

成熟ラット速筋の形態ならびにミオシン重鎖分子種組成に
及ぼす長期非荷重の影響山内 秀樹¹⁾ 刈谷 文彦²⁾ 田端 淳一³⁾ 宮野 佐年¹⁾¹⁾ 東京慈恵会医科大学リハビリテーション医学講座体力医学研究室²⁾ 国際武道大学体育学部 ³⁾ 東京都衛生局医療福祉部

要旨：成熟ラット速筋における長期非荷重の影響を筋線維横断面積，ミオシン重鎖（MHC）分子種発現の変化から検討した。生後6カ月齢のFischer 344系雌ラット20匹を対照群（n = 10）と非荷重群（n = 10）に分けた。非荷重群は後肢懸垂状態で8週間飼育した。実験期間終了後、大腿直筋のタイプ別筋線維横断面積とMHC分子種発現を調べた。筋線維タイプはmyofibrillar ATPase染色から、MHC分子種発現はSDS-PAGEにより決定した。非荷重によりtypeIIb, IIc/x, IIa, I線維の横断面積はそれぞれ34, 29, 25, 26%低下した。MHC分子種の相対的比率は非荷重によりMHCIIbの増加とMHCIIc/xならびにMHCIIaの減少がみられたが、MHCIに変化はみられなかった。以上の結果は、長期非荷重によるMHCIIbの比率増加はタイプ移行によって引き起こされたことを示唆する。

Key words：非荷重，速筋，筋萎縮，筋線維タイプ，ミオシン重鎖

1. はじめに

近年の宇宙ステーション構想により長期宇宙滞在のミッションが増加する傾向にあるだろう。宇宙空間では、真空状態、微小重力、放射線、極端な温度差、閉鎖的空間など特殊な異常環境状態に暴露されるため、様々な身体機能の変化が引き起こされる。とりわけ、微小重力環境はさけることができず、非荷重の影響による筋や骨の萎縮は帰還後の生活活動に支障を来す変化として憂慮される。

これまでの宇宙飛行による骨格筋の変化に関する研究は、2週間程度の短期間の研究が多い。また、長期の宇宙飛行では、筋萎縮を軽減するために何らかのcountermeasureが実施されることから、長期微小重力環境の影響を検討することは困難である。したがって、現時点では、長期非荷重

が骨格筋に及ぼす影響を検討する手段としては、ground-baseの動物実験が有用である。

後肢懸垂モデルは微小重力環境における非荷重をシミュレートするモデルとして頻用されており、その有用性も確認されている [1]。実験動物の後肢懸垂モデルによる非荷重状態が骨格筋に及ぼす影響は筋萎縮と速筋化に特徴づけられる [1]。筋萎縮や速筋化の程度は対象とする実験動物の週齢 [2, 3] や筋の種類 [1, 4, 5] により異なるが、懸垂直後から筋蛋白代謝が分解に傾くため、筋萎縮は懸垂早期からみられる [1, 6]。しかし、タイプ変化に関しては、成熟ラット速筋では萎縮率がほぼプラトーになる懸垂3週間では認められない [6]。本研究では、組織化学的ならびに電気泳動学的手法を用いて、速筋の長期非荷重による筋萎縮とタイプ変化について検討した。

II. 実験方法

A. 実験動物の取り扱い

本実験は日本生理学会の制定した「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」を遵守して行った。実験動物で長期の後肢非荷重による影響を検討した報告は散見されるが、発育期のラットを用いた研究がほとんどである。われわれは、非荷重による発育抑制の影響を除外するために、実験期間中に発育による筋量増加やタイプ変化が認められない成熟ラットを用いた。すなわち、生後6ヶ月齢のFischer 344系雌ラット20匹（実験開始時体重約240g）を被検動物とした。実験に先立ち、各群の平均体重がほぼ同じとなるように、通常飼育の対照群と非荷重群に分け、各群10匹とした。非荷重群は、後肢懸垂状態 [7] で8週間飼育した。なお、実験期間中の固型飼料（MM-3、船橋農場）と水は自由摂取とした。

動物の体重測定後、Pentobarbital sodium（40 mg/kg ip）麻酔下にて、右側大腿直筋を摘出し、湿重量を測定した。その後、動物は上記麻酔薬の過投与により安楽死させた。筋は液化窒素にてあらかじめ冷却されたイソペンタン中で瞬間凍結

し、組織化学的ならびに電気泳動的な分析までフリーザー内（-70℃）で保存した。大腿直筋は組成的にはtypeII優位の速筋であるが（Table 2）、全ての筋線維タイプを有するため、各タイプの筋線維の萎縮やタイプ変化を調べる目的で被検筋とした。

B. Myofibrillar ATPase 染色

各群3検体につき、-20℃下のクライオミクロトーム（Bright, OT/FAS）で厚さ10μmの連続切片を作成し、myofibrillar ATPase染色を行った。アルカリ前処理ATPase染色では、前処理に先立ち4%パラホルムアルデヒド溶液（pH 7.4, 200mM カコジル酸ナトリウム, 1%塩化カルシウム, 11.5%サッカロースを含む）にて、4℃で8分間固定した。その後、冷やした脱イオン水で洗浄し、アルカリ前処理（100mM 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール, 50mM 塩化カリウム, 18 mM 塩化カルシウム, pH 10.4）を室温で15分間行った。酸性前処理（100mM 酢酸ナトリウム, 100mM 塩化カリウム）は20℃でpH 4.3は5分間、pH 4.55は8分間行った。すべての前処理終了後、冷やした脱イオン水で洗浄し、

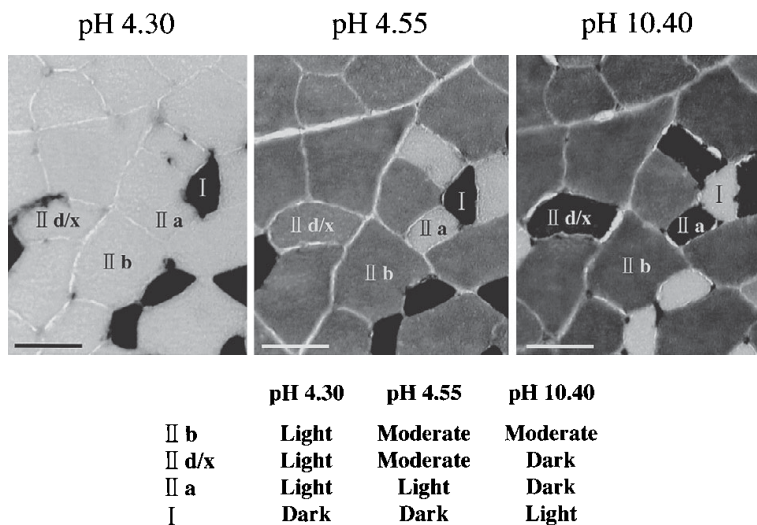


Fig. 1 Serial cross-sections stained for myofibrillar ATPase after pre-incubation at pH 4.30, 4.55, and 10.40 and criteria for fiber type classification. Scale Bar=50 μm.

Table 1. Body weight and rectus femoris wet weight in age-matched control (CON) and 8-week hindlimb unloaded (HU8W) rats

| | CON (n = 10) | HU8W (n = 10) |
|--------------------|--------------|----------------|
| Body weight (g) | 237.8 ± 12.3 | 218.8 ± 12.8 * |
| Muscle weight (mg) | 661.4 ± 30.3 | 559.8 ± 43.5 * |

mean ± S.D. * significantly different ($p < 0.05$) from CON by using unpaired t-test.

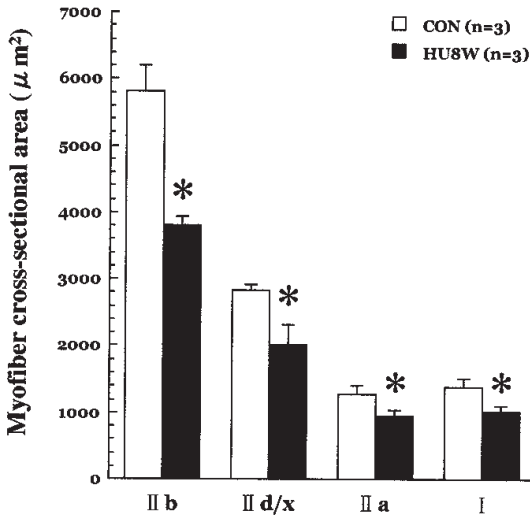


Fig. 2 Myofiber cross-sectional area of each type in rectus femoris muscle from age-matched control (CON) and 8-week hindlimb unloaded (HU8W) rats. Fiber types were determined by staining density for myofibrillar ATPase (see Fig. 1). * significantly different ($p < 0.05$) from CON by using unpaired t-test.

37℃で30分間、インキュベーション (100mM 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール, 50mM塩化カリウム, 18 mM塩化カルシウム, 3.1mMアデノシン三リン酸ナトリウム, pH 9.4) した。その後, 1%塩化カルシウム溶液で洗浄, 2%塩化コバルト溶液に浸漬, 脱イオン水で洗浄後, 1%硫化アンモニウム溶液中で発色させた。標本は通常のエタノール脱水, キシレン透徹を施し, グリセリンゼリーで封入した。前報 [8] にしたがって分析対象エリアの選択ならびに画像処理を行い, Fig. 1の基準にしたがってtypeIIb, II d/x, IIa, I線維を同定した。タイプ決定された筋線維を無作為に抽出し, 各タイプにつき150~200本の筋線維

につき, NIH image (ver. 1.61) により筋線維横断面積を測定した。

C. ミオシン重鎖 (MHC) 分子種解析

タイプ変化の指標として, MHC分子種の相対的比率を算出した。まず, Tsika et al [9] の方法にしたがって, 全筋をポリトロンホモジナイザーを用いて均質化した後, 筋原線維蛋白を抽出し, Talmadge & Roy [10] の方法によりSDS-PAGEに展開し, MHC分子種を分離した。スタッキングゲル及びセパレートゲルに含まれるアクリルアミドは, それぞれ4%, 8%とした。電気泳動は10℃以下の条件下において, サンプルがスタッキングゲルを通過するまで60V, その後は100Vで22時間行った。その後, 銀染色 (和光純薬) にて可視化した。MHC分子種の相対的比率は乾燥ゲルをスキャナーにてパーソナルコンピュータに取り込み, NIH image (ver. 1.61) を用いて算出した。

D. 統計処理

結果は平均値±標準偏差で示した。群間における有意性の検定はF検定により等分散を確認した後, unpaired t-testを実施し, 危険率5%未満を有意とした。

III. 結果

非荷重群の体重ならびに大腿直筋の湿重量は対照群に比べ低値を示した (Table 1)。非荷重群のタイプ別筋線維横断面積は対照群に比べtypeIIb, II d/x, IIa, I線維でそれぞれ34, 29, 25, 26%低下した (Fig. 2)。大腿直筋にはいずれの群においても全てのadult typeのMHC分子種が確認さ

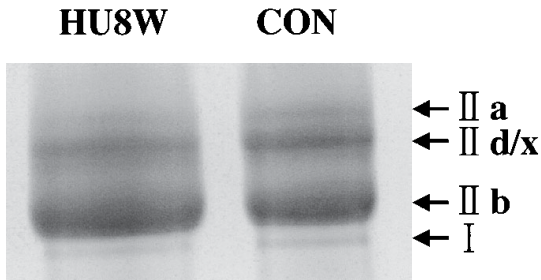


Fig. 3 Electrophoretic separation of myosin heavy chain isoforms in rectus femoris muscle from age-matched control (CON) and 8-week hindlimb unloaded (HU8W) rats.

れた (Fig. 3). MHC 組成を両群で比較すると、対照群に比べ非荷重群では MHCIIb の増加と MHCII d/x, IIa の低値を認めたが、MHCI に差はみられなかった (Table 2).

IV. 考 察

筋線維の萎縮に関するタイプ依存性は筋の種類によって異なることが報告されている。

Riley et al [11] は宇宙飛行ラットのヒラメ筋では SO (typeI) 線維の萎縮が、逆に長指伸筋では FG (typeIIb) 線維の萎縮が顕著であることを認めている。同様の傾向は Kraemer et al [12] によっても報告されている。また、彼らは腓腹筋の白色 (表層) 部では typeIIb 線維が、赤色 (深層) 部では typeIIa と I 線維の萎縮が顕著であるように、筋内での部位特異性も観察している。これらの先行研究結果は、その筋や筋の部位において構成比率の高い、あるいは筋線維の最も太いタイプにおいて顕著な萎縮が起こる可能性を示唆している [12]。本研究において、構成比率が最も高く、横断面積の最も大きい typeIIb 線維の萎縮率が顕著であった成績は先行研究結果を支持する。

非荷重による萎縮と速筋化は typeI 優位な遅筋のヒラメ筋に比べ、速筋では程度が少なく、また進行も遅い [4, 13]。成熟ラットの速筋の一つである足底筋の非荷重による変化を検討した報告によれば、およそ 3 週間で萎縮はプラトーに達するが、筋線維のタイプ変化はみられないことが示さ

Table 2. Relative distribution of myosin heavy chain isoforms of rectus femoris muscle in a age-matched control (CON) and 8-week hindlimb unloaded (HU8W) rats

| | CON (n = 7) | HU8W (n = 6) |
|-------------|-------------|--------------|
| %MHC II b | 44.9 ± 3.0 | 61.2 ± 2.8 * |
| %MHC II d/x | 30.8 ± 1.6 | 23.8 ± 3.1 * |
| %MHC II a | 17.7 ± 3.5 | 9.1 ± 1.8 * |
| %MHC I | 6.6 ± 1.5 | 5.9 ± 2.5 |

Mean ± S.D. *significantly different ($p < 0.05$) from CON by using unpaired t-test.

れている [6]。同様に、MHC 分子種発現を調べた報告においても、ヒラメ筋では MHCII d/x の増加が観察されたのに対し、足底筋では MHC 分子種発現に変化はみられないことが報告されている [14]。したがって、本研究の加齢段階 (生後 6 から 8 カ月齢) では、3 週間の非荷重状態では速筋のタイプ変化は生じない時期であると考えられる。結果として、8 週間の非荷重により typeII サブタイプ間での typeIIa から IIb 方向へのシフトが観察された。したがって、成熟期における速筋のタイプ変化は長期の非荷重によって生じるものと結論される。MHCI の比率が少ない速筋においては、非荷重によって MHC I の減少がみられたとしても変化は僅かであること [4, 13] から、主に typeII のサブタイプ内での変化によって非荷重に対して適応するものと考えられる。MHC 分子種発現は、既存のタイプに新たな異なる分子種の発現 (タイプ移行) と筋線維の横断面積変化に影響される。本研究では typeIIb 線維の萎縮率が最も高かったにもかかわらず、MHCIIb の増加が観察されたことから、MHC 分子種構成比率の変化はタイプ移行によって引き起こされたものと推察される。

文 献

1. Thomason DB & Booth FK : Atrophy of soleus muscle by hindlimb unweighting. J Appl Physiol 68 : 1-12, 1990.
2. Ansved T : Effects of immobilization on soleus muscle in relation to age. Acta Physiol Scand 154 : 291-

- 302, 1995.
3. Saitoh A, Okumoto T, Nakano H, Wada M & Katsuta S : Age effect on expression of myosin heavy and light chain isoforms in suspended rat soleus muscle. *J Appl Physiol* 86 : 1483-1489, 1999.
 4. Diffie GM, Caiozzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM : Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension. *Am J Physiol* 260 : C528-534, 1991.
 5. Winiarski AM, Roy RR, Alford EK, Chiang PC, Edgerton VR : Mechanical properties of rat skeletal muscle after hind limb suspension. *Exp Neurol* 96 : 650-660, 1987.
 6. 山内秀樹, 宮野佐年, 田端淳一, 米本恭三 : 後肢懸垂に伴う速筋における筋線維組成変化. *体力科学* 48 : 668, 1999.
 7. 山内秀樹 : 退行性筋萎縮に対する防止法としての筋運動とアナボリックステロイド投与の効果. *日生誌* 58 : 331-340, 1996.
 8. 山内秀樹, 田端淳一, 遠藤千草, 宮野佐年 : ラット足底筋の組織化学的特性と非荷重による変化—長軸方向の部位間での比較—. *リハ医学* 38 : 832-838, 2001.
 9. Tsika RW, Herrick RE, Baldwin KM : Time course adaptations in rat skeletal muscle isomyosins during compensatory growth and regression. *J Appl Physiol* 63 : 2111-2121, 1987.
 10. Talmadge RJ, Roy RR : Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* 75 : 2337-2340, 1993.
 11. Riley DA, Ellis S, Slocum GR, Satyanarayana T, Bain JLW, Sedlak FR : Hypogravity-induced atrophy of rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *Muscle Nerve* 10 : 560-568, 1987.
 12. Kraemer WJ, Staron RS, Gordon SE, Volek JS, Koziris P, Duncan ND, Nindl BC, Gonez AL, Marx JO, Fry AC, Murray JD : The effects of 10 days of spaceflight on the shuttle Endeavour on predominantly fast-twitch muscles in the rat. *Histochem Cell Biol* 114 : 349-355, 2000.
 13. Haddad F, Qin AX, Zeng M, McCue SA, Baldwin KM : Interaction of hyperthyroidism and hindlimb suspension on skeletal myosin heavy chain expression. *J Appl Physiol* 85 : 2227-2236, 1998.
 14. 山内秀樹, 刈谷文彦, 遠藤千草, 宮野佐年 : 高齢期の廃用性筋萎縮に対するビタミンE補充の効果. *体力科学* 50 : 762, 2001.