	82.7±7.7	17.3±7.7
HS2	82.9±6.8	17.1±6.8
HS4	76.5±6.6	23.5±6.6

平均値±標準偏差, CON: 対照群, HS1: 懸垂1週群, HS2: 懸垂2週群, HS4: 懸垂4週群.

本数の割合である筋線維タイプ構成比率を示す。

3. 統計学的分析

MCSAは筋線維タイプ別に次の分析を行った。

1) 平均値比較

MCSAの平均値比較は、全標本の中から各群無作為に10本を選び、「月齢」と「懸垂期間」を因子とする二元配置分散分析を行った。「月齢」と「懸垂期間」の交互作用が有意でない場合には、Bonferroniの方法で月齢ごとに多重比較を行った。

2) 度数分布の形状比較

全標本の中から各群無作為に50本を選んで基本統計量を求め、区間を400μm²に区切ってヒストグラムを作成した。群間におけるMCSA分布の形状の差異は2標本のKolmogorov-Smirnov検定に対し、Bonferroniの補正を用いた多重比較で考察した。本検定で2群間に有意差が認められた場合、その2群は母集団の確率分布が異なることを示している。2群間に有意差が認められた場合に分布の形状がどのように異なるのかについては、基本統計量およびヒストグラムより考察した。

本研究では、度数分布の形状比較における標本数は50本とした。これはMCSA全体の度数分布への考察を行った結果、階級数を7とした場合にその分布の特徴が最も過不足なく表れると判断した。この階級数7よりSturgesの公式²⁰⁾より逆算し、今回の無作為抽出標本のサイズ50を決定した。

なお、すべての統計学的分析は統計ソフトSPSS 11.0Jで行い、p<0.05を有意とした。

結果

1. MCSAの平均値比較 (表4)

タイプI線維は、二元配置分散分析で交互作用は認められなかった。多重比較の結果、3ヶ月齢ではHS2とHS4はCONに比べて有意に減少しており(それぞれp<0.01, p<0.001)、HS4はHS1と比べても

表 4. 筋線維横断面積平均値の比較

	CON	HS1	HS2	HS4	二元配置分散分析 (p値)		
					月齢	懸垂期間	月齢×懸垂期間
タイプ I 線維							
3ヶ月齢	2134.6 ± 471.0	1738.4 ± 484.3	1180.5 ± 641.4*	880.7 ± 285.2**,#	p<.001	p<.001	p=.245
8ヶ月齢	2764.0 ± 745.4	2526.7 ± 547.0	2258.0 ± 816.8	1217.7 ± 481.3**,#,†			
タイプ II 線維							
3ヶ月齢	1913.6 ± 226.0	1289.6 ± 229.3	1116.4 ± 369.7	821.4 ± 287.9	p<.001	p<.001	p<.05
8ヶ月齢	2430.7 ± 305.4	1947.1 ± 532.2	1966.7 ± 532.5	965.6 ± 188.8			

単位: μm^2 , 平均値 ± 標準偏差.

CON: 対照群; HS1: 懸垂 1 週群; HS2: 懸垂 2 週群; HS4: 懸垂 4 週群.

筋線維は測定した全標本の中から各群無作為に10本ずつ選んだ。

二元配置分散分析で交互作用が認められなかった場合は月齢内の群間で多重比較を行った: CONとの有意差 **p<.001, *p<.01, HS1との有意差 #p<.01, HS2との有意差 †p<.01.

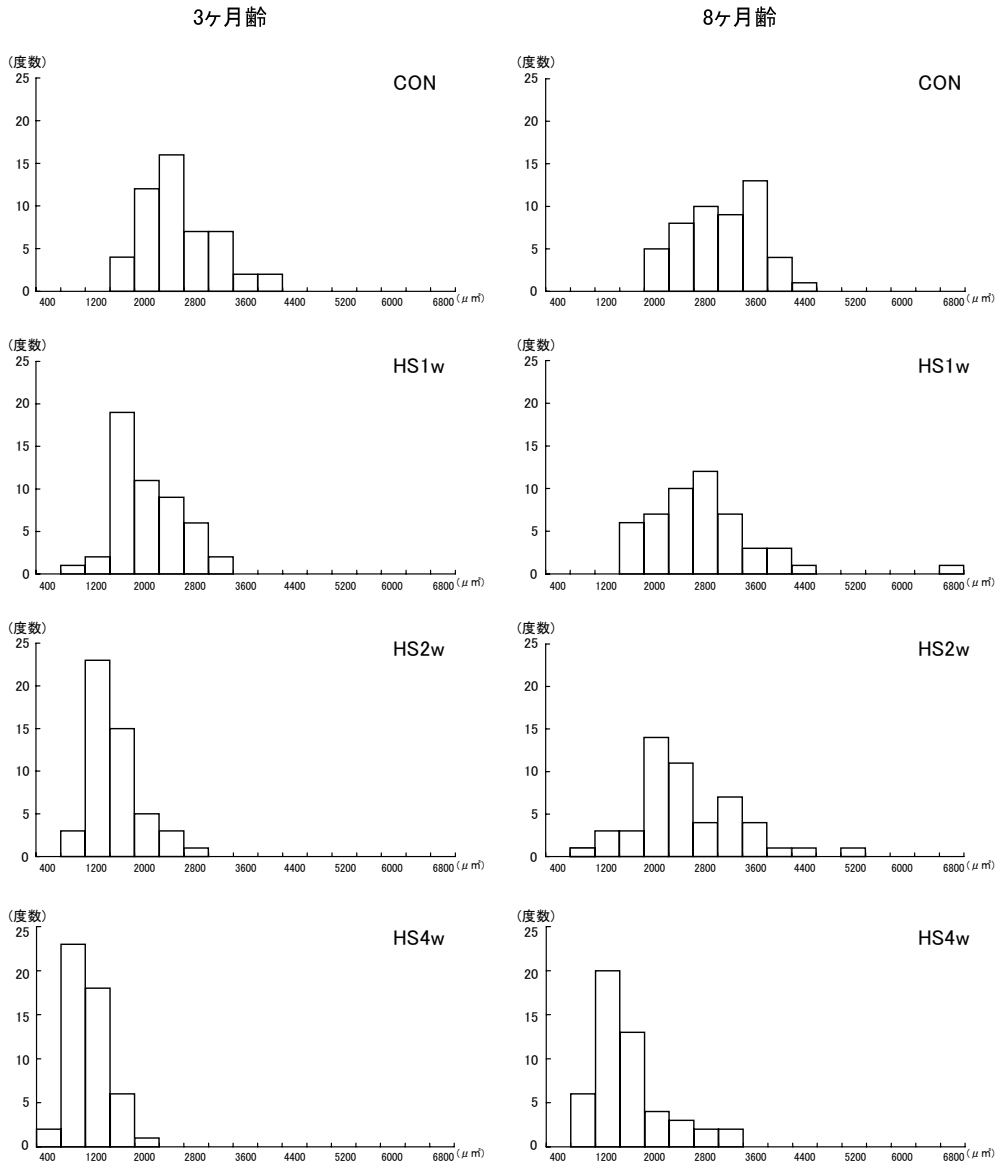


図 1. タイプ I 線維横断面積の分布

縦軸は該当する区間に含まれる筋線維数 (度数) を横軸は $400 \mu\text{m}^2$ ごとに区切った筋線維横断面積の区間の上限値を示す。

CON: 対照群; HS1w: 懸垂 1 週群; HS2w: 懸垂 2 週群; HS4w: 懸垂 4 週群.

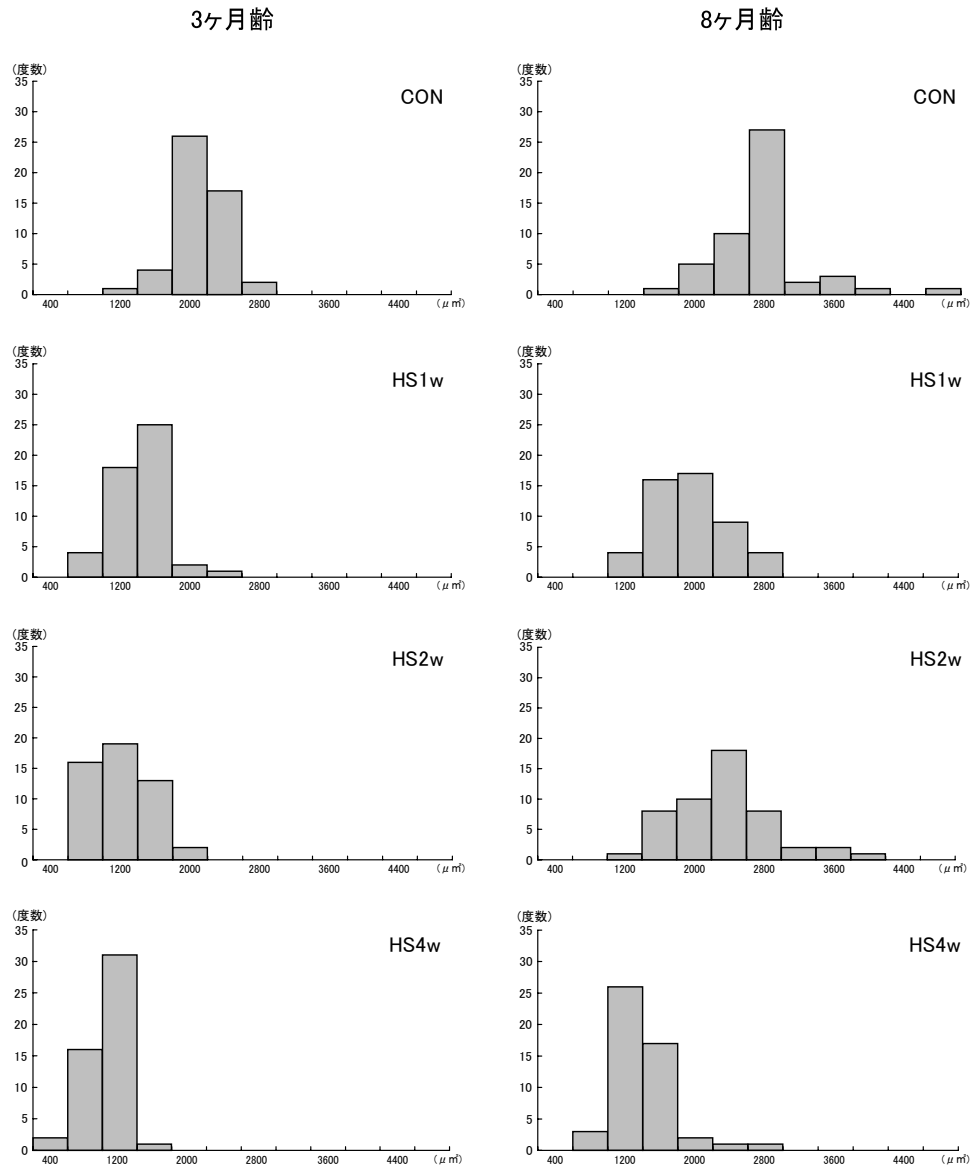


図2. タイプII線維横断面積の分布

縦軸は該当する区間に含まれる筋線維数(度数)を横軸は400 μm^2 ごとに区切った筋線維横断面積の区間の上限値を示す。

CON: 対照群; HS1w: 懸垂1週群; HS2w: 懸垂2週群; HS4w: 懸垂4週群。

有意な減少を認めた ($p < 0.01$)。8ヶ月齢ではHS4がCON、HS1、HS2よりも有意に減少していた ($p < 0.01$)。

タイプII線維は交互作用が認められた ($p < 0.05$)。

2. MCSAにおける度数分布の形状比較

図1、2のヒストグラムの縦軸は各区間に含まれる筋線維数、横軸は各区間の上限値を表示した。

1) タイプI線維の比較

タイプI線維はKolmogorov-Smirnov検定の結果、月齢間比較ではCON、HS1、HS2、HS4のすべての群間に有意差が認められた ($p < 0.001$)。月齢内比較では、3ヶ月齢で4群間における6つの組合せすべてに有意差が認められた ($p < 0.01$, 表5)。8ヶ月齢

ではCON対HS2、およびHS4対他の3群との間にそれぞれ有意差を認めた ($p < 0.01$, 表5)。各群の分布の形状は基本統計量(表6)とヒストグラム(図1)より、3ヶ月齢の平均値と分布の範囲はCONが最も大きく、懸垂した3群のMCSAの分布はより小さいほうに偏移していた。8ヶ月齢の平均値はCONが最も大であったが、分布の範囲はHS1 > HS2 > HS4 > CONの順であり、CONが最も小さかった(表6、図1)。

2) タイプII線維の比較

タイプII線維はKolmogorov-Smirnov検定の結果、月齢間比較ではCON、HS1、HS2、HS4のすべての群間に有意差を認められた ($p < 0.001$)。月齢内比較で

表 5. 月齢別筋線維横断面積の分布の形状比較

A. タイプ I 線維

3ヶ月齢	CON	HS1	HS2	HS4	8ヶ月齢	CON	HS1	HS2	HS4
CON	—	**	**	**	CON	—	N.S.	**	**
HS1	—	—	**	**	HS1	—	—	N.S.	**
HS2	—	—	—	**	HS2	—	—	—	**
HS4	—	—	—	—	HS4	—	—	—	—

B. タイプ II 線維

3ヶ月齢	CON	HS1	HS2	HS4	8ヶ月齢	CON	HS1	HS2	HS4
CON	—	**	**	**	CON	—	**	**	**
HS1	—	—	**	**	HS1	—	—	*	**
HS2	—	—	—	N.S.	HS2	—	—	—	**
HS4	—	—	—	—	HS4	—	—	—	—

CON: 対照群; HS1: 懸垂 1 週群; HS2: 懸垂 2 週群; HS4: 懸垂 4 週群.
 **p<.01, *p<.05, N.S. 有意差なし.

表 6. 筋線維横断面積ヒストグラムの基本統計量

	3ヶ月齢				8ヶ月齢			
	CON	HS1	HS2	HS4	CON	HS1	HS2	HS4
タイプ I 線維								
平均値	2334.9	1807.1	1261.4	886.8	2899.0	2581.1	2311.7	1365.6
標準偏差	596.6	524.4	417.0	313.4	628.4	897.5	843.0	586.8
最小値	1409.2	747.4	662.3	366.0	1678.2	1267.2	685.0	416.3
最大値	3997.9	3023.8	2512.0	1600.8	4171.8	6461.6	4800.7	3123.4
範囲	2588.7	2276.3	1849.7	1234.8	2493.5	5194.4	4115.7	2707.2
タイプ II 線維								
平均値	1902.0	1214.7	1029.1	851.4	2532.2	1745.0	2123.4	1190.0
標準偏差	319.0	279.1	323.9	242.9	525.4	437.3	546.1	347.0
最小値	1129.3	708.9	568.9	263.4	1483.9	962.2	1104.0	491.8
最大値	2761.0	2008.1	1934.2	1536.5	4658.3	2711.2	3663.5	2455.8
範囲	1631.7	1299.3	1365.3	1273.1	3174.4	1749.0	2559.5	1963.9

単位: μm^2 .
 CON: 対照群; HS1: 懸垂 1 週群; HS2: 懸垂 2 週群; HS4: 懸垂 4 週群.

は3ヶ月齢でHS2対HS4の組合せ以外の群間に有意差が認められた ($p < 0.01$, 表5)。8ヶ月齢では4群間のすべての組合せに有意差が認められた (表5)。各群の分布の形状はヒストグラム (図2) と基本統計量 (表6) より、どちらの月齢も平均値と分布の範囲はCONが最も大きく、懸垂した3群のMCSAの分布はより小さいほうに偏移していた。

考 察

本研究では、不活動状態によるラットヒラメ筋の萎縮経過は、MCSA平均値比較と度数分布の形状比較の併用により、3ヶ月齢と8ヶ月齢で違いがあることが示された。また、その経過は筋線維タイプによっても異なっていた。

1. タイプ I 線維について

タイプ I 線維では、MCSAの平均値比較において分散分析で交互作用は認められず、「月齢」と「懸垂期間」はそれぞれ独立した因子として加法的に作用するといえる。同じく、平均値比較における多重比較では、3ヶ月齢がHS2の時点でCONよりも有意に減少していたのに対し、8ヶ月齢がCONに比べて有意に減少した時点はHS4であり、月齢による違いが示された (表4)。さらに度数分布の形状比較 (図1, 表5, 6) でも、両月齢の筋萎縮経過の違いが示された。Kolmogorov-Smirnov検定により、3ヶ月齢はCONとHS1、HS1とHS2の間に有意差を認めた (表5)。しかし、8ヶ月齢ではこれらの群間に有意差は認められず、HS2時点までの1週間ごとの懸垂間隔で有意な分布の形状変化はなかった (表5)。次に懸垂期間に伴い、分布の形状がどのように変化したのかを表6と図1より検討する。4群間のすべての組合せで有意に分布の形状が異なることが示された3ヶ月齢では、懸垂期間が長くなるほど平均値および分布の範囲の両者が小さくなっており、分布の形状は懸垂期間に伴って萎縮方向に変化したと考える。8ヶ月齢では平均値は懸垂期間に伴って小さくなったが、分布の範囲は懸垂した3群のどれもがCONに比べて広がっていた。これは、筋線維によって萎縮しているものとMCSAが維持されている、もしくは萎縮の程度が小さいものがあることを示唆している。8ヶ月齢の経過は、3ヶ月齢のように懸垂開始初期からすべての線維が一律に萎縮方向へ変化するわけではなく、萎縮程度の小さい線維を有しつつ萎縮方向へ向かっていると考えられる。これらの所見を総合すると、タイプ I 線維では不活動期間中、3ヶ月齢のほうが速やかに萎縮方向へ変化

し、8ヶ月齢の経過は3ヶ月齢よりも緩やかであると考える。

その一方で、萎縮期間が経過したHS4の時点では、月齢に関わらず、平均値比較と度数分布の形状比較の両者で、他の群と比べて有意にMCSAが減少していることが確認された。不活動による筋萎縮と加齢との関係について、懸垂期間4週間でMCSA変化を比較した報告は、検索した範囲では見当たらなかった。本研究のHS4は、月齢間の分布の形状比較で有意差が認められた。ただし、統計学的には両者の同一性は否定されたとはいえ、両月齢のHS4のヒストグラムはHS1、HS2に比べると類似しているように見える (図1)。Grahamら¹³⁾は後肢懸垂後のヒラメ筋の萎縮に関して、線維サイズが非荷重筋に最適ないくつかの最小サイズと考えられる同じサイズへと減少する傾向があり、他の研究でも観察されていると述べている。懸垂4週間の時点では両月齢ともGrahamら¹³⁾が述べた傾向と一致していると思われる。

月齢間での萎縮経過の違いに関して、成熟ラットで2週間の懸垂で変化した生化学的パラメータは、成長期の幼若ラットでは懸垂1週間以内に明らかに変化していた²¹⁾。また、Husomら⁹⁾は、加齢骨格筋は細胞サイズを変化させるような不活動への適応能力が減弱していると述べている。このような加齢で非荷重に対し、反応減弱となる細胞サイズの調節には、骨格筋の核が関わっている²²⁾という説がある。細胞サイズと筋核数の間には有意な関係があるため、通常、筋核数は骨格筋線維サイズの決定要因と考えられている²³⁾が、14日間の後肢懸垂後の老齢動物ヒラメ筋ではこの関係が成立しなくなってくる⁸⁾。これらの報告と本研究では対象としたラットの月齢は異なるが、MCSA経過の違いが生じた要因の一つに加齢によって変化した骨格筋反応の影響が考えられる。その結果、8ヶ月齢のMCSA減少が3ヶ月齢よりも緩やかな経過をたどる、あるいは懸垂群の分布の範囲が広がるという現象が生じた可能性がある。

2. タイプ II 線維について

タイプ II 線維では、MCSAの平均値比較において分散分析で交互作用が認められた。したがって、「月齢」と「懸垂期間」の2つの因子はMCSAの変化に関して独立に作用しているわけではなく、融合した一つの因子として作用していると考えられる。これはタイプ I 線維とは異なる結果であった。表4より、この交互作用は8ヶ月齢のHS2が大きく影響していると考えられる。3ヶ月齢が懸垂期間に伴って減

少したのに対し、8ヶ月齢のHS2はHS1に比べて微増した。タイプII線維では、分布の形状比較結果もタイプI線維とは異なっていた。3ヶ月齢ではHS2とHS4間に有意差は認められず、両者の分布の形状は同様と考えられた。8ヶ月齢では、4群間のすべての組合せに有意差を認め、CONとHS1、HS1とHS2の1週間ごとの懸垂間隔で分布の形状は変化していた。次に表6と図2より分布の形状の変化を検討する。3ヶ月齢では、対照群に比べて懸垂した3群の平均値と分布の範囲は小さくなっている。懸垂群の中で比較すると、懸垂期間に伴って平均値は小さくなっているものの、分布の範囲はHS1に比べてHS2のほうが広がっている。8ヶ月齢も3ヶ月齢と同様であった。つまり、タイプII線維は、両月齢ともHS1で萎縮方向への変化がみられた後、HS2ではMCSAが維持される筋線維が存在し、HS4ではHS2と比べて3ヶ月齢では維持、8ヶ月齢では萎縮の方向に変化したと推察される。

Thomason³⁾は不活動状態下でのラットヒラメ筋萎縮に関して、タイプII線維の萎縮は後肢懸垂を開始した最初の2週間の萎縮が大きいと述べている。本研究の結果と照らし合わせると、3ヶ月齢の反応は比較的当てはまると思われる。8ヶ月齢はHS2-HS4間も萎縮の進展は大きく、Thomason³⁾の見解や3か月齢の反応とは異なっていた。加齢では一般にタイプII線維で優位に萎縮する¹⁾とされている点も加味すると、加齢の不活動期間中はタイプII線維の萎縮を予防する運動が重要かもしれない。しかし、今回のタイプII線維の結果に対する機序の考察は不十分であり、今後さらなる検討を要する。考慮すべき点として、ラットヒラメ筋は大部分がタイプI線維から構成される筋であり、本研究でもタイプII線維が占める割合はタイプI線維に比べて圧倒的に少なく(表3)、サンプリング時点で影響を及ぼす可能性があることである。

3. 対照群における度数分布の形状の違いについて

本研究では、タイプI線維、タイプII線維のいずれもCONで既に分布の形状は有意に異なっていた。筆者が以前調べた、Wistar系ラットの3ヶ月齢と9ヶ月齢では、CONのタイプII線維は今回と同様に月齢間で分布の形状は異なり、タイプI線維には両月齢間で有意差は認められなかった¹⁴⁾。タイプI線維の結果が異なる理由として、筋線維タイプの構成比率の影響が考えられる。Wistar系ラットのタイプI線維構成比率は3ヶ月齢が89.4%、9ヶ月齢は88.4%と2つの月齢がほぼ同様の数値であったのに対し¹⁴⁾、

本研究のタイプI線維構成比率(表3)は3ヶ月齢が77.2%と8ヶ月齢の82.1%に比べて低値であった。ラットヒラメ筋は新生児期には未分化で、タイプIIC線維からタイプI線維、タイプII線維へと分化が進み、成熟ラットでは筋線維タイプ構成比率は90%以上がタイプI線維となることが報告されている²³⁾。本研究で対象としたF344ラットの3ヶ月齢は分化が完全とはいえ、CONの分布の形状が8ヶ月齢と異なったものと考えられる。

本研究におけるCONのMCSAヒストグラムの基本統計量(表6)では、タイプI線維の平均値は8ヶ月齢のほうが3ヶ月齢よりも大きく、分布の範囲は3ヶ月齢のほうが8ヶ月齢よりも広い。そしてタイプII線維は平均値、分布の範囲ともに8ヶ月齢のほうが3ヶ月齢よりも大きかった。この結果はWistar系ラットの結果¹⁶⁾と同様であった。度数分布の形状には両月齢におけるMCSA分布の特徴が表れていると考える。

4. 理学療法における実践について

本研究での8ヶ月齢のラットヒラメ筋の不活動によるMCSA減少は、ヒラメ筋で大部分を占めるタイプI線維では、3ヶ月齢に比べて緩やかであった。理学療法における実践では、高齢者が疾病発症などで不活動状態となり、早期に十分な負荷を与えられない場合でも、短期的にはMCSAは維持される可能性がある。そして、不活動期間が4週間になると、8ヶ月齢もCON、HS1、HS2のどの群と比べてもMCSAは有意に減少し、度数分布の形状が萎縮方向へと変化した。筋力トレーニングによる高齢者の筋肥大は若年者と比べて少ないと考えられている²⁴⁾。不活動期間が長期に渡ることが予想される場合、高齢者に対する廃用予防の取り組みは重要である。

文 献

- 1) Brooks SV, Faulkner JA: Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. *Med Sci Sports Exerc* 26: 432-439, 1994
- 2) 石川愛子, 長谷公隆, 千野直一: Disuse syndrome (廃用症候群)とSarcopenia, *老年医学* 42: 895-902, 2004
- 3) Thomason DB, Booth EW: Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* 68: 1-12, 1990
- 4) Stump CS, Tipton CM, Henriksen EJ: Muscle adaptations to hindlimb suspension in mature and old Fischer 344 rats. *J Appl Physiol* 82: 1875-1881, 1997
- 5) Thompson LV, Johnson SA, Shoeman JA: Single soleus muscle fiber function after hindlimb unweighting in adult and aged rats. *J Appl Physiol* 84: 1937-1942, 1998

- 6) Brown M, Hasser EM: Differential effects of reduced muscle use (hindlimb unweighting) on skeletal muscle with aging. *Aging Clin Exp Res* 8: 99-105, 1996
- 7) Simard C, Lacaille M, Vallieres J: Effects of hypokinesia/hypodynamia on contractile and histochemical properties of young and old rat soleus muscle. *Exp Neurol* 97: 106-114, 1987
- 8) Gallegly JC, Turesky NA, Strotman BA: Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age. *J Appl Physiol* 97: 1082-1090, 2004
- 9) Husom AD, Ferrington DA, Thompson LV: Age-related differences in the adaptive potential of type I skeletal muscle fibers. *Exp Gerontol* 40: 227-235, 2005
- 10) 室 増男: 筋力増強におけるリスク管理, *理学療法* 21: 513-521, 2004
- 11) Brooke MH, Engel WK: The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 2 Disease of the upper and lower motor neuron. *Neurology* 19: 378-393, 1969
- 12) Dubowitz V: Muscle biopsy: A Partical Approach, 2nd ed, Bailliere Tindall, London, pp 82-94, 1985
- 13) Graham SC, Roy RR, West SP, et al: Exercise effects on the size and metabolic properties of soleus fibers in hindlimb-suspended rats. *Aviat Space Environ Med* 60: 226-234, 1989
- 14) Yokogawa M: Age-related differences in the effect of weight bearing on the rat soleus muscle subjected to hindlimb suspension. *J Tsuruma Health Sci Soc* 29: 35-50, 2005
- 15) Yamazaki T: Influence of hindlimb unweighting and intermittent weight bearing on dynamics of nuclei in rat soleus muscle. *J Jpn Phys Ther Assoc* 6: 1-8, 2003
- 16) Leeuwenburgh C, Gurley CM, Strotman BA, et al: Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1288-R1296, 2005
- 17) Hauschka EO, Roy RR, Edgerton VR: Size and metabolic properties of single muscle fibers in rat soleus after hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 62: 2338-2347, 1987
- 18) Rowe RWD: Muscle fibre growth in five different muscles in both sexes of mice. I. normal mice. *J Anat* 104: 519-530, 1969
- 19) 埜中征哉: 臨床のための筋病理, 第3版, 日本医事新報, pp 2-14, 1999
- 20) 東京大学教養学部統計学教室編: 基礎統計学I 統計学入門, 東京大学出版会, p 22, 1991
- 21) Steffen JM, Fell RD, Geoghegan TE, et al: Age effects on rat hindlimb muscle atrophy during suspension unloading. *J Appl Physiol* 68: 927-931, 1990
- 22) Wada KI, Katsuta S, Soya H: Natural occurrence of myofiber cytoplasmic enlargement accompanied by decrease in myonuclear number. *JJP* 53: 145-150, 2003
- 23) 岡田理美, 埜中征哉, 石浦章一, 他: ラット筋線維の発育・分化に関する組織化学的研究, *神経内科* 15: 363-370, 1981
- 24) Lemmer JT, Hurlbut DE, Martel GF, et al: Age and gender responses to strength training and detraining. *Med Sci Sports Exerc* 32: 1505-1512, 2000

Age-related differences in the atrophy for the rat soleus muscle subjected to hindlimb suspension: Comparison of the pattern of frequency distributions of muscle fiber cross-sectional area

Masami Yokogawa, Katsumi Inoue, Toshiaki Yamazaki
Keiko Morikawa*, Katsuhiko Tachino

Abstract

OBJECTIVE: To clarify the influence of aging on the course of muscle atrophy due to inactivity, muscle fiber cross-sectional area (MSCA) was investigated in the rat soleus using two statistical methods, comparison of mean values and comparison of the pattern of frequency distributions.

METHODS: A total of 21 3- and 8-month-old male rats were assigned to three experimental groups and one control group. The rats in the experimental groups (HS1, HS2, HS4) had their hindlimb kept in suspension for one, two, four weeks, respectively. The control group was maintained for four weeks without hindlimb suspension. The HS4 group consisted of three 3-month-old and three 8-month-old rats. The other groups each consisted of three 3-month-old and two 8-month-old rats. For each rat, MCSA of the right soleus muscle was measured for more than 200 muscle fibers. From all samples, we randomly selected 10 fibers per group to compare the means, and 50 fibers per group to compare the pattern of frequency distributions. Analysis was performed with respect to the type of muscle fibers.

RESULTS: The course of muscle atrophy differed between the 3-old-month and 8-month-old rats and depended on the type of muscle fiber. In type I fibers, the decrease of MCSA in 8-month-old rats was less marked than that in 3-month-old rats. The mean MCSA in HS4 was significantly more decreased than those in other groups for 8-month-old rats, and the pattern of frequency distributions in HS4 was biased toward the smaller side. In type II fibers, the pattern of frequency distributions suggested that muscle atrophy between HS2 and HS4 in 8-month-old rats was more marked than that in the 3-month-old rats.

CONCLUSION: Even when elderly persons are inactive due to the onset of disease, and a sufficient level of load cannot be restored in the early period, the MCSA may be maintained for a short period. Preventive approaches to disuse atrophy are important in elderly patients, if prolonged bed rest is expected.