
= 原著論文 =

成熟期中期のラット足底筋に対する 走トレーニングの影響

辻本 尚 弥¹⁾ 鈴木 英 樹²⁾

Effects of Running Training on the Rat Plantaris Muscle
during the Middle Maturation Period.

Hisaya TSUJIMOTO¹⁾, Hideki SUZUKI²⁾

Abstract

We studied the effects of running training on myosin heavy chain (MyHC) isoform composition in 16 female mature Fischer 344 rats (12 month old). The animals were divided into two groups: sedentary (S; n=7) or run (R; n=9) group. Animals in the R group were trained with treadmill running (30 m/min, 60 min/day and 5 days/wk) for 8 weeks. After 8-weeks of training, the plantaris muscle (PLA) was isolated, and crude myosin was prepared. MyHC isoform composition was analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamidegel electrophoresis (SDS-PAGE).

Body weights in both groups increased significantly during the training period. However, the final body weights of each group were not significantly different. PLA weight and relative PLA weight of the R group were significantly higher than those in the S group.

No statistical difference was found in the compositions of the MyHC I and II_d isoforms in either group. However, the R group value for the type II_a MyHC isoform was higher than that of the S group and the type II_b MyHC isoform value for the R group was relatively lower than that of the S group.

These results indicated that the MyHC isoform composition of the PLA muscle changed with running training. We conclude that running training during the middle period of maturation affected muscle contractile protein metabolism.

Key words ; Female Fischer 344 rat, Myosin heavy chain, Mature,
Plantaris muscle, Running training

1) 久留米大学 健康・スポーツ科学センター

2) 愛知教育大学 保健体育講座

緒 言

高齢者人口の増加により、健康長寿社会をめざして国や民間で多くの取り組みがなされている¹⁾²⁾。高齢者の健康維持や増進には適度な運動が有用とされ、多くの介入研究がある^{3)~6)}。高齢者の健康には、その年齢で実施している運動も影響するが、疫学的な研究からはそれ以前の運動習慣も影響すると報告されている⁷⁾⁸⁾。つまり、健康に対する運動のよりよい効果を得るには、成熟期以降の、いわゆる中年期に運動を開始し習慣化することが重要と考えられる^{9)~11)}。

歩行やランニングといった持続性のトレーニングは、生活習慣病やその温床となる肥満の改善に有効であるとされ、中高年に対して推奨されている。持続的な走トレーニングは骨格筋において、毛細血管密度、ミオグロビン量、ミトコンドリア量の増加や酸化酵素活性の上昇、筋線維の肥大、筋線維タイプの移行、疲労耐性の向上などの様々な変化を引き起こすことが報告されている^{12)~16)}。我々はこれまで、主に成熟期初期と高齢期の実験動物を用いた基礎的な研究で、持続性走トレーニングの効果について、筋の構成タンパク質に注目し検討してきた^{17)~19)}。

本研究では、ヒトの中年期にあたりと考えられる成熟期中期の実験動物を用いて、持続的な走トレーニングの骨格筋に対する影響について、特にミオシン重鎖 (Myosin heavy chain; MyHC) アイソフォームの構成比に注目して検討した。

方 法

実験動物には、生後12ヶ月齢の Fischer344系の雌ラットを用いた (日本 S L C)。餌 (CE-2: 日本クレーア) 及び飲水は自由摂取とし、昼夜逆転した12時間の明暗サイクルで室温 22 ± 1 、湿度 $60 \pm 5\%$ の環境下で飼育した。実験群として対照群 (Sedentary; S群, N=7) と持続性走トレーニング群 (Running; R群, N=9) の2群を設けた。R群には持続性運動として、実験動物用トレッドミルを用いた走トレーニングを分速30mで1日1時間、週5日行った。トレーニングは1週間の予備トレーニング期間を設けた後、12ヶ月齢に達するまで8週間行った。トレーニング終了後、ラットの体重を計測、麻酔下にて頸動脈より放血し屠殺した。その後、足底筋を摘出、筋重量を測定した後ただちに液体窒素により冷却したイソペンタン中で瞬間凍結し、生化学的分析を行

うまで-60の冷凍庫で保存した。なお飼育および屠殺でのラットの取り扱いについては、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に沿って行った²⁰⁾²¹⁾。また本実験では飼育の過程において病的に死亡したラットは除外した。実験に供したラットの観察からは活動、特に自発歩行や走行などの行動に異常は認められなかった。

次に、足底筋の MyHC アイソフォーム構成比の分析を行った。保存していた筋は分析時に筋腹にて二分し、一方を MyHC アイソフォーム構成比の分析に供した。まず筋を Tsika ら²²⁾の方法に従いホモジナイズし、さらに Bar と Pette²³⁾の方法により粗ミオシンを抽出した。蛋白量調整のための蛋白定量には Biuret 法を用いた²⁴⁾。次に抽出した粗ミオシンに変性剤を添加し、56で10分間インキュベートし変性させた。変性粗ミオシンは、Sugiura ら²⁵⁾の方法に従い5-7%の濃度勾配ゲルを用いた SDS-PAGE (KS8020型:マリソル) により MyHC アイソフォームを分離した。泳動後ゲルは銀染色 (銀染色キットワコー: 和光純薬) を施しタンパク質を可視化した。アイソフォームの相対的構成比の分析は、前報^{17)~19)}と同様に蛋白質の泳動パターンを CCD カメラでコンピューターに取り込み、イメージデジタイザーシステム (FDM98-RGB: フォトロン) を用いて画像解析により行った。

各測定値は群ごとに平均値及び標準偏差を求め統計学的な検定を行った。体重では1要因に対応がある2要因の分散分析を用いた。筋重量及び相対的筋重量では、それぞれの群の比較に、分散の検定には F 検定法を用い、分散が等質であった場合は t 検定法を、分散が等質でなかった場合は Aspin-Welch 検定法を用いた。MyHC アイソフォーム相対的構成比では、2組の独立な標本に対する²検定を行った。全ての検定において有意水準は5% ($p < 0.05$) とした²⁶⁾。

結 果

体重と足底筋重量および相対的足底筋重量を平均値と標準偏差により表1に示した。S群の体重は、トレーニング期間中増加傾向を示した。一方、R群ではトレーニング期間が進むに従い体重は減少傾向を示した。最終体重ではR群においてS群に比べ有意に低値を示した。足底筋重量および相対的足底筋重量は、R群においてS群に比べ有意に高値を示し、トレーニングによる筋肥大が観察された。

Table 1. Body weight, plantaris muscle weight and relative plantaris muscle weight of rat.

	Sedentary (n=7)	Running (n=9)	
Initial body weight (g)	222 ± 13	213 ± 7	
Final body weight (g)	226 ± 18	208 ± 9	*
Plantaris weight (mg)	195 ± 16	210 ± 11	*
Relative plantaris weight (mg/100g BW)	86 ± 5	97 ± 2	*

Values are expressed as mean ± SD
 BW ; Body weight
 * : Significant difference from the value in sedentary group(p<0.05)

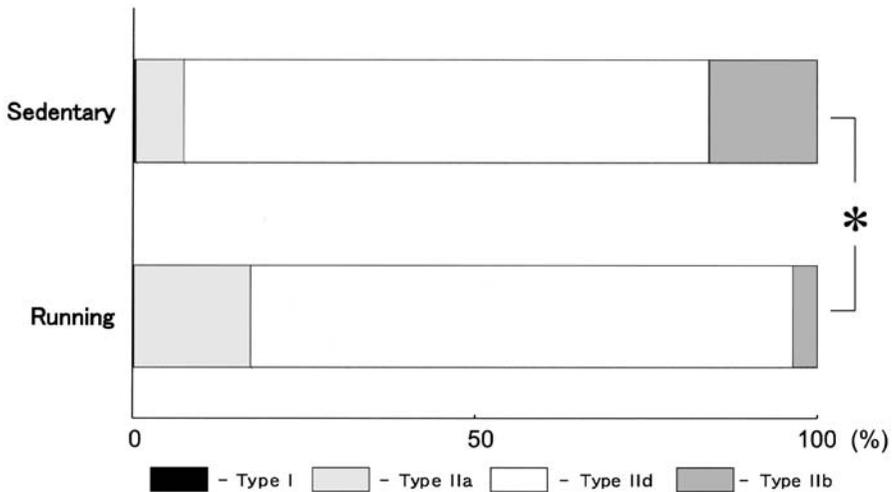
図1には各群のタイプ I、IIa、IIc、IIb MyHC アイソフォームの相対的構成比を示した。各群の MyHC アイソフォーム相対的構成比を統計処理した場合、S 群に対し R 群の MyHC アイソフォーム相対的構成比に有意な差が認められた。特に、タイプ IIa MyHC アイソフォーム相対的構成比は、S 群の7.1 ± 3.2%に比べ、R 群では17.2 ± 6.2%と有意に高値を示した。一方タイプ IIb MyHC アイソフォーム相対的構成比は、S 群の15.8 ± 11.7%に比べ、R 群では3.5 ± 2.9%と有意に低値を示した。タイプ I MyHC およびタイプ IIc MyHC アイソフォーム相対的構成比は両群間で有意な差はみられなかった。これは、持久的トレーニングにより、タイプ IIb MyHC アイソフォームの発現が減少し、相対的にタイプ IIa MyHC アイ

ソフォームの発現が増加した結果であると考えられる。

考 察

本実験では、成熟期中期のラット足底筋を対象に、持久的走トレーニングの影響について検討し、トレーニングによる足底筋重量の増加とミオシン重鎖アイソフォーム構成比の変化を明らかにした。

トレーニング期間中のラットの体重は、R 群で体重の減少傾向がみられた。これはこれまでの報告と同様に、ストレスによる食欲低下や摂食量の減少、脂肪沈着の抑制などの要因による考えられる²⁷⁾。筋組織の重量については、R 群では筋重量および相対的筋重量ともに、S 群に比べて有意に高値を示した。



* : Significant difference from the value in sedentary group.

Fig 1. Myosin heavy chain isoform composition of plantaris muscle in each group.

またS群の筋重量を前報¹⁶⁾の6ヶ月齢群と比較すると、相対的な筋重量では低値を示しており、加齢にともなう体重の増加に比べ、それに見合った筋重量が増加していないことを示していた。12ヶ月齢という成熟期中期での体重増加の要因は、筋以外の部分、多くは体脂肪増加によるのではないかと考えられる。ヒト中年期では体重の増加がみられるものの、それに見合った筋重量は増加せず、体脂肪が増加する。本実験でもラットの体重と筋重量に同様な関係がみられた。このことから今回用いた月齢は筋の量的変化では、ヒトの中年期あたると考えられる。走トレーニングにともなう実験動物の活動筋肥大は、これまで多く報告されている^{17)-19) 25) 28)}。本研究でもこれらの報告と同様にトレーニング効果として筋肥大が観察された。また我々は前報で、本実験と同月齢のラット前脛骨筋において、走トレーニングによる筋重量の増加を観察している¹⁷⁾。前脛骨筋は足底筋の拮抗筋であることから、走トレーニングでは下肢の前部と後部の両筋が活動参加していると考えられる。

トレーニングにともなうMyHCアイソフォームの変化について、Sugiuraら²⁵⁾は、1日1時間、週5日で4週間の持続的な水泳トレーニングを行ったラット長指伸筋において、タイプIId MyHCの相対的構成比の増加とタイプIIb MyHCの減少を報告している。Wadaら²⁸⁾は1日最大2時間、週5日で10週間の持続的な走トレーニングを行ったラット外側広筋において、タイプIIb MyHCの減少とタイプIId MyHCおよびIIa MyHCの有意な増加を報告している。我々も前報で、成熟期ラット足底筋のMyHCアイソフォーム構成比において、持続的な走トレーニングと瞬発的なジャンプトレーニングによりタイプIId MyHCの有意な増加と相対的にタイプIIb MyHCの減少を報告した¹⁷⁾⁻¹⁹⁾。成熟期中期ラットを用いた本実験でも、S群に比べR群ではタイプIIb MyHCが減少した。一方、タイプIId MyHC構成比には両群間で有意な差はみられず、タイプIIa MyHCにおいて走トレーニングにより有意な増加が観察された。筋活動量が増加し蛋白合成能に変化が生じた場合、活動筋内のMyHCアイソフォーム合成のスイッチングが起こるとされている。Kirschbaumら²⁹⁾は、活動量増加にともなうMyHCアイソフォームの変化の方向は、速筋ではタイプIIb IId IIa Iの順序で起こるとしている。また、運動刺激など活動様式の変化に対して単一筋線維内のMyHCアイソフォーム合成に変化が起こった場合、単一筋線維内に数種類のア

イソフォームが存在するハイブリッド線維を増加させると考えられている³⁰⁾⁻³³⁾。本実験の走トレーニングの結果、筋活動量の増加によりアイソフォーム合成のスイッチングがおこりタイプIId MyHCの発現と、さらにタイプIIa MyHCの発現が促進され、単一筋線維内のMyHCアイソフォームの混在が引き起こされたと考えられる。またタイプIId MyHCの構成比に変化が見られなかったのは、タイプIId MyHCのみを発現しているタイプIId線維においても、タイプIIa MyHCが発現したためではないかと考えられる。本研究ではハイブリッド線維の種類とそれらの構成比についての検討を行っていない。筋構成タンパクの詳細な変化を明確にするためには、今後MyHCをベースとして単一筋線維を分類し、実験条件によりその分布がどのように変化するかを明確にする必要があると考えられる。

以上の結果から、持続的な走トレーニングが実施された場合、成熟期前期と同様に成熟期中期においても、筋タンパク質の代謝に影響する事が、ミオシン重鎖を中心とする蛋白レベルの分析より示唆された。

引用文献

- 1) 内閣府. 平成22年版 高齢社会白書. 初版. 大分県: 佐伯印刷, 2010.
- 2) 全国老人保健施設協会. 介護白書 平成22年版: 介護老人保健施設を取り巻く環境の変化と対応. 初版. 東京都: オフィスTM, 2010.
- 3) 大淵 修一, 佐竹 恵治. 介護予防包括的高齢者運動トレーニング. 初版. 東京都: 健康と良い友だち社, 2006.
- 4) 漆畑 俊哉, 衣笠 隆, 相馬 優樹, 三好 寛和, 長谷川 聖修. 女性前期高齢者のバランス能力を改善させる運動介入: 無作為比較試験. 体力科学 2010; 59:97-106.
- 5) 加藤 雄一郎, 川上 治, 太田 壽城. 高齢期における身体活動と健康長寿. 体力科学 2006; 55:191-206.
- 6) Suzuki T, Kim H, Yoshida H, Ishizaki T. Randomized controlled trial of exercise intervention for the prevention of falls in community-dwelling elderly Japanese women. J Bone Miner Metab. 2004; 22(6): 602-11.
- 7) Schnohr P, Scharling H, Jensen JS. Changes in leisure-time physical activity and risk of death: an

- observational study of 7,000 men and women. *Am J Epidemiol.* 2003; 158(7): 639-44.
- 8) 小熊祐子. サイエンスとしての運動とアンチエイジング. *アンチ・エイジング医学* 2007; 3(2): 203-9.
- 9) Kokkinos P, Myers J. Exercise and physical activity: clinical outcomes and applications. *Circulation.* 2010; 122(16): 1637-48.
- 10) Kruk J. Physical activity and health. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2009; 10(5): 721-8.
- 11) Shephard RJ. Independence: a new reason for recommending regular exercise to your patients. *Phys Sportsmed.* 2009; 37(1): 115-8.
- 12) Baldwin KM, Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol.* 2001; 90(1): 345-57.
- 13) Booth FW, Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev.* 1991; 71(2): 541-85.
- 14) Pette D. Training effects on the contractile apparatus. *Acta Physiol Scand.* 1998; 162(3): 367-76.
- 15) Holloszy JO, Booth FW. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol.* 1976; 38:273-91.
- 16) 的場秀樹, 森田俊介, 杉浦崇夫. 骨格筋の筋線維タイプと適応変化. *日本運動生理学雑誌* 1995;2(2):127-42.
- 17) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克. 走及びジャンプトレーニングの前脛骨筋に対する効果. *名古屋経済大学・市邨学園短期大学 自然科学研究会誌* 1994;29(1):5-18.
- 18) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克, 石河利寛. 走及びジャンプトレーニングによるラット骨格筋ミオシン重鎖アイソフォーム組成の変化. *体力科学* 1995;44(1):97-104.
- 19) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 平野朋枝, 西沢富江, 小坂井留美, 山下晋, 春日規克. ラット骨格筋に対するトレーニング期間の違いによる影響. *東海保健体育科学* 1996;18:1-8.
- 20) 総理府内閣総理大臣官房管理室. 実験動物飼育保管研究実験動物飼育及び保管等に関する基準の解説. 1版. 東京: ぎょうせい, 1980.
- 21) 前島一淑, 江崎考三郎, 篠田元扶, 山内忠平, 光岡知足, 菅野茂, 辻 茂, 土井邦雄. *新実験動物学*. 1版. 東京: 朝倉書店, 1988.
- 22) Tsika RW, Herrick RE, Baldwin KM. Interaction of compensatory overload and hindlimb suspension on myosin isoform expression. *J Appl Physiol.* 1987; 62(6): 2180-6.
- 23) Bär A, Pette D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1988; 235(1-2): 153-5.
- 24) Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret method. *J Biol Chem.* 1949; 177: 751-6.
- 25) Sugiura T, Morimoto A, Sakata Y, Watanabe T, Murakami N. Myosin heavy chain isoform changes in rat diaphragm are induced by endurance training. *Jpn J Physiol.* 1990; 40(5): 759-63.
- 26) 森敏昭, 吉田寿夫. *心理学のためのデータ解析テクニカルブック*, 1版, 京都: 北大路書房, 1990.
- 27) Stevenson JAF, Box BM, Feleki VB, Eaton JR. Bouts of exercise and food intake in the rat. *J Appl. Physiol.* 1996; 21(1): 118-22.
- 28) Wada M, Inashima S, Yamada T, Matsunaga S. Endurance training-induced changes in alkali light chain patterns in type IIB fibers of the rat. *J Appl Physiol.* 2003; 94(3): 923-9.
- 29) Kirschbau BJ, Kucher H, Termin A, Kelly AM, Pette D. Antagonistic effects of chronic low frequency stimulation and thyroid hormone on myosin expression in rat fast-twitch muscle. *J Biol Chem.* 1990; 265: 13974-80.
- 30) Bottinelli R. Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibers: do myosin isoforms tell the whole story? *Pflugers Arch.* 2001; 443(1): 6-17.
- 31) Parry DJ. Myosin heavy chain expression and plasticity: role of myoblast diversity. *Exerc Sport Sci Rev.* 2001; 29(4): 175-9.
- 32) Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol.* 2001; 115(5): 359-72.
- 33) 辻本尚弥, 平野朋枝, 鈴木英樹, 春日規克. ラット腓腹筋外側部表層のミオシン重鎖アイソフォーム構成に及ぼす持久性走トレーニングの影響-単一筋線維での検討-. *久留米大学健康・スポーツ科学センター研究紀要* 2004;12(1): 23-9.