

# 求心性運動及び遠心性運動が筋組織に及ぼす影響 筋収縮特性と筋形質膜透過性の変化による検討

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9228">http://hdl.handle.net/2297/9228</a>

## 求心性運動および遠心性運動が筋組織におよぼす影響

—筋収縮特性と筋形質膜透過性の変化による検討—

金沢大学医学部医学科整形外科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

菊 地 尚 久

リハビリテーション医学では筋力増強訓練の際に求心性運動と遠心性運動が用いられるが、これら2種類の運動を収縮力学的側面、筋形質膜透過性の変化から検討した報告はない。そこで本研究では、比較的強い強度で求心性運動と遠心性運動を行った後に生化学的評価、収縮力学的評価、筋形質膜透過性の評価を施行し、これら2種類の運動後の変化について検討したので報告する。105匹の成熟マウスをコントロール群 (N=10)、上り坂群 (N=49)、下り坂群 (N=46) の3群に分けた。運動群に対しては20m/minの速度で150分間の運動を上り坂または下り坂の傾斜付きトレッドミル上で施行した。運動終了直後、3日後、7日後に屠殺し、血清クレアチンキナーゼ (creatine kinase, CK) 値の測定、ヒラメ筋の収縮特性、フルオロセインイソチアネート標識付きデキストラン (fluorescent isothianate-labeled dextran, FDX) による筋細胞内染色を施行した。血清CK値は、上り坂群では運動終了直後にコントロールに比較して304%と有意な増加を認めた。一方、下り坂群では運動終了直後のみで692%と有意な増加を認め、運動終了3日後まで有意な増加は持続した。強縮力、単収縮力と単収縮時間については、上り坂群、下り坂群とも運動終了直後に有意な低下を示した。FDXによる筋細胞内染色は、下り坂群においては運動終了直後にHE染色上の正常細胞に淡い筋細胞内染色を認め、運動終了後早期から筋形質膜が損傷されていることが示された。運動終了3日後には、下り坂群でオパーク細胞と壊死細胞で明瞭な細胞内染色を認め、筋形質膜が大規模に破壊されている状態が示された。一方、上り坂群では運動終了後いずれの時期においてもFDXによる筋細胞内染色は認めなかった。以上より、比較的強い運動強度における運動では、求心性運動と遠心性運動の双方において運動終了直後には筋損傷を生じるが、遠心性運動においてはさらに長期にわたり筋損傷の影響が持続すると結論された。

**Key words** concentric exercise, eccentric exercise, muscle injury, permeability, contractility

リハビリテーションの場面において、運動療法のプログラムの一つとして筋力増強訓練がある。筋力増強訓練は、その収縮様式の種類により等尺性運動訓練<sup>12)</sup>、等張性運動訓練<sup>13)</sup>、等速性運動訓練<sup>14)</sup>に分類されている。また筋収縮による運動の分類は、張力が負荷に打ち勝って筋長が短縮する求心性収縮と、筋収縮により張力よりも外部負荷が大であるため筋長は延長する遠心性収縮の2種類がある<sup>15)</sup>。

しかしながら、遠心性収縮では高負荷の運動を行った場合に正常な筋線維構造が破壊され、筋損傷を引き起こすことが知られており<sup>9)~16)</sup>、筋形質膜の破壊によりクレアチンキナーゼ (creatine kinase, CK) や乳酸デヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase, LDH) といった筋細胞内蛋白が血清中に逸脱し、これらの血清中酵素値が上昇することが報告されている<sup>11)~13)15)17)18)</sup>。このような血清中のCK値やLDH値の上昇は運動終了直後からみられる現象であるが、病理組織学的には運動終了直後から筋損傷を検出することは困難である。この方法では運動後2~3日後になって、ようやく筋線維の変性や壊死像が認められ、筋損傷の病態が把握できる<sup>10)13)15)17)19)~21)</sup>。ところが近年 McNeil ら<sup>22)</sup>は、光学顕微鏡レベルでの病理組織学的手法

では検出することが困難な運動直後の筋形質膜損傷をアルブミンと蛍光標識付きデキストランの筋細胞内染色を用いて、初めて直接的に証明した。また Carter ら<sup>23)</sup>は、蛍光標識付きデキストランの筋細胞内染色を用いて、正常マウスの遠心性運動後の筋形質膜透過性の経時的変化と病的筋細胞における筋形質膜の病態を報告した。さらに筋収縮力学的には、Lieber ら<sup>24)</sup>がウサギの前脛骨筋を用いた研究から遠心性運動により運動後の最大強縮力は69%減少したと報告し、これは筋損傷によるところが大きいと述べている。

一方、求心性運動に対する実験では、運動後の血液生化学、病理組織学、収縮力学上の変化について統一した見解が得られておらず、相反した結果が報告されている。Clarkson ら<sup>25)</sup>は、ヒトの前腕屈筋で求心性運動を行い、運動後の血清CK値の上昇と筋細胞内浮腫を認めたと報告しており、また Peeze-Binkhorst ら<sup>26)</sup>は、求心性運動によりラットのヒラメ筋に筋細胞内浮腫を認めたと報告している。一方 McCully ら<sup>27)</sup>は、最大強度の求心性運動を施行したが、マウスの長趾伸筋で筋変性は生じず、強縮力にも全く影響を与えなかったと報告している。

しかし、これらの研究で求心性運動と遠心性運動の両方を生

平成8年6月21日受付, 平成8年7月16日受理

Abbreviations: CK, creatine kinase; FDX, fluorescent isothianate-labeled dextran; LDH, lactate dehydrogenase; TCT, twitch contraction time

化学的側面、収縮力学的側面、筋形質膜透過性の変化から総合的に評価した報告はなく、これらがそれぞれの運動パターンにおいてどのように作用しているかは興味あるところである。

そこで本研究では、正常な成熟マウスを用いてトレッドミル上の上り坂と下り坂を走らせることで求心性運動と遠心性運動を行い、運動終了後経時的に血清 CK の測定、後肢の筋収縮特性の測定、フルオロセインイソチアネート標識付きデキストラン (fluorescent isothianate-labeled dextran, FDX) の静脈内投与による筋形質膜透過性の変化を評価して、求心性運動と遠心性運動の双方における収縮力学的側面、筋形質膜の微細損傷を総合的に評価することを目的に実験を行った。

#### 対象および方法

##### I. 材 料

実験動物には C57BL/10 系の同腹子のマウス (日本クレア, 東京) を用いた。生齢20週齢の成熟マウスを用い、体重は平均 28.8g (26.8~32.2g) であった。総数は105匹であり、これをコントロール群と運動群として上り坂群, 下り坂群に分けた。コントロール群には10匹を用い、運動群に関しては上り坂群は49匹, 下り坂群46匹であった。

##### II. 走行運動

走行速度、傾斜角を変化させられる小動物用トレッドミル (Quinton, San Diego, USA) を用い、走行運動を行った (図1)。マウスの走行を促すために筆先で尾部に刺激を行った。それでも走行が促されない場合には、後方の電気刺激装置により走行を励ますように設計されている。しかし、15秒以上の電気刺激が加わるとゲートが開放され、後方のケージに収容される。

走行運動のプロトコールは、Carter ら<sup>23)</sup>の実験に準じて施行した。トレッドミルの傾斜角は上り坂, 下り坂とも 20° とし、走行運動は最初の 5 分間 12m/分の速度でウォーミングアップを行った後、20m/分の速度で30分間ずつ走行させ、5 分間の休憩を入れて計 5 回走行させた。また休憩時には水分と食料を十分に補給した。

##### III. 運動終了後の実験方法

実験は過去の報告から<sup>10)17)19)20)</sup>筋形質膜の損傷と筋細胞の微細損傷が予想される走行運動終了直後 (N=35), 走行運動終了 3 日後 (N=31), 走行運動終了 7 日後 (N=29) に施行した。

実験施行時には 65mg/kg の塩化ペントバルビタールの腹腔内投与により全身麻酔を行った後、開胸して心腔内より血清 CK 測定のために採血を施行した。その後一側の後肢を組織学的検索および筋形質膜透過性の評価に、他側の後肢を収縮特性の実験に用いた。組織標本には後肢の筋のうち最も損傷を受けやすいとされる近位筋として大腿四頭筋を選択し<sup>13)17)19)</sup>、さらに遠位筋の代表としてヒラメ筋を選択した。

##### IV. CK 測定

血液をヘパリン入りチューブに注入し、遠心分離を行って血清分離した後、血清を-80℃で凍結保存した。実験時に血清を 10mM の HCl, 0.25mM の果糖, 0.2mM の EDTA, 1.0mM のジチオスレイトール (Sigma, St. Louis, USA) で 30℃, PH 7.4 で 1/20 の濃度に希釈した。CK 測定は Szasz ら<sup>24)</sup>の方法に準じて作成された市販の CK 測定キット (Ciba Corning Diagnostics Corporation, Oberlin, USA) を使用し、340nm で分光光度計 (Gilford Systems, Oberlin, USA) を用いて測定した。

##### V. 収縮特性

ヒラメ筋を 35℃ に加温したクレブスリンゲル液と d-ツボクラリン (44μM) の混入した恒温ビーカーに浸漬させた。ビーカー内で筋の中極端を固定し、末梢端には微小荷重変換器 120T-50D (共和電業, 東京) を接続した。刺激用のプラチナ製ワイヤー電極を恒温ビーカーに設置し、等尺性の単収縮力と強縮力を記録した。記録中、溶液は混合ガス (95% 酸素, 5% 二酸化炭素) で十分に通気を行った。

刺激条件は、最大上の強度で単収縮を誘発させるためには持続時間 1msec の矩形波を、強縮の誘発には持続時間 1msec、頻度 230Hz, 280msec の群発波を用いた<sup>25)</sup>。刺激、動歪増幅、張力記録は筋電計 MS-6 (Medelec, Sally, UK) を使用した。そして単収縮時の最大張力 (maximal twitch tension, Pt), 強縮時の最

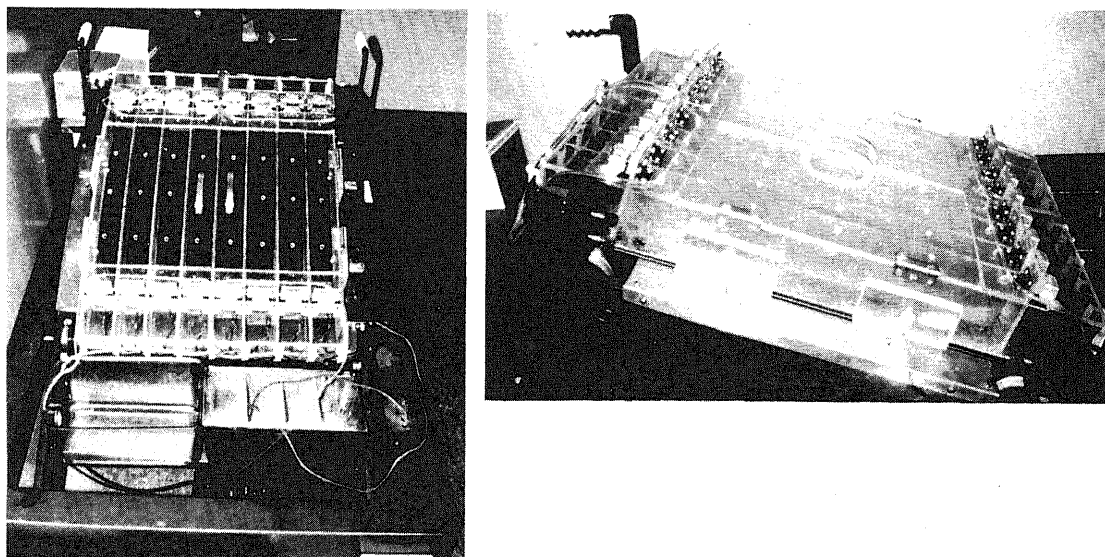


Fig. 1. Treadmill for uphill and downhill running. The angle is set at 20° incline, electrical stimulation is used to encourage the mice to run.

大張力 (maximal tetanic tension, Po), 刺激後単収縮時の最大張力が出現するまでの時間 (twitch contraction time, TCT) を計測した。また疲労試験として持続時間 1msec, 頻度 230Hz で 67pulse の強縮刺激を 5 秒間ごとに 5 分間継続して施行した<sup>29,30</sup>。

#### VI. 病理組織学的検索

張力測定を行った後肢の対側から大腿四頭筋とヒラメ筋を切離し, 液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速に凍結固定し, クライオスタット・マイクロトームを用いて 10 $\mu$ m 厚の連続切片を作成した。病理組織学的検索を行うために HE 染色を行い, マクロファージによる貪食所見, リンパ球浸潤, 筋細胞の前壊死状態であるオパーク細胞, 壊死細胞, 再生筋細胞である中心核細胞を有意な所見とした。また, 定量的評価を行うため

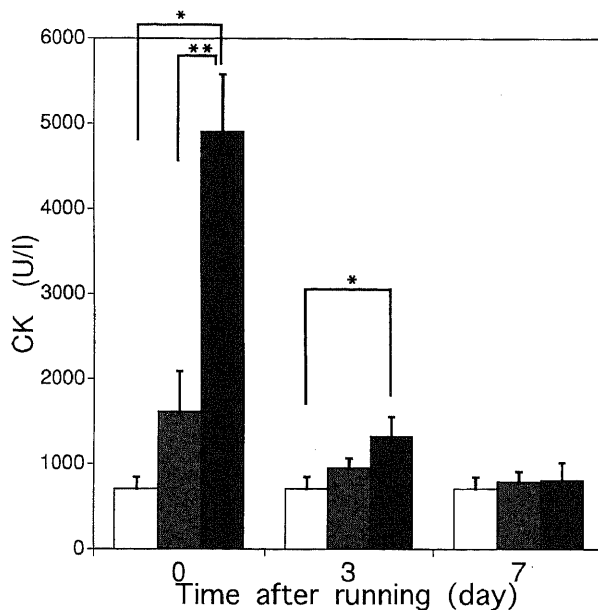


Fig. 2. Plasma creatine kinase (CK) values after uphill and downhill running. The animals were running on uphill treadmill (▨, n=49), downhill treadmill (■, n=46), or no running as the control (□, n=10). Values are  $\bar{x} \pm SD$ . \*P<0.05 versus control group. \*\*P<0.05 versus uphill treadmill group.

にそれぞれの標本に対し, 200の細胞のうちどれだけの細胞が病理的变化を起こしているかを数えて百分率で表示し, 全ての標本の平均値を算出した。

#### VI. FDX による筋形質膜透過性の評価

FDX には市販されているもの (Sigma) を使用した。この分子はイオン化されておらず, 正常な状態では細胞膜を透過することができないものである。予備実験として 5,000D, 10,000D, 70,000D, 100,000D の FDX (Sigma) を用いて実験を施行した。その結果 5,000D の分子量ではコントロールマウスでも背景の蛍光染色が強すぎ, 高分子量では筋細胞内への取り込みが悪いことがわかった<sup>22</sup>。そこで, 以前の報告でも最も適したとされた分子量の 10,000D とした<sup>22,23</sup>。

150mg/ml の FDX を 0.2ml のリン酸緩衝食塩水 (pH7.2) に溶解した後, 27ゲージ針を用いて尾静脈より FDX 溶解液を注入した。FDX 溶解液の注入は, 運動直後に評価した群では運動終了予測時間の 4 時間前に施行し, その他の群では屠殺する 4 時間前に施行した。屠殺後 HE 染色の手順と同様に, 大腿四頭筋とヒラメ筋を切離し, 液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速に凍結固定し, クライオスタット・マイクロトームを用いて 10 $\mu$ m 厚の連続切片を作成した。FDX の存在は蛍光顕微鏡で観察し, HE での連続切片と比較検討した<sup>31</sup>。また, それぞれの標本に対して 200の細胞中どれだけの細胞が筋細胞内染色を生じているかを数え, -, ±, +, ++ の 4 段階に分類して半定量化を施行した。

#### VII. 統計学的検定

得られた測定値は平均値±標準偏差で表した。3群の平均値の差の検定は, 分散分析を行い, 有意な値が認められた項目については 2 群間で t 検定を施行した。なお, 棄却水準は 5% とした。

#### 成 績

##### 1. CK の変化 (図 2)

上り坂群においては, 運動終了直後で血清 CK 値は 1616 $\pm$ 477U/l とコントロールと比較して 228% で有意な増加を示していた。しかし運動終了 3 日後では, 953 $\pm$ 116U/l (コントロール比 134%), 運動終了 7 日後では 791 $\pm$ 128U/l (コントロール比 115%) であり, コントロールと比較して有意差は認めなかった。

Table 1. Contractile properties after uphill and downhill running

Group	Time after running (day)	Number of mice examined	Po (g)	Pt (g)	TCT (ms)
Uphill running	0	18	19.4 $\pm$ 2.0*	2.2 $\pm$ 0.3*	28.9 $\pm$ 0.8*
	3	16	22.0 $\pm$ 1.1	3.3 $\pm$ 0.2	33.4 $\pm$ 0.5
	7	15	24.2 $\pm$ 0.9	3.8 $\pm$ 0.2	34.7 $\pm$ 0.4
Downhill running	0	17	20.9 $\pm$ 1.7*	3.0 $\pm$ 0.3*	32.9 $\pm$ 1.0*
	3	15	21.7 $\pm$ 0.8	3.8 $\pm$ 0.2	35.4 $\pm$ 0.7
	7	14	22.7 $\pm$ 1.3	3.9 $\pm$ 0.3	34.5 $\pm$ 0.7
Control		10	23.6 $\pm$ 0.9	3.9 $\pm$ 0.2	35.9 $\pm$ 1.4

Po, maximum tetanic tension; Pt, maximum twitch tension; TCT, twitch contraction time.

\*P<0.05 versus control. Values are  $\bar{x} \pm SD$ .

下り坂群においては、運動終了直後で血清 CK 値は  $490 \pm 674 \text{ U/I}$  とコントロールと比較して 692% で有意な増加を示していた。さらに、このデータは上り坂群の運動終了直後での血清 CK 値と比較して 304% と有意な増加を示していた。運動終了 3 日後でも  $1326 \pm 233 \text{ U/I}$  (コントロール比 187%) と有意な増加を示したが、運動終了 7 日後では  $814 \pm 269 \text{ U/I}$  (コントロール比 115%) であり、コントロールと比較して有意差は認めなかった。

II. 筋収縮特性の変化 (表 1)

Pt に関しては、上り坂群では運動終了直後には  $2.2 \pm 0.3 \text{ g}$  とコントロールと比較して有意な張力の低下を認めたが、3 日後には  $3.3 \pm 0.2 \text{ g}$ 、7 日後には  $3.8 \pm 0.2 \text{ g}$  とコントロールと比較して有意差を認めなかった。下り坂群では、運動終了直後には  $3.0 \pm 0.3 \text{ g}$  と有意な張力の低下を認めたが、3 日後には  $3.8 \pm 0.2 \text{ g}$ 、7 日後には  $3.9 \pm 0.3 \text{ g}$  とコントロールと比較して有意差を認めなかった。

Po に関しては、上り坂群では運動終了直後には  $19.4 \pm 2.0 \text{ g}$  と有意な張力の低下を認めたが、3 日後には  $22.0 \pm 1.1 \text{ g}$ 、7 日後には  $24.2 \pm 0.9 \text{ g}$  とコントロールと比較して有意差を認めなかった。下り坂群では、運動終了直後には  $20.9 \pm 1.7 \text{ g}$  と有意な

張力の低下を認めたが、3 日後には  $21.7 \pm 0.8 \text{ g}$ 、7 日後には  $22.7 \pm 1.3 \text{ g}$  とコントロールと比較して有意差を認めなかった。また上り坂群と下り坂群の運動終了直後と 7 日後の Po を比較すると、上り坂群では 125% の増加を示しているのに対し、下り坂群では 109% の増加にとどまった。

TCT に関しては、上り坂群では運動終了直後には  $28.9 \pm 0.8 \text{ ms}$  と有意な張力の低下を認めたが、3 日後には  $33.4 \pm 0.5 \text{ ms}$ 、7 日後には  $34.7 \pm 0.4 \text{ ms}$  とコントロールと比較して有意差を認めなかった。下り坂群では  $32.9 \pm 1.0 \text{ ms}$ 、3 日後には  $35.4 \pm 0.7 \text{ ms}$ 、7 日後には  $34.5 \pm 0.7 \text{ ms}$  とコントロールと比較して時間は短縮していたが有意差を認めなかった。

III. 疲労特性の変化

コントロール群においては、強縮力は初回刺激時の  $23.9 \pm 1.0 \text{ g}$  から時間とともに徐々に低下し、300 秒後には  $10.1 \pm 0.8 \text{ g}$  (初回刺激時比 42.3%) となった。上り坂群においては (図 3)、運動終了直後では初回刺激時は  $19.4 \pm 2.0 \text{ g}$  とコントロール群に比して低下しており、初回刺激以後も疲労曲線はコントロールに比して常に低値を示し、30 秒後から 180 秒後までは有意差を示した。300 秒後の張力は  $8.3 \pm 0.9 \text{ g}$  (初回刺激時比 42.8%) となった。運動終了 3 日後では初回刺激時は  $22.0 \pm$

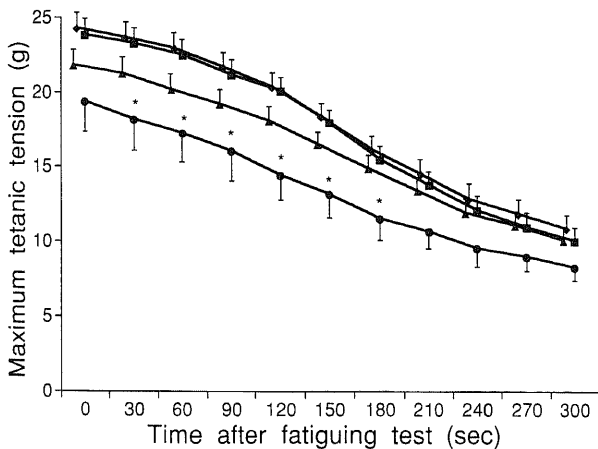


Fig. 3. Fatigue curves after uphill running. The animals were immediately after running (●, n=18), 3 days after running (▲, n=16), 7 days after running (◆, n=15), or no running as the control (■, n=10). Values are  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \*P<0.05 versus control group.

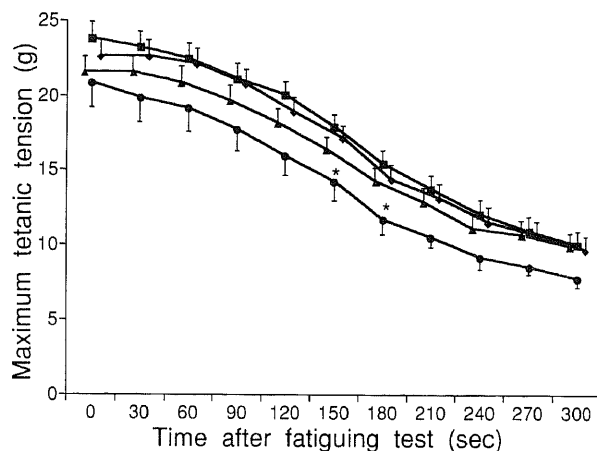


Fig. 4. Fatigue curves after downhill running. The animals were immediately after running (●, n=17), 3 days after running (▲, n=15), 7 days after running (◆, n=14), or no running as the control (■, n=10). Values are  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \*P<0.05 versus control group.

Table 2. Intracellular fluorescence of quadriceps and soleus muscle after uphill and downhill running

Group	Time after running (day)	Number of mice examined	Presence of intracellular fluorescence in	
			quadriceps muscles	soleus muscles
Uphill running	0	18	-	-
	3	16	-	-
	7	15	-	-
Downhill running	0	17	+	+
	3	15	±	±
	7	14	-	-

-, negative; ±, variably and faintly positive; +, constantly but weakly positive; #, constantly positive.

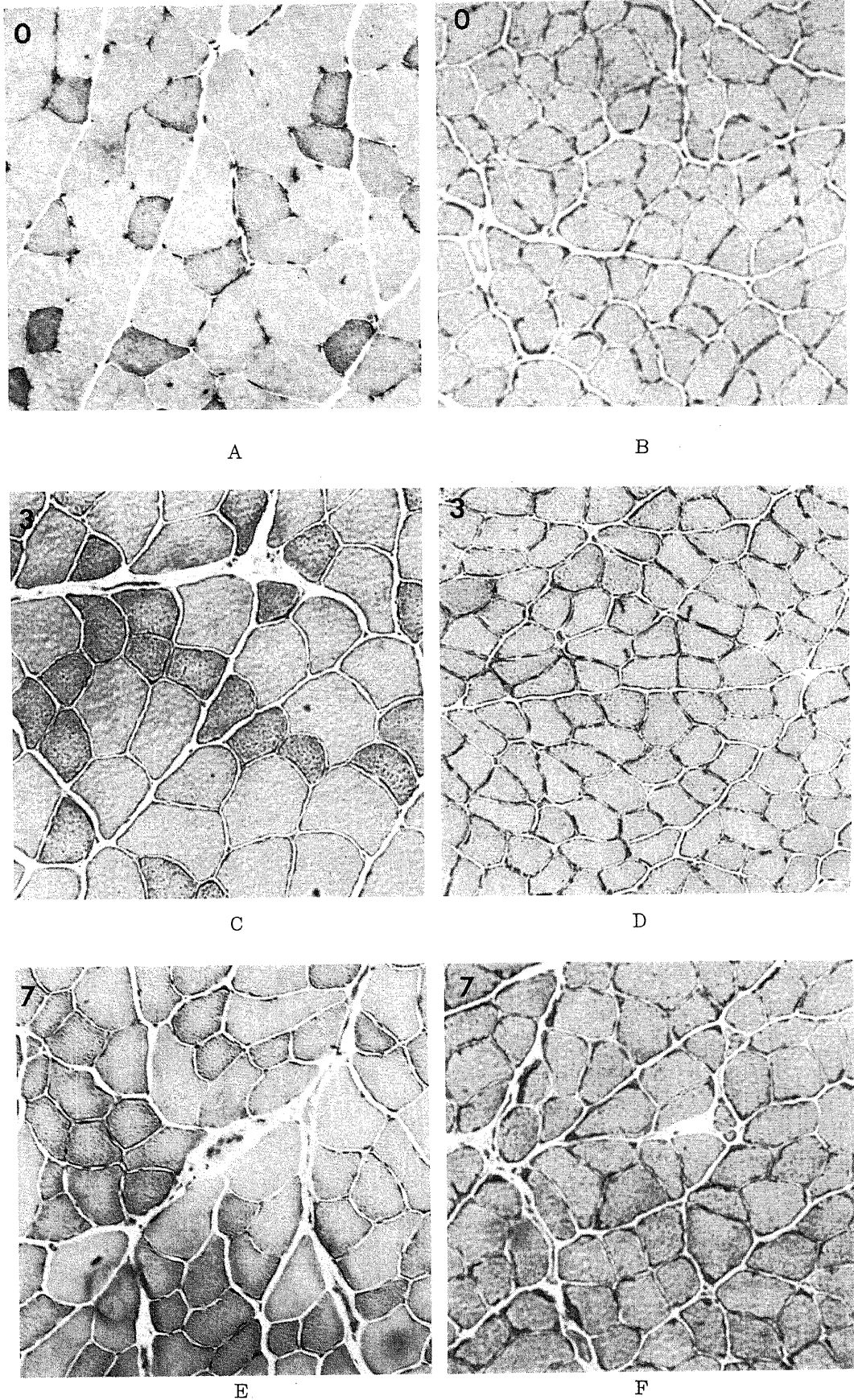


Fig. 5. Histopathological findings of quadriceps muscles (A, C and E) and soleus muscles (B, D and F) after uphill running. (A) and (B) are immediately after running, (C) and (D) are 3 days after running, (E) and (F) are 7 after running respectively. No abnormalities are observed in any muscles. HE,  $\times 160$ .

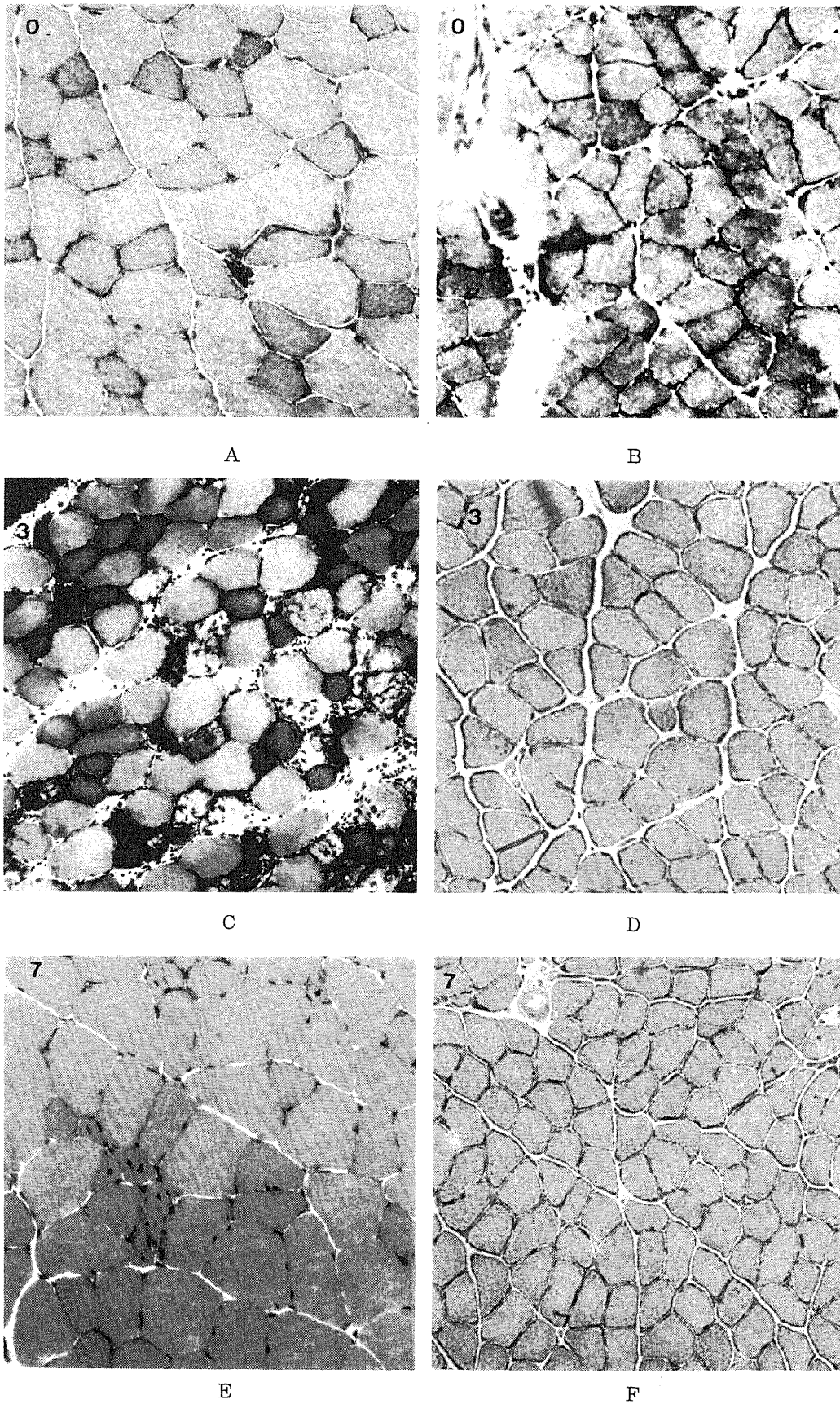
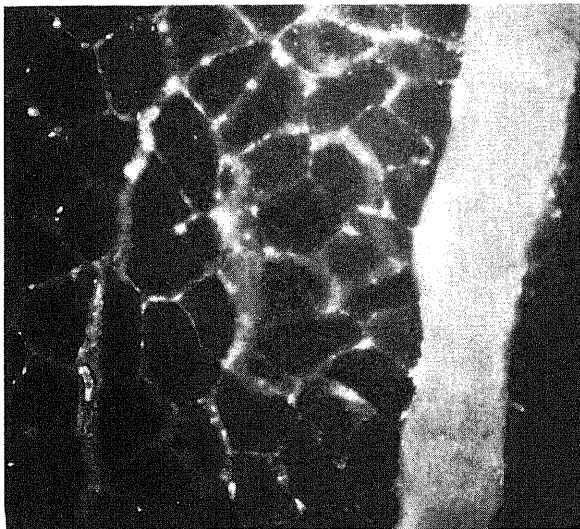


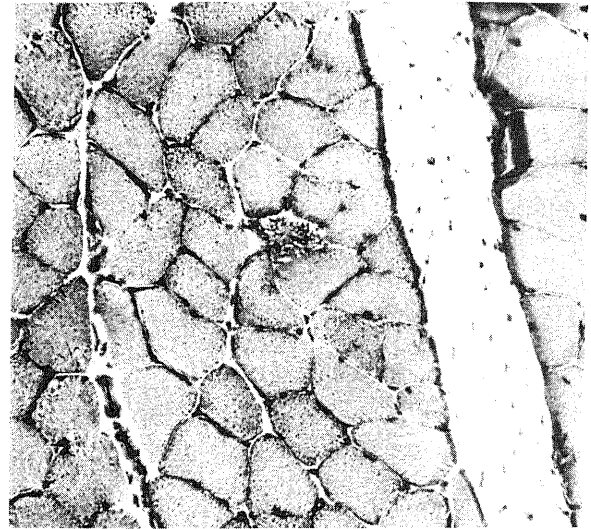
Fig. 6. Histopathological findings of quadriceps muscles (A, C and E) and soleus muscles (B, D and F) after downhill running. (A) and (B) are immediately after running. No abnormalities are observed. (C) and (D) are 3 days after running, severe necrosis and inflammation are observed in (C). (E) and (F) are 7 days after running, regenerated muscle cells are observed in (E). HE,  $\times 160$ .

1.1g でコントロール群と比較して軽度低値を示したが、有意差を認めたポイントはなく、180秒以後の刺激ではほぼ同様の疲労曲線であった。300秒後の張力は  $10.3 \pm 0.9$ g (初回刺激時比 46.8%) となった。運動終了7日後では初回刺激時  $24.2 \pm 0.9$ g でコントロールとほぼ同様であり、有意差を認めたポイントはなく、ほぼ同様の疲労曲線であった。300秒後の張力は  $10.8 \pm 0.7$ g (初回刺激時比 44.6%) となった。下り坂群においては (図4)、運動終了直後では初回刺激時  $20.9 \pm 1.7$ g とコントロール群に比して減少しており、初回刺激以後も疲労曲線はコ

ントロールに比して常に低値を示し、150秒後と180秒後で有意差を示した。300秒後の張力は  $7.8 \pm 0.6$ g (初回刺激時比 37.3%) となった。運動終了3日後では初回刺激時  $21.7 \pm 1.1$ g でコントロール群と比較して軽度低値を示したが有意差を認めたポイントはなく、すべてのポイントでコントロールとほぼ同様の疲労曲線であった。300秒後の張力は  $10.0 \pm 0.6$ g (初回刺激時比 46.1%) となった。運動終了7日後では初回刺激時  $22.7 \pm 1.3$ g でコントロールとほぼ同様であり、有意差を認めたポイントはなく、全てのポイントでコントロールとほぼ同様の

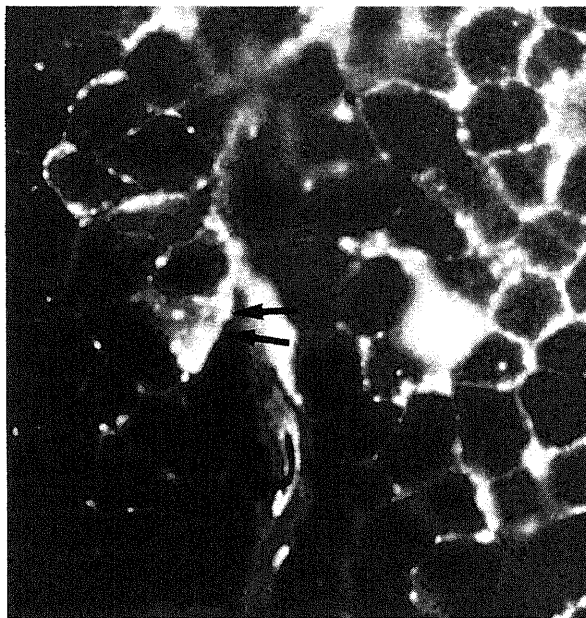


A



B

Fig. 7. Fluorescent isothianated-labeled dextran (FDX) stain in normal muscles. (A) FDX stain in control soleus muscles,  $\times 200$ . (B) HE stain on the same slice,  $\times 200$ . Strong fluorescence is seen between the muscle cells, but no fluorescence is observed within the cells.



A



B

Fig. 8. Fluorescent isothianated-labeled dextran (FDX) stain of soleus muscles immediately after running. (A) FDX stain shows intracellular fluorescence. Muscle membranes are getting indistinct borders (arrow),  $\times 200$ . (B) HE stain on the same slice does not show any abnormalities,  $\times 200$ .



疲労曲線であった。300秒後の張力は  $9.7 \pm 1.2\text{g}$  (初回刺激時比 42.7%) となった。

#### IV. 病理組織学的検索

上り坂群においては (図5), 運動終了直後, 3日後, 7日後で, 大腿四頭筋, ヒラメ筋とも, 筋変性, 炎症所見, 再生筋線維は全視野において認められなかった。下り坂群においては (図6), 運動終了直後には, 大腿四頭筋, ヒラメ筋とも筋変性の所見は認められなかった。運動終了3日後では, 大腿四頭筋

においてはエオジン濃染のオパーク細胞, 細胞核の消失した壊死細胞, リンパ球浸潤やマクロファージの食食所見を  $32.7 \pm 8.5\%$  の筋細胞で認めた。ヒラメ筋においては, 筋変性や炎症所見は認められなかった。運動終了7日後には, 大腿四頭筋で軽度の単核細胞浸潤を認めたが, 筋壊死像は消失しており, 細胞面積の小さい中心核細胞を  $15.5 \pm 4.2\%$  の細胞で認めた。これらの変化は下り坂群を施行した全てのマウスで認められた。

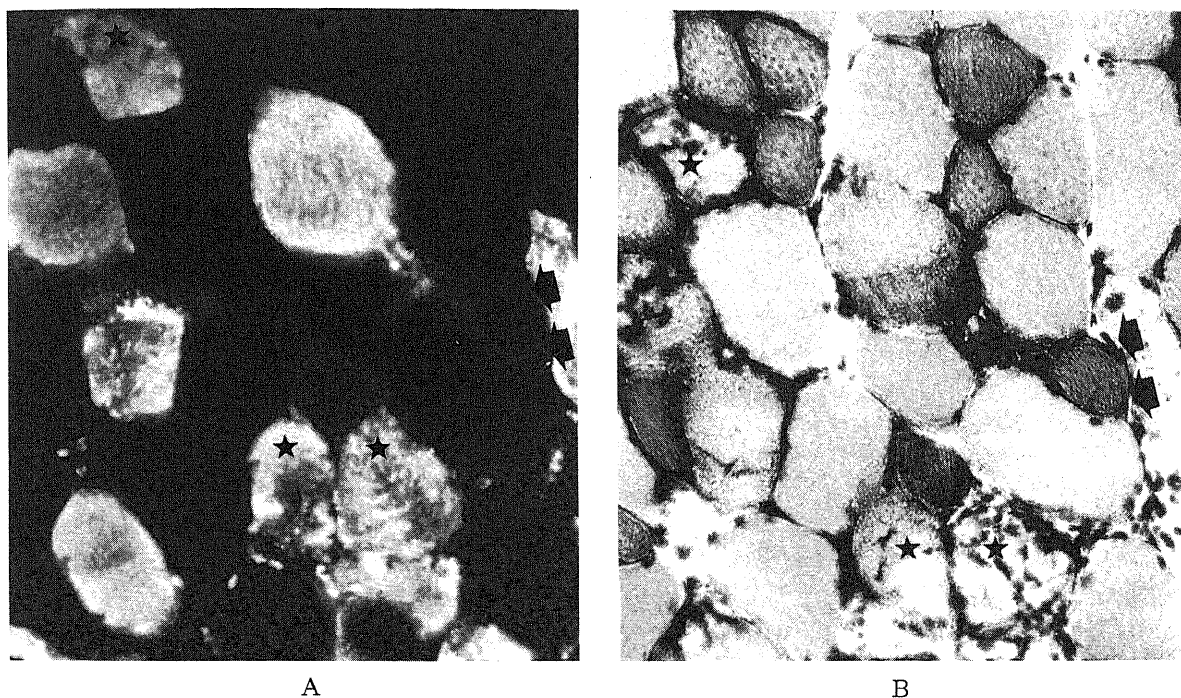


Fig. 9. Fluorescent isothianated-labeled dextran (FDX) stain of quadriceps muscles 3 days after running. (A) FDX stain,  $\times 400$ . (B) HE stain on the same slice,  $\times 400$ . Intracellular fluorescence corresponding to areas of opaque cells (arrow) and necrotic cells (star) shown by (B) are observed.

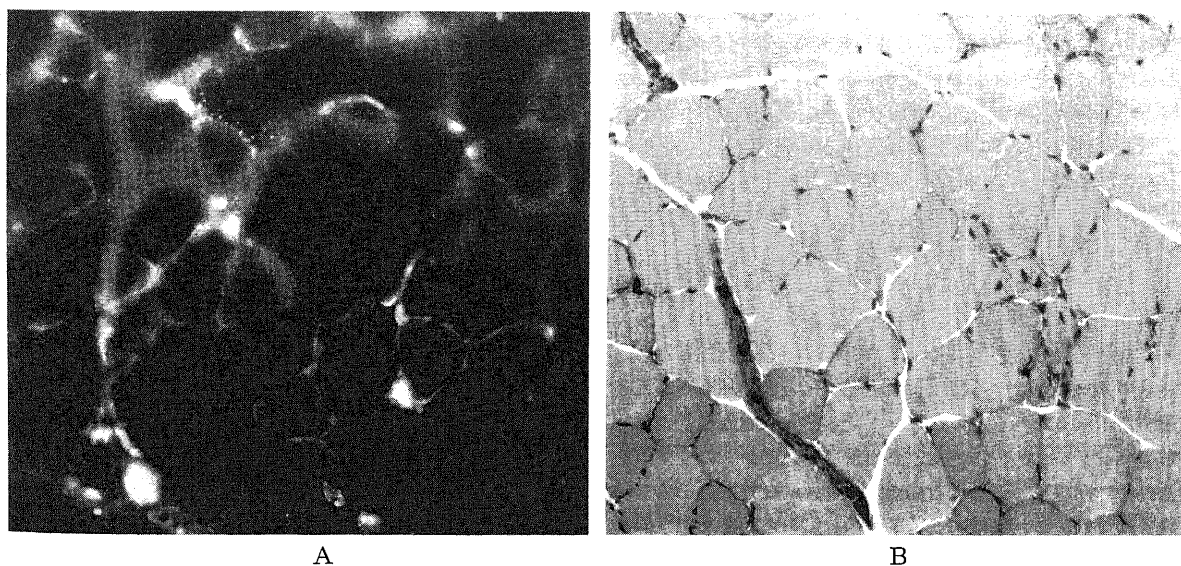


Fig. 10. Fluorescent isothianated-labeled dextran (FDX) stain of quadriceps muscles 7 days after running. (A) FDX stain,  $\times 200$ . (B) HE stain on the same slice,  $\times 200$ . Fluorescence is seen between the muscle cells, but no fluorescence is observed within the regenerated muscle cells.

### V. FDX による筋細胞内染色の変化 (表 2)

コントロール群における FDX 染色では細胞間のみならず明らかな蛍光染色を認め、FDX が筋細胞周囲に十分に満たされていることが示された。しかし細胞内染色は認められなかった (図 7)。

上り坂群においては、運動終了直後、3日後、7日後で、大腿四頭筋、ヒラメ筋とも、筋形質膜透過性の変化による FDX の筋細胞内染色は全視野を通じて認められなかった。下り坂群においては、運動終了直後に大腿四頭筋、ヒラメ筋ともわずかな数の細胞で筋形質膜透過性の変化による FDX の筋細胞内染色が認められた (図 8)。この細胞内染色を示した細胞は HE 染色では異常を認めなかった。FDX の染色性は淡く細胞が染まる程度で、筋形質膜の境界が不明瞭となる部分的な変化が認められた。運動終了 3 日後には、大腿四頭筋ではかなり多くの細胞で細胞内染色が認められた (図 9)。この細胞内染色は HE 染色においてエオジン濃性に認められるオパーク細胞と壊死細胞で認められ、HE 染色における正常細胞の筋細胞内染色はみられなかった。FDX の染色性は細胞内全体で非常に明瞭で、大量に FDX が細胞内に流入していることを示していた。また、筋細胞内染色の比率は異なるもののヒラメ筋においても筋細胞内染色を認めた。運動終了 7 日後には大腿四頭筋、ヒラメ筋とも FDX の筋細胞内染色は認められず、また HE 染色上の再生筋細胞の FDX の流入は認めなかった (図 10)。

### 考 察

筋損傷は比較的強い強度での運動、長時間の運動、遠心性収縮による運動の際に生じる。これらの運動により最初に生じる変化は、筋細胞内の微細損傷によるとされ<sup>17)32)33)</sup>、筋細胞の損傷による一過性張力低下<sup>9)34)</sup>、遅発性筋痛<sup>9)31)71)9)35)~38)</sup>が運動に及ぼす具体的な証拠として挙げられている。臨床所見では、血清 CK 値の上昇<sup>9)~13)51)71)9)</sup>や電子顕微鏡レベルでの筋線維の破壊像<sup>9)17)34)</sup>が指摘されている。本研究では、上り坂群においては血清 CK 値の軽度上昇、ヒラメ筋の張力の一過性低下が認められたが、筋形質膜の部分破壊を示す FDX の筋細胞内染色は認められなかった。下り坂群においては血清 CK 値の上昇、ヒラメ筋では張力の一過性低下、FDX の筋細胞内染色が認められた。したがって、本研究では求心性運動、遠心性運動の双方が、CK 値の上昇から筋細胞内蛋白の細胞外逸脱、ヒラメ筋の張力低下から筋線維の微細損傷が確認され、遠心性運動ではさらに筋形質膜の破壊も生じていることが示された。つまり筋損傷の程度に差はあるものの、求心性運動でも比較的強い運動強度においては、Clarkson ら<sup>25)</sup>や Peeze-Binkhorst ら<sup>29)</sup>が述べるように筋損傷は起こしうると考えられた。

傾斜付きトレッドミル走は、後肢を電気刺激して筋収縮を施行する方法と比較して運動量を正確に規定することはできないが、運動の効果を評価するにはより生理的な負荷を加えることが可能であると思われる。すなわちトレッドミル走は自動走行による運動であるため、正常な運動単位での運動がおり、電気刺激の様に筋線維の過大な収縮による物理的な筋断裂を生じる危険性はない。これは特に長時間強い強度での運動を行う際に重要であると思われる。Armstrong ら<sup>17)</sup>や Duan ら<sup>39)</sup>は動物の上り坂走は重心を常に上方へ移動させる運動パターンであるため、後肢の伸筋において収縮に従って筋長が短縮する求心性運動になり、逆に下り坂走は重心を常に下方へ移動させる運動

パターンであるため、収縮に従って筋長が伸張する遠心性運動となると述べている。その後の Mcneil ら<sup>22)</sup>や Carter ら<sup>23)</sup>の報告からも下り坂走は遠心性運動のパターンを示すとされている。本研究でも上り坂群においては大規模な筋損傷はみられなかったのに対し、下り坂群においては、特に負荷の影響を受けやすい近位筋である大腿四頭筋で運動終了 3 日後に大規模な筋損傷を認めており、傾斜付きトレッドミル走による下り坂群は遠心性運動の要素が大きいことが示された。

血清 CK 値の変動は筋病変の活動度を反映するため、筋原性疾患の進行度の評価や治療効果の判定に用いられている<sup>30)</sup>。本研究では、上り坂群においては運動終了直後のみに軽度の CK 値の上昇を認め、下り坂群においては運動終了直後に高度の CK 値の上昇を認め、運動終了 3 日後に軽度の CK 値の上昇を認めた。したがって、筋細胞内酵素逸脱の側面からは、求心性運動の方が遠心性運動よりも運動終了直後の筋損傷は軽度であり、経時的変化としては、求心性運動では筋損傷が短期間で修復されるのに対し、遠心性運動では筋損傷が十分に修復されないままに一部が壊死に陥るのではないかと推察される。McNeil らは<sup>22)40)</sup>、細胞膜には自己修復機能があり軽微な細胞膜損傷は細胞内に変化を及ぼさずに短期間のうちに修復されることを証明した。この見地から考えると、求心性運動は軽微な筋形質膜損傷であるため自己修復が可能で短期間のうちに修復されるが、遠心性運動は大規模な筋形質膜損傷を引き起こすため、自己修復が不可能な筋細胞が生じて、壊死へと至るのではないかと考えられる。

ヒラメ筋の収縮特性に関しては、強縮力、単収縮力および単収縮時間で、上り坂群において運動終了直後には張力の低下、単収縮時間の短縮を認めたが、3日後、7日後には有意には張力の低下、単収縮時間の短縮を認めなかった。下り坂群においては運動終了直後には張力の低下を認めたが、3日後、7日後には張力の低下および単収縮時間の短縮を認めなかった。筋張力の低下と単収縮時間の短縮については、求心性運動では Peeze-Binkhorst らが<sup>3)26)</sup>、遠心性運動においては多数の報告があり<sup>13)14)51)71)23)24)27)39)</sup>、この理由として細胞内 Ca イオンの増加による影響<sup>13)14)39)41)</sup>、Z 線の破壊や筋フィラメントの変性などの筋線維の破壊による影響<sup>9)17)34)</sup>が挙げられている。また上り坂群と下り坂群の運動終了直後と 7 日後の強縮力の回復度を比較すると、上り坂群の方が下り坂群よりも有意に増加しており、下り坂群の方が長期間張力の低下が持続していたと考えられる。疲労曲線においては、上り坂群、下り坂群とも運動終了直後に著しい低下を認めた。しかし 3 日後、7 日後にはコントロールとは有意差を認めず、筋疲労に関しても上り坂群、下り坂群とも長期間持続することはなかった。Faulkner ら<sup>42)</sup>は筋損傷を生じる程度の運動をさせても、筋疲労実験に関しては運動終了後わずか 3 時間で完全に回復したと述べており、この理由として疲労実験は嫌気性解糖系の影響が大きく、好気性解糖系の関与が少ないためではないかと述べている。今回の実験の結果からヒラメ筋の疲労実験に関しては、上り坂群、下り坂群とも早期に回復が得られることがわかった。

FDX による筋細胞内染色は、上り坂群において全く認められなかったが、下り坂群においては、運動終了直後に大腿四頭筋、ヒラメ筋とも淡い筋細胞内染色が認められ、筋形質膜が早期から損傷を受けていることが示された。運動終了直後には筋損傷の結果としての全体的な影響としての CK 値の上

昇<sup>11)</sup>、<sup>13)</sup>、<sup>14)</sup>、電子顕微鏡レベルでの一つの筋細胞における筋線維構造の変化<sup>9)</sup>が報告されているが、これらと比較したFDXによる筋細胞内染色の利点は、HE染色との連続切片を用いて比較することにより、組織学上どの細胞が筋形質膜損傷を受けているかが把握できること、全組織中どれだけの細胞が筋形質膜損傷を受けているかを把握できることである。運動終了3日後には、下り坂群で大腿四頭筋、ヒラメ筋ともオパーク細胞と壊死細胞で細胞内染色を認め、FDXの染色性は細胞内全体で非常に明瞭で、大量にFDXが細胞内に流入していることが示された。この状態では運動終了直後のような筋形質膜が修復可能な状態ではなく、初期の損傷から細胞死へと至った状態であると思われる。これはマクロファージやライソゾームによる壊死細胞の能動的破壊により、筋形質膜が大規模に破壊している状態ではないかと考えられた<sup>14)</sup>。運動終了7日後では面積が小さく、中心核を持った再生細胞が認められ<sup>14)</sup>、FDXの筋細胞内染色は認められなかった。したがって、再生筋細胞では筋形質膜の透過性は正常細胞と同様であることが示された。

以上の結果から比較的強い運動強度における同一負荷での求心性運動と遠心性運動を比較すると、求心性運動においては、運動終了直後には筋損傷を生じるが長期間持続することはなく、一方遠心性運動においては、運動終了直後から3日間にわたって筋損傷への影響が強いことがわかった。したがって、継続性が必要となる筋力増強訓練としてはこの運動強度では長期間筋損傷が持続することがない求心性運動の方がより安全な方法ではないかと考えられる。しかし、今後中等度や軽度の運動強度での求心性運動と遠心性運動についても比較検討する必要があると考えている。

## 結 論

トレッドミル上の上り坂と下り坂を走らせることで求心性運動と遠心性運動を行い、生化学的側面、収縮力学的側面、筋形質膜透過性の変化を評価し、以下のような結論を得た。

1. 上り坂群では運動終了直後のみに軽度のCK値の上昇を認め、下り坂群では運動終了直後に高度のCK値の上昇を認めて運動終了3日後まで高値が持続した。すなわち、求心性運動の方が運動終了直後の筋損傷は軽度で、経時的変化としては求心性運動では筋損傷が短期間で修復されるのに対し、遠心性運動では筋損傷が十分に修復されないままにこの一部が筋壊死に陥り、その後筋の再生が生じることが示された。

2. ヒラメ筋の収縮特性に関しては、張力については単収縮力、強縮力、単収縮時間とも上り坂群、下り坂群で運動終了直後に低下し、筋線維の微細損傷による影響と考えた。運動終了3日後、7日後の収縮特性はコントロールと比較して有意差を認めなかったが、強縮力の回復は上り坂群で著明であった。

3. FDXによる筋細胞内染色では、下り坂群において運動終了直後に大腿四頭筋、ヒラメ筋とも淡い筋細胞内染色が認められ、筋形質膜は運動終了後早期から損傷を受けていることが示された。運動終了3日後には、下り坂群で大腿四頭筋、ヒラメ筋ともオパーク細胞と壊死細胞で明瞭な細胞内染色が認められ、筋形質膜が大規模な破壊を受けていることが示された。

以上より、比較的強い運動強度における求心性運動と遠心性運動においては、求心性運動では運動終了直後には筋損傷を生じる危険性があるが長期間持続することはなく、遠心性運動においては運動終了直後から長期間にわたって筋損傷の影響が持

続すると結論された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、ご指導とご校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚の謝意を捧げます。また本研究を直接ご指導、ご教示いただきました金沢大学医学部保健学科立野勝彦教授に心より謝意を表します。また筋張力測定法をご指導いただきましたカリフォルニア大学デービス校医学部リハビリテーション研究所 William M. Fowler 博士、および筋細胞内染色に際し、懇切なご助力とご助言をいただきましたカリフォルニア大学デービス校医学部リハビリテーション科 Gregory T. Carter 博士に深謝いたします。最後に本研究の遂行にご協力をいただきました金沢大学医学部保健学科の諸先生方に感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨は第8回日本整形外科学会基礎学術集会(松本, 1993)、第81回中部日本整形外科災害外科学会(松山, 1993)、2nd Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies (San Diego, USA, 1995)において発表した。

## 文 献

- 1) Stoboy H, Friedebold G, Strand FL. Evaluation of the effect of isometric training in functional and organic muscle atrophy. Arch Phys Med Rehabil 49: 508-514, 1968
- 2) Magness JL, Lillegard C, Sorensen S, Winkuski P. Isometric strengthening of hip muscles using a belt. Arch Phys Med Rehabil 52: 158-162, 1971
- 3) Ward J, Fisk GH. The difference in response of the quadriceps and the biceps brachii muscles to isometric and isotonic exercise. Arch Phys Med Rehabil 45: 614-620, 1964
- 4) DeLateur B, Lehmann J, Stonebridge J, Warren CG. Isotonic versus isometric exercise: a double-shift transfer-of-training study. Arch Phys Med Rehabil 53: 212-216, 1972
- 5) Hislop HJ, Perrine JJ. The isokinetic concept of exercise. J Am Phys Ther Ass 47: 114-117, 1967
- 6) Rosentswieg J, Hinson MM. Comparison of isometric, isotonic and isokinetic exercises by electromyography. Arch Phys Med Rehabil 53: 249-252, 1972
- 7) Komi PV, Kaneko M, Aura O. EMG activity of the leg extensor muscles with special reference to mechanical efficiency in concentric and eccentric exercise. Int J Sports Med 8: 22-29, 1987
- 8) Henriksson J, Knuttgen HG, Bonde-Petersen F. Perceived exertion during exercise with concentric and eccentric exercise. Ergonomics 15: 537-544, 1972
- 9) Friden J, Sjostrom M, Ekblom B. Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. Int J Sports Med 4: 170-176, 1983
- 10) Kuipers H, Drukker PM, Fredrik PM, Geurten P, Kranenburg GV. Muscle degeneration after exercise in rats. Int J Sports Med 4: 45-51, 1983
- 11) Newham DJ, McPhail G, Mills KR, Edwards RHT. Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscles. J Neurol Sci 61: 109-122, 1983
- 12) Lieber RL, Friden J. Selective damage of fast glycolytic muscle fibres with eccentric contraction of the rabbit tibialis anterior. Acta Physiol Scand 133: 587-588, 1988
- 13) Stauber WT. Eccentric action of muscles: physiology,

- injury and adaptation. *Exerc Sports Sci Rev* 17: 157-185, 1989
- 14) Armstrong RB. Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc* 22: 429-435, 1990
- 15) Garrett WE. Muscle strain injuries: clinical and basic aspects. *Med Sci Sports Exerc* 22: 436-443, 1990
- 16) Friden J, Lieber RL. Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 24: 521-530, 1992
- 17) Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 54: 80-93, 1983
- 18) Clarkson PM, Byrnes WC, McCormick KM, Turcotte LP, White JS. Muscle soreness and serum creatine kinase activity following isometric, eccentric and concentric exercise. *Int J Sports Med* 7: 152-155, 1986
- 19) Byrnes WC, Clarkson PM, White JS, Hsieh SS, Frykman PN, Maughan RJ. Delayed onset muscle soreness following repeated bouts of downhill running. *J Appl Physiol* 59: 710-715, 1985
- 20) Salminen A, Veikko V. Susceptibility of mouse skeletal muscles to exercise injuries. *Muscle Nerve* 6: 596-601, 1983
- 21) Faulkner JA, Jones DA, Round JM. Injury to skeletal muscles of mice by force lengthening during contractions. *J Exp Physiol* 74: 661-670, 1989
- 22) McNeil PL, Khakee R. Disruptions of muscle fiber plasma membranes: Role in exercise-induced damage. *Am J Pathol* 140: 1097-1109, 1992
- 23) Carter GT, Kikuchi N, Horasek SJ, Walsh SA. The use of fluorescent dextrans as a marker of sarcolemmal injury. *Histol Histopathol* 9: 443-447, 1994
- 24) Lieber RL, Woodburn TA, Friden J. Muscle damage induced by eccentric contractions of 25% strain. *J Appl Physiol* 70: 2498-2507, 1991
- 25) Clarkson PM, Nosaka K, Braun B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med Sci Sports Exerc* 24: 512-520, 1992
- 26) Peeze-Binkhorst FM, Slaaf DW, Kuipers H, Tangelder GJ, Reneman RS. Exercise-induced swelling of rat soleus muscle: its relationship with intramuscular pressure. *J Appl Physiol* 69: 67-73, 1990
- 27) McCully KK, Faulkner JA. Characteristics of lengthening contractions associated with injury to skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* 61: 293-299, 1986
- 28) Szasz G, Gruber W, Berndt E. Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. *Clin Chem* 22: 650-656, 1976
- 29) Fowler Jr. WM, Abresch RT, Larson DB, Entrikin RK. High-repetitive submaximal treadmill exercise training: effect on normal and dystrophic mice. *Arch Phys Med Rehabil* 71: 552-557, 1990
- 30) 菊地尚久, 立野勝彦, 岸谷 都, 影近謙治, 富田勝郎. 傾斜付トレッドミル走が筋組織に及ぼす収縮力学的影響について. *中部整災誌*, 37: 861-862, 1994
- 31) 菊地尚久, 立野勝彦, 染矢富士子, 岸谷 都, 影近謙治, 富田勝郎. マウスにおける downhill exercise 後の筋組織の変化—静脈内蛍光デキストラン注入による筋細胞内染色—. *日整会誌*, 67: S1293, 1993
- 32) Kuipers H, Drukker J, Frederik PM, Geurten P, Kranenburg G. Muscle degeneration after exercise in rats. *Int J Sports Med* 4: 45-51, 1983
- 33) Duncan CJ. Mechanism that produce rapid damage to myofilaments of amphibian skeletal muscle. *Muscle Nerve* 12: 210-218, 1989
- 34) Ogilvie RW, Hoppeler H, Armstrong RB. Decreased muscle function following eccentric exercise in the rat. *Med Sci Sports Exerc* 17: 195, 1985
- 35) William CB, Clarkson PM, White JS, Hsieh SS, Frykman PN, Maughan RJ. Delayed onset muscle soreness following repeated bouts of downhill running. *J Appl Physiol* 59: 710-715, 1985
- 36) Newham DJ, Jones DA, Clarkson PM. Repeated high-force eccentric exercise: effects on muscle pain and damage. *J Appl Physiol* 63: 1381-1386, 1987
- 37) Ebbeling CB, Clarkson PM. Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Int J Sports Med* 10: 207-234, 1989
- 38) Percy ME, Chang LS, Murphy EG, Oss I, Verellen-Dumoulin C, Thompson MW. Serum creatine kinase and pyruvate kinase in Duchenne muscular dystrophy carrier detection. *Muscle Nerve* 2: 329-339, 1982
- 39) Duan C, Delp MD, Hayes DA, Delp PD, Armstrong RB. Rat skeletal muscle mitochondrial ( $Ca^{2+}$ ) and injury from downhill walking. *J Appl Physiol* 68: 1241-1251, 1990
- 40) McNeil PL, Ito S. Gastrointestinal cell membrane wounding and resealing in vivo. *Gastroenterol* 96: 1238-1248, 1989
- 41) McCully KK, Faulkner JA. Injury to skeletal muscle fibers of mice following lengthening contractions. *J Appl Physiol* 59: 119-126, 1985
- 42) Faulkner JA, Opiteck JA, Brooks SV. Injury to skeletal muscle during altitude training: induction and prevention. *Int J Sports Med* 13: S160-162, 1992
- 43) Russell B, Dix DJ, Haller DL, Jacobs-El J. Repair of injured skeletal muscle: a molecular approach. *Med Sci Sports Exerc* 24: 189-196, 1992

**Influence of Concentric and Eccentric Exercise on Muscles: Contractile properties and Muscle Sarcolemmal Permeability** Naohisa Kikuchi, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 105, 518—529 (1996)

**Key words** concentric exercise, eccentric exercise, muscle injury, permeability, contractility

#### Abstract

Although both concentric and eccentric muscle strengthening exercise are used in rehabilitation medicine, neither their contractile properties nor muscle sarcolemmal permeability following these two types of exercise have been studied. The present study was undertaken to evaluate biochemical parameters, the contractile properties and muscle sarcolemmal permeability of the hindlimbs of mice following exhaustive concentric and eccentric exercise. One hundred and five adult mice were divided into 3 groups; control (N=10), uphill running (N=49) and downhill running (N=46) groups. The mice in the latter two exercise groups ran on a treadmill uphill and downhill at 20 m/min for 150 min. Serum CK, contractile properties, and intracellular fluorescent isothianate-labeled dextran (FDX) stains were evaluated on postexercise days 0, 3 and 7. The level of serum CK of the uphill running group was elevated 304% more than that of the control group on day 0, which was statistically significant. The serum CK level of the downhill running group was elevated 692% more than that of the control group on day 0 and remained elevated till day 3, which was also statistically significant. Tetanic tensions, twitch tensions and twitch contraction time were significantly reduced on day 0 in both of the uphill and downhill running group. Intracellular FDX stain was faintly observed in the normal muscle cells on HE stain on day 0 in the downhill running group. On the third postexercise day, in the downhill running group clear intracellular FDX stain was observed in both the opaque cells and necrotic cells on HE stain, which may have been due to major damage of the muscle sarcolemma. The uphill running group did not show FDX stain on any postexercise day. In conclusion, both exhaustive concentric and eccentric exercise can cause muscle injury immediately following exercise, but injury from the latter lasts longer.