

スポーツ適性という立場からの骨格筋に関する基礎的研究

A Basic Study on the Skeletal Muscle from the Standpoint of Sports Aptitude

1. 一般人のパフォーマンステストの成績による筋線維組成推定法
2. ミオシンの重鎖成分から見た筋組成
3. 速筋線維サブグループ間での張力特性の比較
4. ラット骨格筋単一筋線維の組織化学的筋線維タイプの分類
5. 骨格筋線維組成に及ぼす低圧とトレーニングの影響 II
—性差について—

筑波大学	勝田	茂
(共同研究者)	金沢大学	北浦 孝
	愛知教育大学	春日 規克
	山口大学	的場 秀樹
	神戸大学	伊藤 一生

スポーツでよい成績をあげるためには、技術、体力のいろいろな部面にわたって適性を有していることが不可欠であるが、いかにして各種目に適した人材を発掘し、これを育てて行くかはわが国のスポーツ界にとっても重要な課題である。近年、筋線維組成もこれら適性を知るための有力な因子の1つになりつつある。しかし、基礎的な研究の不足のために、十分スポーツの現場で実用的に役立つレベルにはいたっていない。

本年度は研究テーマの1つとして、バイオプシー（筋生検）を行わないで、ランニングなどのパフォーマンステストから筋線維組成を推定することができるかどうかを一般人を対象として検討した。さらに筋線維タイプの生理学的、生化学的な新しい観点からの検討、低圧環境とトレーニングなどに関する検討を試みた。これらの研究テーマに関する報告を通じて、スポーツ適性の開発および、トレーニングという面で、スポーツ界や学校

における教育の場において、やがて重要性が理解され、利用されることを願うものである。本報告

はその内容が多岐にわたるので、各分担研究者の成果をそれぞれ報告した。

1. 一般人のパフォーマンステストの成績による筋線維組成推定法

筑波大学 勝 田 茂

(共同研究者) 同 久 野 譜 也

Estimation of Muscle Fiber Composition Using Performance Test in Untrained Men

by

Shigeru Katsuta and Shin-ya Kuno

University of Tsukuba, Institute of Health and Sports Sciences

ABSTRACT

This study was undertaken to investigate whether or not fiber composition (% area FT) of M. vastus lateralis from untrained men could be estimated from the results of performance test, in which they performed a 50m dash and a 12min running. As a result, there was a significant positive correlation between % area FT in the M. vastus lateralis and 50m dash velocity/12min running mean velocity ratio ($r=0.763$, $p<0.05$).

Thus, it appears that there is a good possibility of predicting muscle fiber composition in untrained men from the results of performance test used in this study.

要 旨

パフォーマンステストの成績から一般人の外側広筋の筋線維組成(% area FT)の推定が可能かどうかについて検討した。10人の一般男子学生に対しニードルバイオプシー法を用いて、それぞれの筋線維組成を調べた。また、パフォーマンステストとして、50m走、12分間走を実施した。推定

のモデルには、筋線維組成と相関が高い($r=0.763$) 50m走の平均速度と12分間走の平均速度の比(50mV/12minV)との回帰方程式 $y=64.807x-52.42$ を用いた。実際に得られた筋線維組成と推定によって得られた筋線維組成の誤差は、平均で $7.5\pm 4.0\%$ であり、最大が13.2%、最小が3.3%であった。誤差が10%以上を示した被検者は、12分間走において真の力が発揮されなかった

可能性が示唆された。

これらの結果より、一般人の外側広筋の筋線維組成を推定することは可能であると考えられる。

緒 言

いくつかの種目のスポーツ選手は特異的な筋線維組成を持つことがこれまでに数多く報告されている^{4,5,8)}。それらによると、持久能力に競技成績が左右される選手の主働筋には遅筋線維の占める割合が高いのに対し、短時間に瞬発力を必要とする選手には、速筋線維の占める割合が高いことが認められている。また、筋線維組成は先天的に決定されており、後天的には変化しにくいとされている^{1,7)}。このことは、あるスポーツ種目に適した筋線維組成が存在することを示しており、筋線維組成がスポーツ適性を占う上で重要なファクターの一つになり得ることを示している。

筋線維組成を直接法で調べるためには、ニードルバイオプシーを実施しなければならない。これは、直接生体から筋標本を得られるという利点がある一方、簡便には行えず、また子どもには実施しにくいという問題点がある。そのため、筋線維組成を間接的に求める方法が望まれる。Katsuta and Takamatsu¹⁰⁾は、パフォーマンステスト(50 m走と12分間走)を用いて鍛錬者の筋線維組成の推定を試みており、その結果、これらのパフォーマンステストによって高い精度で筋線維組成を推定できる可能性を示唆した。しかし、被検者は鍛錬者のみしか用いておらず、非鍛錬者である一般人に対する検討はなされていない。

そこで本研究は、一般人を対象にパフォーマンステストを用いて、筋線維組成の推定が可能であるかどうかについての検討を行った。

方 法

a) 被検者

被検者として、運動部などで特別に規則的なト

レーニングをしていない、また体育を専攻としない男子学生(ボランティア)10名を用いた。被検者各個人の年齢、身長、体重、および全員の平均値については、表1に示した。

表1 Physical characteristics of subjects

No.	Subjects	Age (yrs)	Height (cm)	Weight (kg)
1	A.K.	18	170.3	63.4
2	H.I.	19	178.9	66.4
3	H.S.	20	170.6	61.8
4	M.A.	18	177.6	66.4
5	S.H.	19	183.1	74.5
6	K.U.	20	172.9	57.9
7	A.O.	20	169.4	59.5
8	K.T.	19	173.5	62.1
9	M.I.	20	167.8	58.3
10	M.N.	18	160.5	53.9
	\bar{X}	19.1	172.5	62.4
	S.D.	0.9	6.5	5.8

b) 組織化学的分析

ニードルバイオプシー法⁹⁾によって、被検者の右外側広筋(M. vastus lateralis)から、約20—30mgの筋を採取し、連続凍結切片を作成した。これに、Myosin ATPase染色¹²⁾とDPNH-diaphorase染色¹¹⁾を施し、Gollnickら⁶⁾の方法に従って速筋線維(FT線維)と遅筋線維(ST線維)に分類し、それぞれの比率(%FT, %ST)を算出した。

また、筋線維タイプ別の平均横断面積を算出し、それぞれに%FTと%STを乗ずることによって、総面積に占めるFTおよびST線維の面積比(%area FT, %area ST)を算出した。

c) パフォーマンステスト

無酸素的パワーの測定として50m走、有酸素的パワーの測定として12分間走とトレッドミルを用いた速度漸増負荷法によるExhaustion testを行い、最大酸素摂取量($\dot{V}O_2\max$)を測定した。

d) 筋線維組成の推定

筋線維組成 (%FTと %areaFT) とパフォーマンステストの各変数, 1) 50m走の平均速度 (50mV), 2) 12分間走の平均速度 (12minV), 3) 50m走と12分間走の平均速度の比 (50mV/12minV), 4) 最大酸素摂取量 ($\dot{V}O_2\max$), との関係を求め, 筋線維組成を推定するのに適したモデルを検討した.

結果と考察

a) 筋線維組成とパフォーマンステスト

表2に, 各被検者の%FT, %areaFT, 50mV, 12minV, 50mV/12minV, $\dot{V}O_2\max$ の測定値および平均値を示した. %FT, %areaFTは, 全被

検者の平均がそれぞれ56.5%, 59.1%であり, 勝田ら⁸⁾が報告している日本人健康青年男子の53.7%, 53.5%とほぼ同様な値を示した. さらに, 全被検者の%FT, %areaFTの範囲は, 37.6~71.4%, 39.7~74.6%と広範であった. このことから, 本研究の被検者は, 特異な筋線維組成を持つ集団ではなく一般的な集団であると思われる.

筋線維組成 (%FTと %areaFT) とパフォーマンステストの各パラメータとの関係を表3に示した. 筋線維組成と高い相関を示したパラメーターは, $\dot{V}O_2\max$ (%FT; $r=-0.823$, $p<0.01$, %areaFT; -0.784 , $p<0.01$) と 50mV/12minV (%FT; $r=0.728$, $p<0.05$, %areaFT; $r=0.763$, $p<0.05$) であった.

表2 Histochemical characteristics and results of performance test of individual subject

No.	Subjects	%FT (%)	%areaFT (%)	50mV (m/sec)	12minV (m/sec)	50mV/12minV	$\dot{V}O_2\max$ (ml/kg/min)
1	A.K.	71.4	71.1	7.34	4.10	1.79	48.8
2	H.I.	70.4	74.6	7.65	4.05	1.89	49.2
3	H.S.	69.1	76.1	7.76	4.32	1.79	56.8
4	M.A.	53.1	54.1	7.50	4.43	1.69	63.2
5	S.H.	61.4	64.6	7.52	3.75	2.01	53.6
6	K.U.	57.6	60.8	7.51	4.52	1.66	66.4
7	A.O.	43.7	44.3	7.06	4.46	1.45	60.2
8	K.T.	38.4	41.2	7.59	4.72	1.58	64.1
9	M.I.	62.3	64.6	7.13	4.10	1.74	53.2
10	M.N.	37.6	39.7	7.14	4.52	1.61	72.6
	\bar{X}	56.5	59.1	7.42	4.34	1.72	58.8
	S.D.	12.9	13.7	0.24	0.34	0.16	7.8

表3 Correlation coefficients between muscle fiber composition and results of performance test

	50mV	12minV	50mV/12minV	$\dot{V}O_2\max$	%FT
50mV					
12minV	-0.216				
50mV/12minV	0.511	-0.945**			
$\dot{V}O_2\max$	-0.206	0.654*	-0.646*		
%FT	0.425	-0.724*	0.728*	-0.823**	
%areaFT	0.504	-0.710*	0.763*	-0.784**	0.990**

* : $p<0.05$ ** : $p<0.01$

パフォーマンステストの成績から筋線維組成を推定する場合には、①できるだけ精度のよい推定法を用いること、②簡単で、しかも③誤差の少ない測定方法を用いることなどが適切であると考えられる。本研究では、 $\dot{V}O_2\max$ と %FT との間に最も高い相関関係が得られたが、上述の3条件と関連づけて検討すると、 $\dot{V}O_2\max$ の測定は必ずしも簡便とは言えない。そこで、 $\dot{V}O_2\max$ に次いで相関係数が高い ($r=0.763$) $50\text{mV}/12\text{minV}$ を用いて筋線維組成の推定を行うのが、方法上からも、また筋機能を反映している点からも望ましいと考えられる。これに関して Katsuta and Takamatsu¹⁰⁾ は、鍛錬者に対して同様なモデルを用いて筋線維組成の推定を行い、相関係数 $r=0.896$ ($p<0.001$) を得ている。

b) 筋線維組成の推定

図1は、 $50\text{mV}/12\text{minV}$ と %areaFT との関係を示した。両者の間には有意な相関関係 ($r=0.763$) が認められたので、回帰方程式 $y=64.807x-52.42$ を用いて筋線維組成の推定を行った。

表4に、全被検者の筋生検によって実際に得られた %areaFT と推定によって求めた %areaFT の差を示した。両者の差の平均は、 $7.5\pm 4.0\%$ であった。10人の被検者の中で誤差が最も大きかったのは被検者S.H.で13.2%、誤差が10%以上を示した者は他に2名であった。一方、最も誤差の小さかったのは被検者M.A.で3.0%であった。

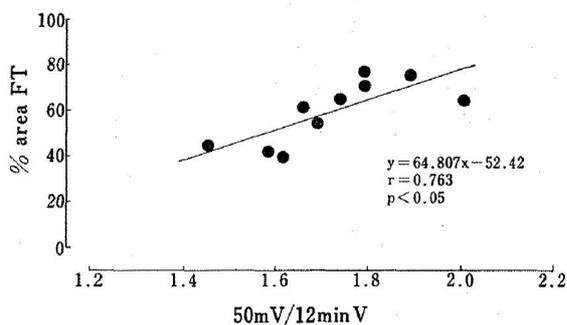


図1 Relationship between %areaFT fibers in M. vastus lateralis and $50\text{mV}/12\text{minV}$

表4 Differences of measured %areaFT and estimated %areaFT

No.	Subjects	%areaFT (%)	Estimated %areaFT (%)	Difference (%)
1	A.K.	71.1	63.6	7.5
2	H.I.	74.6	70.1	4.5
3	H.S.	76.1	63.6	12.5
4	M.A.	54.1	57.1	3.0
5	S.H.	64.6	77.8	13.2
6	K.U.	60.8	55.2	5.6
7	A.O.	44.3	41.0	3.3
8	K.T.	41.2	50.0	8.8
9	M.I.	64.6	60.3	4.3
10	M.N.	39.7	51.9	12.2
	\bar{X}	59.1	59.1	7.5
	S.D.	12.9	10.5	4.0

Blomstrand and Ekblom⁴⁾ は、ニードルバイオプシー法を用いて同一人における左右の脚からと、同一脚から二度筋組織を採取するという実験を行った(被検筋はいずれも外側広筋)。それによると、左右の外側広筋の組成の違いは約10%認められ、同一脚から二度バイオプシーを行った場合には、約5%の相違が認められた。このような誤差は、微量の筋を採取し、その横断面より筋線維組成を決定している以上やむをえないことであろう。実際にニードルバイオプシーを実施し、筋線維組成の決定を試みても約5~10%の誤差が考えられるのに対し、本研究の %areaFT の推定値による誤差は平均で7.5%、最大でも13.2%であった。したがって、本研究の推定法はかなり高い精度で %areaFT を推定していると考えられる。

筋線維組成の推定誤差が10%以上を示した被検者は10名中3名であったが、その中で2名は実際の %areaFT より速筋型に推定値が示された。この原因を検討してみると、12分間走におけるパフォーマンスが十分に発揮されなかった可能性が考えられる。12分間走のパフォーマンスは、気候条件、被検者のコンディション、モチベーションなどの要因に影響されやすいことが予想されるた

め、12分間走において真のパフォーマンスが得られているかどうかを検討する必要がある。12分間走は $\dot{V}O_2\max$ と高い相関関係を持ち、12分間走の値から $\dot{V}O_2\max$ を推定するために、 $\dot{V}O_2\max$ の推定表が作成されている²⁾。

そこで、本研究の被検者について、逆に $\dot{V}O_2\max$ から12分間走を推定してみると、推定した筋線維組成の誤差が10%以下の7人の被検者は、12分間走のパフォーマンスが $\dot{V}O_2\max$ から推定した値とほぼ一致するのに対し、最も誤差の大きかった被検者S.H.は、実際の12分間走のパフォーマンスが推定値よりも約200m低く示された。 $\dot{V}O_2\max$ から考えれば、この被検者はあと200m高いパフォーマンスが予想されるが、それがなされていないために、%areaFTの推定値が実際の値より速筋型に示されたものと考えられる。そのため、本研究における推定法では、12分間走テストにおいて信頼のおけるデータを得ることが重要であろう。

Katsuta and Takamatsu¹⁰⁾は、50mV/12minVより鍛錬者の外側広筋の%areaFTを回帰直線 $y = 76.3x - 68.6$ を用いて推定している。この回帰直線は、本研究の回帰直線 $y = 64.807x - 52.42$ と傾き・切片とも異なっており、一般人の筋線維組成の推定式は鍛錬者の推定式と区別する必要性が示唆された。

最後に、50m走の平均速度と12分間走の平均速度の比によって、高い精度で筋線維組成を推定できる可能性が示唆された。これは、ニードルバイオプシーが簡便に行えないことを考えると、教育現場などにおいてより有効な筋線維組成の推定法になり得るものと思われる。今後、さらに精度を増すために例数を増やして、確実に応用できる推定式の決定が課題である。

文 献

1) Andersen, P. and J. Henriksson; Training

- induced changes in the subgroups of human type II skeletal muscle fibers. *Acta Physiol. Scand.*, **99** : 123—125 (1977)
- 2) 浅見俊雄; 体力診断, スポーツによる健康づくり運動カルテ, 体育科学センター(編), 講談社, 東京, p48—49 (1983)
- 3) Bergström, J.; Muscle electrolytes in man. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **14**, Suppl., 68 (1962)
- 4) Blomstrand, E. and B. Ekblom; The needle biopsy technique for fibre type determination in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.*, **116** : 437—442 (1982)
- 5) Costill, D.L., W.J. Fink and M.L. Pollock; Muscle fiber composition and enzyme activities of elite distance runners. *Med. Sci. Sports*, **8** : 96—100 (1976)
- 6) Gollnick, P.D., R.B. Armstrong, C.W. Saubert IV, K. Piehl and B. Saltin; Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. *J. Appl. Physiol.*, **33** : 312—319 (1972)
- 7) Gollnick, P.D., R.B. Armstrong, B. Saltin, C. W. Saubert IV, W.L. Sembrowich and R.E. Shepherd; Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, **34** : 107—111 (1973)
- 8) 勝田茂, 麻場一徳, 田淵健一, 高松薫, 田中守; ニードルバイオプシー法による日本人健康青年男子の筋線維組成. 筑波大学体育科学系紀要, **8** : 173—179 (1985)
- 9) 勝田茂, 宮田浩文, 麻場一徳, 土肥徳秀; ニードルバイオプシー法による各種スポーツ選手の筋線維組成および毛細血管について. 筑波大学体育科学系紀要, **9** : 175—180 (1986)
- 10) Katsuta, S. and K. Takamatsu; Estimation of muscle fiber composition using performance tests. *Biomechanics X-B* : (1986)
- 11) Novikoff, A.B., W. Shin and J. Drucker; Mitochondrial localization of oxidative enzymes; Staining results with two tetrazolium salts. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9** : 47—61 (1961)
- 12) Padykula, H.A. and E. Herman; The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* **3** : 170—195 (1955)

2. ミオシンの重鎖成分から見た筋組成

金沢大学 北 浦 孝

Muscle Composition by Myosin

Heavy Chains Isoforms

Takashi Kitaura

College of Liberal Arts,

Kanazawa University

ABSTRACT

Muscle compositions were determined by the fast and slow myosin heavy chains isoforms and were compared to the histochemical muscle fibers compositions reported.

Muscles were obtained from a 9-week-old male Sprague-Dawley rat (310g). The soleus, the extensor digitorum longus, the plantaris, the red portion of the gastrocnemius, the white portion of the vastus lateralis the diaphragm, and the left ventricle muscles were examined with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The fractionated myosin heavy chain isoforms were quantified with the densitometric method.

Muscle compositions determined with heavy chain isoforms were similar to the reported results with histochemical methods. These biochemical results support the use of the histochemical method to examine the sports aptitude.

要 旨

筋組成を速筋型と遅筋型のミオシンの重鎖成分の異種性から検討を行い、組織化学的筋線維組成との関係を調べた。生後9週齢（体重310g）の雄ラット（Sprague-Dawley系）からヒラメ筋、長指伸筋、足底筋、腓腹筋赤色部、外側広筋白色部、横隔膜、左心室筋を採取し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により速筋型と遅筋型ミオ

シンの重鎖成分を分画し筋におけるその割合を求め、報告されている組織化学的方法による筋線維組成の結果と比較した。

ミオシンの重鎖成分の異種性により求めた筋組成は組織化学的方法により決定されている筋線維組成と比較的一致した結果が得られることが示された。これはスポーツ適性を検討する上で利用される組織化学的方法による筋線維組成が基礎科学的にも妥当なものである可能性が認められたこと

を意味する。

1. 緒 言

筋肉における筋線維タイプの分布比率（筋線維組成）が一流の競技選手の競技成績と密接な関係があると言う事実から筋線維組成を調べることがしばしば行われる^{6,9)} これは筋線維が現在のところ収縮特性という意味において速筋線維と遅筋線維に大別できることによる。そしてこの収縮特性を規定しているものは収縮タンパク質の一つでATPaseであるミオシン²⁾の異種性である。すなわち速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンの存在によって筋線維タイプが決定されるのである。ミオシンの分子構造に関する詳細な研究進歩がめざましく^{10,14)}、その異種性は基本構造の軽鎖成分の違いで決められることが多かった^{7,8,10)}、しかし、Billeterら³⁾が組織化学的方法による結果がむしろもう一つの重鎖成分と関係が深いことを示唆し、生化学的結果の再吟味が必要となってきた。スポーツ適正やトレーニング効果を組織化学的方法でより正確に評価するための基礎研究として、今回はそのミオシンの重鎖成分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法⁵⁾により容易に検討することが可能になったので従来から行われている組織化学的方法による結果と比較検討することを目的として行った。

2. 実験方法

筋試料はネブタールにより麻酔をした9週齢のSprague-Dawley系雄ラット（体重310g）のヒラメ筋（SOL）、長指伸筋（EDL）、足底筋（PLA）、腓腹筋赤色部（RGA）、外側広筋白色部（WVL）、横隔膜（DPH）、左心室筋（VEN）を骨格筋と心筋として採取し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結した。凍結した試料はステンレス製試料粉碎器で処理しミオシン抽出液（50 mM NaPPi pH 8.8, 5mM DTT, 0.4M NaCl,

5mM EGTA, 100unit/ml, 0.05 μ g/ml

Leupeptin, 0.1mg/ml PMSF)にて抽出（4 $^{\circ}$ C）を行い、続いて20分間遠心分離（3000xg, 4 $^{\circ}$ C）を行った。粗ミオシン上澄み液は最終濃度 2mM SDS, 125mM Tris-HCl(pH 6.8), 5%2-MEとなるような試料作成溶液にて 95 $^{\circ}$ C で5分間の加熱処理を行った。冷却後約150ngのミオシンが重鎖成分の分析のためにSDS-ポリアクリルアミドゲルの試料泳動溝に入れられた。

電気泳動はミニスラブゲル電気泳動装置を用いCarraro & Cataniの方法⁵⁾に従って行った。濃縮ゲルの濃度は4%で分離ゲルは5%（架橋度は2.6%）であった。泳動は泳動先端マーカーが濃縮ゲル中は40V、分離ゲル中は140Vの定電圧で約3時間室温で行われた。ミオシン重鎖成分の分離のための最適条件は前もって行われた数回の試行によって決定された。泳動後ゲルはOakleyらの方法¹²⁾に従って銀染色が施された。その後ミオシン重鎖成分はデンストメーター（550nm）にて定量された。

タンパク質の濃度はLowryらの方法¹¹⁾に従い牛血清アルブミンを標準として決定された。

筋線維組成を示す組織化学的方法による資料はこれまでに報告されているもののうちできるだけ動物の種類や大きさなど条件の近いものを選んで採用した。

3. 実験結果

現在までに確認されているミオシン分子の基本構造の一般的モデルを図1に示した。従来は速筋

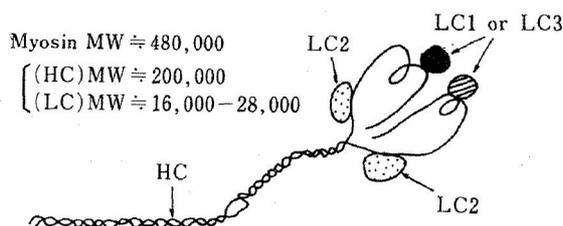


図1 ミオシン分子の基本構造モデル

表1 組織化学的方法による結果とミオシンのサブユニットとの関係³⁾
(左端の FG・FOG・SOと右端の TF・I・TS は著者加筆)

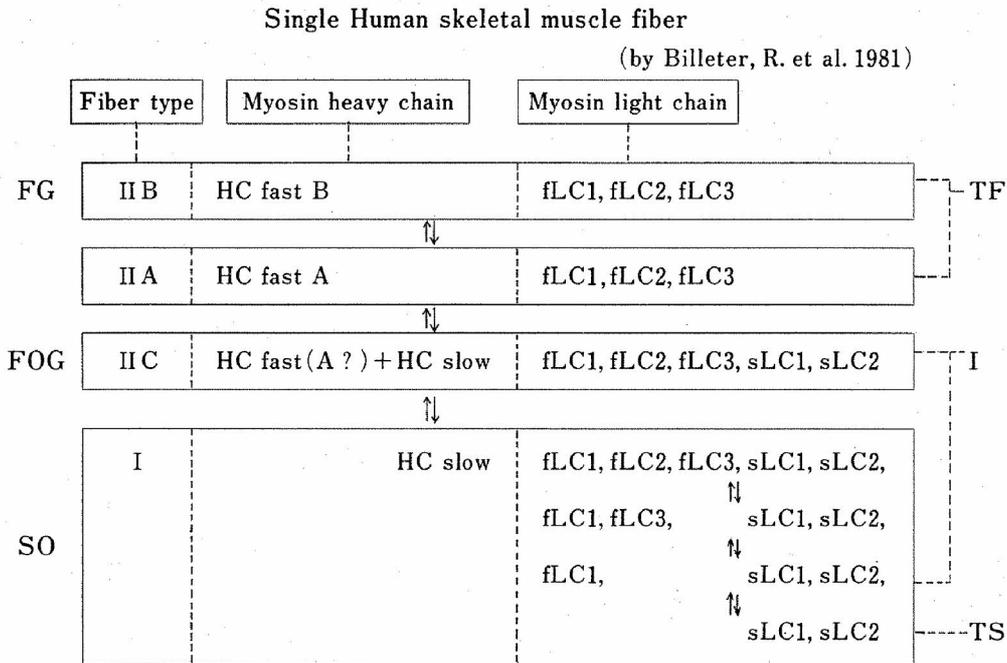


表2 ミオシンのサブユニットのアイソフォームの数

Source	Heavy Chain	Light Chain
	No.	No.
Skeletal muscle		
Fast	2	3
Slow	1	3
Neonatal	1	
Embryonic	1	1
Cardiac muscle		
Ventricular	2	2
Atrial	1	2
Smooth muscle	1	2
Nonmuscle	2	

型と遅筋型のミオシンの分類は軽鎖成分 (LC1, LC2, LC3) の違いにより行われていて重鎖成分 (HC) では区別が困難であった。Billeter ら³⁾ が報告した組織化学的方法による結果とミオシンのサブユニットとの関係を表1に示した。また現在までに報告されているミオシンのサブユニットのアイソフォームの数を表2に示した。今回行った電気泳動における分離状態の時間的変化の一例を図2に示した。分離開始後1時間では速筋型と遅

筋型の区別は困難である。しかし、3時間後では容易に区別が可能となった。全試料の泳動結果を図3に示した。速筋と言われるEDLではほぼ完全に速筋型のミオシンの重鎖成分だけであるのに対し一般に遅筋の代表とされるヒラメ筋は大部分が遅筋型のミオシンであるが若干速筋成分が混在しているのが確認できる。通常遅筋型のミオシンと類似したものとして考えられる心筋のミオシンは重鎖成分がむしろ速筋型のものによく似た移動を示しているのが特徴的である。

これらの定量した結果と他の文献^{1,4,13)}より採用した組織化学的方法による筋線維組成の結果を表3にまとめて示した。

4. 考 察

本研究においてミオシン重鎖成分の筋における分布の割合が従来から利用されている組織化学的方法による筋線維組成とかなり近い値を示すことがうかがえた(表3)。ミオシンの重鎖成分の割合はその分子構造の大きさを考えた場合ミオシンを十分に反映している(図1)のでその割合はミオシン

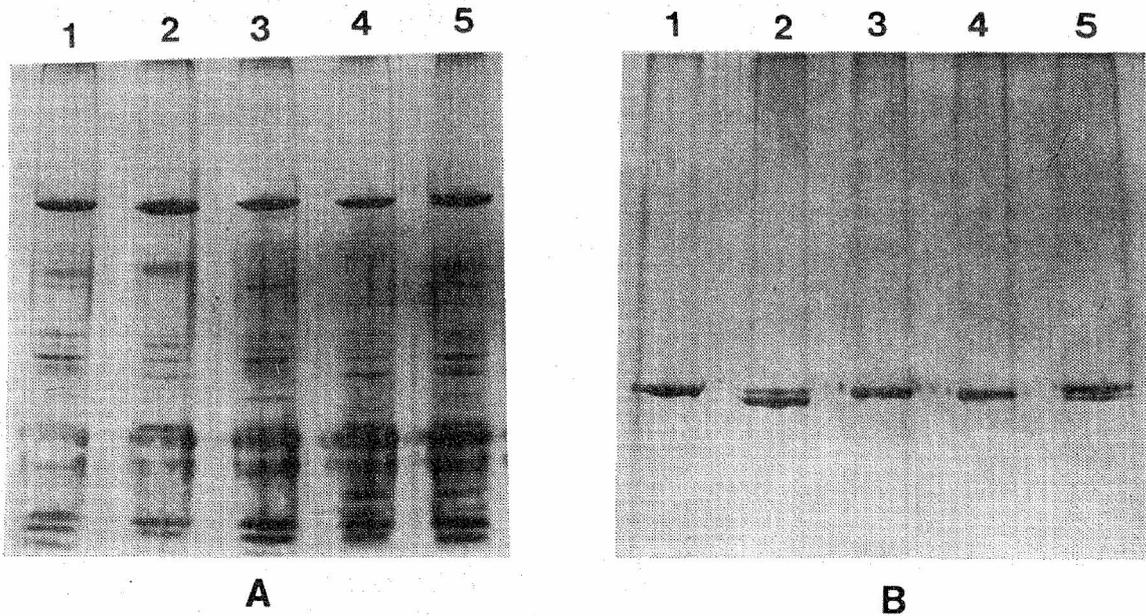


図2 ミオシン重鎖成分の電気泳動における時間変化。
左側は泳動後約1時間、右側は約3時間後の結果を表している。
1) EDL; 2) SOL; 3) WVL; 4) PLA; 5) RGA

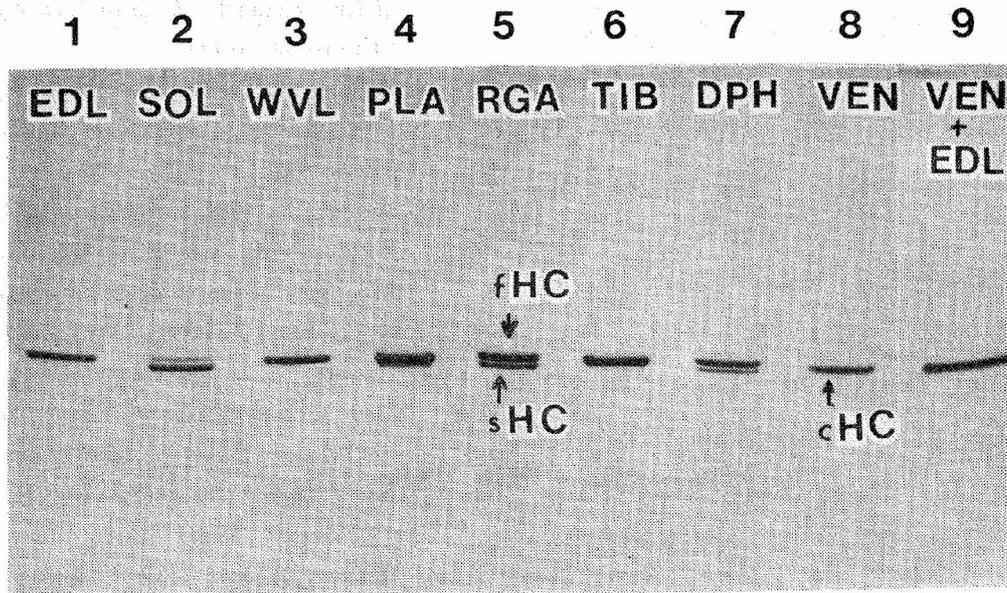


図3 各筋におけるミオシン重鎖成分の電気泳動による分離結果。
図中の略語は本文の実験方法参照

の異種性の割合に等しいと考えることができる。
ところでこの方法における試料の採取方法を考慮
した場合ミオシンの含量は3次元的情報の結果で
あるから数の割合で求められる筋線維組成は1次
元的情報であり本結果を評価する場合はそれらの
情報次元差を慎重に検討してみる必要がある。

すなわち、もう一つの筋の特徴を評価する組織
化学的方法は筋線維面積比(例 %STarea)であ
る。これは2次元的情報であり、筋線維が筋の肥
大との関係で調べられる場合には必要不可欠の測
定因子である。一本の筋線維内におけるミオシン
の分布がすべての種類の筋線維において均一であ

表3 筋のミオシン重鎖成分の割合と組織化学的筋線維組成。
組織化学的結果は他の文献^{1,4,13)}より引用したものの、(range)は同一試料をおのおの日を代えて5回泳動したときの最大値と最小値を意味する

Muscle	%of myosin heavy chain			%of total number		
	fHC	sHC	(range)	SO	FOG	FG
EDL	100	0		3	59	38
SOL	10	90	(85—95)	84	16	
PLA	98	2	(1—4)	6	53	41
WVL	100	0		2	56	42
TIB	100	0		2	66	32
RGA	72	28	(23—35)	25	58	17
DPH	85	15	(10—20)	40	30	30

ると仮定すれば2次元的情報は3次元の物と同等であると見なすことができる。

したがって、本研究において得られた結果は1次元と2次元の結果がほぼ等しいことを意味していると考えられる。即ちここに採用した組織化学的方法による結果は速筋線維と遅筋線維において一本の筋線維の面積が等しい、換言すれば直径がほぼ等しいということを示唆している。

全筋の収縮特性における特徴を明らかにする場合 Barany によれば²⁾それはミオシンの ATPase 活性によって決定されるのであるから速筋型のミオシンと遅筋型のミオシンの含量を正確に定量することが重要になってくる。このことは先述したように組織化学的方法を採用する場合筋線維面積比がたんなる筋線維組成で全筋を評価するよりも信頼度が高いということの意味しており、筋線維の直径に違いがある場合にはより重要となる。今回の電気泳動的方法ではそれらを直接的に求められる利点がある。

しかし、表2で示したようにミオシンのタイプを決定するにはまだいくつかの問題点が残されている。ミオシンを構成するサブユニットが複数存在し単なる速筋型と遅筋型に二分できない可能性があることである。したがって、ミオシンと組織

化学的結果が正しく評価されるためには Billeter ら³⁾によって示された組織化学的結果とミオシンの対応がさらに多くのデータによって支持される必要がある⁹⁾。組織化学的分析法にはまた代謝特性を加味した分類方法(FG・FOG・SO)があるところからまたその吟味も必要である(表1)。

今回の結果は比較した筋線維組成が他の資料を利用したものであるため生化学的結果との関係が説得力にかけているので、これを同一の試料を用いて一致させることはスポーツ科学の中で筋の特徴を正確に理解するための今後の重要な研究課題であると思われる。

文 献

- 1) Ariano, M.A., R.B. Armstrong and V.R. Edgerton; Hindlimb muscle fiber population of five mammals. *J. Histochem. Cytochem.*, **21**: 51—55 (1973)
- 2) Barany, M.; ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.*, **50**: 197—218 (1967)
- 3) Billeter, R., C.W. Heizmann, H. Howald, and E. Jenny; Analysis of myosin light chain types in single human skeletal muscle fibers. *Eur. J. Biochem.*, **116**: 389—395 (1981)
- 4) Carraro, U., L. Dalla Libera, C. Cantini and D. Danieli-Betto; Chronic denervation of rat diaphragm: Selective maintenance of adult fast myosin heavy chains. *Muscle & Nerve*, **5**: 515—524 (1982)
- 5) Carraro, U., and C. Cantini; A sensitive SDS-PAGE method separating myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscles reveals the heterogeneous nature of the embryonic myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**: 793—802 (1983)
- 6) 勝田茂, 和田正信; 筋線維組成と運動競技適性, デサントスポーツ科学, **7**: 34—43 (1986)
- 7) Kitaura, T., T. Ishiko and T. Mikawa; Classification of single muscle fibers in mouse soleus and extensor digitorum longus muscles with myosin light chains. *体力科学*, **32**: 32—36 (1983)

- 8) 北浦孝; 骨格筋の Fiber type と Myosin の関係, 体育の科学, 34 : 109—112 (1984)
- 9) 北浦孝; 筋線維分類とスポーツ, 臨床スポーツ医学, 1 : 619—623 (1984)
- 10) Lowey, S.; Cardiac and skeletal muscle myosin polymorphism. *Med. Sci. Sports exerc.*, 18(3) : 284—291 (1986)
- 11) Lowry, O.H., A.L. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall; Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 205—275 (1951)
- 12) Oakley, B.R., D.R. Kirsh, and N.R. Morris; A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 105 : 361—363 (1980)
- 13) Saubert IV, C.W., R.B. Armstrong, R.E. Shepherd and P.D. Gollnick; Anaerobic enzyme adaptations to sprint training. *Pflugers Arch.*, 341 : 305—312 (1973)
- 14) 山本啓一; ミオシンの構造と働き, 現代化学, 188 : 41—44 (1986)

3. 速筋線維サブグループ間での張力特性の比較

愛知教育大学 春日規克

(共同研究者) 東海大学 竹倉宏明

A Comparative Mechanical Study of Shortening Velocity in Subgroup of Fast-twitch Fiber

by

Norikatsu Kasuga

Aichi University of Education

Hiroaki Takekura

Tokai University

ABSTRACT

The effects of temperature, concentration of ATP and pH in solution on shortening velocity of skinned muscle fibers were examined. The skinned fibers were prepared from tibialis anterior muscle of adult male rats. The fibers were classified into myosin subgroups by its reaction for myofibrillar ATPase and for enzymes of energy metabolism. The both histochemical fiber classifications were in good agreement. The shortening velocities for SO fibers were quite below those obtained from fast-twitch fibers, and the velocities for FG fibers were about 1.2—1.5 times greater than that of FOG fibers. There were no characteristic differences between

FG and FOG fibers with respect to the shortening velocity changes depending on the temperature, concentration of ATP and pH.

The results indicate that there are no differences of ATPase properties between the subgroups of fast-twitch fibers. However, FG fibers had ATPase activity that were consistently higher than that of FOG fibers.

要 旨

成熟したラットの前脛骨筋から得た, skinned fiber を, 筋線維タイプの分類を行い, 次に種々の溶液条件下で短縮速度を調べた. ATPase 染色と代謝特性による筋のタイプ分類は, ほぼ対応する結果であった. 温度 (5~30°C), ATP 濃度 (0.05~10mM) を変化させた時の, また pH4.6 にて skinned fiber を処理した時の短縮速度の変化率には, FG と FOG 線維間で差が認められなかった. しかし, FOG に比べ FG の短縮速度は, いずれの温度および ATP 濃度においても, 1.2~1.5 倍高値を示した. このことから, 筋の ATPase 活性は, FG の方が FOG より有意に高いことを示すものと考えられた.

緒 言

骨格筋は, 主に組織化学的手法より, 2~6 種類の筋線維タイプに分類される. これは遅筋線維と速筋線維, さらに速筋線維をいくつかのサブグループに分類することによるものである. 多くの研究報告では, SO, FOG, FG という分類, またこれらに対応して Type I, Type II a, II b という筋線維のタイプ別けが行われている. 前者の分類は, Peter ら¹⁰⁾により紹介されたもので, 各タイプのもつ ATPase と酸化系酵素活性値をもとに, 分類を行うものであり, 後者の分類は, ATPase 活性に及ぼす pH の影響 (活性化または不活性化) により, 筋線維タイプを分類するものである²⁾. 両者の分類方法によって, 決定された筋線維タイプは, SO と Type I, FOG と II a,

FG と II b がそれぞれ対応すると考えられるが, そうでないとする報告もみられる⁹⁾.

速筋線維である FG と FOG では, 酸化系酵素活性に差があることより, 筋の持久力に違いがあることは, 多くの報告からも知られている^{3,4,8)}. しかし, ATPase の pH に対する特異性で分類される Type と II a と II b とでは (pH4.5~4.6 付近で ATPase 活性が抑えられやすいか, 抑えられにくいかにより分類される), 筋の機能としての張力特性にいかなる差異があるかに関しては, 知られていない. ATPase は筋の機能としては短縮速度と高い相関があることが確認されている¹⁾.

本研究では, 組織化学的に筋線維タイプを決定した, 単一筋 skinned fiber を用い, 種々の溶液条件下で短縮速度を測定し, とくに速筋線維のサブグループの機能的差異に関して検討した.

実験方法

実験材料には, 成熟した Wistar 系雄性ラット (体重 300~400g) の前脛骨筋を用いた. 弛緩液中にて, 約7mm 程度の単一筋線維とし, chemically skinned fiber とした. 線維の一部を縦に3つに切りさき, それぞれを別のカバーガラスに添付し, 次に ATPase 染色 (pH 4.6 と pH 4.3)²⁾, SDH 染色を行った¹⁰⁾. 残りの線維は, Edoman ら⁹⁾の方法により, 短縮速度を求めた.

図1に示すように, 筋線維の一端は張力トランスジューサ (AE 801) に接続し, 他端は線維を引き伸ばす向きにフックが振れるよう電流をながした micro-ammeter に接続した. Ca²⁺濃度を上げ, 筋線維が等尺性最大張力に達した時点で, micro-

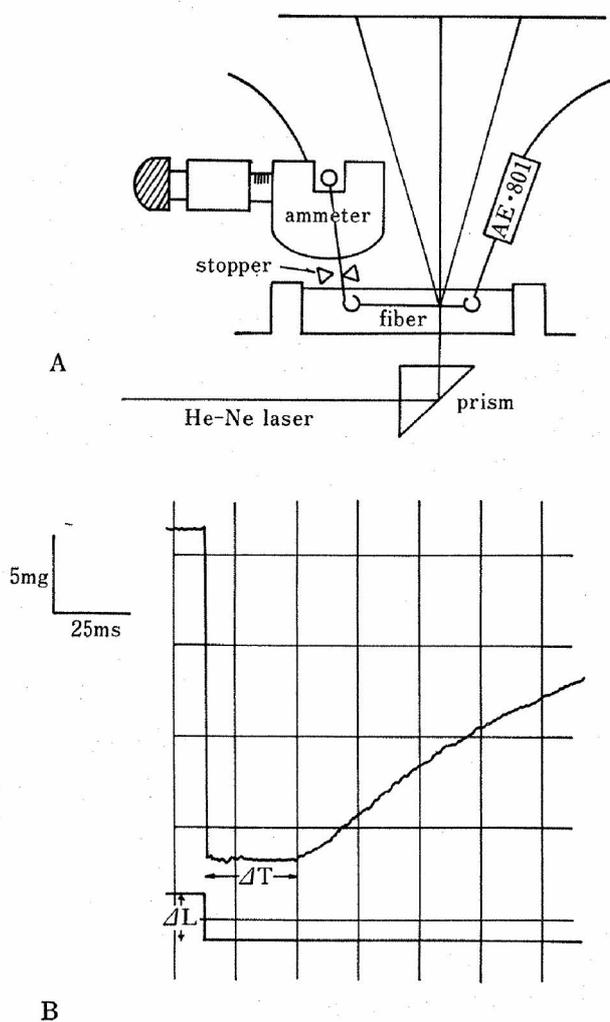


図1 A. Schematic illustration of experimental setup. B. Record of tension (upper trace) response to length step (lower trace) applied during activation.

ammeter に逆向きの電流を流し、フックを stopper の位置まで急激に動かすことより線維の長さを縮めた。フック移動速度は、筋の短縮速度より速いため、線維は一度たわみ張力はゼロとなる。その後、線維は無負荷で短縮し、フック移動距離分短縮した時点で、再び張力が発生する。3つの異なる短縮距離 (ΔL) とその時に得られる張力再発生までの時間 (ΔT) および静止時の筋線維長から、短縮速度 (ML/sec, muscle length per second) を求めた。ATP 濃度, pH, 温度をそれぞれ変えて短縮速度を測定したが、この際の他の溶液条件はつねに、4mM, MgATP, 4mM EGTA, 10mM PIPES, pH 6.8, 0.2M Ionic

strength とした。

実験結果

単一筋線維のタイプ別分類を行った結果では、ほとんどの場合 FG と II b, FOG と II a, SO と I タイプが対応した。しかし、pH 4.6 でプレインキュベートした ATPase 染色において、染まりにくいものが II a, 中程度に染まるものが II b というような比較を、厚さにもばらつきがある個々に添付した単一筋線維で行うことは、非常に困難をようした。そこで、染まるか染まらないかで比較できる、ATPase と SDH 染色を用いた Peter ら¹⁰⁾の方法の方が、単一筋線維のタイプ決定には間違いがないと考えた。

各タイプ別の短縮速度を、温度を変え測定したものを図2に示した。速筋タイプの短縮速度は、

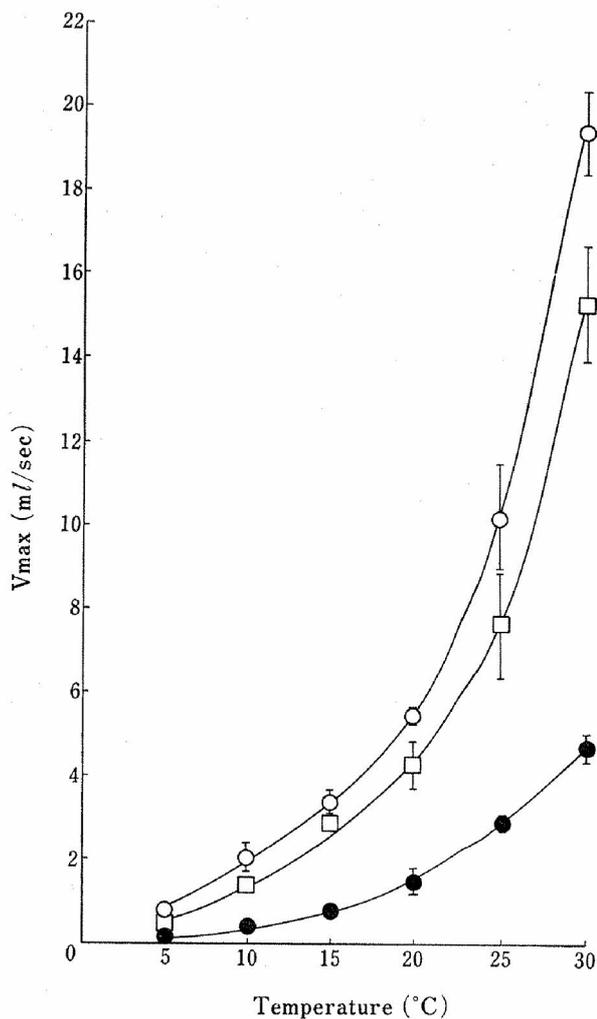


図2 Dependence on temperature of shortening velocity ($\bar{x} \pm SD$). FG (○), FOG (□), SO (●)

いずれの温度においても、遅筋タイプより3~4倍高い値を示し ($p < 0.001$), また, 5°C 以外はFGの方がFOGより有意に高値を示した ($p < 0.05 \sim 0.01$). 各短縮速度の値をArrheniusの式に代入し, 温度依存性のエネルギーを求めた. Arrhenius式は下記に示すものである.

$$\text{Rate} = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

(A = constant, E_a = Arrhenius activation energy,

$R = 8.317 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$, T = absolute temperature)

この結果, FG, FOG, SOでそれぞれ, 87.35, 91.58, 83.09 kJ であり, 各タイプ間による差は認められなかった.

次に, 短縮速度をATPase反応速度の指標とし, 基質であるATPの濃度を変えた際の変化を調べた. この実験においては, 溶液中に10mM CrP, 15unit/ml CKを加え, ATP濃度を規定した. 結果を図3に示した. すべての筋線維タイプにおいて, 一次反応を示す曲線が得られた. そこで, Michaelis定数(K_m)をLineweaver-Burkeの式より求め, タイプ間の比較を行った. 各筋線維タイプの K_m は, FG-0.292, FOG-0.305, SO-0.096mMであり, 速-遅筋線維間には差がみら

れたが, 速筋のサブグループ間では基質濃度によるATPase酵素反応速度には差が認められなかった.

図4は, ATPase染色に用いられるプレインキュベーション溶液, pH 4.6, にて処理したskinned fiberの短縮速度と処理時間との関係を示すものである. 全タイプにおいて組織化学によるATPaseの変化と異なり, 処理時間の延長に伴ない, 短縮速度は低下した. 速筋タイプでは, 30秒以上の処理時間では, 短縮速度が測定できないほどに張力が低下した.

考 察

筋線維をタイプ別に分類可能な理由は, それぞれのタイプ間に酵素活性の高低の差とか酵素自体の違いが存在するためである. FG, FOG, SOという分類は, 酵素活性の高低による分類法であり, Type I, II a, II bという分類は, ATPaseの種類による分類であると考えられる.

本研究では, 両者の分類を同一の単一筋線維において行った. その結果, ほぼFGとII b, FOGとII a, SOとIが対応した. しかし, この両者の分類が正確に対応しないと報告もみられ

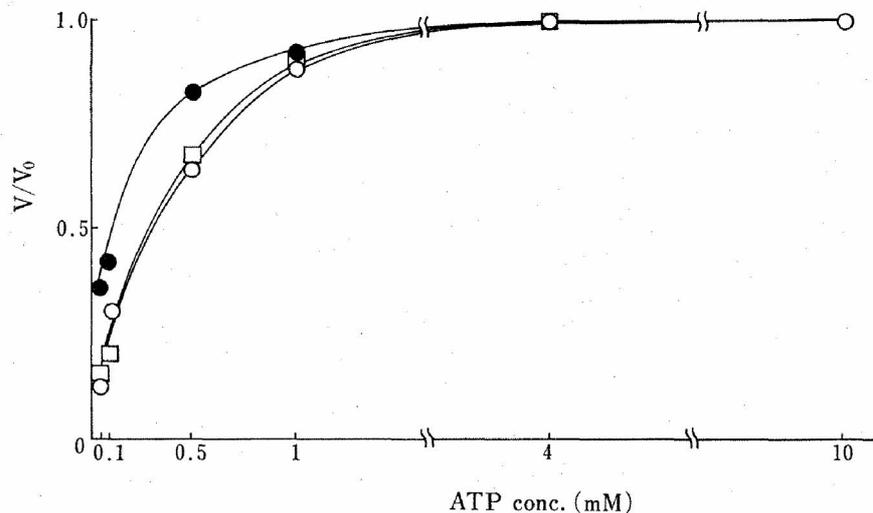


図3 Dependence on ATP concentration of shortening velocity. FG(○), FOG(□), SO(●)

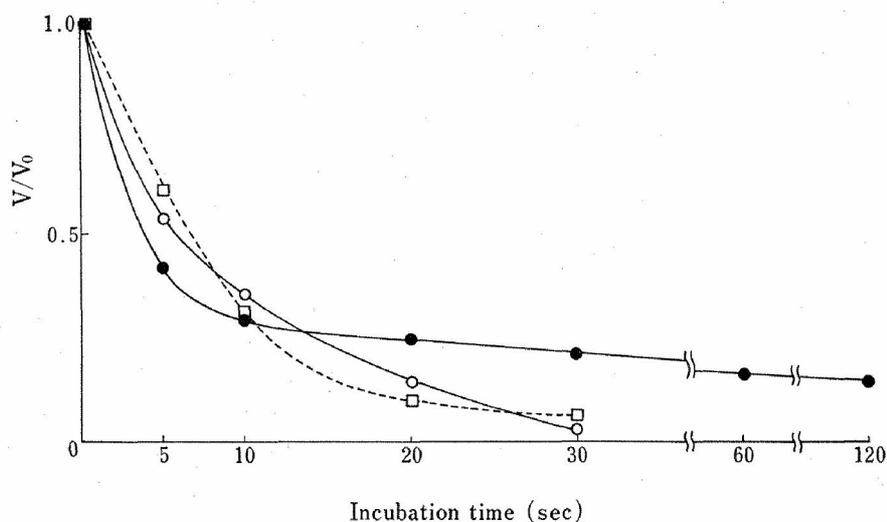


図4 Time course of the shortening velocity. The fiber were incubated in a solution containing 0.05M potassium acetate and 18mM CaCl₂ (pH4.6). FG(○), FOG(□), SO(●)

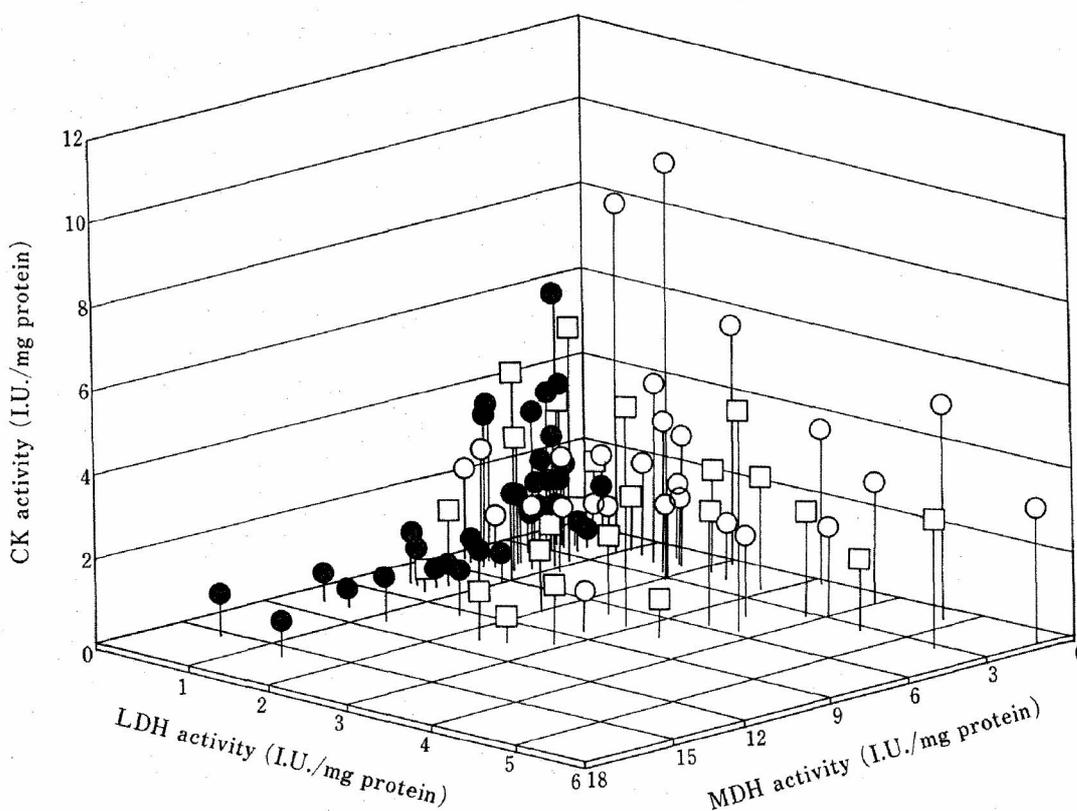


図5 Three-dimensional diagram sammarizing the metabolic enzyme profiles. FG(○), FOG(□), SO(●)

る⁹⁾。われわれは、組織染色により分類した、単一筋線維の筋内酵素活性を測定した。

その結果、図5に示すように、各タイプの各酵素活性は、その筋の特性を示す活性を有するもの

が多いが、タイプ間に大きく重複が見られた。この重複は、組織化学と生化学の測定法の違いや、単一筋線維の蛋白・酵素の定量の困難さに帰因する可能性もあるが、単に一酵素のみで筋タイプを

決定することに関しての問題を示す結果であった。

速筋線維のサブグループ間には、疲労抵抗に顕著な差が存在することは知られている^{3,8)}。しかし、他に機能的差異が存在するかについての報告はみられない。とくに、ATPase 活性の pH 特異性により分類される Type II a と II b において、その分離の機能面からの意義に関する研究は少ない⁵⁾。

本研究では、筋の短縮速度を ATPase 活性の指標として実験結果を検討した。ATPase 活性は、生化学的手法を用い変化させた。筋タイプ間に、ATPase が異なるなら、その変化率（短縮速度）に差が生じることから、タイプの分類を機能面から測ることが可能であろう。酵素の化学反応は、温度の上昇や基質濃度により反応速度が変化する。また、pH の変化より、酵素の変性や酵素蛋白の双性イオン荷電状態の変化から性質を変える。

本研究の結果では、温度、基質、pH を変えた際においても、FG (II b) と FOG (II a) との間には、顕著な差が認められなかった。このことから、組織染色で用いられる pH 4.6 における不活性化の度合の異なる ATPase は、非常に似かよった生化学的特性を有するものと考えられる。しかし、図 2 に示すように、短縮速度に 1.2 から 1.5 倍と FOG より FG の方が有意に高いことより、ATPase 活性には違いがあると考えられる。

図 4 に示した全タイプの短縮速度の低下は pH 4.6 で処理後の筋の stiffness は著しく低下しており、非生理的条件下で、収縮蛋白の変性を行ったものと考えられる。

文 献

- 1) Barany, M.; ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening, *J. gen. Physiol.*, **50** : 197—218 (1967)
- 2) Brooke, M.H. and K.K. Kaiser; Some comments on the histochemical characterization of muscle adenosine triphosphatase, *J. Histochem. Cytochem.*, **17** : 431—432 (1969)
- 3) Burke, R.E., D.N. Levine, F.E. Zajac, III, P. Tsairis and W.K. Engle; Mammalian motor units; physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius, *Science*, **174** : 709—712 (1971)
- 4) Burke, R.E., D.N. Levine and F.E. Zajac, III; Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius, *J. Physiol.*, **234** : 723—748 (1973)
- 5) Donaldson, S.K.B; Ca²⁺-activated force-generating properties of mammalian skeletal muscle fibres: histochemically identified single peeled rabbit fibres, *J. Muscle Res. Cell Motility*, **5** : 593—612 (1984)
- 6) Edoman, K.A.P.; The velocity of unloaded shortening and its relation to sarcomere length and isometric force in vertebrate muscle fibres, *J. Physiol.*, **291** : 143—150 (1979)
- 7) Guth, L. and F.J. Samaha; Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase, *Exp. Neurol.*, **28** : 365—367 (1970)
- 8) Kugelberg, E.; Histochemical composition, contraction speed and fatiguability of rat soleus motor units, *J. Neurol. Sci.*, **20** : 177—198 (1973)
- 9) Nemeth, P. and D.Pette; Succinate dehydrogenase activity in fibres classified by myosin ATPase in three hind limb muscles of rat, *J. Physiol.*, **320** : 73—80 (1981)
- 10) Peter, J.B., R.J. Barnard, V.R. Edgerton, C.A. Gillespie and K.E. Stempel; Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits, *Biochemistry*, N.Y., **11** : 2627—2633 (1972)

4. ラット骨格筋単一筋線維の組織化学的筋線維タイプの分類

山口大学 的 場 秀 樹

**Histochemical Fiber Typing of Single Fibers
Isolated from the Rat Skeletal Muscle**

by

Hideki Matoba

*Laboratory of Biomechanics and Physiology,
Department of General Education, Yamaguchi University*

ABSTRACT

An attempt was made to improve upon the methods for identifying histochemical fiber types of single fibers in the skeletal muscle.

Single fibers were isolated from the rat lateral gastrocnemius and soleus muscles in a relaxation solution containing 5mM EGTA. Isolated single fibers were quickly frozen and serial cross-sections were cut in a cryostat. A preparation of the cross-sections in single fibers was the most important point in the present methods; it is possible to perform multiple stainings on a single fiber of short length, and similarity of the section thickness allows us to evaluate the staining intensity as a true reflection of enzyme activities.

The cross-sections of single fibers were stained for succinate dehydrogenase and for myofibrillar ATPase after a preincubation in alkaline, acid or copper solution. For reference, the cross-sections of the freshly frozen rat plantaris muscle were stained under the same conditions as those for the single fibers.

The staining pattern of the isolated single fibers was basically the same as that of fibers in the reference muscle except that the difference in the acid sensitivity of Type II fibers exist. This allowed us to classify the isolated single fibers into Type II A, Type II B or Type I on the basis of histochemical profiles established from the multiple stainings.

The alteration in the acid sensitivity of myofibrillar ATPase in Type II single fibers was suggested to be brought about by an immersion of single fibers in the relaxation solution containing 5mM EGTA.

要 旨

本研究では、従来の単一筋線維分類法を改良することを目的とした。

まず 5mM の EGTA を含む弛緩液中で、ラットの外側広筋およびヒラメ筋より単一筋線維を分離した。分離した単一筋線維を凍結後、クリオスタット中で連続横断切片を作成した。単一筋線維の連続横断切片の作成は、最も重要な改良点の一つで、次のような利点を持つ。すなわち第一の利点は、比較的短い単一筋線維に多くの染色法を施すことができることである。また切片の厚さが同一であるので、染色度の違いがそのまま酵素活性の違いを表わすという利点もある。

単一筋線維に myofibrillar ATPase 染色およびコハク酸脱水素酵素染色を施した。なお myofibrillar ATPase 染色に先だち、アルカリ、酸、あるいは銅イオンを含む溶液中でプレインキュベーションを行った。またラット足底筋の新鮮凍結切片を対照に選び、単一筋線維と同一条件下で染色をした。

単一筋線維の染色パターンは、酸性プレインキュベーション後の myofibrillar ATPase 染色を除き、対照である足底筋線維の染色パターンと同様であった。従って各染色の組織化学的プロフィールから、単一筋線維を Type II A, Type II B, あるいは Type I のいずれかに分類することができた。

その後の実験で、単一筋線維における Type II 線維の酸に対する安定性の変化が弛緩液の影響によることを示唆する結果を得た。

1. 緒 言

筋線維タイプについてのこれまでの研究の多くは、全筋あるいはバイオプシー・サンプルのような筋線維束を用いて行われてきた^{1,2)}。しかし、全筋あるいは筋線維束には種々の筋線維タイプに

属する筋線維が混在しているため^{1,2)}、このような研究から各筋線維タイプの生理学的・生化学的特性についての明確な結論を得ることは極めて困難である。筋線維タイプの性質に関する明確な結論を得るためには、組織化学的な筋線維タイプと生理学的・生化学的特性を単一筋線維レベルで対応づける研究が必要であると考えられる。

このようなアイデアに基づいた研究は、すでに幾人かの研究者によって試みられている³⁻⁶⁾。しかし技術的な困難さ、および得られる資料が少ないことから、今なお十分な成果はあがっていない。今後単一筋線維レベルの研究を進展させるためには、組織化学的筋線維タイプの同定あるいは生理学的・生化学的特性の分析を、少ない材料でしかも確実に行うことのできる方法の開発が必要であると考えられる。

そこで、本研究では単一筋線維の組織化学的筋線維タイプのより確実な同定法を確立することを目的とした。

2. 実験方法

A. 実験材料

実験材料には6ヶ月齢の Wistar 系雄性ラットの足底筋、外側腓腹筋およびヒラメ筋を用いた。ラットをエーテルで屠殺し、これら3種類の骨格筋を摘出した。

摘出後、外側腓腹筋とヒラメ筋から、単一筋線維を分離した。一方、足底筋は液体窒素で -170°C に冷却したヘキサン中で凍結し、新鮮凍結切片の作成に供するまで -80°C で保存した。

B. 単一筋線維の分離

外側腓腹筋とヒラメ筋を Mizusawa et al.⁷⁾ の方法に従って調整した弛緩液液中 (5mM EGTA, 4mM Na_2ATP , 4mM MgSO_4 , 130mM メタンスルホン酸カリウム, 20mM トリス, 20mM マレイン酸, pH 6.80) に浸した。単一筋線維の分離は、双眼実体顕微鏡下で、木綿針とピンセットを

使って行った。使用に先だってピンセットの先端を研いで鋭くした。また木綿針は接着剤（アロンアルファ）で注射針の先に取りつけて用いた。双眼実体顕微鏡の照明は、暗視野照明とした。

分離した単一筋線維を、結果の項で詳述する方法により、スライドガラスに張りつけた。そして約60分間室温にて乾燥させた後、組織化学的染色に供した。

C. 組織化学

組織化学的染色としては myofibrillar ATPase 染色とコハク酸脱水素酵素（SDH）染色を行った。

Myofibrillar ATPase 染色は、Matoba and Gollnick⁸⁾および Gollnick and Matoba⁹⁾の方法を修正した以下の手順によった。

1) Myofibrillar ATPase 染色に先だち、切片を次のいずれかの条件でプレインキュベーションする。

ア) 酸性プレインキュベーション：溶液は 100 mM 酢酸ナトリウム・100mM KCl に酢酸を滴下して pH を 4.55~4.60 としたもの。溶液温度は 25°C とする。プレインキュベーション効果の時間経過をみるため、一つの標本から作成した4枚の連続切片に対して、原則として、おのおの1,2,3,4分間プレインキュベーションを行う。

イ) アルカリ・プレインキュベーション：溶液は 100mM 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール (Ampro)・50mM KCl・18mM CaCl₂に6N HCl を滴下して pH を 10.2 としたもの。溶液温度は37°C、プレインキュベーション時間は10分間とする。

ウ) 銅イオン・プレインキュベーション：まず 100mM Ampro に 100mM 酢酸を加えて pH を 4.60 とし、その 99ml に対して 1ml の 100mM CuCl₂ を加えたものを溶液とする。CuCl₂ の最終濃度は 1mM である。溶液温度は 25°C、プレインキュベーション時間は、1,2,3 および 4分間とす

る。

2) 切片を蒸留水で2~3回洗浄する。

3) インキュベーション：溶液は 100mM Ampro・50mM KCl・18mM CaCl₂・3.1mM Na₂ ATP に 6N HCl を滴下して pH を 9.4としたもの。溶液温度は37°C、インキュベーション時間は30分間とする。

4) 切片を蒸留水で2~3回洗浄する。

5) 切片を 2%塩化コバルトに3分間浸す。

6) 切片を蒸留水で2~3回洗浄する。

7) 100mM トリスで緩衝した硫化水素水に切片を浸して発色させる。硫化水素水は、硫化鉄に 6N HCl を加えて発生させた硫化水素ガスを 100 mM トリス中に溶解させて作る。

8) 蒸留水で2~3回洗浄する。

9) グリセロール・ゼリーで封入する。

SDH 染色は、Nachlas et al.¹⁰⁾の方法によった。溶液温度は37°C、またインキュベーション時間は20分とした。

3. 結果と考察

A. 単一筋線維連続横断切片の作成

弛緩液中で分離した単一筋線維を直接スライドガラスに張りつける方法⁵⁾は、1枚のスライドガラスあたり少なくとも1~2mmの長さの筋線維を必要とする。また弛緩液中で分離できる単一筋線維の長さは、通常5mm以下である。したがって分離した単一筋線維をすべて組織化学的検索のために用いることができると仮定しても、2~3種類の染色ができるにすぎない。単一筋線維の組織化学的特性と生化学的特性を対応づけることを目的とした研究などでは、組織化学的検索に供することのできる試料はさらに限られてくる。そこで限られた長さの単一筋線維で多種類の染色を行うことができる方法の開発が望まれる。

以下に述べる単一筋線維の連続横断切片を用いた組織化学的染色は、上述の要求を満足すると思

われる。さらにこの方法では切片の厚さを統一することができるので、単一筋線維を直接スライドガラスに張りつける従来の方法のもう一つの欠点、すなわち染色度の違いが酵素活性のみならず筋線維の太さの違いをも反映しているため染色の濃さの違いをそのまま酵素活性の違いと解釈できない点⁶⁾、をも克服できると考えられる。

単一筋線維の連続横断切片の作成は、次の手順で行った。

- 1) 双眼実体顕微鏡下で単一筋線維を分離する。
- 2) 外科用縫合糸をほぐして得た細い糸で単一筋線維の両端をしぼる。
- 3) 細い糸でしぼった単一筋線維をアルミホイル上に滴下したリプショウ社製包埋用マトリックス中に埋め込む。この際、糸の先をアルミホイルの上下端に張りつけ、包埋剤中で筋線維が湾曲することを防ぐとともに、筋線維の長軸方向を知る手がかりとする。
- 4) 液体窒素で約 -170°C に冷却したヘキサン中で、単一筋線維を凍結する。
- 5) クリオスタット中で厚さ $10\mu\text{m}$ の連続横断切片を作り、これをスライドガラスに張りつける。
- 6) 包埋用マトリックスが乾燥してしまわないうちに、スライドガラスの切片付着部位近くに、ヤスリで目印をつける。これは染色後単一筋線維のスライドガラス上での位置を見失わないためである。

以上の方法により、1本の単一筋線維から、myofibrillar ATPase 染色のために10枚（アルカリ・プレインキュベーション用2枚、酸性プレインキュベーション用4枚、 Cu^{2+} プレインキュベーション用4枚）、SDH 染色のために2枚、合計12枚の連続切片を容易に作成できた。さらに、単一筋線維のうち薄切しなかった部分をディープフリーザー(-80°C)に保存し、後日再び同様の染色を繰り返すことも可能であった。

2) 組織化学的染色

組織化学的検索に供した単一筋線維は、アルカリ・プレインキュベーション、酸性プレインキュベーションおよび Cu^{2+} プレインキュベーション後の Myofibrillar ATPase 染色、および SDH 染色の組織化学的プロフィールより、次の3グループのいずれかに分類された(表1)。

すなわち第1のグループは、アルカリ・プレインキュベーション後の myofibrillar ATPase 染色では濃く染色されるが、SDH 染色や Cu^{2+} プレインキュベーション後の myofibrillar ATPase 染色ではほとんど染色されなかった。また酸性プレインキュベーション時間の延長に伴ない、myofibrillar ATPase 活性が若干低下する傾向が見られた。外側腓腹筋の白色部より分離した単一筋線維のほとんどは、このような組織化学的プロフィールを示した。

第2のグループはアルカリ・プレインキュベーション後の myofibrillar ATPase 染色、SDH 染色、および Cu^{2+} プレインキュベーション後の、myofibrillar ATPase 染色ともに濃く染色された。このグループに属する単一筋線維は、第1のグループと同様に、酸性プレインキュベーション時間が長くなるにしたがい、myofibrillar ATPase 活性が徐々に低下する傾向があった。外側腓腹筋の赤色部から分離した筋線維の約50%は、このような組織化学的プロフィールを示した。

第3のグループは、アルカリ・プレインキュベーション後の myofibrillar ATPase 染色ではほとんど染色されなかった。一方、酸性プレインキュベーションにより強く活性化され、濃く染色された。活性化に要するプレインキュベーション時間は、通常1分以内であった。また Cu^{2+} プレインキュベーション後の myofibrillar ATPase 染色では、プレインキュベーション時間が1分の場合には中間的な濃さに染色されたが、2分間以上のプレインキュベーションではきわめて薄くしか染色されなかった。SDH 染色ではかなり濃く染色

表1 Staining intensity of single fibers and reference fibers

Staining Condition		Staining Intensity					
		Single Fibers			Reference		
		II A	II B	I	II A	II B	I
Myofibrillar ATPase							
preincubation at pH 10.2	10min	4	4	0	4	4	0
preincubation at pH 4.60	1min	4	4	4	2	3	3
	2min	4	3~4	4	0	3	4
	3min	3	3~4	4	0	2	4
	4min	3	2~3	4	0	1	4
preincubation in 1mM Cu ²⁺	1min	4	1	2	4	1~2	2
	2min	4	1	2	4	1~2	2
	3min	4	1	2	3	1~2	2
	4min	4	1	2	3	1~2	2
Succinate Dehydrogenase		3	1~2	2	3	1~2	2

Staining intensity is rated subjectively on a scale of 0 to 4. Arbitrary units of 0 and 4 indicate light and dark stainings, respectively. Arbitrary units of 1 and 2 show the two ranks of intermediate stainings

された。外側腓腹筋の赤色部から分離した単一筋線維の約50%およびヒラメ筋から分離した単一筋線維のほとんどは、このような組織化学的プロフィールを示した。

以上3グループの組織化学的プロフィールと、対照として用いた足底筋における各筋線維タイプの組織化学的プロフィールには、若干の相異点が見られた。すなわち、Type IIに属すると推定される第1および第2グループの単一筋線維の酸に対する安定性は、足底筋のType II Aおよび Type II Bのいずれよりも高かった。さらに両グループ間には、足底筋のType II AとType II Bで見られたほど明確な酸に対する安定性の差異は認められなかった。しかし酸性プレインキュベーション後のmyofibrillar ATPase 染色の結果を除けば、各グループの組織化学的プロフィールは、足底筋における各筋線維タイプの組織化学的プロフィールに極めてよく一致した。したがって、上に述べた3グループの単一筋線維は、それぞれ Type II B, Type II A, および Type Iに属すると判断された。

3) 組織化学的染色におよぼす弛緩液の影響

上に述べたように、Type IIに属するとみられる単一筋線維と、対照である足底筋の新鮮凍結切片中の Type II線維とは、myofibrillar ATPaseの酸に対する安定性が異なっていた。このような差がどのような機序により生ずるかは、現在のところ明らかでない。しかし本研究では、単一筋線維の分離を5mMのEGTAを含む弛緩液中で行ったので、EGTAあるいは弛緩液中の他の成分がmyofibrillar ATPaseの酸に対する安定性を変化させることは、十分考えうる⁶⁾。また弛緩液中で分離した単一筋線維と新鮮凍結切片中の筋線維の染色性の比較では明らかにされなかったが、弛緩液の成分が他の染色にも何らかの影響を及ぼす可能性もある⁶⁾。そこで各染色におよぼす弛緩液の影響を調べるために、新鮮凍結切片と凍結切片作成後60分間弛緩液に浸した切片の染色性を比較した。なお弛緩液に浸した切片は、蒸留水で2~3回洗浄したあと、各染色に供した。

得られた結果は次のとおりであった。すなわち5mMのEGTAを含む弛緩液への浸漬は、アルカリおよびCu²⁺プレインキュベーション後のmyofibrillar ATPase 染色、およびSDH染色を

ほとんど変化させなかった。しかし酸性プレインキュベーション後の myofibrillar ATPase 染色に対しては、次のような影響があった(図1)。すなわち新鮮凍結切片の場合に比し、Type II A, Type II B とも、酸に対する安定性が増した。また Type II A 線維と Type II B 線維の酸に対する安定性の差は少なくなった。さらに Type II B 線

維の中には、Type II A 線維よりも不活性化の時間経過が速いものもあった(例えば、図1中の星印のついた筋線維)。

単一筋線維の筋線維タイプ分類、とりわけType IIのサブタイプ分類をより確実にするためには、酸性プレインキュベーション条件下においても新鮮凍結切片と同様の染色性を保持しうる単一筋線

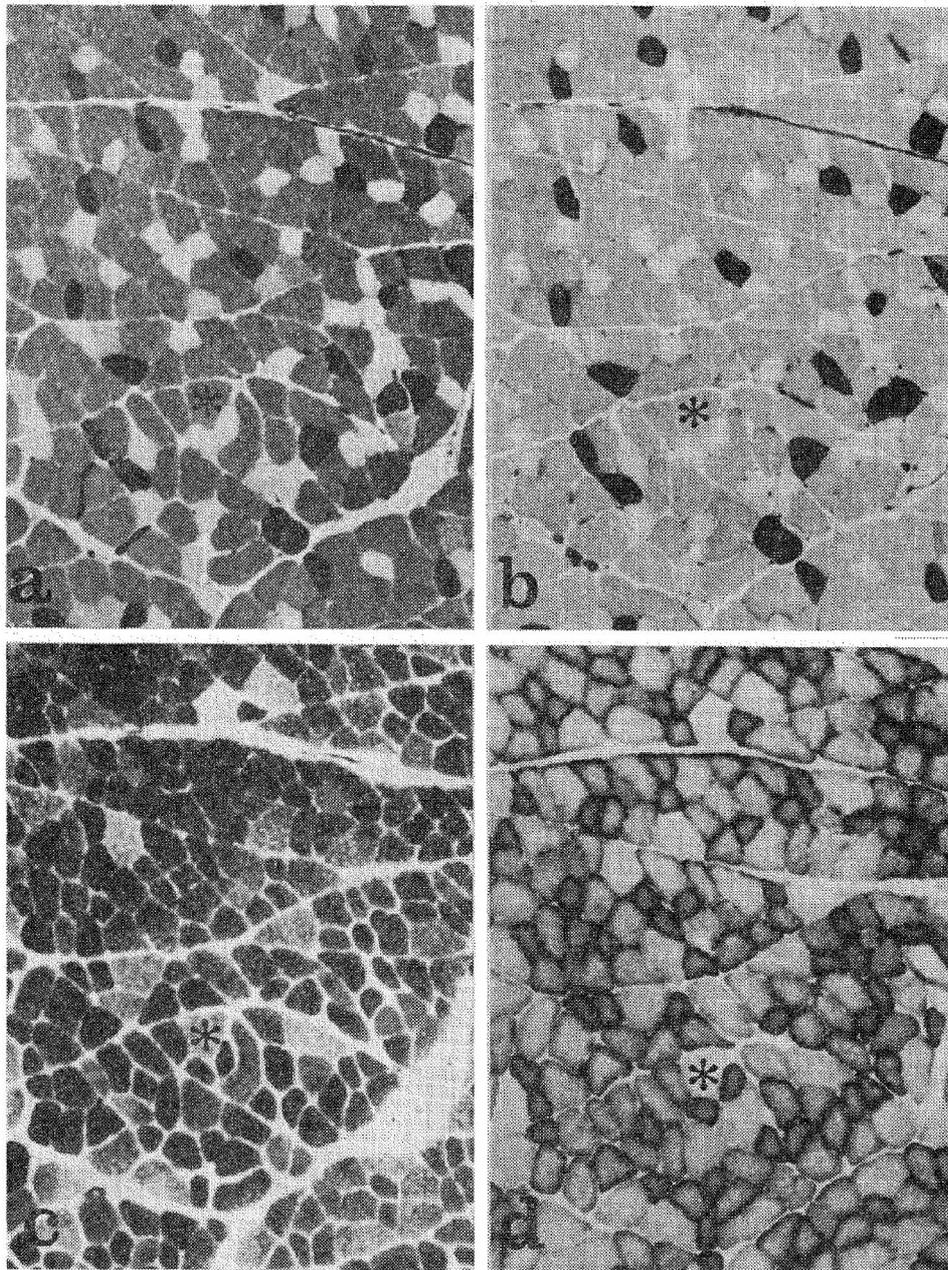


図1 Cross-sections of the rat plantaris muscle stained for myofibrillar ATPase after acid preincubation (a,b,c) and for SDH(d). Section c was immersed in a relaxation solution of Mizusawa et. al. (1982)⁷⁾ for 60min. before preincubation while sections a and b received no such treatment. Preincubation of sections a,b,c lasted 2, 4, 4min respectively

維分離法の開発が望まれる。

文 献

- 1) Saltin, B. and Gollnick, P.D.; Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. Peachy, L.D. and Adrian, R.H., Geiger, S.R. (eds.), Handbook of physiology. Skeletal muscle. Baltimore, Williams and Wilkinson, 555—631 (1983)
- 2) Ariano, M.A., Armstrong, R.B. and Edgerton, V.R.; Hindlimb muscle fiber population of five Mammals. *J. Histochem. Cytochem.*, **21**: 51—55 (1973)
- 3) Billeter, R., Heinzmann, C.W., Howald, H. and Jenny, E.; Analysis of myosin light and heavy chain types in single human skeletal muscle fibers. *Eur. J. Biochem.*, **116**: 389—395 (1981)
- 4) 春日規克; 発育およびトレーニングが単位断面積あたりの張力に与える影響—マウスskinned fiberによる検討—, *デサントスポーツ科学*, **7**: 23—28 (1986)
- 5) 杉浦崇夫, 的場秀樹, 村上憲; ラット骨格筋単一筋線維のミオシンL鎖パターンの発育に伴う変化, 第41回日本体力医学会大会予稿集, p170 (1986)
- 6) Donaldson, S.; Ca^{2+} -activated force-generating properties of mammalian skeletal muscle fibres: histochemically identified single peeled rabbit fibres. *J. Muscle Res. Cell Motility*, **5**: 593—612 (1984)
- 7) Mizusawa, H., Takagi, A., Sugita, H. and Toyokura, Y.; Coexistence of fast and slow types of myosin light chains in a single fiber of rat soleus muscle. *J. Biochem.*, **91**: 423—425 (1982)
- 8) Matoba, H. and Gollnick, P.D.; Influence of ionic composition, buffering agent, and pH on the histochemical demonstration of myofibrillar actomyosin ATPase. *Histochemistry*, **80**: 609—614 (1984)
- 9) Gollnick, P.D. and Matoba, H.; Identification of fiber types in rat skeletal muscle based on the sensitivity of myofibrillar actomyosin ATPase to copper. *Histochemistry*, **81**: 379—383 (1984)
- 10) Nachlas, M.M., Tsou, K., DeSouza, E., Cheng, C and Seligman, A.M.; Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new *p*-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.*, **5**: 420—436 (1957)

5. 骨格筋線維組成に及ぼす低圧とトレーニングの影響 II

—性差について—

神戸大学 伊藤 一生

(共同研究者) 京都大学 田口 貞善

Influence of Hypobaric Hypoxia and Physical Training on Fiber Composition of Skeletal Muscle in Rats. —Sex Difference—

by

Kazuo Itoh

Faculty of Education, Kobe University

Sadayoshi Taguchi

College of Liberal Arts, Kyoto University

ABSTRACT

Fifteen male and fifteen female Sprague-Dawley rats were randomly assigned to three groups respectively.

They consisted of untreated control rats bone and raised at sea level (male SL-CO, female SL-CO), swimming training rats at sea level (male SL-SW, female SL-SW), and swimming training rats under intermittent hypobaric exposure (male Hypo \rightleftharpoons SL-SW, female Hypo \rightleftharpoons SL-SW).

The intermittent hypobaric groups were exposed on alternative two weekes to 460torr and sea level for 14weeks beginning at five weeks of ages.

The swimming program consisted of endurance swimming at 30minutes a day, 3days a week for 14weeks.

At nineteen weeks of age, fiber composition of three hird-limb muscles were histochemicalley studied. Sample of the soleus, EDL and plantaris muscles were sectioned (10 μ m thiok) by cryostat at -20°C .

In soleus muscle, male hypobalic swimming group induced significant increase in FOG fibers and decrease in SO fibers.

EDL and plantaris muscles had a higher percentage of FOG fibers in the male hypobaric swimming group than in the sea level control group.

There were no statistically significant differences in fiber composition of all muscles among female any of groups.

要 旨

5週齢の雄雌のラット15匹づつを用いて低圧およびトレーニングが、ラット骨格筋線維組成に及ぼす影響について検討した。

低圧運動群は、低圧(460torr)と常圧の二つの環境を2週間の間隔でくりかえし生育させ、その間、週3回、1回30分間の水泳トレーニングを負荷した。常圧水泳群は、常圧下で飼育し、同様の水泳トレーニングを行わせた。また、常圧非運動群は常圧で14週間生育させた。

19週齢で、ヒラメ筋、長指伸筋、足底筋を摘出し、組織化学的方法により、各筋の筋線維組成の変化について、雄雌を比較した。

ヒラメ筋では、雄の低圧運動群のFOG fiberの

比率が他の2群に比して有意に高い傾向がみとめられたが、雌では三群間に差はみとめられなかった。

骨格筋線維組成の変化からみて、低圧とトレーニングの影響は、雌に比較して雄の方により強くあらわれるものと考えられる。

緒 言

高地で日常生活を送っているものが、マラソンや長距離走において、すぐれた成績をあげて以来、高地トレーニングが持久性体力の向上のために、重要な位置を占めてきたことは周知の事実である。

それに伴って、高地でのトレーニングの効果や体力測定に関する資料も数多くみられるようにな

った^{5,10)}.

また、高地と同様の低圧、低酸素の環境を設定して、血液その他身体諸機能への影響が検討されている^{1,3,6)}。しかし、これらの資料や研究も、呼吸循環系に関するものが大部分で、骨格筋、なかならず筋線維構成や筋酵素活性の面からの報告は極めて少なく、さらにその低圧、低酸素環境への適応の性差についてはほとんど知られていない。そこで本研究では、長期間にわたる低圧環境が、骨格筋線維組成に与える影響を、主として性差の面から検討した。

実験方法

生後5週齢のSprague-Dawley種のラット雄雌15匹ずつ計30匹を用いた。

実験グループは次の通りである。

a. Hypo. ⇄ SL, SW群

低圧と常圧の二つの環境を2週間の間隔で計14回くりかえして生育させ、その間週3回、1回30分間の水泳トレーニングを負課した群（低圧運動群）。

b. SL, SW群

常圧下で飼育し、同様の水泳トレーニングを課した群（常圧運動群）。

c. SL, CO群

常圧で飼育（常圧非運動群）。

各群とも雄雌それぞれ5匹ずつをあてた。低圧条件は460torr（高度約4000mに相当）で一定した。

14週間のトレーニング終了後、麻酔下で下肢筋（ヒラメ筋、長指伸筋、前脛骨筋、足底筋）を摘出し、アセトン・ドライアイスで冷却したイソペンタン中で急速凍結した。クリオスタット内（-20°C）で厚さ10 μ mの連続切片を作成し、室温で約60~90分間乾燥した。

組織化学的検索のための染色は、SDH⁴⁾、myosin ATPase^{7,16)}について行った。

ヒラメ筋、長指伸筋、足底筋の筋線維組成を収縮特性、代謝特性の面から、顕微鏡写真よりPeterら¹⁷⁾の方法に従って分類し検討した。

実験結果

各群の体重変化は、**図1**に示す通りである。雄では、低圧運動群、常圧運動群、常圧非運動群の間には、それぞれ10週齢以後有意の差がみとめられた。しかし雌では、低圧運動群の体重が他の2群に比して若干下まわる傾向はあるが、その差は有意ではなかった。

また、雄では、低圧暴露時に体重の増加が停滞し、鋸の歯状の曲線となるが、雌ではこの変動も明らかではなかった。

図2は水泳による performance test の結果である。水泳持続時間においても、雄では3群の間に有意差がみとめられ、(p<0.01)低圧運動群が最も優位であったが、雌では、運動群と非運動群の差が大であった。

図3はヒラメ筋の筋線維組成について、各グループおよび雄雌を比較したものである。

雄では、常圧運動群と常圧非運動群の間には差はみとめられないが、低圧運動群では常圧群に比較して、FOG fiberの数の比率が高く、SO fiberの比率が低い傾向がみとめられた（FOG fiberの比率は、常圧非運動群：15.9%、常圧運動群：15.2%、低圧運動群：26.8%）。しかし雌では、FOG fiberの比率は、いずれの群においても、平均値で見れば、10.9%~14.3%の間にあり、各群間に有意差はみられなかった。ただし雄に比較して個体差が大きく、FOG fiberの比率が10%以下のものや、15%を越えるものがあった。

同様に、**図4**は長指伸筋の筋線維組成の比較である。雄では低圧運動群のFOG fiberが、常圧非運動群に比較して多い傾向がみられるが、その差は有意ではなかった。また、雌では三群間の筋線維組成に差はみとめられなかった。足底筋におい

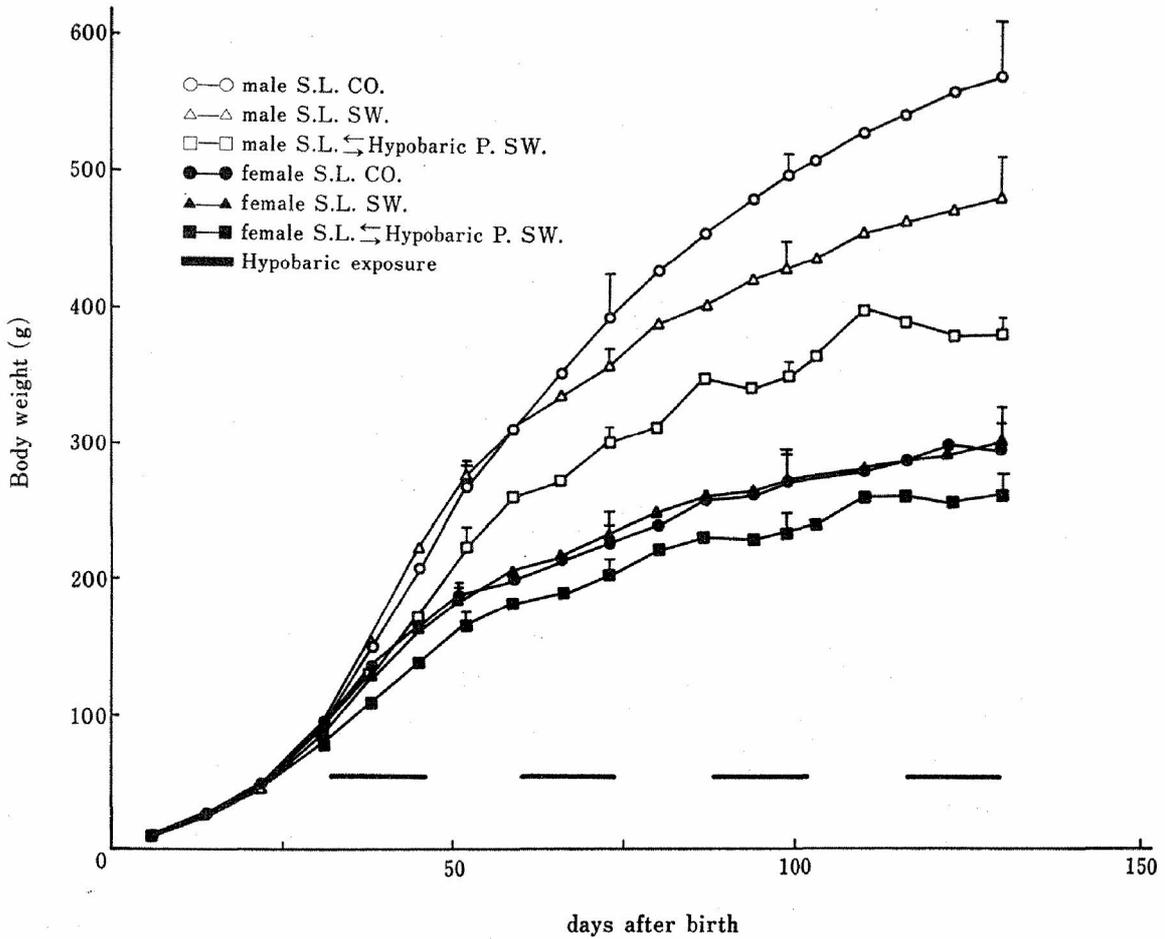


図1 発育に伴う各グループの体重変化

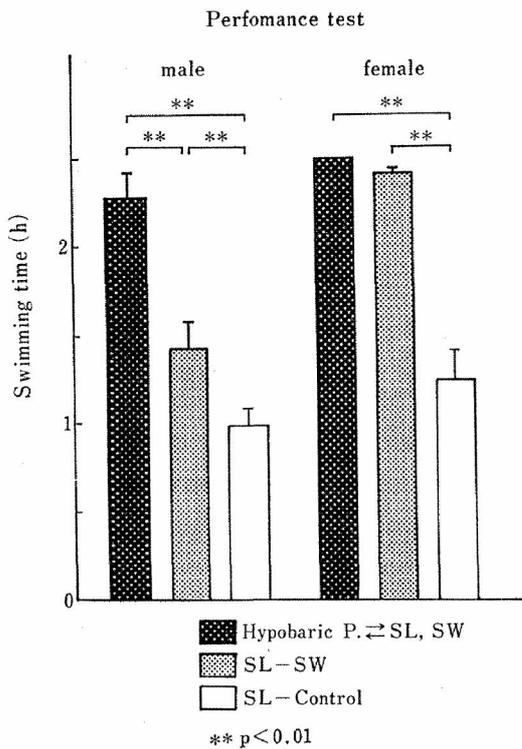


図2 水泳による持久性テスト

ては、図5にみられるように、長指伸筋と同様に、雄の低圧運動群のFOG fiberの比率が、常圧運動群に比較して高い傾向があるが、個体差が大きく、その差は統計的に有意ではなかった。雌では、雄に比較して、三群ともSO fiberの比率が若干高いように思われる。

考 察

骨格筋にみられる性差については、筋力を指標とした男女の比較が一般的である。しかし、最大筋力にみられる性差は筋横断面積の差によるものであり、単位面積当りの筋力には性差のないことが明らかとなった⁸⁾。

骨格筋の発達には、遺伝、栄養、内分泌、活動状態など多くの因子が複雑に影響しているものと考えられる。

Kochakian¹³⁾らは、去勢によって雄の動物の筋重量は減少するが、androgen 投与により回復す

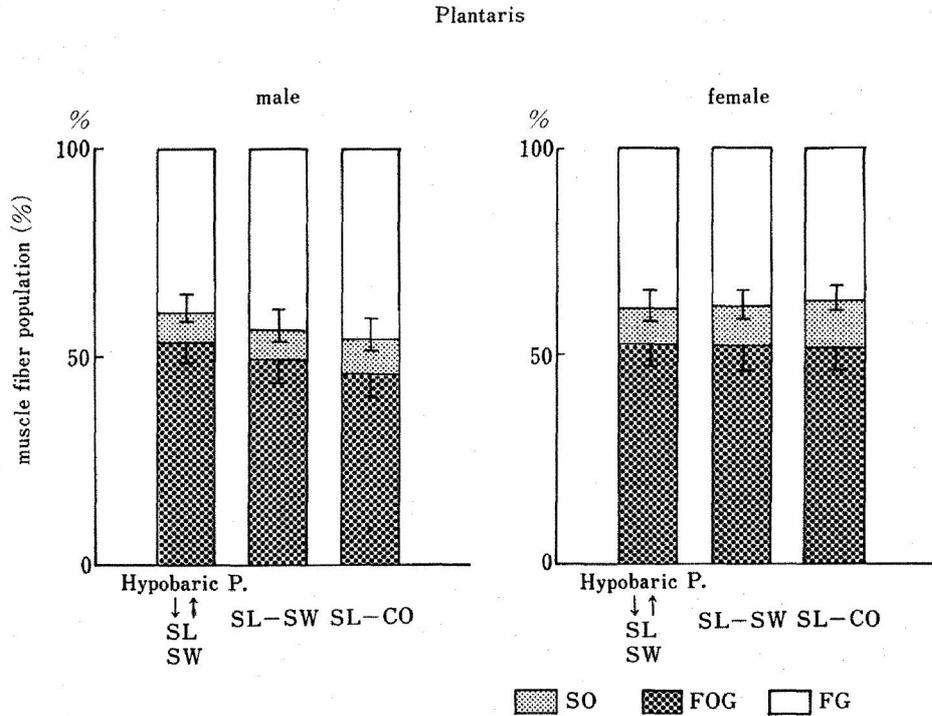


図5 足底筋の横断面の筋線維組成の比較

ることから androgen の蛋白同化作用へのかかわりあいを認めている。

発育に伴う筋組成の変化に性差があるかどうかについての研究では、菊地¹²⁾は、内分泌因子としての性ホルモンとくに卵胞ホルモンが骨格筋に対して蛋白異化的に作用し、骨格筋の発達、とくに白筋線維にその影響が大であったと報告し、筋線維の種類によってその影響の異なることを示唆している。

杉浦ら¹⁹⁾は、ラットについて総 NCP 量を測定し、筋 1g 当りで見れば性差や加齢変化は認められないとし、ヒトの筋蛋白量の性差についての、Grimbyら⁹⁾、マウス筋蛋白量の加齢変化をみた Salminenら¹⁸⁾と同様の結果を得ている。

一方、筋線維構成からみた性差については、Vaughanら²¹⁾は、成熟マウスのヒラメ筋で雄の Type I fiber の比率が雌に比して有意に低く、去勢により雌の値に近づくことを報告し、Gutmannらも androgen の fiber type への影響を認めて

いる。さらに的場ら^{14,15)}は、マウスヒラメ筋で、発育時に Type I fiber の比率の増加を認め、この増加の程度は雌が雄に比してより顕著であることを明らかにしている。また雄の去勢後は雌の値に近づくが、テストステロン投与により回復することを認め、雄ではテストステロンにより Type I fiber の増加の程度が抑制されるためであろうと推論し、性ホルモンが筋線維組成に及ぼす影響を認めている。

本研究において、低圧、低酸素環境暴露により、雄のヒラメ筋の SO fiber の比率が、常圧群のそれに比して有意に低いことを認めたが、この低圧群にみられる SO fiber の比率は実験開始時の 5 週齢のラットの比率にほぼ等しく、加齢に伴う SO fiber の比率の増加が、低圧環境暴露という刺激により、テストステロンの存在下で抑制されたのではないかと考えられる。このことは、伊藤ら¹¹⁾の雄ラットを去勢することにより同様に低圧環境暴露しても、SO fiber の比率は常圧下のそれ

と差がなかったことから肯定できるであろう。

しかし、他の足底筋、長指伸筋では性差は認められなかった。

文 献

- 1) Alan Tucker and Steven M. Horvath; Relationship between organ weight and blood flow in rats adapted to simulated high altitude. *Aerospace Medicine*, **44**(9) : 1036—1039(1973)
- 2) Anderson, P. and J. Henriksson; Training induced changes in the subgroups of human type II skeletal muscle fibres. *Acta Physiol. Scand.*, **99** : 123—125 (1977 a)
- 3) 浅野勝己; 高所トレーニングの応用と効果, *J. J. of Sports Science*, **4**(11) : 834—836 (1985)
- 4) Baka, T. and Anderson, P; Histochemistry (P.P.313), New York Hoeber Medical Division, Harper and Row Publishers (1963)
- 5) Carl M. Maresh, Bruce J. Noble, Kenneth L. Robertson and Wesley E. Sime; Maximal exercise during hypobaric hypoxia (447torr) in moderate-altitude natives. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, **15**(5) : 360—365 (1983)
- 6) Daniel S.Miles. James A. Wagen, Steven M. Horvath and John A. Reylurn; Absolute and relative work capacity in women at 758, 586 and 523 torr barometric pressure, *Aviation Space, and Environmental Medicine*, **51**(5) : 439—444 (1980)
- 7) Davies, A.S. and H.M. Genu; Histochemical fiber types in the mammalian diaphragm. *J. Anat.*, **112** : 41—46 (1972)
- 8) 福永哲夫; ヒトの絶対筋力, 杏林書院 (1978)
- 9) Grimby, G., Danneskiold-Samsøe, B. Hvid, K. and Saltin B; Morphology and enzymatic capacity in arm and leg muscle 78—81year old men and women. *Acta Physiol. Scand.*, **115** : 125—134 (1983)
- 10) 猪飼道夫; 高地トレーニング, 医学のあゆみ, **64** : 551—556 (1968)
- 11) 伊藤一生, 田口貞善, 伊藤稔, 廣藤千代子, 武内ひとみ; 低圧およびトレーニングが骨格線維の組織化学的特性に及ぼす影響, 日本体育学会第36回大会 (1985)
- 12) 菊地邦雄; 赤筋線維, 中間筋線維および白筋線維の発達におよぼす性ホルモンの影響に関する組織学的研究, *体育学研究*, **20**(4) : 195—201(1975)
- 13) Kochakian, C.D. and Cockrell, D; Response of individual muscle of the guinea-pig to large doses of testosterone propionate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **97** : 148—149 (1958)
- 14) 的場秀樹; マウスヒラメ筋の fiber type 比に及ぼす去勢の影響について, 山口大学教養部紀要, **10** : 267—275 (1975)
- 15) 的場秀樹, 村上恵; 雌雄マウス・ヒラメ筋の生後発育に関する組織化学的研究, *日本生理誌*, **48** : 466—473 (1986)
- 16) Padykula, H.A. and E. Herman; The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase, *J. Histochem. Cytochem.*, **3** : 170—195 (1955)
- 17) Peter, J.B., Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Gillespie, C.A. and Stempel, K.E; Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits, *Biochemistry*, **11**, 2627—2633 (1972)
- 18) Salminen, A. and Vihko V; Effects of age and prolonged running of proteolytic capacity in mouse cardiac and skeletal muscle, *Acta Physiol. Scand.*, **112** : 89—95 (1981)
- 19) 杉浦崇夫, 的場秀樹, 村上恵; ラット骨格筋の酵素活性の性差に関する研究, *体力科学*, **32** : 17—24 (1983)
- 20) Taguchi S., Yuko Hata and Kazuo Itoh; Enzymatic responses and adaptations to swimming training and hypobaric hypoxia in post-natal rat. *Japanese J. of Physiol.*, **35** : 1023—1032 (1985)
- 21) Vaughan, H.S., Aziz-Ullah, Galdspink G, and Nowell N.W; Sex and stock differences in the histochemical myofibrillar adenosin triphosphatase reaction in the soleus muscle of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, **22** : 155—159 (1974)