

久留米大学比較文化研究
第33輯抜刷（本文169頁～181頁）
平成16年 3 月発行

ラット腓腹筋外側部表層の筋線維形態に
及ぼす自発走トレーニングの影響

辻 鈴 春
本 木 日
尚 英 規
弥 樹 克

ラット腓腹筋外側部表層の筋線維形態に 及ぼす自発走トレーニングの影響

辻 本 尚 弥 (久留米大学 健康・スポーツ科学センター)

鈴 木 英 樹 (愛知教育大学 保健体育)

春 日 規 克 (愛知教育大学 保健体育)

Abstract

The effects of voluntary running training were investigated in the 13-weeks-old female Fischer344-rats ($n=12$). Animals were divided into two groups; sedentary (S; $N=7$) or voluntary running training (VT; $N=5$) group at 4-weeks of age. Animals in group VT were given free access to a running wheel for 8 weeks. Sample from the superficial portion of the lateral gastrocnemius (GAS) muscle was analyzed using histochemical techniques.

Body weight of all groups was significantly increased during training period. There was significantly difference between S and VT in the final body weight. The average running revolution of group VT was 6951 ± 2369 (Mean \pm SD) per day. Heart weight and relative heart weight of group VT were significantly higher than group S. There was no significantly difference between S and VT in the GAS weight. However, the relative GAS weight of group VT was significantly higher than that of group S. Mean cross sectional area (CSA) of type II B fiber was significantly wider than that of type II D fiber. Variance of CSA was significantly different between type II D and II B fiber. The mean CSA of the VT group was significantly bigger than that of the S group in each typed fiber. Variance of CSA was significantly different between VT and S group in type II D fiber.

These results indicate that type II D and type II B fiber of the superficial portion of the lateral gastrocnemius muscle is affected by voluntary training.

Key words : voluntary running training, morphological change, F344 female rat, gastrocnemius muscle

緒 言

実験動物に対する自発走を用いたトレーニングは、生存率上昇¹⁾や最大酸素摂取量の増大^{2) 3)}などの効果があると報告されている。自発走トレーニングは持久的な強制走トレーニングに比べて走行距離が長いという特徴を持ち²⁾³⁾⁴⁾、筋のトレーニングに対する適応機序解明のモデルとしてよく研究に用いられている。自発走運動は、比較的高強度で短時間の運動が活動期間中に高頻度で繰り返される特徴を持つ⁴⁾。このことから自発走トレーニングでは、下肢の各筋において各筋線維タイプの多くが活動増員されると考えられ、低強度の持続的運動であり遅筋タイプの動員が主な強制走トレーニングの様相とは異なる可能性があると考えられる。

そこで本研究では筋の形態、特に筋線維横断面積を指標として、ラット速筋線維で構成される腓腹筋の外側部表層に対する自発走トレーニングの効果を明らかにすることを目的とした。

方 法

1. 実験動物、飼育方法及びトレーニング方法

実験動物には、生後13週齢の Fischer 344系の雌ラット12匹を用いた（日本 SLC）。Fischer 344系の雌ラットを用いた理由は、この系は肥満になりやすく体重の個体差が少ないという特徴を持つことと、雌は雄に比べて運動量が多いためである。実験動物に対する餌（CE-2：日本クレア）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 ± 5 %の環境下で飼育した。実験群として対照群（Sedentary；S群，N=7）と自発走トレーニング群（Voluntary running training；VT群，N=5）の2群を設けた。4週齢時より1週間予備飼育した後、群間の体重がほぼ同一になるように、それぞれ5週齢時にラットを2群に分けた。対照群は $24 \times 38 \times 20$ cmの大きさのケージにて飼育された。VT群は図1に示したラット回転式運動量測定装置（直径 $32 \times$ 幅 10 cm）付きの $38 \times 28 \times 38$ cmの大きさのケージにて飼育された。ケージより回転車輪への通路は常に解放されており、ラットは24時間自由に運動が可能であった。トレーニングは5週齢より13週齢に達するまで8週間行った。なお飼育・トレーニング・屠殺での実験

動物の扱いについては、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に沿って行った⁵⁾。

2. 筋の摘出および組織化学的分析

トレーニング終了後、ラットの体重を計測し、ペントバルビタールナトリウム溶液にて麻酔を行い、十分な麻酔下において断頭し屠殺した。心臓及び腓腹筋を摘出し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°C の冷凍庫で保存した。組織化学的分析は、腓腹筋外側部の表層部位を用いた。 -20°C のクリオスタット (CM-3B: サクラ精機) 中にて厚さ $10\mu\text{m}$ の連続切片を作成し、Myosin ATPase (pre-incubation; pH 4.6及び10.3) 染色を行った。筋線維は Gorza の方法⁶⁾に従い、Myosin ATPase 染色の結果から II B と II D/X 線維に分類した。すなわち II B および II D/X 線維は pH 4.6の pre-incubation 条件下では、I と II A 線維の間に染まり、pH 10.3の pre-incubation 条件下では、D/X 線維は II B 線維より濃染される。これら二つの pre-incubation 条件の組合せから筋線維タイプを分類した^{6) 7)}。染色後、CCD を接続した顕微鏡にて腓腹筋外側部表層の染色画像をコンピューターに取り込んだ。筋線維横断面積の分析は腓腹筋外側部表層より無作為に選定した部位より画像を得て、筋線維タイプ別に無作為に約20~50本の筋線維を抽出して、NIH

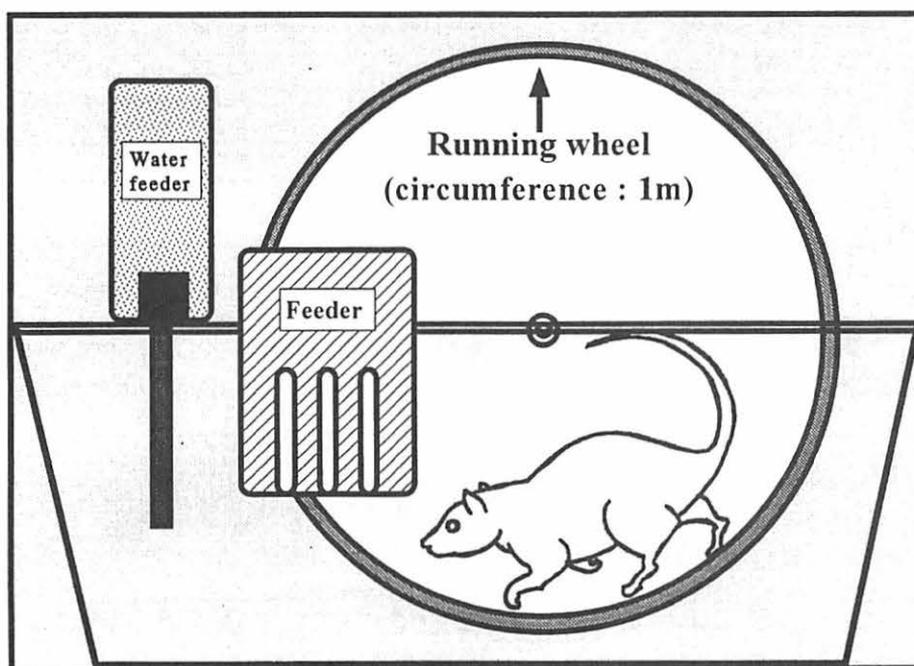


Fig. 1 Illustration of voluntary running training

image を用いて筋線維横断面積を求めた⁷⁾。抽出した筋線維はすべてをプールして平均値及び分布を求めた⁷⁾⁸⁾。

3. 統計処理

各測定値は群ごとに平均値、標準偏差及び標準誤差を求め、統計学的な検定を行った。最終体重、心重量、腓腹筋重量および筋線維タイプごとの横断面積では、分散の検定にF検定法を用い、分散が等質であった場合は平均値の検定にt検定法を、分散が等質でなかった場合はAspin-Welchの検定法を用いた。筋線維タイプごとの横断面積の分布では、分散の検定にF検定法を用いた。全ての検定において有意水準は5% ($p < 0.05$) とした⁹⁾。

結 果

トレーニング期間中のVT群各個体別の1日当りの回転数を図2に示した。トレーニング期間中のVT群の1日当りの平均回転数は1週目と5週目で低値を示したが、4~6週目まで徐々に増加しその後徐々に減少した。1匹のラットを除き他の全てのラットで4週

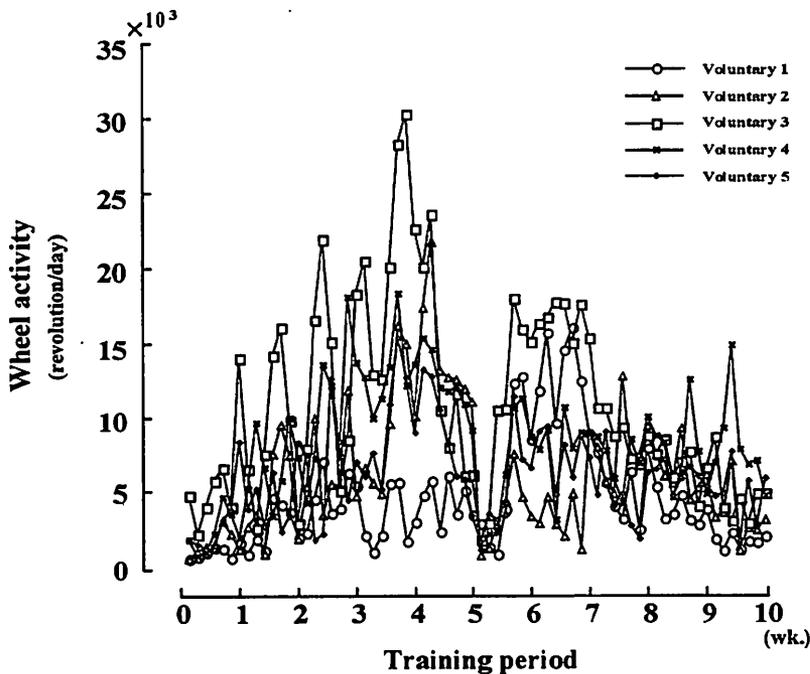


Fig. 2 Changes of voluntary running activity

目に回転数の最大値を示した。1日当りの平均回転数の平均値±標準偏差は、6951±2369回であった（最低値；4372-最大値；10499）。回転数は走行距離（m）と一致する。

Table 1 Body weight, heart weight, and gastrocnemius muscle weight in each group

| Group (number) | Sedentary (7) | Voluntary training (5) | |
|----------------------------------|---------------|------------------------|---|
| Body weight (g) | 156± 2 | 145± 3 | * |
| Heart weight (mg) | 418± 5 | 451±10 | * |
| Gastrocnemius muscle weight (mg) | 719±12 | 700±14 | |

Values are expressed as mean±SEM

* : Significant difference from the value in sedentary group

次に最終体重及び心重量と腓腹筋重量を平均値と標準誤差により表1に示した。最終体重ではVT群がS群に比べて有意に低値を示した。心重量は、VT群がS群に比べて有意に高値を示し心臓の肥大が観察された。腓腹筋の筋重量では両群間に有意な差は認められなかった。次に相対的心重量と腓腹筋の相対的筋重量を図3に示した。相対的心重量では、心重量と同様にVT群がS群に比べて有意に高値を示し、持久的トレーニングの結果、循環器系の発達を引き起こしたことが示された。腓腹筋の相対的筋重量では、VT群がS群に比べて有意に高値を示し、体重を負荷とする走運動の主動筋に対してもトレーニング効果が認められた。

次に、各筋線維タイプの筋線維横断面積とその領域を平均値と標準誤差により表2に

Table 2 Mean fiber area and range of each fiber type for each group in rats

| Group | Sedentary | Voluntary training |
|--------------------------|-----------------|--------------------|
| Fiber area (μm^2) | | |
| Type II D | 956±13 (406) | 1086±16 (390) * |
| Type II B | 2043±21 (479) ¶ | 2137±19 (414) ¶ * |
| Range (μm^2) | | |
| Type II D | 396-2294 | 430-2153 |
| Type II B | 939-3477 | 757-3581 |

Values are expressed as mean±SEM (Number of fibers)

* ; Significant difference from the value in sedentary group

¶ ; Significant difference from the value in type II d

示した。筋線維横断面積はⅡ B 線維がⅡ D/X 線維に比べ両群とも有意に高値を示した。両タイプの筋線維横断面積はS群に比べVT群が有意に高値を示し、走トレーニングにともなう筋線維の肥大が観察された。また、トレーニングにともなう筋線維横断面積の領域（最低値と最高値の幅）は、Ⅱ B 線維では対照群に比べ広がっているが、Ⅱ D/X 線維では逆に集束していた。そこで図4に各タイプの筋線維横断面積の度数分布を示し、F検定法を用い分散の検定を行った。その結果、両群においてⅡ D/X とⅡ B 線維の分布は等質ではなかった。また、S群とVT群の比較では、Ⅱ B 線維では分布は等質で差がみられなかった。Ⅱ D/X 線維では両群間で分布は等質ではなく、VT群がS群に比べて筋線維横断面積の大きい部位に多くの線維が分布していた。

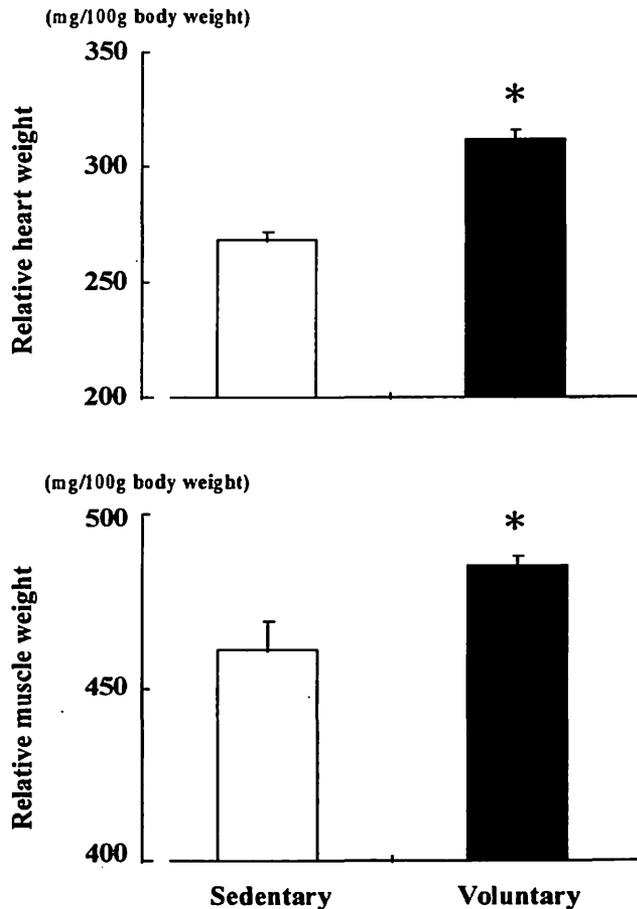


Fig. 3 Relative heart and gastrocnemius muscle weight
* : Significant difference from the value in sedentary group

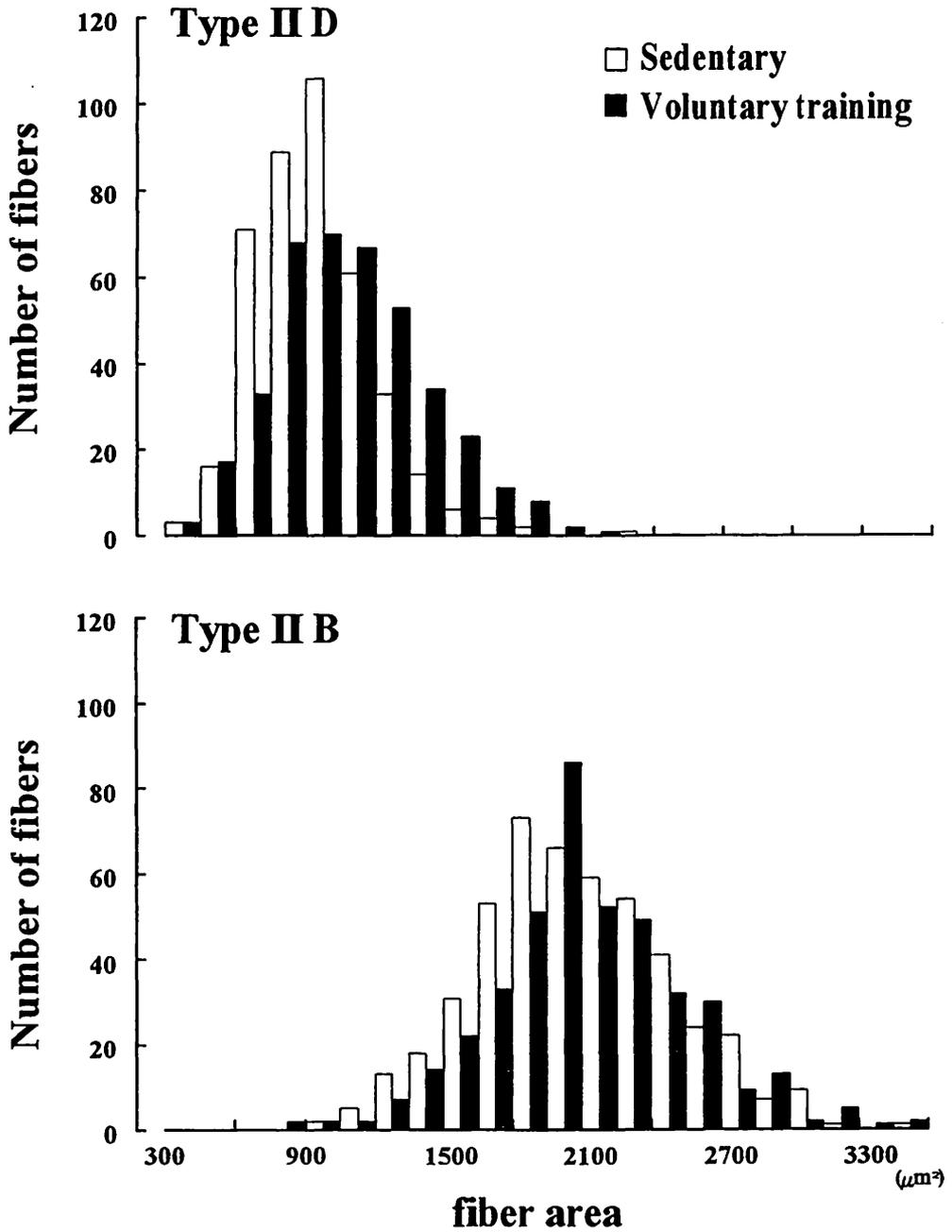


Fig. 4 Frequency distribution of fiber area

考 察

本研究において自発走トレーニング期間の1日当たりの平均回転数は、ラットの系及び週齢が同じであった我々の先行研究¹⁰⁾に比べて低値を示した。これは飼育施設内の騒音など環境の違い、トレーニング期間の季節差などによるのではないと思われるが、その要因については不明である。組織重量について Yano ら⁴⁾、Rodnick ら¹¹⁾、田中ら¹²⁾、Sexton¹³⁾及び竹倉ら¹⁴⁾は自発走トレーニングによる心重量の増加を報告している。本結果で得られた1日当たりの平均走行距離は約7000m/日に達し、強制走で行う持久的走運動速度35m/minから換算した場合、総運動時間は約3時間20分に及ぶものであった。また、記録された最大値は10499m/日であり、相当量の活動が行われていたと考えられる。このような持久的運動が8週間継続された本研究において、VT群の心臓及び相対的心重量はS群に比べ有意に高値を示した。本研究の自発走トレーニングが、循環器機能の大きな要因である心筋の肥大に対して十分な刺激量を持っていたことが示唆された。

骨格筋はミオシン重鎖のアイソフォームにより遅筋線維と速筋線維に、さらに速筋線維はいくつかのサブタイプに分類される。これらの筋線維タイプは、代謝特性や機能特性などが異なり、様々な運動に対応できるように一つの筋内にも適当な比率でモザイク状に分布している。各筋線維タイプは形態的にも異なることが知られており、また筋線維の平均横断面積については、存在する筋によっても異なることが報告されている。DelpとDuan¹⁵⁾はSD系の雄ラットの腓腹筋白色部の平均筋線維横断面積を調べ、II B線維がII D/X線維に比べて大きいと報告している。Larssonら^{16) 17)}、HämäläinenとPette¹⁸⁾もラット前脛骨筋で、Sieckら¹⁹⁾はラット横隔膜筋で同様に、II B線維の平均横断面積がII X線維に比べて大きいと報告している。我々も先の研究でラット腓腹筋外側部表層ではII B線維の平均筋線維横断面積がII D/X線維に比べ大きいことを観察報告している⁷⁾。本研究のラット腓腹筋外側部表層ではこれらの先行研究と同様に、平均の筋線維横断面積はII B線維がII D/X線維に比べ大きかった。

また、筋線維の横断面積の分布についてもII D/X線維とII B線維との間には、本研究では有意な差が認められた。HämäläinenとPette¹⁸⁾はII B線維の分布域がII D/X線維に比べ広く、その広がりにより面積の大きい分布域に多くの筋線維が観察されると報告している。我々も先の研究でラット腓腹筋外側部表層では両タイプ筋線維横断面積の分布域は異なり、II B線維では面積の大きい分布域に多くの筋線維が観察されると報告した⁷⁾。

本研究のラット腓腹筋外側部表層ではこれらの先行研究と同様に、両タイプ筋線維横断面積の分布域は異なり、II B 線維では面積の大きい分布域に多くの筋線維が観察された。しかし、本研究では筋線維横断面積の分布幅（レンジ）は我々の先行研究と比べ両筋線維タイプとも狭かった。これは、実験に供したラットの週齢が先行研究に比べ若齢であり、体重についても低かったためではないかと考えられる。

これまで自発走トレーニングによるラット下肢骨格筋の筋線維横断面積に対する影響については、いくつかの報告が見られる。春日ら⁴⁾は Fischer344系の雌ラットにおいて9週間の自発走トレーニングにより足底筋のII A 線維が肥大したと報告している。堀田ら²⁰⁾も Fischer系の雌ラットにおいて8週間の自発走トレーニングによる足底筋のFOG線維の肥大を報告している。さらに Ishihara ら²¹⁾は老齢期の Wistar 系雄ラットにおいて45日間の自発走トレーニングにより足底筋の FOG 線維が肥大したと報告している。勝田ら²²⁾も若齢期の Wistar 系雄ラットにおいて10週間の自発走トレーニングによる足底筋 FOG 線維の肥大を観察している。一方、Ishihara ら²³⁾は SD 系雄ラットにおいて、8週間の無負荷自発走トレーニングでは足底筋の FOG 線維に肥大は観察されなかったと報告している。このように自発走トレーニングによるラット下肢速筋線維横断面積に対する影響は明かではない。また、トレーニングによるラット腓腹筋外側部表層の筋線維横断面積に対する影響については、Garner ら²⁴⁾による高強度のウエイトトレーニングによる肥大の報告がある。しかし走トレーニングの影響をみた場合、Gute ら²⁵⁾は持久性走トレーニングよりラット腓腹筋の白色部位の筋線維横断面積には差が見られないと報告している。また、Hickson ら²⁶⁾もスプリント走トレーニングによりラット腓腹筋の筋線維横断面積には差が見られないと報告している。Seburn ら²⁷⁾は、ラット腓腹筋内側部表層において、自発走に分速27mの持久的走トレーニングを加えた条件でもII B 線維平均横断面積に差が見られなかった報告している。Seburn ら²⁷⁾の研究では、自発走トレーニングの平均走行距離が2140m程度と短く、また持久的走トレーニングとの組み合わせが12週間のトレーニング中に7週間だけである。本研究では、同腓腹筋外側部表層の筋線維横断面積を調べ、Seburn ら²⁷⁾とは異なる結果が得られたが、これは本実験でのトレーニング期間中のラットの走行量・走行能力が、彼らの実験で用いたラットに比べ顕著に優れていた違いによるのではないと思われる。また、春日ら⁴⁾の行った自発走トレーニングでは、回転車輪軸に負荷を加えた装置を用いており、負荷強度を高めることにより、筋線維肥大が顕著であったとしている。このことは筋線維が肥大を起こすためには、走行距離だけではなく運動強

度にも要因のあることを示している。本研究では、平均筋線維横断面積ではVT群で両筋線維タイプに肥大が観察された。これは、1日約7000mを走るラットの自発走が、短時間の高速（高強度）での運動を高頻度にて何度も繰り返すことで組み立てられている⁴⁾ためであり、トレーニングの強度及び量が両筋線維タイプの形態面に適応を引き起すほどの十分に大きかったためではないかと考えられる。

また、II D/X線維横断面積の分布がVT群とS群では異なっており、トレーニング性に变化したことが示されていた。SeburnとGardiner²⁸⁾は、腓腹筋外側部で自発走運動によりfatigue-resistant (FR)の運動単位が多く動員されると報告している。FRの運動単位を構成するFOG線維はII A及びII D/X線維より構成される²⁹⁾。このため本研究でみられたII D/X線維横断面積の分布の変化が、自発走ではII D/X線維がより多く動員されことを示す結果であると考えられる。しかし、筋線維形態面に関して、横断面積では両筋線維タイプに肥大が観察され、面積分布域ではII D/X線維にのみトレーニング性に变化が見られた。これはII B線維はトレーニング性の变化を起こしやすく、肥大による枝分かれあるいは増殖も起こり、II B線維と判定される細い線維も出現する³⁰⁾。このためII B線維は分布域の拡大がみられるものの統計上の差が現れない。一方、II D/X線維は極端な肥大は起こさないが、十分な活動参加がある場合には枝分かれを起こさない程度には肥大するため、筋線維横断面積の分布域に適応を引き起したと判断できる明白な差が現れると考えられた。

以上、本研究では筋線維形態面に適応が見られたことから、ラット腓腹筋外側部表層の速筋線維は自発走トレーニングにより影響を受けることが明らかとなった。

本稿を終えるにあたり、動物の飼育及び実験・分析に協力して頂いた愛知教育大学卒業生の山下晋、小笠原仁美、稲垣洋、藤田慎一の各氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) Holloszy JO. Mortality rate and longevity of food-restricted exercising male rats: a reevaluation. *J Appl Physiol.* 1997 Feb ; 82(2) : 399-403.
- 2) Lambert MI, Noakes TD. Spontaneous running increases VO_2 max and running performance in rats. *J Appl Physiol.* 1990 Jan ; 68(1) : 400-3.
- 3) Yano H, Yano L, Kinoshita S, Tsuji E. Effect of voluntary exercise on

maximal oxygen uptake in young female Fischer 344 rats. *Jpn J Physiol.* 1997 Feb ; 47(1) : 139-41.

- 4) 春日規克, 山下 晋, 小笠原仁美, 鈴木英樹, 辻本尚弥, 石原昭彦. 加負荷式回転車輪によるラットの自発走特性と骨格筋への効果. *体力科学* 1999 ; 48 : 99-110.
- 5) 総理府内閣総理大臣官房管理室 実験動物飼育保管研究. 実験動物の飼養及び保管等に関する基準の解説. 1版. 東京:ぎょうせい, 1980.
- 6) Gorza, L. Identification of novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 1990 ; 38(2) : 257-65.
- 7) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克. ラット腓腹筋外側部表層における筋線維及び毛細血管の老化による変化. *名古屋経済大学・市邨学園短期大学 自然科学研究会誌* 1996 ; 31(1) : 1-13.
- 8) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 藤田慎一, 小笠原仁美, 稲垣 洋, 山下 晋, 春日規克. ラット腓腹筋外側部表層のタイプII単一筋線維におけるミオシン重鎖構成と筋線維横断面積の関係について. *久留米大学保健体育センター研究紀要* 1999 Jul ; 7 : 27-32.
- 9) 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.
- 10) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 梅村義久. 自発走によるラット足底筋ミオシン重鎖アイソフォーム構成比の変化. *久留米大学健康・スポーツ科学センター研究紀要* 2002 Dec ; 10 : 37-44.
- 11) Rodnick KJ, Henriksen EJ, James DE, Holloszy JO. Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles. *Am J Physiol.* 1992 Jan ; 262(1 Pt 1) : C9-14.
- 12) 田中紀子, 林 國興, 堀 清記, ラットにおける自発運動量による骨格筋肥大の性差について, *日本栄養・食糧学会誌* 1997, 50(2) : 111-7.
- 13) Sexton WL. Vascular adaptations in rat hindlimb skeletal muscle after voluntary running-wheel exercise. *J Appl Physiol.* 1995 Jul ; 79(1) : 287-96.
- 14) 竹倉宏明, 大金雅子, 春日規克. 持久的運動がラット心筋細胞内膜系の構造変化に及ぼす影響. *健康医科学* 1999 Mar ; 14 : 110-19.
- 15) Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, II A, II D/X, and II

- B fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol.* 1996 ; 80(1) : 261-70.
- 16) Larsson L, Ansved T, Edström L, Gorza L, Schiaffino S. Effects of age on physiological immunohistochemical and biochemical properties of fast-twitch single motor unit in the rat. *J. Physiol.* 1991 ; 443 : 257-75.
 - 17) Larsson L, Edström L, Lindgren B, Gorza L, Schiaffino S. MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *Am J Physiol.* 1991 ; 261 (Cell Physiol. 30) : C93-101.
 - 18) Hämaläinen M, Pette D. The histochemical profiles of fast fiber types II B, II D, and II A in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. *J Histchem Cytochem.* 1993 ; 41(5) : 733-43.
 - 19) Sieck G C, Zhan W Z, Prakash Y S, Daood M J, Watchko J F. SDH and actomyosin ATPase activities of different fiber types in rat diaphragm muscle. *J Apply Physiol.* 1995 ; 79(5) : 1629-39.
 - 20) 堀田 昇, 内藤久士, 沢田 亨, 富田寿人, 石河利寛. 種々の持久的トレーニングがラットの骨格筋に及ぼす組織化学的および生化学的影響. *東京体育学研究* 1984 ; 11 : 85-91.
 - 21) Ishihara A, Inoue N, Katsuta S. The relationship of voluntary running to fiber type composition, fiber area and capillary supply in rat soleus and plantaris muscles. *Eur J Appl Physiol.* 1991 ; 62 : 211-5.
 - 22) 勝田 茂, 田中 守, 高松 薫. ラットの自発的走運動が骨格筋線維におよぼす影響の組織化学的研究. *筑波大学体育科学系紀要* 1982 ; 5 : 125-34.
 - 23) Ishihara A, Roy RR, Ohira Y, Iyata Y Edgerton VR. Hypertrophy of rat plantaris muscle fibers after voluntary running with increasing loads. *J Appl Physiol.* 1998 ; 84 : 2183-89
 - 24) Garner RP, Terracio L, Borg TK, Buggy J. Intracranial self-stimulation motivates weight-lifting exercise in rats. *J Appl Physiol.* 1991 Oct ; 71(4) : 1627-31.
 - 25) Gute D, Laughlin MH, Amann JF. Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of interval-sprint and low-intensity, endurance-trained rats.

Microcirculation. 1994 Oct ; 1(3) : 183-93.

- 26) Hickson RC, Heusner WW, Van Huss WD, Taylor JF, Carrow RE. Effects of an anabolic steroid and sprint training on selected histochemical and morphological observations in rat skeletal muscle types. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1976 Sep 23 ; 35(4) : 251-9.
- 27) Seburn K, Coicou C, Gardiner P. Effects of altered muscle activation on oxidative enzyme activity in rat alpha-motoneurons. *J Appl Physiol.* 1994 Nov ; 77(5) : 2269-74.
- 28) Seburn KL, Gardiner P. Adaptations of rat lateral gastrocnemius motor units in response to voluntary running. *J Appl Physiol.* 1995 May ; 78(5) : 1673-8.
- 29) Richard L. Lieber. *Skeletal Muscle Structure, Function, & Plasticity: The Physiological Basis of Rehabilitation.* 2nd ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.
- 30) 平野朋枝, 辻本尚弥, 春日規克. 伸張性収縮による筋損傷と運動効果. *体力科学* 2000 ; 48(6) : 782.