

幼少期の筋力トレーニングが成熟後の トレーニング効果に及ぼす影響について

東京大学大学院 山田 茂

The Influence of a Muscular Strength Training in the Immature Period on Training Effect after Maturity

by

Shigeru Yamada

*Graduate school of arts and sciences, Department of sports
sciences, The University of Tokyo*

ABSTRACT

This study assessed the influence of muscle strength training in the immature period on training effect after maturity. Seven-week-old male Wistar rats were used in each group (experimental and control group). The tenotomy method was used to create a model of muscle hypertrophy. The rats in the experimental group, were repeatedly injected with bupivacaine to activate a satellite cells in their muscle tissue.

After three bupivacaine injections, the muscle weight of the bupivacaine experimental group was recovered to the muscle weight of the control group, and a tendon was then removed surgically. The muscle cells in the tissue of the control group were enlarged and exhibited muscle hypertrophy, and open spaces were observed in the perimysium and endomysium. Small cells with central nuclei, were observed in the perimysium and endomysium.

Most muscle cells were newly generated after three bupivacaine injections. Most of the muscle fibers the contralateral muscle in the experimental group had central nuclei.

In addition, enlarged cells formed by fusion between muscle cells were observed in the muscle tissue in the tenotomy side in the experimental group.

The FGF was expressed in the muscles in the control group, and its expression increased with compensation load. In the experimental group, on the other hand, the level of FGF gene expression on the contralateral side was extremely decreased, but it increased in response to a compensation load.

Increases in plantaris and soleus muscle weight after maturity were compared in the group in which muscle hypertrophy was induced by tenotomy in the immature period and in the control group. The rates of increase in weight of the plantaris muscle, were significantly different between the two groups, and also there was a significant difference in the weight of soleus muscle, a so-called slow muscle, between the two groups.

Muscle weight in the group of rats whose tendon was removed surgically in the immature period increased in response to compensatory load. The results of experimental 1 suggested that activation of satellite cells in the immature period adversely affects muscle enlargement after maturity. However, no such results were obtained in this experiment. Future study is needed to elucidate the case.

はじめに

幼少期の筋力トレーニングが成熟後のトレーニング効果にどのような影響をおよぼすのであろうか？骨格筋の成長は個々の筋細胞の肥大と増殖によるものである。その筋細胞の増殖は成長ホルモン、テストステロンなどの内分泌系ホルモンの作用によるものと、線維芽細胞成長因子、インスリン様成長因子など自己分泌や傍分泌系の成長因子の働きによっておこるものがある^{1), 2), 3)}。筋力トレーニングによる筋の成長にはこれら、内分泌系物質や成長因子に加え、機械的伸展刺激もその役割を担っている。In vitroでの機械的伸展刺激による実験研究から、筋そのものの活動が筋の成長を促すことが判明している。したがって筋活動によるトレーニング効果は幼少期から老年期まで期待される。

筋力トレーニングによる筋肥大も個々の筋細胞

の肥大と増殖によるものである。この筋細胞の肥大と増殖はサテライト細胞の活性化に依存する。筋活動によりサテライト細胞が活性化され、増殖し、その後、サテライト細胞は互いに融合して新たな筋線維を形成する⁴⁾。さらに、既存の筋線維は肥大し、その筋線維には多くの核が含まれている。最終の分化産物である筋線維は細胞分裂や核分裂をしない。したがって肥大筋線維に含まれる核の由来はサテライト細胞であることが示唆される。このような視点で考えれば、サテライト細胞は、運動による筋肥大に欠くことのできない存在である。

幼少期の筋力トレーニングは、発育にともなうサテライト細胞の活性化に加え、さらなる、サテライト細胞の分裂を招くことが予想される。このようにサテライト細胞は、骨格筋の補償細胞として存在するものの、その分裂能には限界がある。したがって、サテライト細胞の分裂を駆使するよ

うな状態に何度もであった場合、その適応能力は徐々に失うものと考えられる。

そこで本実験では幼少期のトレーニングが成熟後のトレーニングに及ぼす影響について検討した。

1. 方法

1. 1 実験1

A. 実験動物

動物はWister系（日本クレア株式会社）のラット7週令雄を用い、実験群と対照群の二群にわけを行った。各群7匹用いた。動物は恒温23 ± 0.5℃、恒湿60 ± 5%とも完全自動制御された部屋で飼育された。餌や水の摂取はとくに制限を設けることなく自由とした。

B. 代償性負荷方法

骨格筋への負荷方式には筋肥大誘導モデルとしての腱切除法を用いた⁵⁾。ラット右側後肢足首を底屈する下腿背部の筋である腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋のうち一番大きな腓腹筋の腱を切断し、残されたヒラメ筋、足底筋に代償的負荷をかける方法である（代償性負荷筋）。左側後肢下腿部の腓腹筋の腱は擬似的に手術を行った（対照筋）。筋への負荷期間は7日間とした。腱切除1週間後に麻酔下で屠殺し、両足のヒラメ筋を採取し重量を測定した。測定には電子天秤を用いた。

C. サテライト細胞の活性化法

筋組織内のサテライト細胞の数を減少させる方法として局所麻酔剤である塩酸ブピバカイン（Marcain 0.5%（藤沢薬品））投与方法を用いた⁶⁾。2週間おきに3回、ヒラメ筋にブピバカイン投与後、投与群の筋がほぼ対照群の筋重量に回復するのを待って、代償性の負荷を与えた（図1）。

D. 細胞の形態の観察

細胞の形態を観察するために骨格筋採取後10%のホルマリン（和光純薬）で固定した。その後、十分に骨格筋を磷酸緩衝液で洗浄後、アルコールの濃度を変え、段階的に脱水を行い、その

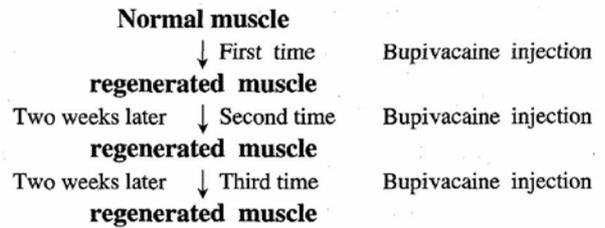


図1 Method of Making regenerated muscle by Bupivacaine injection

後樹脂（ヒストレジン）で包埋した。樹脂を筋組織内に充分浸透させるため50%樹脂に数時間浸透し、その後、100%樹脂液に筋組織を浸透した。その後、固定剤を加えた。包埋した検体はマイクロトームで5 μmの切片に調整した。筋切片の染色はヘマトキシリン-エオジンで行った。

E. 成長因子遺伝子発現の検索（ノーザンプロット法）

液体窒素で急速凍結した骨格筋を液体窒素存在下で破碎し、RNAを抽出した⁷⁾。得られたRNAからcDNAを合成し、これを鋳型としてPCR反応を行った。反応に用いる鋳型cDNA量はコントロール反応（GAPDH cDNAの増幅）で同等であるように補正された量とし、PCRプライマーはbFGFの翻訳領域全体（465bp）が増幅できるように選択した。PCRは94C. 1分/50C. 2分/72C. 3分で30サイクル行った。ついでナイロンメンブレン（Hybond-N）に転写し、32P標識されたbFGFプローブで検出した。

1. 2 実験2

A. 実験動物

動物はWister系（日本クレア株式会社）のラット3週齢雄を用い、実験群と対照群の二群にわけた。各群5匹を用いた。動物は恒温23 ± 0.5℃、恒湿60 ± 5%とも完全自動制御された部屋で飼育された。餌や水の摂取はとくに制限を設けることなく自由とした。

B. 代償性負荷方法

骨格筋への負荷方式には実験1と同じ腱切除法を用いた。3週齢雄の右側後肢足首の底屈に關する腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋のうち一番大きな腓腹筋の腱を切断し、残されたヒラメ筋、足底筋に代償的負荷をかけた。左側後肢下腿部の腓腹筋の腱には擬似的に手術を施した。このとき腱のみを切断し、腱を取り除くことなく、腱が融合するまで負荷をかけた(実験群)。その後、8週間後、同じ部分の腱を切除し、筋に負荷をかけた。対照群にはこのとき初めて腱切除を施した。1週間後に両群のラットを麻酔下で屠殺し、両足のヒラメ筋と足底筋を採取し重量を測定した。

2. 結果

2.1 実験1

I. 筋の発達に及ぼす代償性負荷の影響

ブピバカイン投与後、実験筋の重量が対照群の筋重量値に回復するのを待って、筋肥大への効果を比較検討した。対照群では代償負荷により明らかにヒラメ筋の重量は増加し、統計的に有意な変化を示した。実験群でのヒラメ筋の重量はわずかな肥大効果を示し、統計的には有意な変化でなかった(図2)。

II. 筋線維の発達に及ぼす代償性負荷の影響

実験群と対照群への代償性負荷の効果を組織学的に観察した。対照群の組織像はこれまでの報告同様、筋肥大にともない個々の筋細胞が肥大し、細胞間隙が開いているのが観察された。さらにその細胞間隙には中心核を持った小さな細胞が観察された。実験群の対照筋のほとんどの筋線維は細胞の中心に核を持ち細胞膜周辺に核をもった細胞は、ほとんど観察されなかった。また、代償性負荷を受けた腱切除側の中心核を持った細胞が互いに融合した像が観察された。実験群においても対照群で見られたような小さな細胞が細胞間隙に観察された(図3 a, 図3 b)。

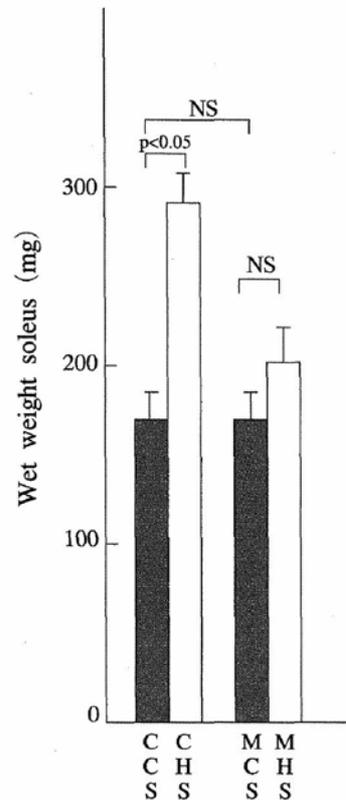


図2 Effects of tenotomy on the growth of normal and regenerated muscle in rats

CCS: control soleus muscle in control group
 CHS: tenotomized soleus muscle in control group
 MCS: control regenerated soleus muscle in experimental group
 MHS: tenotomized soleus muscle in experimental group

III. 筋の線維芽細胞成長因子遺伝子発現に対する代償性負荷の影響

筋の肥大にともない傍分泌あるいは自己分泌されるであろう線維芽細胞成長因子の動態を遺伝子発現から観察した。観察の方法としては、RT-PCR法で塩基性線維芽細胞成長因子(b-FGF)のmRNAをcDNAとして増幅した。その結果、対照群のbFGF発現は代償性負荷のない状態でも認められたものの、明らかに代償性負荷によりbFGFのmRNAは増加した。一方、実験筋群におけるbFGFの発現は極端に減少した。しかしながら、腱切除側でbFGFのmRNAが増加した(図4)。

2.2 実験2

幼少期の筋代償性負荷が成熟後の筋肥大効果に

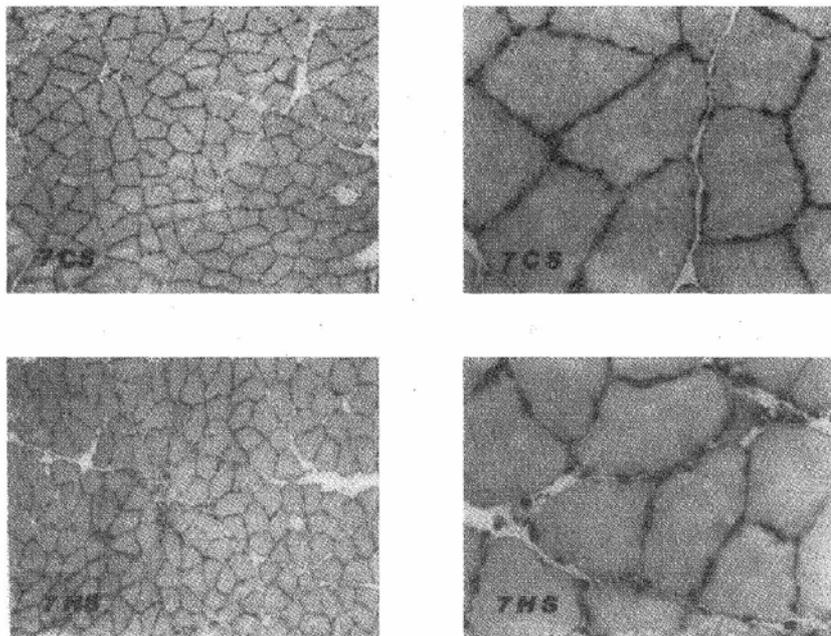


図 3 a Photographs of muscle tissue in control group

7CS: control soleus muscle in control group

7HS: tenotomized soleus muscle in control group

Photographs on the right and left sides are images of x400 and x100 respectively.

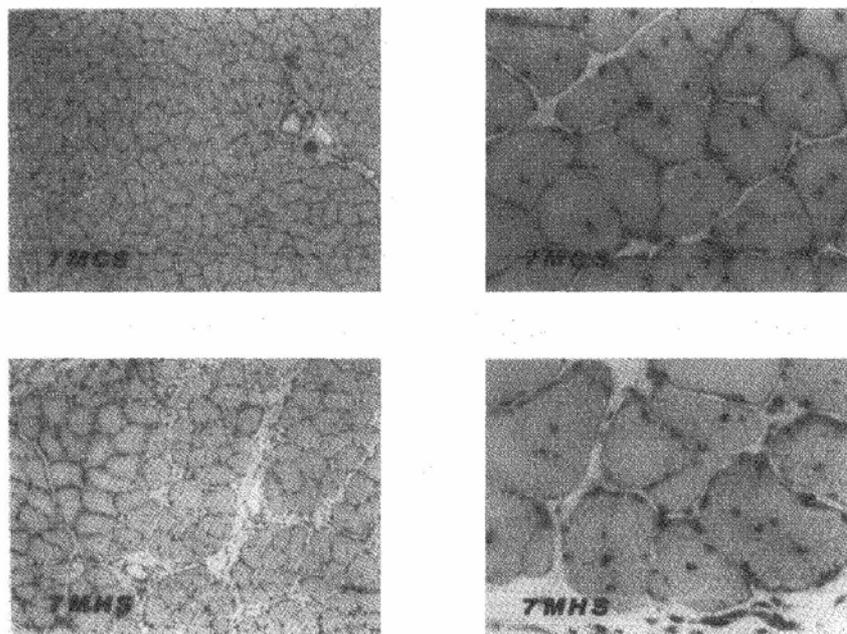


図 3 b Photographs of muscle tissue in experimental group

7MCS: control regenerated soleus muscle in experimental group

7MHS: tenotomized soleus muscle in experimental group

Photographs on the right and left sides are images of x400 and x100 respectively.

及ぼす影響

幼少期に代償性筋肥大を促した群（実験群）とラットが成熟した後、代償負荷を施した群（対照群）の、ヒラメ筋と足底筋の重量の増加率をもとめた。その結果、速筋である足底筋の増加率は対

照筋で 26.5 %，実験群で 92.7 % の増加を示し、両群間には統計的に有意な差が観察された。一方、遅筋であるヒラメ筋では対照群で 34.9 %，実験群で 45.5 % の増加を示した。同じく両群間では統計的に有意な変化が観察された。このように幼

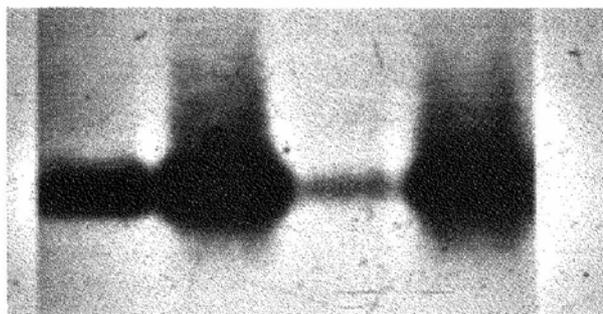


図4 Influence of tenotomy on the fibroblast growth factor gene expression in the regenerated muscle

CCS: control soleus muscle in control group
 CHS: tenotomized soleus muscle in control group
 MCS: control regenerated soleus muscle in experimental group
 MHS: tenotomized soleus muscle in experimental group

少期に腱切除をして、筋に負荷をかけた群で高い値を示した(表1)。

表1 The influence of tenotomy in the immature period on compensatory muscle hypertrophy after maturity

	Control group		Tenotomized group in the immature period	
	Mean (mg)	SD	Mean (mg)	SD
Soleus muscle				
contralateral side	159.1	3.8	135.6	9.3
tenotomized side	214.7	24.2	197.6	35.1
Plantaris muscle				
contralateral side	382.0	26.3	317.5	27.5
tenotomized side	481.5	26.5	611.8	164.8

3. 考察

3.1 実験1

I. 代償性負荷が筋の肥大に及ぼす影響

腱切除法は、筋肥大を誘導するモデルとして一般的に用いられている。このモデルを用いた実験で、肥大筋には、個々の筋線維の肥大とともに新たな筋線維の出現が観察される^{1), 2), 3)}。サテライト細胞は新たな筋線維を形成する筋原細胞であると同時に筋線維の肥大に関与する。したがって今回の実験のようにサテライト細胞の分裂能を減退させた筋では代償性負荷に対する適応能は著しく

減少したと思われる。

II. 代償性負荷が筋線維の肥大に及ぼす影響

ブピバカインを投与し、代償性負荷を受けた筋で、個々の筋細胞は大きく肥大した。これは運動に対する筋細胞の基本的な適応現象として捉えることができる。近年、骨格筋の肥大にともない筋細胞の増殖が示されているものの、運動による筋肥大の主因は個々の筋細胞の肥大によるものである。すなわち骨格筋の運動に対する適応は個々の筋細胞の肥大を起こすことが優先されるように思われる。

これまで運動刺激によって促された筋細胞肥大の機構解明はタンパク質の合成や分解の抑制に着目され生化学的に研究が行われてきた。しかしながら今回の実験に示すようにサテライト細胞の融合が筋細胞の肥大にとって重要な要因であることから今後、細胞生物学的な視点での研究が望まれる。今回の実験で、実験群で筋肥大が起きにくい背景にサテライト細胞の分裂能の減退とサテライト細胞の減少が考えられる。もし既存の筋細胞とサテライト細胞の融合によって筋が肥大するとしたならば、そのサテライト細胞は筋細胞肥大の器となる細胞膜と蛋白質合成を促す核を提供することになる。事実、対照群、実験群とも代償負荷にともない、細胞周辺に多くの核をもつ細胞が観察できる。さらに実験群の代償負荷を受けた筋で細胞どうしが融合したと思われるような、細胞が多数存在していることである。このようにして筋細胞は肥大し負荷に適応した形づくりをしているものと思われる。これらを解明するためには時間経過を追って観察する必要がある。たとえば、トレーサーを用いた実験などを行ってより確かな証拠が要求される。

III. 代償性負荷が筋の線維芽細胞成長因子遺伝子発現に及ぼす影響

このモデルにより誘発される筋肥大は、テストステロン、成長ホルモンやインスリンさらには神

経系など筋の成長を促す因子に依存しない。その後の研究で、このモデルによって誘導された肥大筋で線維芽細胞成長因子の活性が高いことが示されている。この成長因子はDNA合成やミオシン合成を促進し、筋線維の増殖や肥大に関与することが知られている^{2), 3)}。またこの成長因子の由来がサテライト細胞であることが示されている。今回の実験の結果、明らかにブピバカイン投与により線維芽細胞成長因子の発現が減少した。この現象はサテライト細胞の減少を示唆するものである。しかしながら実験群の腱切除側で線維芽細胞成長因子の遺伝子発現が増加したのはサテライト細胞以外の筋組織の細胞によるものと思われる。その可能性として筋組織に浸潤した血液由来の細胞が示唆される。その血液由来の細胞のなかでも、線維芽細胞成長因子を合成分泌することが報告されているマクロファージである⁴⁾。事実、筋肥大に伴い細胞間隙にマクロファージらしき細胞が多数観察されている。このように骨格筋肥大にともない増大する線維芽細胞成長因子の由来についてはサテライト細胞とマクロファージの両方に求めることができる。しかしながらそれらの細胞それぞれから分泌される機構や生理的な意味の違いについては今回の実験からは推測の域を出ない。今後それぞれの細胞での線維芽細胞成長因子の合成、分泌機構を解明することによって骨格筋細胞の肥大機構や増殖機構が解明されるものと思われる。

3. 2 実験 2

幼少期の筋代償性負荷が成熟後のトレーニング効果に及ぼす影響

実験1の結果から想像すると、幼少期のトレーニングはサテライト細胞の過剰な活性化を招き、成熟後の筋肥大効果にマイナスに働くものと考えられる。しかしながら、本実験で示すように、逆に速筋、遅筋とも、幼少期に代償性負荷を加えた群は成熟後の筋肥大効果にプラスに作用した。代

償性負荷を施すこの腱切除法の特徴は、体重を重荷とし、身体を支える、抗重力筋であるヒラメ筋につよく作用するものと考えられるが、肥大率を比較すると明らかに速筋でその効果は大きかった。従って、今後は、サテライト細胞の活性化機構を含め、個々の筋細胞の成長の可塑性について、さらに実験を進める必要がある。

4. まとめ

本実験は幼少期の筋力トレーニングが成熟後のトレーニング効果に及ぼす影響について検討した。

4. 1 実験 1

Wistar系のラット7週令雄を各群7匹用いて実験を行った。骨格筋の負荷方式には腱切除法を用いた。

筋組織内のサテライト細胞の活性化を促すためにブピバカインを繰り返し投与した。3回のブピバカイン投与後、投与群の筋がほぼ対照群の筋重量に回復するのを待って腱切除を行なった。対照群の組織像は筋肥大とともに個々の筋細胞が肥大し、細胞間隙が開いた像が観察された。3回のブピバカイン投与により、実験群の対照筋の筋線維のほとんどは中心核を持ったものであった。代償性負荷を受けた筋には、中心核を持った細胞の融合した像が観察された。線維芽細胞成長因子の遺伝子発現を検討した結果、代償負荷をかけない状態でも対照群において線維芽細胞成長因子の遺伝子の発現がみられた。代償性負荷は顕著に遺伝子を発現させた。一方、実験群の対照筋での線維芽細胞成長因子の遺伝子発現量は対照群の対象筋に比べ極端に減少した。腱切除側は対照側に比べて線維芽細胞成長因子の遺伝子発現は増加した。

4. 2 実験 2

幼少期に腱切除を施し、代償性筋肥大を促した群と対照群のラットが成熟した後、再び腱切除を

施し、代償性負荷を加え、1週間後、ヒラメ筋と足底筋に対する肥大効果を比較した。足底筋の増加率は両群間で統計的に有意な差が観察された。同様に、ヒラメ筋の重量も両群間で統計的に有意な変化が観察された。このように、幼少期に筋に負荷をかけた群は成熟後、高い値を示した。

文 献

- 1) Yamada S., Buffinger N., DiMario J. et al. ; Fibroblast growth factor is stored in fiber extracellular matrix and plays a role regulating muscle hypertrophy, *Med. Sci. Sports*, 21, S 173-S180 (1989)
- 2) R. C. Strohman, J. Dimario, N. Buffinger & S. Yamada ; The control of satellite cell growth in skeletal muscle during hypertrophy and regeneration ed, *Dirk Pette*, 707-717 (1990), The Dynamic state of muscle fibers, Walte de Gruyter, Berlin
- 3) S. Yamada, H. Kimura, A. Fujimaki, R. Strohman ; Expression of fibroblast growthfactors in exercise-induced muscle hypertrophy with special reference to the role of muscle satellite cells, *Medicine and Sports Science*, 37, pp67-83 (1992)
- 4) Allen R, Dodson M, Luiten L ; Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation by bovine pituitary fibroblast growth factor, *Exp. Cell. Res.*, 152, 154-160 (1984)
- 5) Denny-Brown, D ; Experimental studies pertaining to hypertrophy, regeneration, and degradation in Neuromuscular Disorder, ed. Adams, R. D., Eaton, L. M., and Shy, A. M., 147-196 (1964), Proceeding of the Association for Research in Nerve and Mental Disease, Baltimore: Williams &Wilkins.
- 6) Shultz E, Jaryszak D, Valliere CR ; Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury, *Muscle Nerve.*, 8, 217-222 (1985)
- 7) J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis ; Molecular Cloning Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)