

加齢と活動量増大に伴うラット横隔膜の機能的・代謝的適応変化

庄野恵美子¹⁾ 山野聖子¹⁾ 宮田浩文²⁾

FUNCTIONAL AND METABOLIC ADAPTATION OF THE RAT DIAPHRAGM TO AGING AND COMPENSATORY INCREASED ACTIVITY

EMIKO SHONO, SEIKO YAMANO and HIROFUMI MIYATA

Abstract

We examined age-related changes in functional, morphological and metabolic adaptations of the rat diaphragm muscle to compensatory increased activity. Forty-two male Wistar rats (6, 48 and 100 weeks after birth) were randomly divided into control (CTL) and compensatory activation (CAC) groups (n=7 in each group). In the CAC group, denervation surgery in the hemidiaphragm was performed to induce compensatory activation on the contralateral hemidiaphragm muscle. Four weeks later (10 weeks, 1 year and 2 years after birth), isometric contraction properties by in-vitro physiological measurement, fiber type composition and metabolic properties (succinic dehydrogenase (SDH), 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD) and phosphofructokinase (PFK)) were analyzed by histochemical and biochemical procedures.

In the CTL groups, significant prolongations in the contraction and half-relaxation times were found in 2-year group, as compared to 10-week group. This age-related changes were attributed to changes in muscle fiber type composition; selective hypertrophy in Slow-twitch Oxidative fiber. In 2-year CAC group, as compared to age matched CTL group, significant improves were found in the half-relaxation time, SDH activities in each fiber type, HAD and PFK activities of the diaphragm muscle.

These results demonstrated that the aged diaphragm muscle has a tendency toward slow muscle in functional and morphological properties, and that the muscle has a high adaptability to compensatory increased activity, at least in metabolic properties.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2005, 54: 121~132)

key word: aged diaphragm, contraction properties, metabolic properties

I. 緒 言

四肢の骨格筋における加齢変化については数多くの報告があり、筋量及び筋力の低下が広く認知されている^{1,8,13,14,19,23,26}。また、骨格筋がトレーニングによる活動量増大^{17,28,34,35}や、尾部懸垂、ギブス固定などの著しい活動量減少¹⁵によって顕著な適応変化を示すことは多くの実験で明らかにされており、骨格筋量と活動量には密接な関係がある。したがって、骨格筋の加齢変化には、その筋の使用頻度や強度、すなわち活動量の加齢にともなう減少が少なからず関与していると考えられる。加齢に伴う活動量の減少は、哺乳動物の行動観察的研

究^{16,20,22})において詳細に調べられているが、その原因は非常に複雑であり未解決な部分が多い。最近、運動の動機付けに關与するドーパミンシステムの変化、すなわちドーパミン産生ニューロンの欠損、ドーパミンレセプター密度の低下なども加齢に伴う身体活動の減少に大きな影響を与えることが指摘されている²¹。このような身体活動の減少は呼吸活動の減少を伴うことが予想される。呼吸活動は横隔膜を含む呼吸筋と称される骨格筋群により実現するが、呼吸筋の加齢変化に関する検討は十分にはなされていない。

骨格筋の活動量は、その筋に要求される機能や運動様式によって大きく異なる。例えば、ネコの下腿

¹⁾ 山口大学大学院 農学研究科
〒753-8515 山口市吉田1677-1

Department of Biological science, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University,
Japan

²⁾ 山口大学 農学部 生物機能科学科
〒753-8515 山口市吉田1677-1

筋における長時間の筋電図記録¹⁸⁾は, ヒラメ筋の duty time(活動時間/総時間)は約13.9%であるのに対して, 長指伸筋のそれは1.9%程度しかないことを明らかにしている. さらに, 呼吸運動の主働筋である横隔膜は吸息時に常時活動しているため, その duty time は約40%に及び³⁰⁾, 他の骨格筋に比べ圧倒的に総活動量が多い.

そこで本研究では, 活動量の多い横隔膜において加齢変化が生じるのか, さらに極端な活動量増大に対して老齢期の横隔膜は適応力を有しているのかについて, 収縮特性, 構造特性, 代謝特性の面から調べることを目的とした. 骨格筋の加齢に伴う変化とその適応力を様々な角度から明らかにすることは, 高齢者の健康や体力づくりのあり方を考える上で重要な意味を持つと思われる.

II. 方 法

A. 実験動物

実験動物には, 6週齢, 48週齢および100週齢の Wistar 系雄ラット各14匹(平均体重±標準偏差 = 186±10, 595±37および 603±83g)を用いた. 各ラットは 25×30×25 cm のゲージ内で飼育され, 餌, 飲水ともに自由摂取とした.

各週齢・年齢グループをコントロール(control: CTL)群と代償性活動量増大(compensatory activation: CAC)群に二分し, CAC 群には片側横隔膜の活動量を増大させるために, 以下の処置を行った. ペントバルビタールナトリウム(50 mg/kg)を腹腔投与し麻酔した後, 手術用顕微鏡下で頸部腹側の中心線を約4 cm切開し, 表層筋を注意深く開いた後, 右横隔神経軸索を露出した. 横隔神経軸索を1~2 cm 取り除くことによって神経切断側の横隔膜の活動を停止させ, 反対側横隔膜の活動量を増大させた. CTL 群には, 神経切除以外はすべて同じ処置を施

す Sham オペレーションを行った. Sham オペレーションまたは横隔神経切断から4週間後, すなわち生後10週齢, 1年齢および2年齢時に体重を測定し(表1), 以下の実験に供した. ペントバルビタールナトリウム(50 mg/kg)を腹腔投与し麻酔した後, 開腹して横隔膜を摘出し, 筋線維の走行方向に沿って幅5 mm 程度の横隔膜筋束を4~5個作成した. なお, 先行研究において, 横隔膜 Mid-Costal 部位には筋線維組成の部位差は無いことが報告されているが^{29,37)}, 正確を期するために神経軸索の付いている筋束を等尺性収縮特性および構造特性の評価用に, その筋束の腹側の2つの切片を代謝酵素活性測定に, 背側の筋束を予備として保存した.

なお, 全ての実験は, 「実験動物の飼養及び保管等に関する基準(昭和55年3月 総理府告示第6号)」に基づく山口大学農学部動物実験指針に従い実施した.

B. 等尺性収縮特性

横隔膜筋束に付着している両側の腱のうち, 肋骨側をクリップに固定し, 他方をトランスデューサーに連結してリンガー液(115 mM NaCl, 5 mM KHCO₃, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 20 mM NaHCO₃, 5 mM BES, 11 mM Glucose, 0.33 mM Glutamic acid, 0.38 mM Glutamine, 2 mM CaCl₂·2H₂Oを含む)中に固定した. リンガー液には95%O₂-5%CO₂を継続的に通入し, pH7.4, 25℃を保持した. 横隔膜筋束をトランスデューサー(三栄測器, 45196 A)に連結固定した後, プレート電極を介して電気刺激(2 ms矩形波)し, 最大単収縮張力が得られる筋長(至適筋長)に設定した. 刺激強度は最大単収縮力が得られる強度の125%に設定した. デジタルオシロスコープ上の単収縮曲線から最高張力高, 単収縮時間, 1/2弛緩時間を測定した. 張力 刺激頻度関係は, 5, 10, 20, 30,

Table 1. Mean value of body weight at denervation surgery and end of experiment in each group.

	CTL group			CAC group		
	10-week	1-year	2-year	10-week	1-year	2-year
Surgery	186±11	596±39	601±96	186±10	594±37	604±75
End of exp.	284±13*	604±40	597±94	282±12*	606±40	599±77

Values are means±SD. CTL: control, CAC: compensatory activation.

*: Significant difference from body weight at surgery($p < 0.05$)

50, 70, 100 Hz の各 1 秒間刺激によって発生した最高張力高を測定し, 10 g のキャリブレーションをもとに換算した。なお, 筋疲労が起こらないように各刺激間には最低 1 分のインターバルを置いた。張力測定後, 測定した至適筋長と筋重量を用い, Mendez & Keys²⁷⁾の式によって筋横断面積を求め, 各刺激頻度に対する単位断面積あたりの張力を算出した。使用した横隔膜は至適筋長に固定した状態で液体窒素を用いて凍結し, 組織化学分析に供するまで -80°C のフリーザー中に保存された。

C. 構造特性

至適筋長で凍結した横隔膜筋束から, 凍結ミクロトーム(ライカ CM510)を用いて連続横断切片(厚さ $10\ \mu\text{m}$)を作成し, Succinic dehydrogenase(SDH)染色および Myofibrillar ATPase 染色に用いた。SDH 染色は, Blanco たち⁶⁾の方法に基づき, コハク酸ナトリウムとニトロブルーテトラゾリウム(NBT)を含むリン酸緩衝液(pH 7.6)中で 8 分間インキュベーションした。NBT が還元され, 蓄積した Diformazan の濃度を SDH 活性の指標として用いた。Myofibrillar ATPase 染色は, Brook & Kaiser⁷⁾の方法に基づき, pH 4.6 と pH 10.3 で前処理を行った後, 30 分間インキュベーション(pH 9.4)を行った。これらの染色画像をパーソナルコンピュータに取り込み, Myofibrillar ATPase 染色画像より筋線維タイプを分類し, 画像処理システム(ライカ DC100 および Scion Image)を用いて, SDH 染色画像より各筋線維タイプの横断面積と SDH 活性レベル(Optical Density: OD)をそれぞれ測定した。また, 画像中にある各筋線維タイプの本数をカウントし, 筋線維タイプ組成(各筋線維タイプの本数比)を求めた。さらにこの筋線維タイプ組成と各筋線維タイプの平均横断面積をもとに, 筋束の横断面積に対する各筋線維タイプの面積占有率を求めた。

D. 代謝特性

脂肪酸分解経路・ β 酸化系の酵素 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase(HAD)と, 解糖系酵素 Phosphofructokinase(PFK)の活性を, 分光光度計(日本分光 V-530)を用いて測定した。液体窒素を用いて瞬間凍結し, -80°C のフリーザー中で保存された横隔膜サンプルを用いて各酵素活性を測定した。

HAD 活性測定では, 横隔膜サンプル(20~50 mg)を氷冷溶液(175 mM KCl, 10 mM Glutathione, 2 mM EDTA を含む)中でホモジネートし, Bass たち³⁾の方法に従って測定した。PFK 活性測定では, 別の横隔膜サンプル(20~40 mg)を氷冷溶液(150 mM KCl, 50 mM KHCO_3 , 6 mM EDTA を含む)中でホモジネートし, Shonk & Boxer⁴⁰⁾の手法に基づいて測定した。また, 構造特性分析において測定した各筋線維タイプの SDH 活性レベル(OD)を用いて, 以下の Beer-Lambert の式をもとに NBT-dfz 濃度を求め, 各筋線維タイプの平均 SDH 活性をフマル酸への酸化速度として表現した($\text{mmol fumarate}/\text{l}/\text{min}$)⁶⁾。

$$[\text{NBT-dfz}] = \text{OD} / \text{kl}$$

ここで, k は NBT-dfz のモル吸光係数(26, 478/ mol/cm), l は光が通過する長さ, すなわち筋切片の厚さ($10\ \mu\text{m}$)である。

E. 統計処理

結果はすべて平均値と標準偏差で表した。年齢(10 週齢, 1 年齢, 2 年齢)および活動量(CTL 群, CAC 群)をもとに二元配置の分散分析を行い, その後の多重比較は Bonferroni 修正の t-test を行った。すべての検定において, 有意水準は $p < 0.05$ とした。

III. 結 果

A. 体 重

各週齢・年齢群の手術直前および解剖直前(手術後 4 週間)の体重を表 1 に示した。10 週齢群のラットにおいては, CTL 群および CAC 群ともに発育に伴う有意な体重変化が認められた。1 年齢および 2 年齢群においては, CTL 群と CAC 群ともにわずかな体重増減が認められたが, 有意差はなかった。また, いずれの週齢・年齢群においても CTL 群と CAC 群の間に有意差は認められなかった。

B. In-vitro 筋収縮特性

各週齢・年齢における CTL 群と CAC 群の単収縮曲線の一例を図 1 に示した。これらの曲線を基に測定された各群の単位断面積あたり張力(peak twitch tension; N/cm^2), 単収縮時間(time to peak

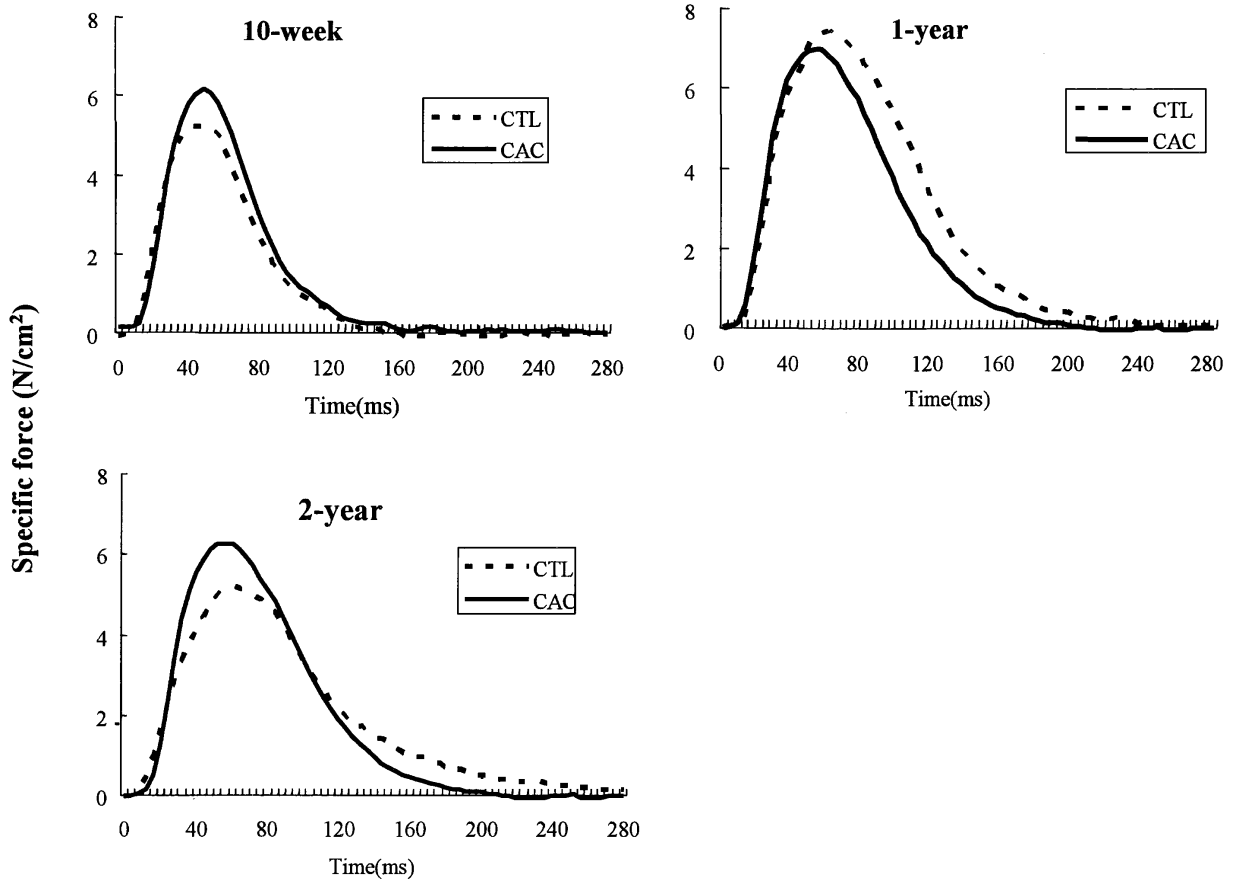


Fig. 1. Samples of twitch force curve in control(CTL)and compensatory activation(CAC) diaphragms in 10-week, 1- and 2-year age groups.

tension ; ms), および 1/2 弛緩時間(half relaxation time ; ms)の平均値を表 2 に示した . 加齢に伴う変化として , 単収縮時間と 1/2 弛緩時間の有意な延長が認められた . 同週齢・年齢の CTL 群と CAC 群の比較を行った結果 , 単収縮時間には有意な変化が認められなかったが , 1/2 弛緩時間は 2 年齢群の CAC 群で有意に短縮した .

図 2 に , CTL 群および CAC 群における 1 ~ 100

Hz の刺激頻度に対する発生張力 (N/cm²)を示した . 1 Hz 刺激では平均 5.9 ~ 8.0 N/cm² の張力が発生し , 70 Hz の刺激頻度では平均 14.3 ~ 20.0 N/cm² の張力が発生した . CTL 群における 50 ~ 100 Hz の範囲で発生した最大強収縮張力の平均値 (N/cm²)は , 10週齢が 16.1 ± 3.8 , 1 年齢が 19.8 ± 2.6 , 2 年齢が 15.1 ± 4.7 であり , 有意な加齢変化は認められなかった . また , CAC 群における最大強収縮張力

Table 2. Isometric twitch contraction properties of diaphragm muscle at 10-week, 1- and 2-year rats.

	CTL group			CAC group		
	10-week	1-year	2-year	10-week	1-year	2-year
PTT (N/cm ²)	6.6±1.5	8.0±1.6	5.9±2.5	7.1±2.0	6.8±2.4	7.8±2.1
TPT (ms)	53.2±6.2	75.3±11.1 ^a	69.4±10.7 ^a	51.2±5.3	63.8±17.5	60.6±12.1
RT _{1/2} (ms)	57.0±10.9	66.8±13.9	75.8±12.3 ^a	58.5±9.5	56.3±5.6	55.4±8.1*

Values are means ± SD.

PTT : peak twitch tension ; TPT : time-to-peak twitch tension ; RT_{1/2} : half-relaxation time.

*: Significant difference from same age in control group(p < 0.05)

a : Significant difference from 10-week rats in same group(p < 0.05)

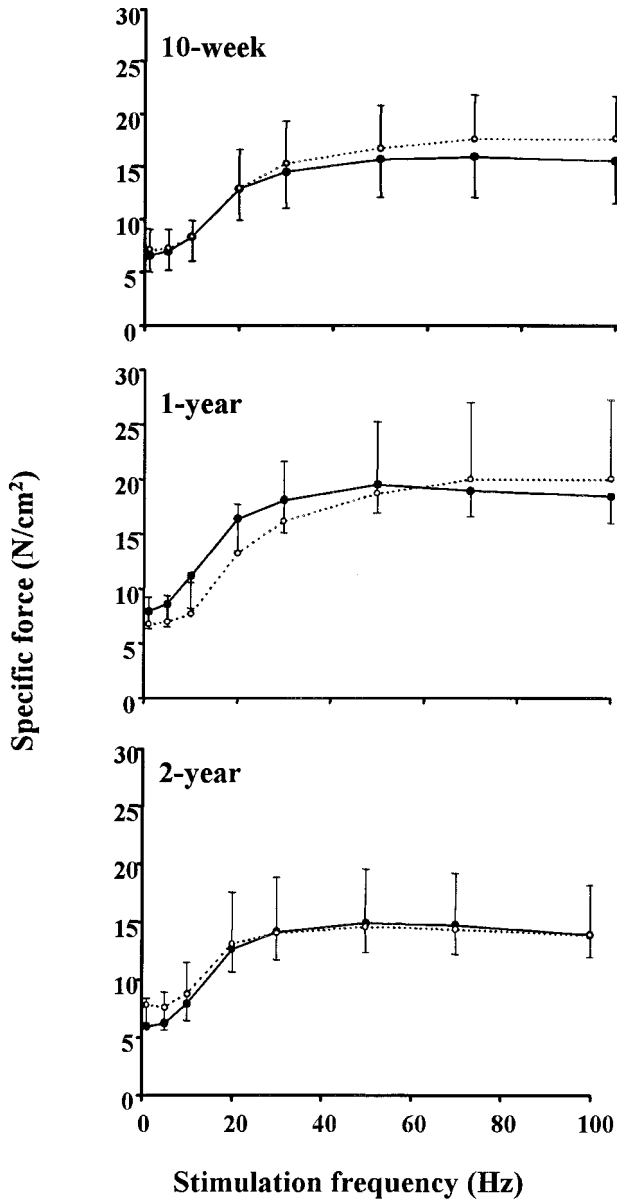


Fig. 2. Specific force-stimulation frequency relationships of diaphragm muscles in CTL(closed circle) and CAC(open circle)groups in 10-week, 1- and 2-year age groups.

の平均値(N/cm^2)は, 10週齡が 17.8 ± 4.2 , 1年齡が 20.2 ± 7.0 , 2年齡が 14.5 ± 2.1 であり, 同週齡・年齡の CTL 群との比較では, 有意な違いは認められなかった.

C. 構造特性

SDH 染色画像(図3)を基に, 各筋線維タイプの横断面積(μm^2), 組成(%)および面積占有率(%)を評価した(表3). 各筋線維タイプの横断面積は, 2年齡ラットの SO(Slow-twitch Oxidative)線維に有意な増大が示された. 図3に示すように, 2年齡においては極端な FG(Fast-twitch Glycolytic)線維の選択的萎縮を示す例も見られたが, 個体差が非常に大きく, 平均値としては有意な変化を示さなかった. いずれの週齡・年齡グループにおいても, CTL 群と CAC 群の違いは認められなかった. 筋線維タイプ組成は, 1年齡の FOG(Fast-twitch Oxidative Glycolytic)線維比率の有意な減少と2年齡の SO 線維比率の有意な増加が示された. すべての筋線維タイプにおいて, 同週齡・年齡の CTL 群と CAC 群間の有意な違いは認められなかった. また上述の筋線維面積と筋線維タイプ組成から算出された各筋線維タイプの面積占有率には, 1年齡の FOG 線維面積占有率の有意な減少, 2年齡の SO 線維面積占有率の増加および FG 線維面積占有率の減少が示された. すべての筋線維タイプにおいて, 同週齡・年齡の CTL 群と CAC 群の有意な違いは認められなかった.

D. 代謝特性

解糖系代謝酵素である PFK の活性値($\mu mol/min/g$ wet weight)については, 各週齡・年齡間で

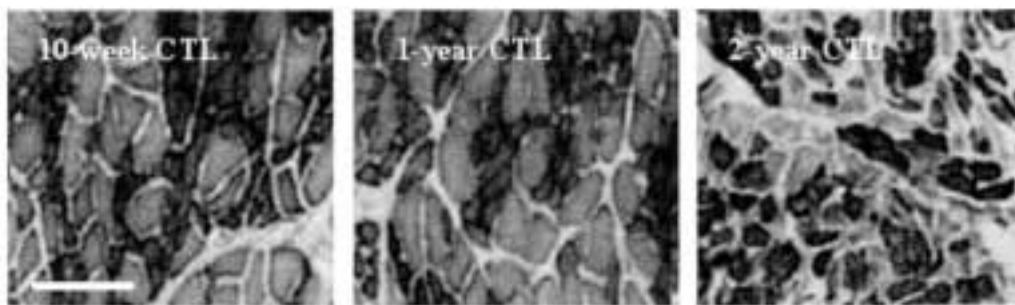


Fig. 3. Histochemical images stained for Succinic dehydrogenase of diaphragm muscle in each age CTL group. Dark and light stained fiber indicate slow-twitch oxidative(SO) or fast-twitch oxidative glycolytic(FOG)fibers and fast-twitch glycolytic(FG)fiber, respectively. White bar=100 um.

Table 3. Histochemical properties of diaphragm muscle at 10-week, 1- and 2-year rats.

	CTL group			CAC group		
	10-week	1-year	2-year	10-week	1-year	2-year
Fiber cross-sectional area (μm^2)						
SO fiber	960 \pm 146	1071 \pm 97	1255 \pm 161 ^a	1106 \pm 106	1021 \pm 71	1134 \pm 104
FOG fiber	1072 \pm 154	1225 \pm 116	1350 \pm 239	1263 \pm 183	1203 \pm 111	1305 \pm 115
FG fiber	2429 \pm 362	3286 \pm 505 ^a	2756 \pm 580	2649 \pm 504	3257 \pm 340	3323 \pm 466
Fiber type composition (%)						
SO fiber	35.0 \pm 2.8	38.2 \pm 3.2	42.5 \pm 4.5 ^a	40.7 \pm 7.7	43.3 \pm 6.4	41.5 \pm 3.7
FOG fiber	43.3 \pm 3.6	36.6 \pm 3.7 ^a	36.0 \pm 6.6	37.5 \pm 12.4	27.8 \pm 10.1	33.0 \pm 7.0
FG fiber	21.7 \pm 4.3	25.2 \pm 5.2	21.5 \pm 6.4	21.8 \pm 8.5	28.9 \pm 4.4	25.5 \pm 6.8
Relative area of each fiber type (%)						
SO fiber	25.4 \pm 3.1	24.5 \pm 3.4	33.3 \pm 6.1 ^{ab}	30.4 \pm 7.3	25.8 \pm 3.8	27.1 \pm 5.2
FOG fiber	35.2 \pm 3.3	26.9 \pm 4.7 ^a	29.8 \pm 6.8	32.1 \pm 12.4	19.7 \pm 7.6	25.1 \pm 7.7
FG fiber	39.4 \pm 4.5	48.6 \pm 7.7	36.9 \pm 7.1 ^b	37.6 \pm 13.8	54.5 \pm 6.9	47.8 \pm 11.8

Values are means \pm SD.

^a: Significant difference from 10-week rats in CTL group ($p < 0.05$)

^b: Significant difference from 1-year in CTL group ($p < 0.05$)

の差は認められなかったが, 2 年齢の CAC 群 (29.1 \pm 3.8) は CTL 群 (23.2 \pm 4.0) に比べ有意に高い値を示した(図 4)。また, β 酸化の代謝酵素である HAD の活性値 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ wet weight) も同様に, 週齢・年齢間での差は認められなかったが, 2 年齢の CAC 群 (28.9 \pm 5.0) は CTL 群 (22.5 \pm 4.6) に比べ有意に高い値を示した(図 4)。

各筋線維タイプの酸化系の代謝酵素である SDH の活性値 (mmol fumarate/l/min) は, 1 年齢から 2 年齢にかけて, SO 線維 (3.8 \pm 0.3 \rightarrow 3.4 \pm 0.3), FOG 線維 (4.1 \pm 0.4 \rightarrow 3.2 \pm 0.2) および FG 線維 (1.4 \pm 0.2 \rightarrow 1.1 \pm 0.1) において有意に低下した(図 5)。また, 活動量増大によって, 各週齢・年齢群のすべての筋線維タイプにおいて平均値は増加した。特に, 2 年齢 CAC 群の SO, FOG および FG の各線維タイプ SDH 活性 (4.2 \pm 0.6, 4.3 \pm 0.7, 1.5 \pm 0.2) は, CTL 群 (3.4 \pm 0.3, 3.2 \pm 0.2, 1.1 \pm 0.1) に比べ有意に高い値を示した(図 5)。また, 10 週齢の FG 線維においても CAC 群 (1.5 \pm 0.1) は CTL 群 (1.2 \pm 0.1) に比べて, 有意に高い値を示した。

IV. 考 察

A. 横隔膜における活動量増大モデル

本研究では, 片側横隔膜に極端な活動量の増大を起すために, 反対側の横隔神経を切断するモデルを用いた。我々の先行研究において, 神経切断された横隔膜には長期間にわたり活動電位は観察されないこと³⁰⁾, intact な片側横隔膜の筋電図積分値は手術直後に約 40% 増大すること³¹⁾ が明らかにされている。さらに, 活動量が増大した片側横隔膜の SDH 活性は, 手術 1 ヶ月後に約 30% 増加していることも報告している³²⁾。これらの結果は, 本研究で用いたモデルにおいて, 極端な活動量の増大が長期間にわたり生じていることを示唆している。

これまで, 下肢筋における協働筋の腱切断あるいは除去手術による過負荷 (overload) モデルが数多く報告されている。これらのモデルでは, 協働筋切除によって, intact な筋に過負荷がかかり極端な筋肥大が生じる。しかし, 本研究で用いた横隔膜は, 左右の筋が融合する特殊な構造をしているために, 神経切除された片側横隔膜の弛緩により intact な筋にはストレッチがかかりにくい。本実験結果においては, いずれの週齢・年齢群でも極端な筋線維肥大

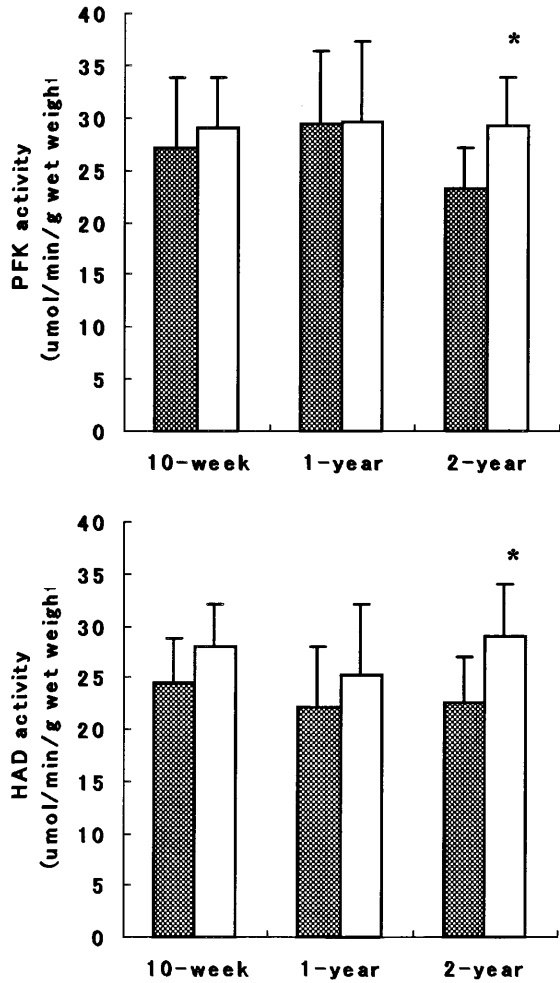


Fig. 4. Comparison of phosphofructokinase(PFK) and 3-hydroxyacyle CoA dehydrogenase(HAD) activities of diaphragm muscle between CTL(gray bar) and CAC(white bar)groups.

*: Significant difference (p<0.05) from age matched CTL group.

は生じていない。この点において2つのモデルは大きく異なり、本実験では、過負荷(overload)でなく代償性活動量増大(compensatory activation)という表現を用いた。

B. 横隔膜の加齢変化

本研究では単収縮特性の加齢変化として、収縮時間と1/2弛緩時間の有意な延長が示されたが、これらの結果は多くの実験結果と一致している^{8,25,33,36}。この収縮特性の変化の主な要因は、本実験結果で示されたようにSO線維面積占有率の増加およびFG線維面積占有率の減少、すなわち横隔膜の構造的な遅筋化である。FG線維は活動参加閾値が他の筋線維タイプに比べて高く、そのため通常の呼吸

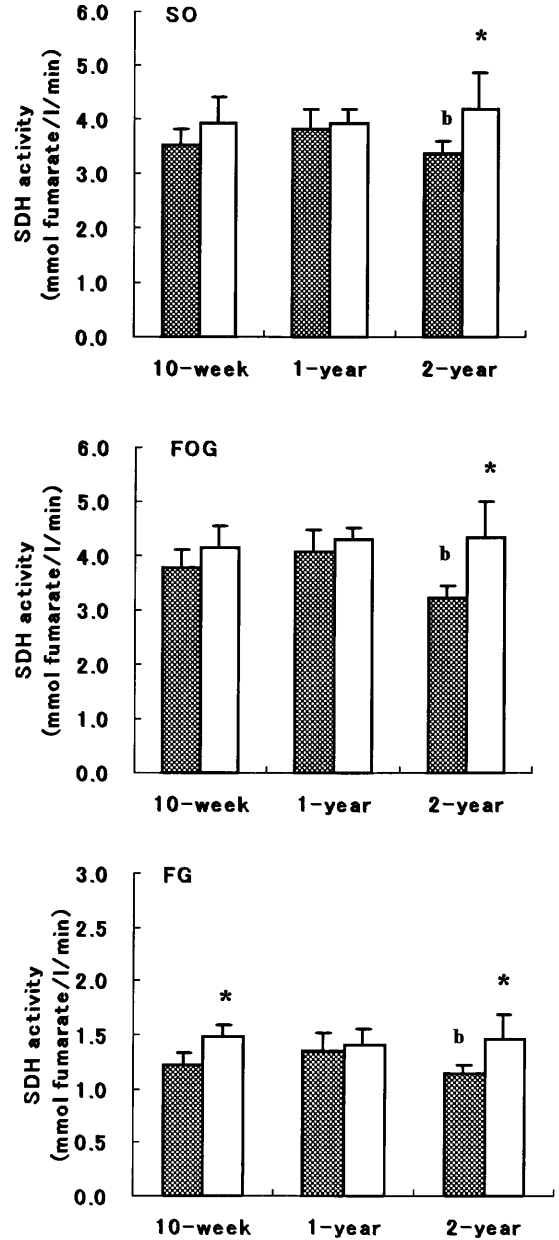


Fig. 5. Comparison of succinic dehydrogenase(SDH) activity of each muscle fiber type between CTL(gray bar)and CAC(white bar)groups in 10-week, 1- and 2-year age groups.

^b: Significant difference from 1-year in control group(P<0.05)

*: Significant differences(p<0.05)from age matched control group.

運動での動員機会は少ないと考えられている⁴¹。老齡期では、身体活動量が有意に低下することがラット、マウス、サルで報告されており^{16,20,22}、特にサルの観察研究では、ジャンピングなどの高強度運動の低下が顕著であることが明らかにされている²²。このことは、老齡期では、高強度運動すな

わち多くの酸素摂取を要求し, 横隔膜においては FG 線維の動員を促すような運動機会が減少することを意味する. 動員機会の減少は, FG 線維の選択的廃用性萎縮が進行する主要因と考えられる. 2 年齢における SO 線維の肥大は, FG 線維の萎縮にともなう横隔膜全体の機能低下等を補償するために代償性に生じたものであると推察される. このように, 横隔膜は他の筋と同様に, 加齢に伴う機能的変化が生じることが明らかになった.

筋の収縮・弛緩には, myofibrillar ATPase, 筋小胞体の Ca^{2+} ATPase などが関与していることが知られている. 筋小胞体 Ca^{2+} ATPase に関しては, 速筋線維は遅筋線維よりも数倍高く, 速い弛緩を達成できることが報告されている^{11,12)}. 本研究において観察された収縮・弛緩の遅い SO 線維の面積占有率の増加が, 横隔膜全体の収縮および弛緩時間延長の主な原因であることは間違いない. また, 筋小胞体の加齢変化については多くの実験があり, Ca^{2+} ATPase 活性の低下^{25,33)}, Ca^{2+} の放出に重要な役割を演ずる ryanodine レセプターと dihydropyridine レセプターの機能変化および量的減少³⁸⁾などが報告されている. さらに, 速筋線維のみを対象とした実験において, ミオシンとアクチンの滑走の引き金となる Ca^{2+} の量が老齢筋では減少していることを見出した電気生理学的データが報告されている¹⁰⁾. このような, 筋中の遅筋線維面積占有率の増加や, 細胞内小器官の機能低下が組み合わさることによって, 収縮特性の加齢変化が生じると推察される.

単位断面あたりの張力は, 単収縮および強収縮の両方において 2 年齢で低値を示す傾向にあるものの, 有意な加齢変化は認められなかった. これまで, マウスの長指伸筋において加齢に伴う単位断面あたりの張力の低下を報告した Brooks & Faulkner⁸⁾ は, この要因として, 単位断面あたりの cross-bridge 数の減少, 同時に働く cross-bridge 数の減少, あるいは cross-bridge ひとつあたりの発揮張力の低下などを挙げている. さらに, 加齢にともなう収縮タンパクの構造変化が cross-bridge の動きを制限している可能性を示唆している. 一方, 彼らは同じ報告の中で, ヒラメ筋の単位断面あたりの張力が低下しないことを見出し, 遅筋線維または活動量の多い筋における加齢変化が少ないことを示し

ている. 横隔膜は, ヒラメ筋よりも遅筋線維比率は低いが, duty time が高く, 活動量の非常に多い筋である. 日常的な活動量の多さは, 筋線維の基本的な構造・機能の加齢変化を抑制しているかもしれない. しかし, Criswell たち⁹⁾は, 26ヶ月齢ラットの横隔膜において単位断面あたりの張力に有意な低下が見られること, その原因が筋中水分量の違いであることを報告している. このように, 加齢変化における単位断面あたりの張力変化に関しては, 一貫した結果が得られていない. 横隔膜における単位断面あたりの張力の加齢変化についても, 水分量の定量を含め, 今後さらに検討が必要である.

本研究において, 生化学的に定量した PFK および HAD 活性には有意な加齢変化は認められなかった. これまで, 多くの先行研究において, 加齢に伴う各種代謝酵素活性の低下が報告されている^{4,19,39)}. Holloszy たち¹⁹⁾は, 27~28ヶ月齢ラットの後肢筋における様々な代謝酵素の測定結果から, 加齢に伴う代謝酵素活性の低下は筋線維の明白な萎縮が起こる場合においてのみ生じる可能性を示している. また, 彼らは, タイプ IIb 線維が多い抗重力筋においてのみ極端な筋萎縮が生じることも示唆している. これらの先行研究と同様に, 本研究の被験筋である横隔膜でも明確な加齢変化が生じていないと考えられる. しかし, 2 年齢の横隔膜では明確な構造変化, すなわちミトコンドリアを豊富に含む SO 線維の面積占有率が有意に増加しているにも関わらず酸化系の HAD 活性が不変あるいは低値を示したことは, 個々の細胞レベルでは酵素活性の低下が生じた可能性を示す. 実際, TCA サイクルの酵素である SDH 活性については, すべての筋線維タイプにおいて加齢に伴う有意な低下が認められた. この結果は, 活動を常に高いレベルで維持している横隔膜であっても, 少なくとも酸化系の代謝酵素は加齢に伴い低下すると結論づけられる.

C. 老齢期における活動量増大の効果

横隔膜における活動量増大の効果に関しては, 持久性の運動により呼吸数を一定期間増加させ, 機能的あるいは代謝的特性の変化を調べた研究がなされている^{17,28,35)}. Metzger & Fitts²⁸⁾は, ラット横隔膜の収縮時間, 1/2 弛緩時間, 単位面積あたりの最大強収縮張力のいずれにもトレーニング効果を見出

さなかった。一方、Bisschop たち⁵⁾は吸気時に抵抗を負荷されたラットにおいて単収縮時間が短縮したことを見出し、その原因が速筋線維の肥大であることを報告している。本実験では、各週齢・年齢グループにおける CTL 群との比較により、10週齢および1年齢では有意な変化が見出されなかったが、2年齢の CAC 群では1/2弛緩時間の有意な短縮が認められた。2年齢の CTL 群においては、10週齢の CTL 群と比較して1/2弛緩時間の有意な延長が認められており、この延長が再び短縮したと解釈される。ヒトの外側広筋のバイオプシーサンプルを用いた Klitgaard たち²⁴⁾の報告によると、通常の高齢者では認められる筋小胞体 Ca-ATPase の低下が、トレーニングを日常的に行っている高齢者では抑制されていた。このような実験結果は、老齡期においても筋小胞体の機能には十分な適応力があることを示唆していると考えられる。

代謝特性の変化として、2年齢 CAC 群の PFK および HAD 活性の有意な上昇が示された。これらの変化は、各筋線維タイプの面積占有率における変化の結果ではなく、個々の筋線維の酵素活性の上昇に起因すると推察される。実際に、2年齢 CAC 群の全筋線維タイプで SDH 活性の有意な上昇が認められ、老齡期のラット横隔膜において活動量増大に対する代謝能力の適応が示された。これまで、老齡期ラットの横隔膜における代謝的な適応力については、肯定的な結果^{17,35)}と否定的な結果^{28,33)}がそれぞれ報告されている。しかし、本研究で用いた代償性活動量増大(CAC)モデルにおいて、老齡期の横隔膜は少なくとも代謝的に十分な適応力を有していることが明らかになった。

V. ま と め

本研究では、呼吸運動の主働筋である横隔膜の加齢変化および、反対側の横隔神経を切断することにより誘導された活動量増大に対する適応力について検討するために、各週齢・年齢群(10週齢, 1年齢, 2年齢)および各実験群(コントロール群, 活動量増大群)のラットにおける横隔膜の収縮特性, 構造特性, 代謝特性を調べた。実験の結果として、以下の点が示された。

1) 加齢にともなう有意な変化として、単収縮時間および1/2弛緩時間の延長, 各筋線維タイプにお

ける SDH 活性の低下, SO 線維面積占有率の増加および FG 線維面積占有率の減少が示された。
2) 老齡期における活動量増大の有意な効果として、1/2弛緩時間の短縮, PFK, HAD 活性の上昇, 各筋線維タイプにおける SDH 活性の上昇が認められた。

以上の結果から、活動量の多い横隔膜においても、収縮, 構造および代謝特性に加齢変化が生じることが明らかとなった。また、活動量の増大によって老齡期のラット横隔膜の収縮特性および代謝特性における加齢変化の一部が改善されることが明らかとなった。特に代謝特性に関しては、高い適応力を有していることが示唆された。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金(C2)(課題番号12680035)によって行われた。記して謝意を表します。

(受理日 平成17年1月11日)

参 考 文 献

- 1) Alnaqeeb, M. A. & Goldspink, G. Changes in fiber type, number and diameter in developing and ageing skeletal muscle. *J. Anat.*(1986) **153**, 31-45.
- 2) Baldwin, K. M., Valdez, V., Schrader, L. F. & Herrick, R. E. Effect of functional overload on substrate oxidation capacity of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, (1981) **50**, 1272-1276.
- 3) Bass, A., Brdiczka, D., Eyer, P., Hofer, S. & Pette, D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur. J. Biochem.*, (1969) **10**, 198-206.
- 4) Bass, A., Gutmann, E. & Hanzlikova, V. Biochemical and histochemical changes in energy supply enzyme pattern of muscles of the rat during old age. *Gerontology*(1975) **21**, 31-45.
- 5) Bisschop, A., Gayan-Ramirez, G., Rollier, H., Gosse-link, R., Dom, R., de Bock, V., Decramer, M. Intermittent inspiratory muscle training induces fiber hypertrophy in rat diaphragm. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*(1997) **155**, 1583-1589.
- 6) Blanco, C. E., Sieck, G. C. & Edgerton, V. R. Quantitative histochemical determination of succinic dehydrogenase activity in skeletal muscle fibers. *Histochem. J.*(1988) **20**, 230-243.
- 7) Brooke, M. H. & Kaiser, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.*(1970) **23**, 369-379.
- 8) Brooks, S. V. & Faulkner, J. A. Contractile properties

- of skeletal muscles from young, adult and aged mice. *J. Physiol.*(1988) **404**, 71-82.
- 9) Criswell, D. S., Powers, S. K., Herb, R. A., Dodd, S. L. Mechanism of specific force deficit in the senescent rat diaphragm. *Respir. Physiol.*(1997) **107**, 149-55.
 - 10) Delbono, O., O'Rourke, K. S. & Ettinger, W. H. Excitation-calcium release uncoupling in aged single human skeletal muscle fibers. *J. Membr. Biol.*(1995) **148**, 211-22.
 - 11) Dulhunty, A. F., Banyard, M. R., & Medveczky C. J. Distribution of calcium ATPase in the sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch muscles determined with monoclonal antibodies. *J. Membr. Biol.*, (1987) **99**, 79-92.
 - 12) Dux, L., Muscle relaxation and sarcoplasmic reticulum function in different muscle types. *Rev. Physiol. Biochem Pharmacol.* 1993 ; **122** : 69-147.
 - 13) Eddinger, T. J., Moss, R. L. & Cassens, R. J. Fiber number and type composition in extensor digitorum longus, soleus, and diaphragm muscles with aging in Fischer 344 rats. *J. Histochem. Cytochem.*(1985) **33**, 1033-1041.
 - 14) Einsiedel, L. J. & Luff, A. R. Alterations in the contractile properties of motor units within ageing rat medial gastrocnemius. *J. Neurol.Sci.*(1992) **112**, 170-177.
 - 15) Gardiner, P. F. Neuromuscular aspects of physical activity, Chapter 6 Neuromuscular responses to decrease in normal activity, *Human Kinetics*, (2001), 171-202.
 - 16) Goodrick, C. L., Ingram, D. K., Reynolds, M. A., Freeman, J. R. & Cider N. L. Effects of intermittent feeding upon growth, activity, and lifespan in rats allowed voluntary exercise. *Exp. Aging Res.*(1983) **9**, 203-209.
 - 17) Gosselin, L. E., Betlach, M., Vailas, A. C. & Thomas, P. Training-induced alterations in young and senescent rat diaphragm muscle. *J. Appl. Physiol.*(1992) **72**, 1506-1511.
 - 18) Hensbergen, E. & Kernell, D. Daily durations of spontaneous activity in cat's ankle muscles. *Exp. Brain Res.*(1997) **115**, 325-332.
 - 19) Holloszy, J. O., Chen, M., Cartee, G. D. & Young, J. C. Skeletal muscle atrophy in old rats : differential changes in the three fiber types. *Mech. Ageing Dev.*, (1991) **60**, 199-213.
 - 20) Ingram, D. K. Toward the behavioral assessment of biological aging in the laboratory mouse : concepts, terminology, and objectives. *Exp. Aging Res.*(1983) **9**, 225-238.
 - 21) Ingram, D. K. Age-related decline in physical activity: generalization to nonhumans. *Med. Sci. Sports Exerc.*, (2000) **32**, 1623-1629.
 - 22) Janicke, B., Coper D. & Janicke U. A. Motor activity of different-aged Cercopithecidae : silver-leafed monkey (*Presbytis cristatus esch.*), lion-tailed monkey (*Macaca silenus L.*), moor macaque (*Macaca maura Cuv.*) as observed in the zoological garden, Berlin (West) *Gerontology*(1986) **32**, 133-140.
 - 23) Kanda, K. & K. Hashizume. Changes in properties of the medial Gastrocnemius motor units in aging rats. *J. Neurophysiol.*(1989) **61**, 737-746.
 - 24) Klitgaard, H., Ausoni, S. & Damiani, E. Sarcoplasmic reticulum of human skeletal muscle: age-related changes and effect of training. *Acta Physiol Scand.* (1989) **137**. 23-31.
 - 25) Larsson, L. & Salviatti, G. Effects of age on calcium transport activity of sarcoplasmic reticulum in fast- and slow-twitch rat muscle fibers. *J. Physiol.*(1989) **419**, 253-264.
 - 26) Luff, A. R. Age-associated changes in the innervation of muscle fibers and changes in the mechanical properties of motor units. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*(1998) **854**, 92-101.
 - 27) Mendez & Keys, A. Density and composition of mammalian muscle. *Metabolism.*(1960) **9**, 184-188.
 - 28) Metzger, J. M. & Fitts, R. H. Contractile and biochemical properties of diaphragm : effects of exercise training and fatigue. *J. Appl. Physiol.*(1986) **60**, 1752-1758.
 - 29) Metzger, J. M., Scheidt, K. B., Fitts, R. H. Histochemical and physiological characteristics of the rat diaphragm. *J. Appl. Physiol.*(1985) **58**, 1085-1091.
 - 30) Miyata, H., Zhan, W. Z., Prakash, Y. S. & Sieck, G. C. Myoneural interactions affect muscle adaptations to inactivity. *J. Appl. Physiol.*(1995) **79**, 1640-1649.
 - 31) 宮田浩文, Zhan, W. Z., Prakash, Y. S. & Sieck, G. C. : 代償性に活動量増大を起こしたラット横隔膜の疲労耐性. *日本運動生理学雑誌*, (2000) **7**, 1-8.
 - 32) Miyata, H. & Wada, N. Electrophysiological properties of compensatory activated phrenic motoneurons in rats. *Adv. Exerc. Sports Physiol.*(2004) **10**, 49-53.
 - 33) Narayanan, N., Jones, D. L., XU, A. & YU, J.C. Effects of aging on sarcoplasmic reticulum function and contraction duration in skeletal muscle of the rat. *Am. J. Physiol.*(1996) **271**, C1032-C1040.
 - 34) Powers, S. K., Lawler, J., Criswell, D., Lieu, F. K. & Martin, D. Aging and respiratory muscle metabolic plasticity: effects of endurance training. *J. Appl. Physiol.*(1992) **72**, 1068-1073.
 - 35) Powers, S. K., Criswell, D., Lieu, F. K., Dodd, S. & Silverman, H. Exercise-induced cellular alterations in the diaphragm. *Am. J. Physiol.*(1992) **263**, R1093-R1098.
 - 36) Powers, S. K., Criswell, D., Herb, R. A., Demirel, H. & Dodd, S. Age-related increases in diaphragmatic maximal shortening velocity. *J. Appl. Physiol.*(1996) **80**, 445-451.
 - 37) Reid, W. D., Hards, J. M., Wiggs, B. R., Wood, E. N., Wright, P. V. & Pardy R. L. Proportions and sizes of

- muscle fiber types in the hamster diaphragm. *Muscle & Nerve*(1989), **12**, 108-118.
- 38) Renganathan, M., Messi, M. L. & Delbono, O. Dihydropyridine receptor- ryanodine receptor uncoupling in aged skeletal muscle. *J. Membr. Biol.*(1997), **157**, 247-53.
- 39) Sanchez, J., Bastien, C. & Monod, H. Enzymatic adaptations to treadmill training in skeletal muscle of young and old rats. *Eur. Appl. Physiol.*(1983), **52**, 5269-5274.
- 40) Shonk, C. E. & Boxer, G. E. Enzyme patterns in human tissues. I. Methods for the determination of glycolytic enzymes. *Cancer Research*(1964), **24**, 709-724.
- 41) Sieck, G. C. & Fournier, M. Diaphragm motor unit recruitment during ventilatory and nonventilatory behaviors. *J. Appl. Physiol.*(1989), **66**, 2539-2545.