

# マウスヒラメ筋の廃用性萎縮の病態ならびに運動負荷効果に関する研究

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 灰田, 信英<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/8234">http://hdl.handle.net/2297/8234</a>                      |

## マウスヒラメ筋の廃用性萎縮の病態ならびに 運動負荷効果に関する研究

金沢大学医学部病理学第一講座（主任：中西功夫教授）

灰 田 信 英

（平成2年11月10日受付）

後肢懸垂によって発生する廃用性筋萎縮の病態と、この萎縮の軽減を目的とする走行運動の有効性について、生理学的、組織化学的、および超微形態学的に検索した。75匹の成熟マウスを、対照群、後肢懸垂 (hindlimb suspension, HS) 群、および後肢懸垂中のトレッドミル走行運動 (hindlimb suspended plus exercise, HS-EX) 群の3群に分けた。2週間の実験終了後、ヒラメ筋を採取し単収縮、強縮張力を計測し、次いでアデノシン三リン酸酵素染色を施し、タイプIとII A線維の横断面積、これらの構成比率を求めた。さらにタイプIとII A線維の小器官の変化を超微計量形態学的に比較し、また運動終板の構造変化を観察した。その結果、活動電位量は対照群に比べHS群で約2/3に、HS-EX群で1.4倍に変化した。このような筋活動量のもとで筋重量、単収縮と強縮張力はHS群では著減したが、HS-EX群で有意な低下は認められなかった。HS群によりタイプI、II A線維は同程度に萎縮したが、HS-EX群では両線維の断面積に変化はなかった。電顕による観察では、筋原線維の変性像が、HS群ではび漫性に、HS-EX群では限局性に出現していた。運動終板には変性あるいは再生性構造変化が観察された。これらの構造変化はHS-EX群よりHS群で、またタイプI線維よりII A線維に好発し、タイプI線維の運動終板の構造的安定性がうかがわれた。超微計量形態学的検索により、ミトコンドリアの体積分率は、HS群ではいずれの線維でも減少していた。HS-EX群のタイプII A線維でも同様に減少していた。以上のように、廃用性萎縮筋の病態像と運動遂行による筋の変化像ととらえることができ、運動負荷は筋萎縮を防止、軽減させることを確認した。

---

**Key words** muscle atrophy, treadmill running, muscle fiber type, motor endplate, morphometry

---

廃用性筋萎縮を検索するため、従来より関節固定、脊髄横切、運動神経の機能的ブロックなどが動物実験で用いられている<sup>1)</sup>。これらの方法に加え、近年Morey<sup>2)</sup>によって後肢懸垂 (hindlimb suspension, HS) 法が開発された。このモデルは動物の後肢を懸垂することで、筋萎縮を減弱 (hypokinesia) させながら、後肢を無荷重負荷 (hypodynamia) にしようとするものであり、筋の運動学的活用<sup>3)</sup>や代謝物質の動態<sup>4)</sup>から長期臥床あるいは安静状態に近似したモデルであると考えられている。

HSによる筋萎縮の病態に対して、近時、生理学的<sup>5)</sup>、生化学的<sup>6)</sup>、組織学的<sup>7)</sup>に検討が加えられ、発生する萎縮の程度は、遅筋のほうが速筋より著明であるといわれている。またヒラメ筋を構成しているタイプI線維とタイプII線維を比較すると、前者のほうが後者よりも変化は大きいとされている<sup>8)11)</sup>。これらの報告では3から8週齢の幼若動物が用いられており、上述の変化はHSの影響による特異的な現象であるのか、あるいはHSによる成長の一時的停滞 (hypoplasia) の反映であるのか不明である。事実、齧歯動物

---

Abbreviations: ATPase, adenosin triphosphatase; CT, contraction time; HRT, half relaxation time; HS, hindlimb suspension; HS-EX, hindlimb suspended plus exercise; P<sub>0</sub>, maximum tetanic tension; P<sub>t</sub>, maximum twitch tension

でのこの期間は、筋線維が成熟型へと分化発達していく過程であり<sup>12)</sup>、その結果としてこれらの変化が発現したとも想定される。

近年、脱神経筋のみならず不動性萎縮筋でも、アセチルコリン受容体の分布の増加<sup>13)</sup>、アセチルコリンエステラーゼ活性の低下<sup>14)</sup>にともない、運動終板も形態学的な変化を示すといわれている<sup>15)16)</sup>。しかしこの形態学的変化は、運動終板の縮小<sup>15)</sup>という意見と膨化<sup>16)</sup>するという意見に二分され、確定していない現状である。このような形態学的変化はHSによる筋萎縮でも同様に認められるのか、そしてタイプIとタイプII線維では、いずれの運動終板により著しく形態学的変化が出現するのか興味あるところである。

廃用性萎縮筋に対して何らかの運動負荷を加えて、萎縮の進行を予防できれば、長期臥床や安静に必発する機能低下を軽減できる可能性がある。電気刺激や等尺性筋収縮を用いた訓練では、動物実験<sup>17)18)</sup>でも、ヒトを用いた研究<sup>19)~21)</sup>でも、筋容量<sup>17)18)</sup>、筋張力<sup>17)21)</sup>、筋線維径<sup>19)</sup>、エネルギー代謝能<sup>20)</sup>のいずれも減少したままであり、筋萎縮の防止は不可能であった。一方、等張性筋収縮を行うと、これらは改善され、萎縮は予防できる可能性が高いといわれている<sup>22)</sup>。このように等張性筋収縮では筋は正常機能により近似した様式で使われるため、筋萎縮を減じえるものと思われる。そこで本研究では筋線維の分化が完了した成熟マウスを用い、HSにより筋萎縮を惹起するとともに萎縮の予防と軽減を目的に等張性筋収縮を加え続けると、どの程度筋萎縮を防止できるのかを生理学的に検索した。さらに筋線維をタイプIとタイプII線維に分別し、HSによる筋萎縮はいずれのタイプの線維に著しいのか、そしてこの期間の運動が各タイプの線維にどのような形態変化をもたらすのか、組織化学的、電子顕微鏡による計量形態学的に検索した。また合わせて運動終板の形態の変化について定性的、定量的に検討した。なお被検筋は形態学的に筋線維タイプの構成が明確であり、かつ個体差の少ないとされているヒラメ筋を用いた。

#### 材料および方法

##### I. 材 料

実験動物には 129B6F/J 系の同腹子の12週齢マウス (25.6~29.3g) を75匹用いた。これをそれぞれ25匹づつ3群に分け、一つは対照群に他の2群は実験群とし、後者に対してHSを実施した。

##### II. 後肢懸垂法

実験群には、Musacchiaらの方法<sup>23)</sup>を改変して後肢懸垂を2週間実施した(図1)。全身麻酔下に、自製の

ジャケットを胴体に巻き、これに懸垂帯を取り付けた。飼育箱内に針金を渡し、懸垂帯と針金の接続には自在継手を用いた。マウスは後肢が床と接触しないように、後肢を懸垂し、後肢筋群の活動を減弱させた。その結果、実験群は前肢の使用によって水と餌のある位置には自由に移動可能である。

##### III. 走行運動

実験群の1群に対して小動物用トレッドミル(Quinton, サンディゴ市, 米国)を用い、走行運動(hindlimb suspended plus exercise, HS-EX)を毎日午前中に行った。走行速度および走行時間は、持久性運動訓練(submaximal endurance exercise training)<sup>24)</sup>に充当する強度に設定し、第1日目は6m/分、10分より開始し、隔日毎に速度を1m、時間を3分ずつ漸増させ、最終日には毎分12m、30分の走行をさせた。

##### IV. 筋活動電位の記録

各群から5匹づつ計15匹のマウスを選び、自発運動時に比較し、HSおよびHS-EX時のヒラメ筋の筋電の変化を検索した。HS開始2日前に導出用の植え込み電極を埋入するため、実験動物を2-メチル-2-ブタノール(1.3%)と2,2,2-トリプロモエタノール(35mM)の混合水溶液の腹腔内投与(1ml/100g)により全身麻酔を行った。その後、頭部の皮膚を正中切開し、頭蓋骨を露出し、スリッピングコネクタを固定した。続いて右後肢の皮膚および筋膜に切開を加え、ヒラメ筋を露出した。100 $\mu$ mのテフロン絶縁ステンレス線の先端を約0.5mm露出し、23G皮下注射

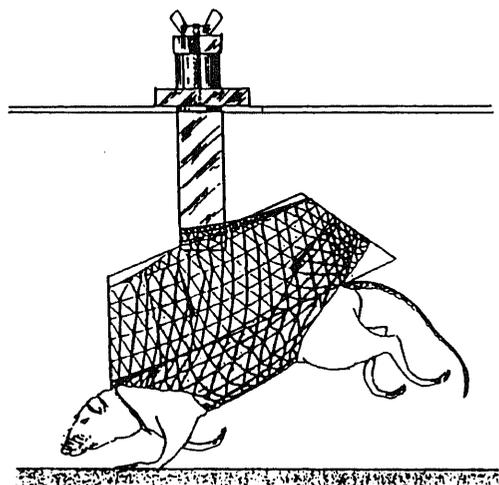


Fig. 1. A model for hindlimb suspension. Mouse is able to use its forelimbs to obtain food and water.

針に通し、ステンレス線の先端を針先から出して曲げ、そのまま筋肉に埋入して注射針を抜いた。この埋入電極を約 3mm の間隔で 2 本筋腹に刺入して双極導出とした。また不関電極は大腿皮下に留置し、これらリード線は他端は頭蓋のコネクターに接続し、その後、切開創を縫合した。埋入電極の位置が適切か否かを確認するため、コネクターにリード線を接続し、電気刺激装置 Pulser 6 (Frederick Haer, ブランズウィック市, 米国) を用い被験筋の収縮を確認した。術後 3 日間感染を予防するため、テトラサイクリン (5mg/100g) を飲水に加えた。

筋電は積分演算装置 Model 9864A (Hewlett-Packard, パロアルト市, 米国) で積分し、対照群および実験群の筋活動の量的変化を比較した。後肢懸垂前日の自発活動時の積分値に対する後肢懸垂、および走行運動中のこれの比によって相対活動量を算出した。

#### V. 餌と水分摂取量, および筋重量の測定

2 週間の実験期間中, 毎日餌と飲水量を測定記録し

た。実験終了後, マウスを断頭屠殺し右ヒラメ筋を摘出し, 直示天秤で重量を測定した。

#### VI. ヒラメ筋の収縮特性

右ヒラメ筋を 35°C に加温した生理的塩類溶液と d-ツボクラリン (44  $\mu$ M) の混入した恒温液槽の中に浸漬させた。筋の中枢端を固定し, 末梢端には微小荷重変換器 120T-50D (共和電業, 東京) を接続し, 筋の長軸に沿って 2 枚の刺激用の白金板電極を, サンドイッチ状に置き, 等尺性の単収縮と強縮張力を記録した。記録中, 溶液は混合ガス (95% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub>) 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 200Hz, 320msec の群発波を用いた。刺激, 動歪増幅, および張力記録は筋電計 MS-6 (Medelec, サリー市, 英国) を使用した。そして単収縮時の最大張力 (maximum twitch tension, Pt), 強縮時の最大張力 (maximum tetanic tension, Po),

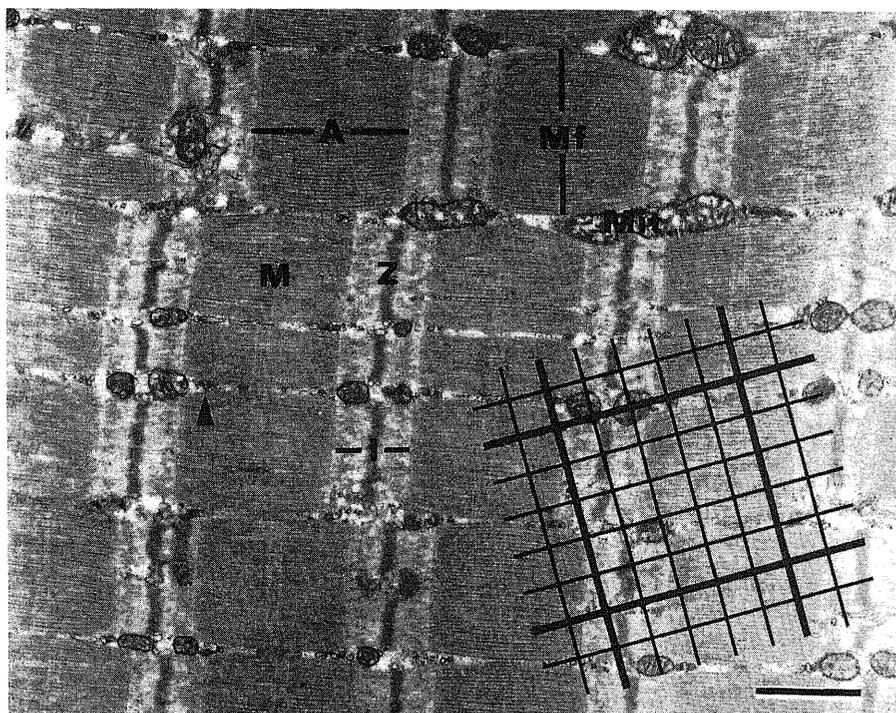


Fig. 2. A longitudinal section through part of a type I fiber from a control mouse. The myofibrils (Mf), mitochondria (Mit), dense Z line (Z), moderate M line (M), dark A band (A) and light I band (I) give the fiber a regularly striated appearance. Arrow points to the triads. The coarse grid spacing is 2  $\mu$ m apart. The fine grid with spacing of 0.4  $\mu$ m is drawn in a coarse square. Scale bar: 1  $\mu$ m.

刺激後 Pt が出現するまでの時間 (contraction time, CT) および筋弛緩中の張力が半減するまでの時間 (half relaxation time, HRT) を計測した。

#### VII. 組織化学的検索

張力の測定後、直ちに筋組織は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・ミクロトームで  $10\mu\text{m}$  厚の連続切片を作成した。この切片に対してミオシン ATPase (adenosin triphosphatase) (pH 10.3, pH 4.6) を行った。アルカリ条件下ではこの酵素の活性はタイプ II 線維が陽性で、それに対し、酸性条件下ではタイプ I 線維が陽性であった。タイプ II 線維には 3 種の亜型がある<sup>28)</sup>といわれているが、マウスヒラメ筋にはタイプ II B, II C 線維は認められず、全てタイプ II A 線維であった。したがってヒラメ筋線維を、タイプ I とタイプ II A の 2 型に分類した。

各群のヒラメ筋の組織染色標本から各個体 100 本の、計 2000 本の線維を選び検鏡し、筋線維タイプの構成比率を算出した。また染色標本を写真撮影し、自動画像解析装置 COSMOZONE (日本光学, 東京) で筋線維横断面積を計測した。

#### VIII. 超微形態学的検索

左ヒラメ筋は、一片を約  $0.5\text{mm}$  の大きさに細切後、 $1\text{M}$  カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) 緩衝の  $2.5\%$  グルター

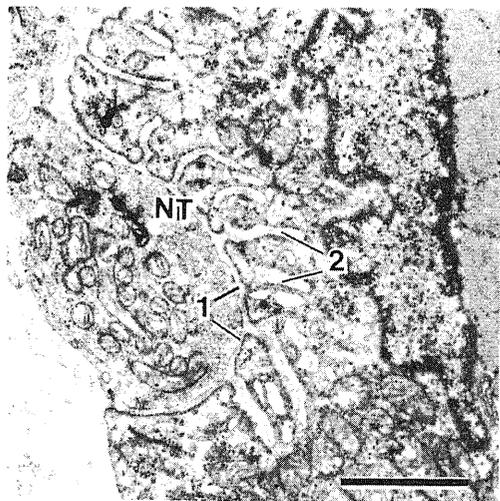


Fig. 3. Motor endplate of type I fiber from a control muscle. A nerve terminal (NT) can be observed to lie within a cup-shaped depression of the muscle fiber surface. The muscle's sarcolemma in this region extends inward and forms an elaborate system of parallel primary junctional folds (1) and secondary clefts (2). Scale bar:  $1\mu\text{m}$ .

ルアルデヒド  $4^\circ\text{C}$ , 1 時間前固定し、充分洗滌の後、同じ緩衝液で緩衝した  $1\%$  四酸化オスミウムで  $4^\circ\text{C}$ , 1 時間後固定した。試料はアルコール脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。包埋した 8 個の試料から無作為に 5 個の試料を選び、計量形態学的検索の材料とした。超薄切片を作製後、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で重染色し、検鏡した (JEM 100C, 日本電子, 東京)。

筋組織は、Z 帯の厚さ、ミトコンドリアの配列および多寡、横細管系の侵入度、そして筋小胞体の発達度等<sup>29)</sup>から、タイプ I 線維とタイプ II A 線維に分別した。各試料毎それぞれ異なったタイプの筋線維を 2 本選び、その中心部を各々  $10$  視野づつ写真撮影した。最終的に撮影した電子顕微鏡写真は各群 200 枚であり、これを  $25000$  倍に印画紙に焼き付けた。

計量形態学的検索は算点法 (point counting method)<sup>29)</sup>を用い、一辺  $2\mu\text{m}$  および  $0.4\mu\text{m}$  の大小の二重方形格子を描いた試験平面を写真の計測する領域上に重ねた (図 2)。体積分率の測定誤差を  $10\%$  以下 ( $p < 0.05$ )<sup>29)</sup> になるように、全領域上の交点をそれぞれ  $3200$  点および  $60000$  点選び観測数とした。

検索は筋節の体積、筋原線維、ミトコンドリア、および筋小胞体の体積分率を測定した。筋節の体積 ( $V_s$ ) は Z 帯間の距離 ( $L$ ) と A 帯の幅 ( $W$ ) を測定し、 $V_s = \pi (1/2 W)^2 L$  より算出した。筋原線維とミトコンドリアの体積分率は試験平面上の大きな格子を、筋小胞体のそれは小さな格子を使用した。体積分率 ( $V_v$ ) は、格子の交点上にこれらが存在する交点の数を  $P_a$ 、試験平面上の全交点の数を  $P_t$  とした時、 $V_v = P_a / P_t$  より算出した。

筋線維の計量形態学的検索と合わせ、運動終板の形態を定性的、定量的に検索した。定量的検索は、タイプ I 及びタイプ II A 筋線維を支配する運動終板を各群により  $40$  個選び、Engel らの方法<sup>29)</sup>により終末神経に面する一次シナプス間隙長とシナプス溝長を乗じた領域 (図 3) を後シナプス域 (postsynaptic area) と呼称し、これを画像解析装置を用いて計測した。

#### IX. 統計学的検定

得られた測定値は平均値士標準偏差で表した。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各群間の差を検定した。なお棄却水準は  $5\%$  とした。

### 成 績

#### I. ヒラメ筋活動量の変化

対照群の筋活動量は実験期間中  $84 \pm 16\%$  から  $122 \pm 22\%$  であり、実験前とほぼ同程度の活動を維持してい

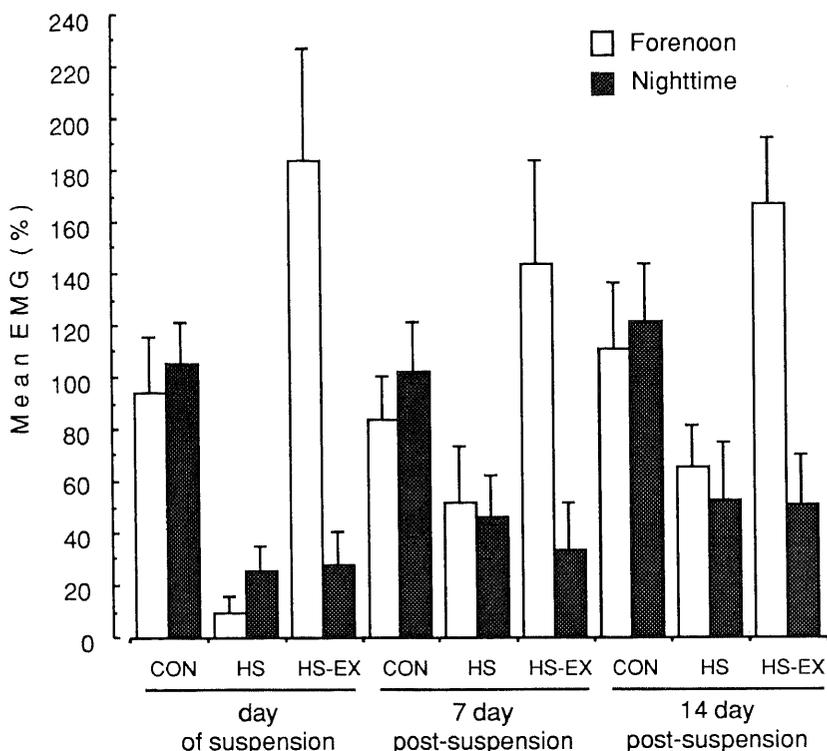


Fig. 4. Amplitude histogram of mean integrated EMG activities on specified days of the experiment in the forenoon (□) and in the nighttime (■). Abbreviations: CON, control animals; HS, animals with hindlimb suspension; HS-EX, animals with hindlimb suspended plus exercise.

た(図4)。それに対してHS群のそれは開始日には $10 \pm 6\%$ にまで著減した。7日後には開始前の $52 \pm 22\%$ に、14日後には $66 \pm 14\%$ にまで筋活動は回復した。HS-EX群の走行中の活動量は、開始日が最も大きく $184 \pm 40\%$ であり、7日後には $144 \pm 39\%$ とやや低下し、以後漸増し、14日後には $167 \pm 25\%$ になった。一方、夜間の活動量は、HS群のそれとほぼ同様の値であった。

## II. 餌と水分摂取量、および筋重量の変化

餌の摂取量は懸垂直後、実験群では対照群の約1/2に、そして飲水量も約1/3に一過性の減少を示した。2日目以降、実験群では餌と水分の摂取は増加し、実験開始4日目以降になると、3群間での摂取量には差はみられなくなった(図5)。筋の絶対重量および体重に対する相対重量は、HS群では $4.9 \pm 1.4\text{mg}$ ,  $0.21 \pm 0.06\text{mg/g}$ と著しく減少し、対照群に比べそれぞれ64%, 67%となった。それに対してHS-EX群では減少率(88%, 87%)は小さく、対照群のそれらとは有意な差はみられなかった(表1)。HS群とHS-EX群の

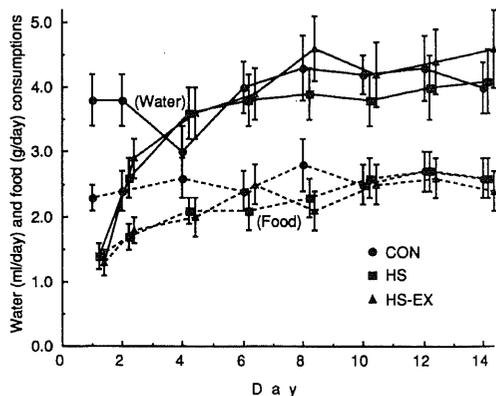


Fig. 5. Daily water (—) and food (.....) consumptions during experimental period. (●) Data from control animals (CON); (■) data from animals with hindlimb suspension (HS); (▲) data from animals with hindlimb suspended plus exercise (HS-EX).

絶対重量と相対重量の比較では、有意に HS 群に減少が認められた。

### III. 筋張力特性の変化

後肢懸垂により筋活動を減弱させると、HS 群および HS-EX 群の Pt は  $0.96 \pm 0.20\text{g}$ ,  $1.27 \pm 0.37\text{g}$  で、対照群の61%および80%となり、走行運動は後肢懸垂に比べ、張力の低下を半減させた (図 6, 表 1)。単位断面積当たりの Pt は、3 群間に差は認められなかった。HS-EX 群の Po は  $11.5 \pm 4.2\text{g}$ 、対照群は  $13.1 \pm 2.8\text{g}$  であり、両群の間には統計学的に差は認められなかったが、HS 群では  $6.6 \pm 1.4\text{g}$  となり、対照群の50%にまで低下した。単位断面積当たりの Po, CT および HRT は 3 群間に差はみられなかった。

### IV. 組織化学的検索

2 週間の HS により、この群のタイプ I 線維横断面積は  $589 \pm 290 \mu\text{m}^2$  で対照群の63%、タイプ II A 線維は  $505 \pm 248 \mu\text{m}^2$  で54%に縮小し、この率は両タイプ線維の間で差はみられなかった ( $p < 0.05$ ) (図 7, 表 2)。このような断面積の縮小とともに構成比率も変化した。対照群に比べ、HS 群はタイプ I 線維が10%増加; それにともないタイプ II A 線維は10%減少し、筋線維タイプの形質転換が認められた (表 2)。それに

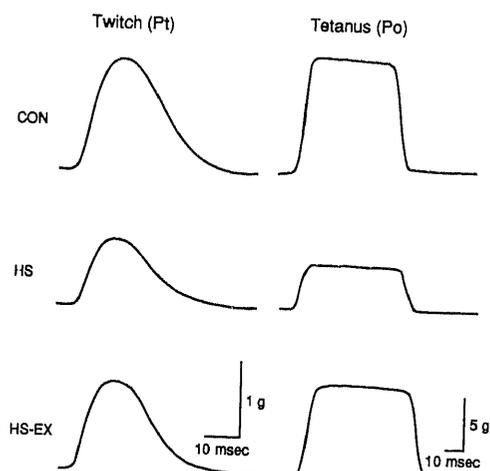


Fig. 6. Contractile responses in control animal (CON), animal with hindlimb suspension (HS), and animal with hindlimb suspended plus exercise (HS-EX). The supramaximal twitch (Pt) is shown in the left trace and the response to a 200-Hz tetanus (Po) in the right trace. Abbreviations: msec, milli second; g, gram.

Table 1. Anthropometric and contractile characteristics of the soleus muscles of control (CON), hindlimb suspended (HS), and hindlimb suspended plus exercise (HS-EX) mice.

|  | CON(n=20)       | HS(n=20)          | HS-EX(n=20)                  |
|--|-----------------|-------------------|------------------------------|
| Anthropometric measurements  |                 |                   |                              |
| Muscle wet weight(mg)  | $7.7 \pm 1.1$   | $4.9 \pm 1.4^*$   | $6.8 \pm 1.8^{**}$           |
| Muscle weight(mg)<br>/animal weight(g)                                       | $0.31 \pm 0.03$ | $0.21 \pm 0.06^*$ | $0.27 \pm 0.06^* \text{ **}$ |
| Muscle cross-sectional<br>area( $\text{mm}^2$ )                              | $0.67 \pm 0.11$ | $0.42 \pm 0.11^*$ | $0.53 \pm 0.20^*$            |
| Tension  |                 |                   |                              |
| Twitch tension(g)  | $1.58 \pm 0.40$ | $0.96 \pm 0.20^*$ | $1.27 \pm 0.37^* \text{ **}$ |
| Twitch tension/muscle<br>cross sectional area<br>( $\text{g}/\text{mm}^2$ )  | $2.35 \pm 0.63$ | $2.29 \pm 1.09$   | $2.38 \pm 0.65$              |
| Tetanic tension(g)   | $13.1 \pm 2.8$  | $6.6 \pm 1.4^*$   | $11.5 \pm 4.2^{**}$          |
| Tetanic tension/muscle<br>cross sectional area<br>( $\text{g}/\text{mm}^2$ ) | $19.6 \pm 4.2$  | $15.7 \pm 6.3$    | $21.7 \pm 4.5^{**}$          |
| Twitch tetanic ratio   | $0.12 \pm 0.03$ | $0.15 \pm 0.03^*$ | $0.11 \pm 0.02^{**}$         |
| Twitch time parameters   |                 |                   |                              |
| Contraction time(ms)   | $16.4 \pm 1.7$  | $14.9 \pm 1.4^*$  | $15.4 \pm 1.4$               |
| Half-relaxation time(ms)   | $15.6 \pm 2.8$  | $14.4 \pm 2.0$    | $14.8 \pm 1.7$               |

Values are mean  $\pm$  SD.

\*Significant differences between CON and suspended groups ( $P < 0.05$ ).

\*\*Significant differences between HS and HS-EX ( $P < 0.05$ ).

対して、HS-EX 群ではタイプ I 線維は  $790 \pm 206 \mu\text{m}^2$ 、タイプ II A 線維は  $768 \pm 227 \mu\text{m}^2$  となり、対照群のそれぞれ  $941 \pm 366 \mu\text{m}^2$ 、 $931 \pm 339 \mu\text{m}^2$  と比べ有意差はみられなかったが、HS 群との間には明らかな差が認められた。タイプ構成比率はタイプ I 線維が  $39 \pm 10\%$ 、タイプ II A 線維が  $61 \pm 10\%$  であり、HS 群でみられたような形質転換は出現しなかった。

#### V. 超微計量形態学的変化

HS 群の筋線維を電子顕微鏡で観察すると、び漫性に筋線維中の収縮性要素に傷害が出現している像がみられた。すなわち、タイプ I および II A 線維のいずれにも筋原線維の配列の異常や消失、そしてその輪郭の不鮮明さなどの筋原線維の変性が生起していた (図 8)。HS-EX 群にも同様な所見がみられたが、周囲の

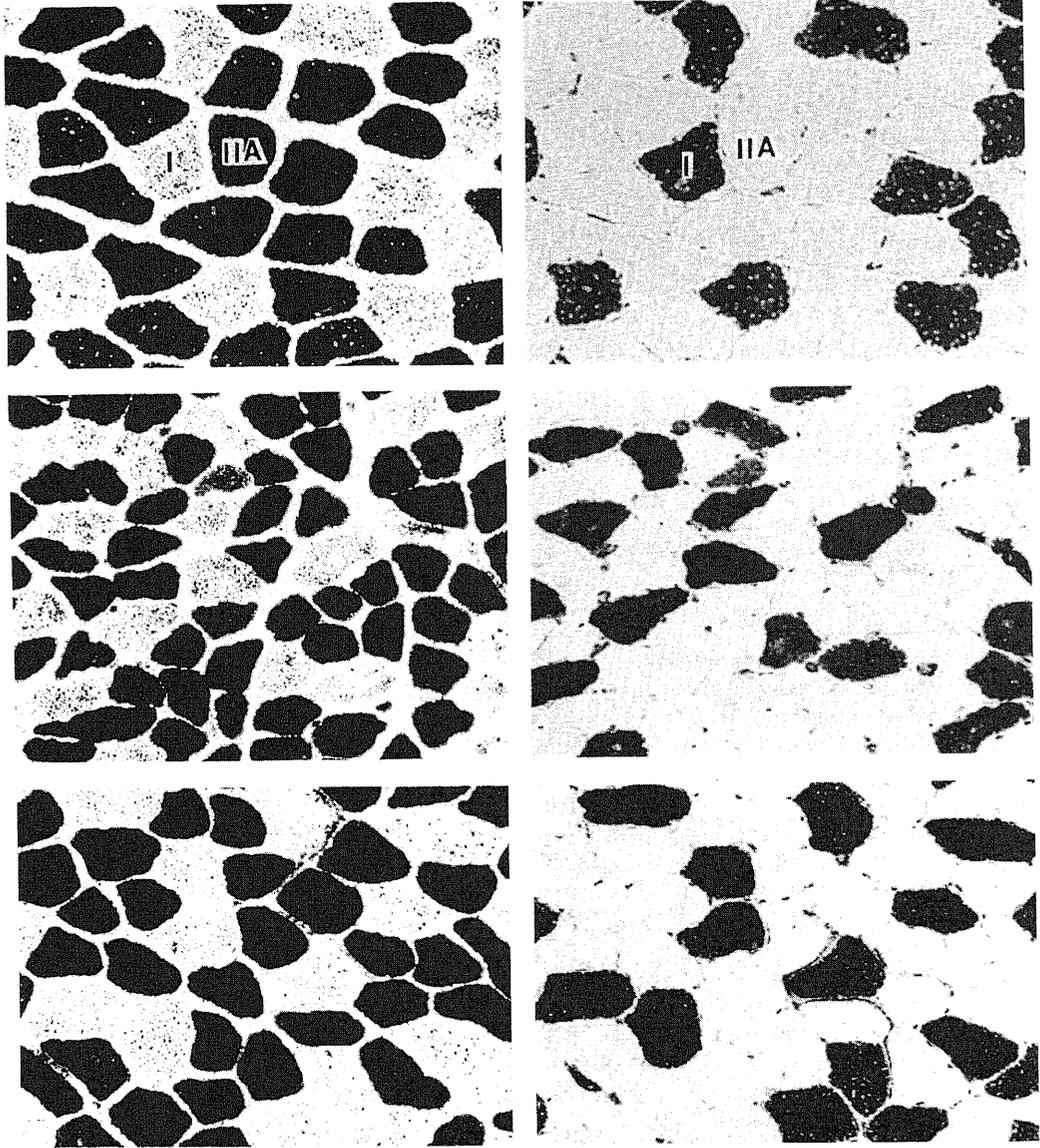


Fig. 7. Fiber typing of soleus muscles from control animal (top row), animal with hindlimb suspension (middle row), and animal with hindlimb suspended plus exercise (bottom row) is shown. Alkaline ATPase activity was used to discriminate type I (light stain) and type II A (dark stain) fibers. Preincubation with acid ATPase (right column) reversed the staining density in the soleus muscles.  $\times 150$ .

正常な筋組織の中に局在しているのみであった (図 9).

筋線維横断面積と同様に筋節の体積は、対照群のタイプ I 線維の  $2.01 \pm 0.44 \mu\text{m}^3$ 、タイプ II A 線維の  $2.52 \pm 0.43 \mu\text{m}^3$  に比べ、HS 群のタイプ I 線維では  $1.42 \pm 0.28 \mu\text{m}^3$ 、そしてタイプ II A 線維では  $1.82 \pm 0.39 \mu\text{m}^3$  となり、それぞれ対照群の 69% および 65% に減少した。しかし、HS-EX 群では、それぞれ  $1.97 \pm 0.31 \mu\text{m}^3$ 、 $2.21 \pm 0.36 \mu\text{m}^3$  であり、減少は認められな

かった (表 3)。収縮性要素である筋原線維の体積分率は、タイプ I 線維ではそれぞれ筋形質の  $76.25 \pm 8.32\%$  から  $78.62 \pm 9.69\%$  を占め、3 群間に差は認められなかったが、タイプ II A 線維では、対照群は  $85.64 \pm 9.55\%$ 、HS 群は  $75.64 \pm 8.72\%$ 、HS-EX 群は  $78.15 \pm 11.65\%$  であり、HS 群では他の 2 群と比較し、有意に減少していた。タイプ I 線維のミトコンドリアの体積分率は、HS 群では  $6.64 \pm 1.12\%$  となり、対照群の 56% にまで減少したが、HS-EX 群では有意

Table 2. Cross sectional area and percentage of soleus muscle fibers of control (CON), hindlimb suspended (HS), and hindlimb suspended plus exercise (HS-EX) mice

|                                | CON(n=20)     | HS(n=20)        | HS-EX(n=20)        |
|--------------------------------|---------------|-----------------|--------------------|
| Fiber size ( $\mu\text{m}^2$ ) |               |                 |                    |
| Type I                         | $941 \pm 366$ | $589 \pm 290^*$ | $790 \pm 206^{**}$ |
| Type II A                      | $931 \pm 339$ | $505 \pm 248^*$ | $768 \pm 227^{**}$ |
| Fiber percentage               |               |                 |                    |
| Type I                         | $35 \pm 7$    | $45 \pm 8^*$    | $39 \pm 10$        |
| Type II A                      | $65 \pm 7$    | $55 \pm 8^*$    | $61 \pm 10$        |

Values are mean  $\pm$  SD.

\*Significant differences between CON and suspended groups ( $P < 0.05$ ).

\*\*Significant differences between HS and HS-EX ( $P < 0.05$ ).

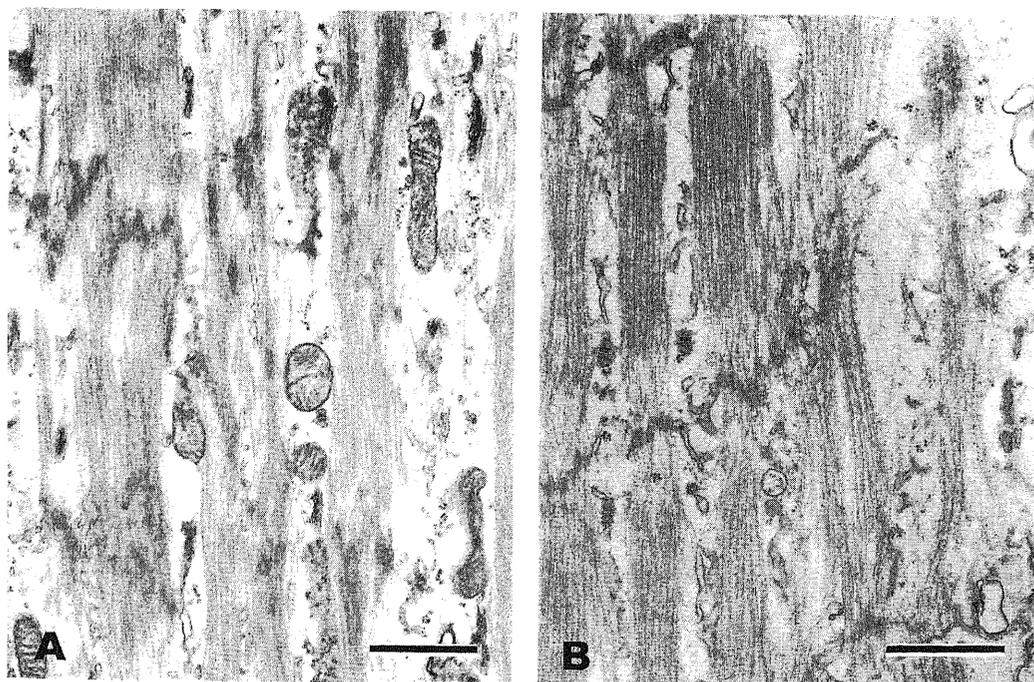


Fig. 8. Electron micrographs of longitudinally oriented type I (A) and type II A (B) in hindlimb suspended muscles. The degenerative change in both I and II A fibers is shown containing deformation of Z line and disintegration of myofibrils. Scale bar:  $1 \mu\text{m}$ .

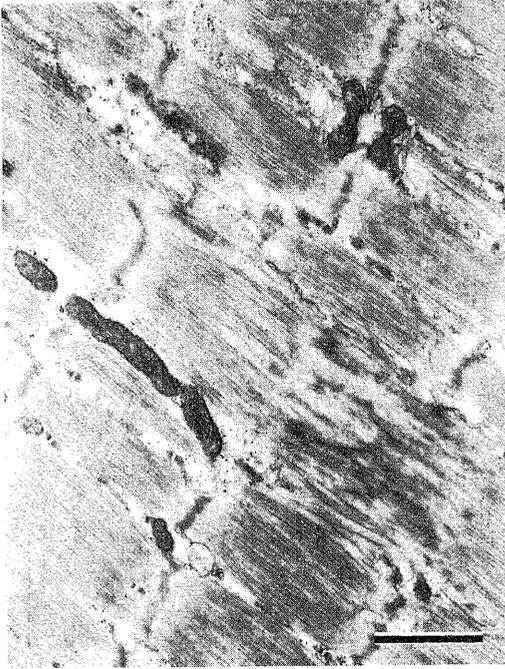


Fig. 9. Type IIA fiber after hindlimb suspended plus exercise. Atrophy of some myofibrils is observed. Degenerative change is more ameliorative than hindlimb suspended state. Scale bar:  $1\mu\text{m}$ .

な減少はみられなかった (表4). それに対して, タイプIIA線維のそれは対照群で $4.30\pm 0.67\%$ , HS群では $2.06\pm 0.74\%$ となり, 対照群の48%にまで減少した. HS-EX群でも $2.76\pm 0.25\%$ であり, 64%にまでしか回復しなかった. 筋小胞体の体積分率は, タイプIおよびタイプIIA線維のいずれにも3群間に差は認められなかった.

対照群の後シナプス域は, タイプI線維では平均 $3.12\pm 0.67\mu\text{m}^2$ , タイプIIA線維では平均 $3.45\pm 0.72\mu\text{m}^2$ であった (表5). これらの分布はタイプI線維では $3\mu\text{m}^2$ , タイプIIA線維では $3\sim 5\mu\text{m}^2$ 近傍の大きさのものが多数を占め, 最小約 $1\mu\text{m}^2$ から最大約 $13\mu\text{m}^2$ の1峰性の分布曲線を示した (図10). HS群ではタイプI, IIA線維は, それぞれ $4.80\pm 0.94\mu\text{m}^2$ ,  $4.99\pm 1.07\mu\text{m}^2$ に拡大し, 対照群に比べ前者は154%, 後者は145%になった. これら両タイプ線維の分布は $5\mu\text{m}^2$ と $9\mu\text{m}^2$ にピークが存在する2峰性の曲線を示した (図10). HS-EX群の後シナプス域は, タイプIIA線維では $4.76\pm 1.00\mu\text{m}^2$ となり, 対照群のそれに比べ138%に拡大したが, タイプI線維は $3.35\pm 0.78\mu\text{m}^2$ であり, HS群に比べ有意に小さいが, 対照群との間に明らかな変化はみられなかった.

これら定量的差異のみならず対照群の運動終板 (図3)に比較し, HS群およびHS-EX群には種々の微細構造の変化が観察された. すなわちHS群の運動終板

Table 3. Sarcomere volume ( $\mu\text{m}^3$ ) of soleus muscle of control (CON), hindlimb suspension (HS), and hindlimb suspended plus exercise (HS-EX) mice

|          | CON(n=20)      | HS(n=20)         | HS-EX(n=20)         |
|----------|----------------|------------------|---------------------|
| Type I   | $2.01\pm 0.44$ | $1.42\pm 0.28^*$ | $1.97\pm 0.31^{**}$ |
| Type IIA | $2.52\pm 0.43$ | $1.82\pm 0.39^*$ | $2.21\pm 0.36^{**}$ |

Values are mean $\pm$ SD.

\*Significant differences between CON and suspended groups ( $P<0.05$ ).

\*\*Significant differences between HS and HS-EX ( $P<0.05$ ).

Table 4. Comparison of relative volume (%) of the cytoplasmic organelles of type I and type IIA fibers from control (CON), hindlimb suspension (HS), and hindlimb suspended plus exercise (HS-EX) mice

|                               | Type I fiber    |                  |                      | Type IIA fiber  |                   |                       |
|-------------------------------|-----------------|------------------|----------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
|                               | CON(n=20)       | HS(n=20)         | HS-EX(n=20)          | CON(n=20)       | HS(n=20)          | HS-EX(n=20)           |
| Myofibril                     | $78.62\pm 9.69$ | $76.25\pm 8.32$  | $76.62\pm 6.93$      | $85.68\pm 9.55$ | $75.64\pm 8.72^*$ | $78.15\pm 11.65$      |
| Mitochondria                  | $11.80\pm 3.00$ | $6.64\pm 1.12^*$ | $10.11\pm 2.21^{**}$ | $4.30\pm 0.67$  | $2.06\pm 0.74^*$  | $2.76\pm 0.25^*^{**}$ |
| Smooth sarcoplasmic reticulum | $3.03\pm 1.05$  | $3.74\pm 1.27$   | $3.20\pm 1.10$       | $4.44\pm 0.56$  | $3.65\pm 0.78$    | $4.74\pm 1.07$        |

Values are mean $\pm$ SD.

\*Significant differences between CON and suspended groups ( $P<0.05$ ).

\*\*Significant differences between HS and HS-EX ( $P<0.05$ ).

Table 5. Mean and standard deviations ( $\mu m^2$ ) postsynaptic areas of folds and clefts per nerve terminal in type I and type II A fibers of mouse soleus muscle

|           | CON(n=20) | HS(n=20)   | HS-EX(n=20) |
|-----------|-----------|------------|-------------|
| Type I    | 3.12±0.67 | 4.80±0.94* | 3.35±0.78** |
| Type II A | 3.45±0.72 | 4.99±1.07* | 4.76±1.00*  |

A minimum of 4 neuromuscular junctions/muscle fiber type/muscle were analyzed for each experimental situation. Abbreviations: CON, control; HS, hindlimb suspension; HS-EX, hindlimb suspended plus exercise.

\*Significant differences between CON and suspended groups ( $P < 0.05$ ).

\*\*Significant differences between HS and HS-EX ( $P < 0.05$ ).

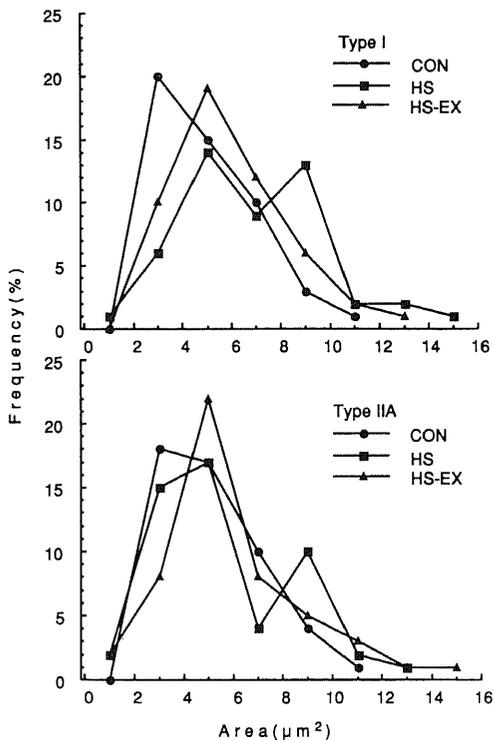


Fig. 10. Distribution of postsynaptic areas of folds and clefts per nerve terminal for type I fibers (top) and type II A fibers (bottom). (●) Data from control animals (CON); (■) data from animals with hindlimb suspension (HS); (▲) data from animals with hindlimb suspended plus exercise (HS-EX).

では、シナプス皺壁は変性、そして減少し、シナプス間隙は拡大していた。これにともない後シナプス領域は平坦化していた。後シナプス領域下の筋形質内には、ポリゾーム、リソゾーム、横細管、そして筋原線

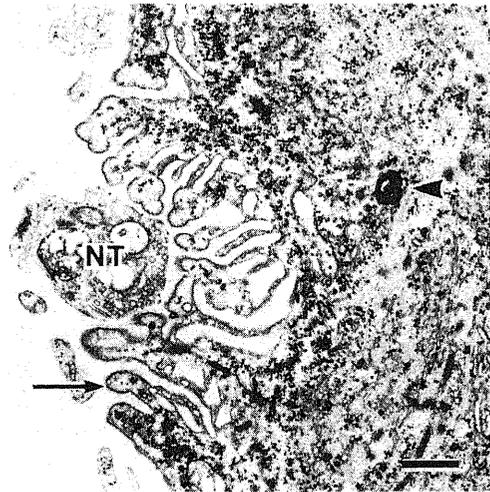


Fig. 11. Motor endplate of type II A muscle fiber from hindlimb suspended muscle fiber. The subjunctional region of this motor endplate contains a large sarcoplasmic mass of irregular, unassembled myofibrillar components and myelin-like figure (arrow head). Ribosomes and triads are oriented in various directions among the myofibrillar components. An area of postjunctional folds with no overlying nerve terminal is also seen (arrow). NT = nerve terminal. Scale Bars: 1  $\mu m$ .

維の変性産物が多数存在していた。これら変性産物内にはミエリン様の残遺物が混在していた。また変性した運動終板の近傍には、終末神経の消失も認められた。このように神経原性の変化を主体とした変性所見がみられた(図11)。このような構造異常を示す所見が、HS群のタイプI線維では全終板の47%に、タイプII A線維では63%に観察され、後者のほうが頻度が大きかった( $p < 0.05$ )。一方、HS-EX群の運動終板では、HS群でも認められたような変性した運動終板の

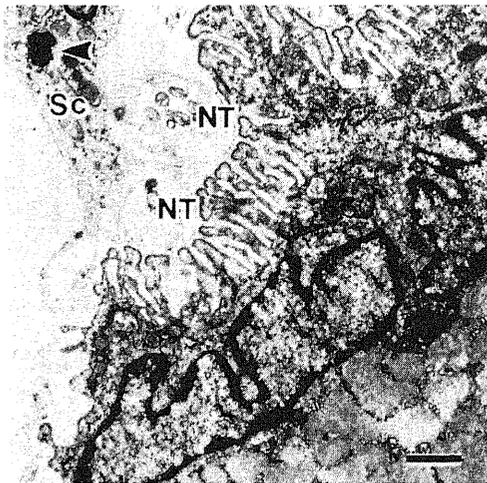


Fig. 12. Motor endplate of type IIA muscle fiber from hindlimb suspended plus exercised muscle. Nerve terminals (NT) isolated from each other by Schwann cell cytoplasm (Sc) are seen within a primary synaptic cleft. The Schwann cell contained myelin-like debris (arrow head). Scale Bars:  $1\mu\text{m}$ .

存在のみならず、再生性運動終板が並存する像が観察された。またシュワン細胞内にしばしばミエリン様の残遺物が混在したり、あるいは一つの1次シナプス間隙に複数に終末神経が存在し、それぞれがシュワン細胞で隔離され、発芽形成をうかがわせる所見を示した(図12)。HS-EX群のタイプI線維では、観察した全終板の29%に、タイプII A線維では25%に、このような構造異常が認められ、両者の間の出現率には差はなかった。すなわち、これらの構造変化はHS-EX群よりHS群で、またタイプI線維よりタイプII A線維に好発していた。

## 考 察

多くの哺乳動物の骨格筋の分化は胎生期に進行し、出生時にすでにタイプI, II線維に分化は完了している<sup>30)</sup>。しかし、マウスの場合、出生直後の筋肉は未分化の状態にあり、129系統では7から8週齢に性的成熟を達成し、この時期にヒラメ筋の分化は完了する<sup>31)</sup>。従来の廃用性筋萎縮の研究の多くは、発育途上の幼若な動物を用いており、筋に起こる各種の変化には実験にともなう成長の一時的な停滞の影響をも含んでいる可能性<sup>30)</sup>がある。本研究では12週齢の成熟マウスを用いており、真の廃用性筋萎縮の病態を検索するには適当なものと考えられる。

廃用性筋萎縮とそれに対する運動負荷の影響を知るためには、筋への負荷量のある程度定量的に検討しておくことが必要であろう。廃用性筋萎縮とは、血行や神経伝導が遮断されずに筋収縮が減少もしくは消失した状態をさす。であるならば、被検筋はできるだけ不動状態になっていることが望ましい。従来の研究では廃用によりどの程度筋活動が減じたのか、また運動にともないどれだけ増大したのかを明確にされていない点に問題を残している。事実、切腿法では速やかに腓断端が周囲と癒着し、筋電位は回復する<sup>32)</sup>。関節固定法では筋電位は対側の非固定肢より減弱するといわれている<sup>33)</sup>。しかし、この場合、動物は水や餌の摂取を目的に積極的に非固定肢を活用するために、非固定肢に対する固定肢の活動量は、相対的に著減したように見えるが事実はそうでない<sup>34)</sup>。このように、従来の研究では筋の廃用を評価するには不十分であり、また筋の活動量も不明確である。

本実験で用いたモデルは、HS直後、筋活動量は一過性に著減し、その後漸増、2週間後には対照群の約66%程度の活動量を示した。走行運動により活動量は、自発行動時に比べ44から84%増加した。四足動物に対してトレッドミルの速度を漸次増加させると、走行の様式は速足(trot)から駆け足(gallop)に変わるといわれ<sup>35)</sup>、そして速足までの速度変化の範囲では、筋収縮力と筋電位は高い相関を示し、速足では自発行動時に比べヒラメ筋の活動量は約1.4倍から1.8倍に増加するといわれている<sup>35,36)</sup>。本実験で用いた6から12m/分の速度の範囲では、マウスは速足様の走行形態を示し、本実験で計測された筋電量と上述の結果とはよく近似している。すなわち本研究でのヒラメ筋に対する負荷の量は、自発的行動時に比較し、HSにともない当該筋への負荷量は約2/3以下に、そしてHS-EXではおよそ1.4倍以上になるといえる。

筋萎縮の予防には、筋の収縮が最も効果的であるが、しかしこれに対する報告はあまり多くない<sup>29)</sup>。St-Pierreら<sup>37)</sup>は、ラットの坐骨神経にテトロドトキシンを4週間投与し、廃用性筋萎縮を生じさせ、運動負荷を与えないヒラメ筋は58%の重量の減少を認めるが、遊永運動と重量負荷訓練の2種の運動を行わせると、前者の実施下では16%にとどまり、後者では全く筋萎縮は起こらなかったと述べている。またHerbertら<sup>38)</sup>はラットを用い、HSで筋重量は30から40%に減少し、毎日走行運動と重量負荷訓練を行うとこれの減少は10%以内に軽減できるとしている。このように筋萎縮の予防には筋収縮が大切であり、特に後肢では荷重をかけることが重要であると強調している。本研

究で認められた HS 群の筋重量の減少、そして HS-EX 群でのこれの維持は、前述の報告とほぼ同値であった。筋重量は食餌摂取量の減少<sup>39)</sup>、発育の一過性の停滞<sup>9)</sup>、ストレス<sup>39)</sup>などでも減少する可能性があり、真の廃用による減少分を隠蔽する危険性が指摘されている。本研究では食餌量は実験開始直後、一過性の減少を認めたが、その後は3群間に差はなく、またマウスは12週齢の完全に成熟したものをを用いている。Feller ら<sup>40)</sup>は、HS により副腎皮質ホルモンの血中濃度は変わらないとしている。また Herbert ら<sup>39)</sup>は HS のみならず HS-EX 群でも副腎の重量は変化しなかったことより、これらの要因の関与は否定される。

ヒラメ筋は共同筋である腓腹筋や足底筋と異なり、持続的な活動電位を示し、1日の25から35%の時間活動し続け、起立姿勢維持の主動作筋であるとされている<sup>41)</sup>。事実、筋電図上でも起立時には約2mVの高振幅の持続的な放電がみられたが、HS直後に放電は著しく減少した。このようにヒラメ筋は後肢の荷重を除去すると、速やかに筋活動は著減し、筋萎縮が進行するといえる。筋の重量と総蛋白量は相関していることより<sup>42)</sup>、筋萎縮は蛋白量の減少と考えられる。ところで、正常状態では筋構造蛋白の合成、分解は動的平衡状態にある。Goldspink<sup>43)</sup>はラットの廃用性萎縮後の摘出筋を用いて蛋白代謝を検索し、蛋白量の減少はその分解速度の急激な促進と合成速度の低下であるとしている。この合成速度の減少はアミノ酸の取り込み速度の低下<sup>44)</sup>ではなく、主に単位 RNA 当たりの蛋白合成の減少、すなわち翻訳過程にある活性型リボゾーム量の低下が主因であると思われる。筋細胞の培養実験で、Brevet ら<sup>45)</sup>は電気刺激により、Vandenburgh ら<sup>46)</sup>は張力を作用させることにより、蛋白合成が増加することを見出した。また Goldspink<sup>43)</sup>は除神経筋でも張力を加えることにより蛋白合成の増加により筋肥大が生じることを示した。その際、アクチノマイシン D あるいは 5-フルオロデオキシウリジンで RNA や DNA の合成を阻害すると、RNA 合成は阻害を受け、蛋白合成の増加を著しく抑制されるとしている。つまり、筋自体の活動が筋の大きさの維持に直接的に関与しているものと推定される。すなわち HS-EX 群で認められる萎縮の軽減は、1日数十分の走行運動で、存在している RNA が効率の高い合成能を示すことで対応しているものと考えられる。そして組織化学的ならびに電頭的検索より、HS 群のみならず HS-EX 群でもタイプ I およびタイプ II A 線維はほぼ同率に萎縮することにより想定すると、代謝回転は筋線維のタイプの違いにかかわらず、ほぼ同じ速度で調節されている可能性が

示唆される。

ヒラメ筋は動物の種と成長過程によって、その筋線維径と筋線維タイプの構成比率は多少異なっており、成熟マウスの場合に両線維とも大きさに違いはなく約 900~1000 $\mu\text{m}^2$ 、タイプ I 線維とタイプ II A 線維の比は、おおむね 2 : 3 前後であり、タイプ II B と II C 線維は存在しないとされている<sup>54)</sup>。今回の実験結果も対照群ではこれと同様であった。Templeton ら<sup>10)</sup>は6週齢のラットを用い、Corley ら<sup>48)</sup>は18日齢のハムスターを用い、HS ではタイプ I 線維の選択的萎縮とこれの割合の減少を報告している。本研究ではこれらの結果とは異なり、HS によりタイプ I と II A 線維のいずれもほぼ同程度の萎縮率 (37%, 46%) であった。また構成比率は HS にともないタイプ I 線維は10%増加、それに平行してタイプ II A 線維は10%減少した。このような差異は実験に使用した動物種の差のみならず、上述の報告では成長途上にある動物を用いているのに対し、本研究では成熟したものを使用しており、この筋線維の分化発達度の違いが大きく起因しているものと想定される。

筋に対して低頻度の電気刺激を慢性的に加えると、収縮速度が速く瞬発的な運動に関与する速筋は、収縮は遅く持続的な筋緊張を担う遅筋へと、筋構造蛋白質の分子種を変化させるといわれている<sup>49)</sup>。このように分子種の変化は筋の活動パターンの変動に大きく依存し、本実験で認められた上述の所見は、HS 条件下でのヒラメ筋の活動は相動性から緊張性のパターンに移行したものと推測される。しかし CT や HRT には変化が認められないことより、10%程度の筋線維の形質転換は収縮速度に変化を及ぼさないものと思われる。Nicolopoulos-Stournaras ら<sup>50)</sup>はラットの走行時の筋電を検索し、立脚相直前から立脚相終了までの間ヒラメ筋は相動性放電のみならず緊張性の放電を示すとしている。HS-EX 群のヒラメ筋も同様の筋活動をおこなっていると考えられ、走行運動によりこのような活動パターンが発現されると、筋線維の形質は維持されるものと想定される。つまり、筋構造蛋白質の分子種は筋に生じる活動のパターンによって調節され、それぞれの筋線維の機能的要請に応じた構造に変化するものと推察される。

HS 群では筋節の体積の変化に比例し、筋原線維の絶対量も変わった。この絶対量の変化とともにこれの配列異常や消失、そして Z 帯の流出等の収縮性蛋白質の変性所見が観察された。この変性所見はタイプ I、II A いずれの線維にもほぼ同程度で、かつび慢性に存在し、HS-EX 群では限局性にしか認められなかった。

このように HS にもない、筋収縮蛋白は変性するのに対して、走行運動を実施するとこれの進行を軽減できる。この収縮蛋白の変性について、Oberc ら<sup>51)</sup>は Ca 染色法を用い、通常小胞体等に貯蔵されている Ca 濃度よりも高濃度の細胞外由来の Ca が病的骨格筋細胞内に存在することを示した。病変骨格筋内に流入したこれら過剰の Ca の細胞内の集積は、ミトコンドリアに対してはこれを取り込むために ATP の産生能を減弱させる。また Ca・ATPase とミオシン ATPase の活性化、小胞体への Ca の取り込みが促進され、これらに対して多量の ATP が消費される<sup>52)</sup>。この ATP の消費にともない、Grinwald ら<sup>53)</sup>は H<sup>+</sup>の増加を引き起こし、筋細胞内の酸化をもたらし、内因性のリソソーム性酵素が活性化される可能性を指摘している。この H<sup>+</sup>の増加あるいは Ca 自体による細胞内イオン環境の変化<sup>54)</sup>がミトコンドリアの容量を変化(表 4)させ、さらにリソソーム性酵素の活性化<sup>55)</sup>を引き起こし、筋細胞は機能的にも形態的にも障害されると考えられる。そして HS-EX 群で認められたごとく、筋肉の活動性の維持が筋肉の収縮蛋白の維持にとって必要であることが示唆される。

表 3, 4 の対照群に示されるタイプ I, II A 線維の細胞内構成要素の相対比は、Eisenberg ら<sup>36)56)</sup>によって報告された組織計量学的特徴とほぼ同様の傾向であった。ミトコンドリアの体積分率は、タイプ I 線維では HS 群で、タイプ II A 線維では HS 群と HS-EX 群のいずれでも減少していた。筋収縮エネルギー生成には、無酸素的条件下でグリコーゲンやブドウ糖を乳酸に分解する解糖系と、ミトコンドリアに存在する TCA 回路と電子伝達系による酸化系の二つの反応系がある<sup>57)</sup>。そしてタイプ II A 線維は解糖と酸化の両系で、タイプ I 線維は酸化系でエネルギーを獲得している<sup>58)</sup>。廃用性萎縮筋では、コハク酸脱水素酵素やナトクロームオキシダーゼなどの酸化系の酵素の活性は低く、ATP の合成能を低下させるといわれている<sup>59)</sup>。この酸化系酵素活性値はミトコンドリアの容量に依存する<sup>60)</sup>ことから、本研究で認められたミトコンドリアの縮小化は、この酸化能力の低下と前述のごとく収縮蛋白の変性にともなう細胞内イオン環境の変化が、関連し発現したものと想定される。そしてこの活性値の低下は、タイプ I よりタイプ II A 線維に著しい<sup>61)</sup>ことから、走行運動を加えても、タイプ II A 線維でのミトコンドリアの体積分率は維持できず、減少したままであると考えられる。

運動終板の後シナプス構造は、これの再生時には正常もしくはやや縮小し、何らかの原因で機能を喪失す

ると拡大することが知られている<sup>16)62)</sup>。本研究での後シナプス域の平均値は、HS 群ではタイプ I, II A 線維の両線維、それに HS-EX 群のタイプ II A 線維で大となった。これらのヒストグラムは 2 峰性を示し、変性および再生した運動終板の混在をうかがわせる。また運動終板の構造変化は、HS 群においてタイプ II A 線維で頻度が高いことより、タイプ I 線維の運動終板は、廃用に対してかなりの構造的安定性を持つことが示唆される。運動終板の構造分化とその形態の維持には、支配運動神経が深い関わりを持つことが神経栄養効果として知られている。神経の栄養性影響を引き起こす因子は栄養性因子<sup>63)</sup>といわれ、これの一つとしてアセチルコリンの関与<sup>14)64)</sup>がある。筋を廃用状態にすると、アセチルコリン増感現象が出現し、それにともないアセチルコリン受容体合成が促進され密度が大となる<sup>13)</sup>。そして遅筋と速筋とでは、アセチルコリン感受性とアセチルコリン受容体の密度は異なることが知られている<sup>65)</sup>。また萎縮筋に対して持続的に電気刺激を加えたり、あるいは運動をさせると、アセチルコリンの感受性は正常状態に回復するとされている<sup>66)</sup>。以上の事実は、持続的なアセチルコリンの放出と、その受容体への刺激が後シナプス構造の維持と形態分化に不可欠であることを示唆している。HS 群でのタイプ II A 線維で高頻度の構造変化は、廃用性萎縮では神経栄養効果がタイプ I と II A 線維とでは発現の程度の程度が異なっているのではないかと考える。この問題の解明には、運動終板の分化や代謝の調節と筋の活動の相互関係を、さらに検索する必要があるものと考えられる。

HS 群および HS-EX 群に共通して認められる運動終板の構造変化は、限局性または全般的なシナプス趨壁の変性とシナプス間隙の拡大、シナプス趨壁の減少にとまなう後シナプス領域の単純化と平坦化、後シナプス領域の筋形質(リボゾーム、グリコーゲン顆粒など)の増加などの変性、あるいは単一のシナプス間隙に複数の終末神経が存在する発芽形成を示す再生所見である。これらは元来ある終板部にみられることから、運動終板の改造の過程が推測される。このような改造にとまなう形態的变化が、どのような細胞学的機序に基づくのかは、現在のところ詳細は不明であるが、シナプス直下に非常によく発達した細線維性の網状構造が確認されている<sup>66)67)</sup>。この網状構造は、後シナプス膜と細胞骨格とを連結しており、本構造がアセチルコリン受容体の保持およびシナプス襲の形態維持に関与していることが示唆されている。今後、筋肉活動性の多寡、そしてタイプ別筋線維の差異による形質膜

の動態, シナプス下網状構造の変動を中心にさらに詳細な観察, 検討を行う必要があるものと考えられる。

実験群の後シナプス領域に神経原性と思われるミエリン様の残遺物が観察された。HS 群では筋線維に神経原性と考えられている群萎縮や標的細胞などの変化は認められず, むしろ壊死や貪食を中心とした筋原性の変化が観察された<sup>9)</sup>。このように, 筋線維の変性の原因が筋原性であるにもかかわらず, 筋肉の活動性の低下により運動終板は神経原性の変化を示し, この変化に関連する何らかの神経・筋間の相互作用の存在が示唆され, 今後更に検討を進めたい。

HS 継続中の運動負荷の有用性についてまとめると, 筋重量, 筋張力は HS 群に比べ有意に増加した。また両タイプの筋線維とも, 断面積, 筋線維微細形態, および運動終板の構造変化も少ない。このように, 寡動による筋萎縮の進行を運動の遂行により抑制, 軽減させることが可能であろうと想定される。既に生じた萎縮に対しての訓練効果について, 動物実験では4週間の廃用でその回復に90日を用いた<sup>60)</sup>という意見や不完全にしか回復しなかった<sup>61)</sup>という報告がある。またヒトでは膝の前十字靭帯損傷再建術後, 10年経過しても筋機能は完全に回復しなかったという文献<sup>70)</sup>もある。このように萎縮発生後に回復を計るよりは, 発生が予測される時にその防止, 軽減の対策を講じることが重要であり, より効果的であると期待される。筋萎縮発生中の運動について, Herbert ら<sup>39)</sup>は長時間の持久運動あるいは短時間の抵抗運動のいずれでも, 萎縮は防止できたとしている。この結果より, 筋萎縮の予防, 軽減に与える要素には, 運動強度と持続時間があり, それらの相乗で萎縮防止発現の閾値が決定されるものと思われる。すなわち, 大抵抗の運動を短時間で終了させるか, あるいはそれが事情により不可能な場合は, 持続時間を延ばすような緻密な対応が必要となる。

## 結 論

後肢懸垂により発生する筋萎縮の病態と筋萎縮発生軽減に対する運動負荷の有効性について, 生理学的, 組織化学的, 超微形態学的に検索し, 以下のような結論を得た。

1. ヒラメ筋の筋電量は, 自発行動時に比べ HS 群で2/3以下に, HS-EX 群では1.4倍以上になった。
2. 単収縮および強縮時の発生張力は, 対照群に比べ HS 群でそれぞれ61%, 51%であった。走行運動を加えることにより張力低下率はほぼ半減した。
3. HS にともない, タイプ I および II A 線維の横

断面積は著しく縮小するのみならずタイプ I 線維の構成比率が増加した。これに対して HS-EX 群では筋線維の萎縮は認められず, また構成比率は変わらなかった。

4. ヒラメ筋の電顕的検索では, タイプ I, II A 線維のいずれにも筋原線維の配列異常や消失, また Z 帯の流出などの変性所見が, HS 群ではび漫性に, HS-EX 群では限局性に観察された。筋節の体積はタイプ I, II A 線維いずれも HS により縮小したが, HS-EX 群では変化が見られなかった。それに対して, ミトコンドリアの体積分率は, HS 群でいずれの線維にも, HS-EX 群ではタイプ II A 線維にのみ減少がみられた。

5. HS により運動終板の後シナプス域は, タイプ I および II A 線維のいずれにおいても拡大した。HS-EX 群ではタイプ II A 線維でのみこの領域の拡大が認められた。この拡大に伴って各種の変性あるいは再生をうかがわせる構造変化が観察された。この構造変化は, HS ではタイプ II A 線維により著しく, HS-EX を行うと両タイプ線維にほぼ同頻度に観察された。

以上より, 廃用性筋萎縮は, 運動負荷を加えることにより, 軽減されるものと思われる。

## 謝 辞

稿を終るにあたり, 御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師中西功夫教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究を直接御指導, 御教示頂きました金沢大学医療技術短期大学部立野勝彦教授に心より謝意を表します。また, 筋活動電位導出法と筋張力測定法を御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科 William M. Fowler 教授, および運動終板の超微形態学的検索に際し, 試料の作製と電子顕微鏡観察について, 御懇切な御助力と御助言をいただきましたニューヨーク大学附属病院リハビリテーション医学研究施設 Bruce R. Pachter 博士ならびに Arthur Eberstein 博士に深く感謝いたします。さらに, 御指導, 御協力を頂いた第一病理学教室勝田省吾助教授, 河原栄講師ならびに教室員の方々に心より感謝いたします。

本研究の一部は昭和63年~平成2年度文部省科学研究費一般研究 (B) 63480338 号の援助を受けたことを感謝いたします。

## 文 献

- 1) Booth, F. R. & Gollnick, P. D.: Effect of disuse on the structure and function of skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 15, 415-420 (1983).
- 2) Morey, E. R.: Spaceflight and bone turnover: Correlation with a new rat model of weightl-

essness. *Bioscience*, **29**, 168-172 (1979).

3) **Musacchia, X. J. & Deavers, D. R.**: A new rat model for studies of hypokinesia and antiorthostasis. *Physiologist*, **23**, S91-S92 (1980).

4) **Saiki, H., Nakaya, M., Sugita, Y. & Kamachi, M.**: Metabolic and hormonal mechanisms of mineral metabolic adaptation to induced hypokinetic in rats. *Aviat. Space Environ. Med.*, **47**, 846-852 (1976).

5) **Haida, N., Fowler, W. M., Abresch, R. T., Larson, D. B., Sharman, R. B., Taylor, R. G. & Entrikin, R. K.**: Effect of hind-limb suspension on young and adult skeletal muscle. 1. Normal mice. *Exp. Neurol.*, **103**, 68-76 (1989).

6) **Fowler, W. M., Abresch, R. T., Haida, N., Larson, D. B., Sharman, R. B., Taylor, R. G. & Entrikin, R. K.**: Effect of hind-limb suspension on young and adult skeletal muscle. 2. Dystrophic mice. *Exp. Neurol.*, **103**, 77-82 (1989).

7) **Goldspink, D. F., Morton, A. J., Loughna, P. & Goldspink, G.**: The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscles of the rat. *Pflügers Arch.*, **407**, 333-340 (1986).

8) **Jaspers, S. R., Fagan, J. M., Satarug, S., Cook, P. H. & Tischler, M. E.**: Effects of immobilization on rat hindlimb muscles under non-weight-bearing conditions. *Muscle Nerve*, **11**, 458-466 (1988).

9) **Haida, N. & Tachino, K.**: Effect of hindlimb suspension on young and adult gastrocnemius muscle in mouse. *Jpn. J. Phys. Ther.*, **16**, 3-9 (1989).

10) **Templeton, G. H., Padalino, M., Manton, J., Glasberg, M., Silver, C. J., Silver, P., DeMartino, G., Leconey, T., Klug, G., Hagler, H. & Sutko, J. L.**: Influence of suspension hypokinesia on rat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.*, **56**, 278-286 (1984).

11) **Riley, D. A., Ellis, S., Slocum, G. R., Satyanarayana, T., Bain, J. W. & Sedlak, F. R.**: Hypogravity-induced atrophy of rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *Muscle Nerve*, **10**, 560-568 (1987).

12) **Wirrtz, P., Loermans, H. M. T., Peer, P. G. M. & Reintjes, A. G. M.**: Postnatal growth

and differentiation of muscle fibers in the mouse. 1. A histochemical and morphometrical investigation of normal muscle. *J. Anat.*, **137**, 109-126 (1983).

13) **Pestronk, A., Drachman, D. B. & Griffin, J. W.**: Effect of muscle disuse on acetylcholine receptors. *Nature*, 352-353 (1976).

14) **Gupta, R. C., Misulis, K. E. & Dettbarn, W. D.**: Changes in the cholinergic system of rat sciatic nerve and skeletal muscle following suspension-induced disuse. *Exp. Neurol.*, **89**, 622-633 (1985).

15) **Cole, W. V.**: The effect of immobilization on striated muscle and myoneural junction. *J. Comp. Neurol.*, **115**, 9-13 (1960).

16) **Malathi, S. & Batmanabane, M.**: Alterations in the morphology of the neuromuscular junctions following experimental immobilization in cats. *Experientia*, **39**, 547-549 (1983).

17) **Gardiner, P. F. & Lapointe, M. A.**: Daily in vivo neuromuscular stimulation effects on immobilized rat hindlimb muscles. *J. Appl. Physiol.*, **53**, 960-966 (1982).

18) **宮崎 寛**: 不動化による筋萎縮に対する筋の緊張および電気刺激の影響。—実験的研究—。日整会誌。 **60**, 1003-1016 (1986).

19) **Halkjaer-Kristensen, J. & Ingermann-Hansen, T.**: Wasting of the human quadriceps muscle after knee ligament injuries. II. Muscle fiber morphology. *Scand. J. Rehabil. Med. Suppl.*, **13**, 12-20 (1985).

20) **Halkjaer-Kristensen, J. & Ingermann-Hansen, T.**: Wasting of the human quadriceps muscle after knee ligament injuries. III. Oxidative and glycolytic enzyme activities. *Scand. J. Rehabil. Med. Suppl.*, **13**, 21-28 (1985).

21) **Halkjaer-Kristensen, J. & Ingermann-Hansen, T.**: Wasting of the human quadriceps muscle after knee ligament injuries. IV. Dynamic and static muscle function. *Scand. J. Rehabil. Med. Suppl.*, **13**, 29-37 (1985).

22) **St-Pierre, D. & Gardiner, P. F.**: The effect of immobilization and exercise on muscle function: A review. *Physiother. Can.*, **39**, 24-36 (1987).

23) **Musacchia, X. J., Deavers, D. R., Meiniger, G. A. & Davis, T. P.**: A model for hypokinesia:

Effects on muscle atrophy in the rat. *J. Appl. Physiol.*, **48**, 479-486 (1980).

- 24) **Saltin, B., Gollnick, P. D.**: Skeletal muscle adaptability: Significance for metabolism and performance. In L. D. Peachey (ed.), *Handbook of physiology: section, 10, 1st ed.*, p555-631, American Physiological Society, Williams & Wilkins, Baltimore, 1983.
- 25) **Brooke, M. H. & Kaiser, K. K.**: Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: The nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**, 670-672 (1970).
- 26) **Eisenberg, R. R.**: Quantitative ultrastructure of mammalian skeletal muscle. In L. D. Peachey (ed.), *Handbook of Physiology: section 10, 1st ed.*, p73-112, American Physiological Society, Williams & Wilkins, Baltimore, 1983.
- 27) **Eisenberg, B.**: Skeletal muscle fibers: Stereology applied to anisotropic and periodic structure. In E. R. Weibel (ed.), *Stereological Methods, 1st ed.*, p274-284, Academic Press, New York, 1980.
- 28) **Weibel, E. R. & Bolender, R. P.**: Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In M. A. Hayat (ed.), *Principles and Techniques of Electron Microscopy, 1st ed.*, p237, Van Nostrand Reinhold, New York, 1973.
- 29) **Engel, A. G., Santa, T., Stonnington, H. H., Jerusalem, F., Tujihata, M. Brownell, A. K. W., Sahakibara, H., Banker, B. Q., Sahashi, K. & Lambert, E. H.**: Morphometric study of skeletal muscle ultrastructure. *Muscle Nerve*, **3**, 229-236 (1979).
- 30) **Dobowitz, V.**: Histochemistry: Enzyme histochemistry of developing human muscle. *Nature*, **211**, 884 (1966).
- 31) **Rowe, R. W. D. & Goldspink, G.**: Muscle fiber growth in five different muscles in both sexes of mice. 1. Normal mice. *J. Anat.*, **104**, 519-530 (1969).
- 32) **金谷文則**: 脱神経性筋萎縮に関する実験的検討。—それに対する電気刺激の効果と不動性萎縮との比較—。日整会誌, **62**, 635-651 (1988).
- 33) **Fischbach, G. D. & Robbins, N.**: Changes in contractile properties of disused soleus muscles. *J. Physiol. (Lond.)*, **201**, 305-320 (1969).
- 34) **Sullivan, T. E. & Armstrong, R. B.**: Rat locomotory muscle fiber activity during trotting and galloping. *J. Appl. Physiol.*, **44**, 358-363 (1978).
- 35) **Smith, J. L., Edgerton, V. R., Betts, B. & Collatos, T. C.**: EMG of slow and fast ankle extensors of cat during posture, locomotion, and jumping. *J. Neurophysiol.*, **40**, 503-513 (1977).
- 36) **Walmsley, B., Hodgson, J. A. & Burke, P. E.**: Force produced by gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *J. Neurophysiol.*, **41**, 1203-1216 (1978).
- 37) **St-Pierre, D. M. M., Leonard, D. & Gardiner, P. F.**: Recovery of muscle from tetrodotoxin-induced disuse and the influence of daily exercise. 1. Contractile properties. *Exp. Neurol.*, **98**, 472-488 (1987).
- 38) **Herbert, M. E., Roy, R. R. & Edgerton, V. R.**: Influence of one-week hindlimb suspension and intermittent high load exercise on rat muscles. *Exp. Neurol.*, **102**, 190-198 (1989).
- 39) **Stevenson, J. A. F., Box, B. M., Feleki, V. & Beaton, J. R.**: Bouts of exercise and food intake in the rat. *J. Appl. Physiol.*, **21**, 118-122 (1966).
- 40) **Feller, D. D., Ginoza, H. S. & Morey, E. R.**: Atrophy of rat skeletal muscles in simulated weightlessness. *Physiologist*, **24**, S9-S10 (1981).
- 41) **Hennig, R. & Lomo, T.**: Discharge patterns of presumed FF, FR and S motor units during normal motor behaviour in the rat. *Acta. Physiol. Scand.*, **121**, 21 (1984).
- 42) **Goldspink, D. F.**: The influence of activity on muscle size and protein turnover. *J. physiol. (Lond.)*, **264**, 283-296 (1977).
- 43) **Goldspink, D. F.**: The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, **264**, 267-282 (1977).
- 44) **Brevet, A. & Pinto, E.**: Myosin synthesis increased by electrical stimulation of skeletal muscle cell cultures. *Science*, **193**, 1152-1154 (1976).
- 45) **Vandenburgh, H. & Kaufman, S.**: In vitro model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science*, **203**, 265-268 (1979).
- 46) **Goldspink, D. F.**: The influence of passive stretch on the growth and protein turnover of the

denervated extensor digitorum longus muscle. *Biochem. J.*, **174**, 595-602 (1978).

- 47) **Parry, D. J. & Parslow, H. G.**: Fiber type susceptibility in the dystrophic mouse. *Exp. Neurol.*, **73**, 674-685 (1981).
- 48) **Corley, K., Kowalchuk, N. & McComas, A. J.**: Contrasting effects of suspension on hind limb muscles in the hamster. *Exp. Neurol.*, **85**, 30-40 (1984).
- 49) **Rubinstein, N., Mabuchi, K. Pepe, F., Salmons, S. & Sreter, F.**: Use of type-specific antimyosins to demonstrate the transformation of individual fibers in chronically stimulated rabbit fast muscles. *J. Cell. Biol.*, **79**, 252-261 (1978).
- 50) **Nicolopoulos-Stournaras, S. & Iles, J. F.**: Hindlimb muscle activity during locomotion in the rat (*Rattus norvegicus*) (Rodentia: Muridae.). *J. Zool. (Lond.)*, **203**, 427-440 (1984).
- 51) **Oberc, M. A. & Engel, W. K.**: Ultrastructural localization of calcium accumulation in normal and abnormal skeletal muscle. *Lab. Invest.*, **36**, 566-577 (1977).
- 52) **Engel, W. K.**: Muscular fiber regeneration in human neuromuscular disease. In A. Mauro (ed.), *Muscular Regeneration*, 1st ed., p285-296, Raven Press, New York, 1979.
- 53) **Grinwald, P. M. & Nayler, W. G.**: Calcium entry in the calcium paradox. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **13**, 867-880 (1981).
- 54) **Cerijo-Santalo, R.**: Mitochondrial swelling at acid pH. *Can. J. Biochem.*, **44**, 695-706 (1966).
- 55) **Gullen, M. J., Appleyard, S. T. & Bindoff, L.**: Morphologic aspects of muscle breakdown and lysosomal activation. *Ann. NY Acad. Sci.*, **317**, 440-467 (1979).
- 56) **Eisenberg, B. R. & Kuda, A. M.**: Discrimination between fiber populations in mammalian skeletal muscle by using ultrastructural parameters. *J. Ultrastruct. Res.*, **54**, 76-88 (1976).
- 57) 山本啓一, 丸山工作: 筋肉, 第1版, 29-34頁, 化学同人, 東京, 1986.
- 58) **Pette, D., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A. & Stemple, K. E.**: Metabolic profiles of three fiber type of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, **11**, 2626-2633 (1972).
- 59) **Hauschka, E. O., Roy, R. R. & Edgerton, V. R.**: Size and metabolic properties of single fibers in rat soleus after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **62**, 2338-2347 (1987).
- 60) **Krieger, D. A., Tate, C. A., McMillin-Wood, J. & Booth, F. W.**: Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J. Appl. Physiol.*, **48**, 23-28 (1980).
- 61) **Baldwin, K. M., Klinkerfuss, G. H., Terjung, R. L., Mole, P. A. & Holloszy, J. O.**: Respiratory capacity of white, red, and intermediate muscle: Adaptive response. *Am. J. Physiol.*, **222**, 373-378 (1972).
- 62) **Pachter, B. R. & Eberstein, A.**: The effect of limb immobilization and stretch on the fine structure of the neuromuscular junction in rat muscle. *Exp. Neurol.*, **92**, 13-19 (1986).
- 63) 宮田雄平: シナプス結合と栄養性因子. *生体の科学*. **30**, 409-415 (1979).
- 64) **Pestronk, A., Drachman, D. B., Stanley, E. F., Price, D. L. & Griffin, J. W.**: Cholinergic transmission regulates extrajunctional acetylcholine receptors. *Exp. Neurol.*, **70**, 690-696 (1980).
- 65) 北沢俊雄: 筋肥大と萎縮の調節機構. *総合リハ*, **9**, 427-434 (1981).
- 66) **Ellsman, M. H., Rash, J. E., Staehelin, A. & Porter, K. R.**: Studies of excitable membranes. II. A comparison of specializations at neuromuscular junctions and nonjunctional sarcolemmas of mammalian fast and slow twitch muscle fibers. *J. Cell. Biol.*, **68**, 752-774 (1976).
- 67) **Hirokawa, N. & Heuser, J. E.**: Internal and external differentiations of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction. *J. Neurocytol.*, **11**, 487-510 (1982).
- 68) **Fitts, R. H. & Brimmer, C. J.**: Recovery in skeletal muscle contractile function after hindlimb immobilization. *J. Appl. Physiol.*, **59**, 916-923 (1985).
- 69) **Rifenberick, D. H. & Max, S. R.**: Metabolic responses of disused rat plantaris and soleus muscle to increased activity. *Am. J. Physiol.*, **227**, 1025-1029 (1975).
- 70) **Arvidsson, I., Eriksson, E., Haggmark, T. & Johnson, R. J.**: Isokinetic thigh muscle strength after ligament reconstruction in the knee

joint.: Results from a 5-10 year follow-up after reconstruction of the anterior cruciate ligament in the knee. *Int. J. Sports Med.*, 2 7-11 (1981).

**Influence of Hindlimb Suspension and Exercise on Mouse Soleus Muscle** Nobuhide Haida, Department of Pathology (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. *Juzen Med. Soc.*, **99**, 1050 - 1067 (1990)

**Key words** muscle atrophy, treadmill running, muscle fiber type, motor endplate, morphometry

#### Abstract

The present study was undertaken to determine the amelioration effect of a daily exercise training program on disuse atrophy of mouse soleus induced by hindlimb suspension. Physiologic, histologic and morphometric examinations were made on seventy five adult mice which were divided into three groups : control (CON), hindlimb suspension (HS), and HS plus exercise (HS-EX) with daily treadmill running. Immediately after checking the contractile functions of the soleus muscle, myosin ATPase staining was employed on frozen sections of muscle to classify into either type I or II A fibers. The ultrastructure of the cytoplasmic organelles of both fibers and their motor endplates were studied and compared morphometrically or qualitatively. The morphometric studies provided estimates of the absolute sarcomere volume, myofibrillar area per fiber, mitochondrial volume fraction and relative volume of the sarcoplasmic reticulum and postsynaptic area. Compared with pre-suspension, soleus muscle activity was reduced to below two thirds on HS, but increased to over 1.4 times of its normal activity on HS-EX. Maximum twitch and tetanic tensions in the HS group were less than those in CON, with those in HS-EX being significantly greater than those in HS. HS reduced the size of both type I and II A fibers and increased the percentage of type I fibers, but not in the HS-EX muscles. Atrophy of a few myofibrils was observed after HS-EX, whereas after HS many myofibrils showed degeneration of the sarcomere of both I and II A fibers. Endplates in the HS group were found to exhibit a great deal of ultrastructural evidence of degeneration and regeneration, but those in the HS-EX group were less affected. The endplates in II A fibers exhibited structural alteration to a greater extent than type I endplates in HS alone. This suggests that type I endplates were more resistant to degenerative changes than type II A fibers. The mitochondrial volume fraction after HS decreased both in the I and II A fibers, whereas it diminished only in the II A fibers after HS-EX as compared with the values in the CON. These data show that exercise training can markedly attenuate the detrimental effects of HS on the soleus muscle.