

9章．先天的な筋線維組成の差と神経性の因子の関係（実験VI）

1．目的

神経性の因子は筋線維組成に影響を与える。除神経によりインパルスや神経栄養物質が筋に伝えられなくなると筋線維組成が変化することが報告されている。ヒラメ筋のような遅筋では除神経によりtype I線維が減少する（Dhoot and Perry 1983, Girlanda et al. 1982, Jeweed et al. 1975）。一方、速筋では除神経により未分化な筋線維（Dhoot and Perry 1983, Girlanda et al. 1982, Redenbach et al. 1988）やtype I線維（Hennig and Løm o 1987, Midrio et al. 1988）が増加する。

これまでの実験から、FFDR群の腓腹筋とヒラメ筋の筋線維組成はtype II線維が高いことが明らかとなっているが、この遺伝的に生じたと考えられる筋線維組成の違いがどのような要因によって引き起こされているのかは不明である。筋線維組成に影響をおよぼす因子はいくつかあるが、そのうち神経性の因子についても検討する必要がある。なぜなら、FFDR群とcontrol群の間で遺伝的に神経性の因子の筋への影響が異なるようなプログラムがなされていることにより筋線維組成が異なるのではないかという仮説が生じるからである。

本研究では、除神経によって神経性の因子の影響を取り除くことにより、FFDR群とcontrol群の筋線維組成の差が神経性の因子の差を介して生じているのかについて検討することとした。

2．方法

(1) 被検動物

被検動物は、実験Iにおいてランダム交配によって得られたcontrol群（雄7匹）と選択交配によって得られたFFDR群（雄7匹）とした。7週齢時に体重が160-200gのものを抽出し、除神経を行った。飼育は12時間サイクルの照明下、温度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 5\%$ に常時維持された飼育室において、オガクズを敷いたプラスチックのケース（夏目製作所製、ポリカーボネイトラットケージKN-602、 $35\text{cm}\times 30\text{cm}\times 17\text{cm}$ で行った。水と飼料（オリエンタル酵母工業製、実験動物用固形飼料MF）は自由摂取とした。

(2) 除神経

被検動物には7週齢時に除神経の手術を施した。手術はペントバルビタール（ $50\text{ mg/kg body wt ip}$ ）麻酔化にて、右脚の大腿部をメスで切開し、坐骨神経をハサミにより約10mm切除して縫合し、除神経脚とした。左脚には偽手術を行い、対照脚とした。

(3) 解剖と組織化学的分析

解剖は除神経手術の14日後（9週齢時）にペントバルビタールオーバードーズ（ $80\text{ mg/kg body wt ip}$ ）で行った。被検筋は、腓腹筋、ヒラメ筋とした。摘出された筋は厚さ数mmに横断し、クリオスタット（ブライト社製 OT-FAS）により厚さ $10\mu\text{m}$ の連続横断切片を作成した。これらの切片にPadykulaとHerman（1955）の方法によりMyosin ATPase染色 preincubation pH10.3を施し、得られた標本よりtype I線維およびtype II線維に分類し（Gollnick et al. 1972）、%type I線維を算出した。なお、腓

腹筋については外側頭深層部を分析部位とし、腓腹筋は800本以上、ヒラメ筋は横断面上の全ての筋線維を分析に用いた。

(4) 統計処理

解剖直前の体重について、control群とFFDR群の平均値の差の検定を行った。方法は、F検定により等分散性が確認されたとき、対応のないt検定を用いて差を検定した。有意水準は5%とした。

腓腹筋とヒラメ筋の体重当たりの筋重量と筋線維構成比、およびヒラメ筋の筋線維数について、平均値の差の検定を行った。検定の方法は、2元配置の分散分析により有意差が認められた場合にScheffe's post-hoc testを用いた。有意水準は5%とした。

3. 結果

(1) 体重と筋重量

表4に9週齢時の体重と体重当たりの筋重量を示した。体重は両群間に差は見られなかった。体重当たりの筋重量は腓腹筋、ヒラメ筋ともcontrol群、FFDR群除神経脚の方が対照脚に対して有意に低値を示した。また、ヒラメ筋の対照脚ではFFDR群が有意に高値を示した。

(2) 筋線維構成比

図18に腓腹筋の、図19にヒラメ筋のmyosinATPase染色の組織像を示した。腓腹筋、ヒラメ筋とも対照脚ではFFDR群の方が%type II線維が多かった。また、対照群では除神経により%type II線維が増加したがFFDR群では変化がなかったことが特徴的であった。

Table 4. Body mass and muscle mass/body mass ratios at 9 weeks age.

	BM	GM/BM	SM/BM
control	237±22	4.96±0.18	0.38±0.03
control-denervated	–	2.29±0.15	0.20±0.02
FFDR	236±24	4.77±0.19	0.44±0.04
FFDR-denervated	–	2.09±0.20	0.20±0.02

BM: body mass. GM: gastrocnemius mass. SM: soleus mass.

Data are expressed as mean±SD.

g : $P < 0.05$ genetic effect (vs. control within same neural state)

d : $P < 0.05$ denervation effect (vs. innervation within same genetic state)

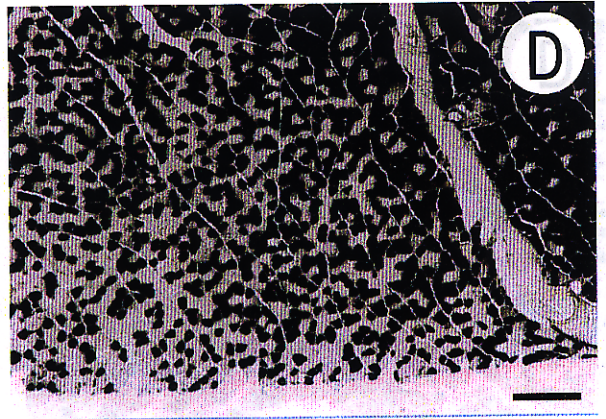
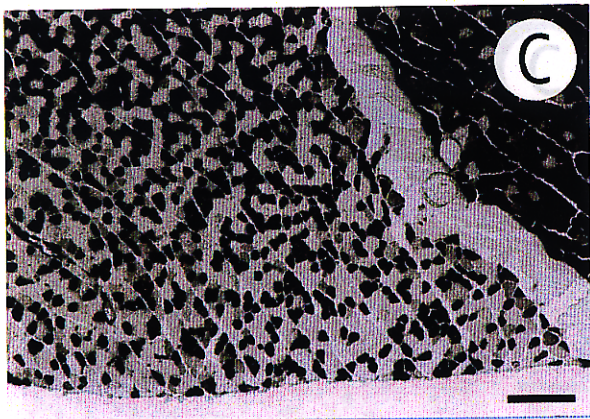
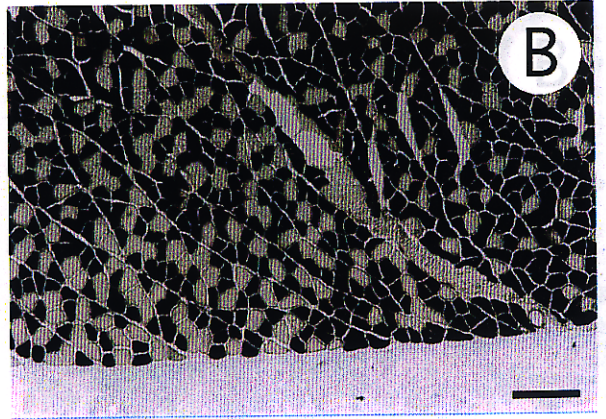
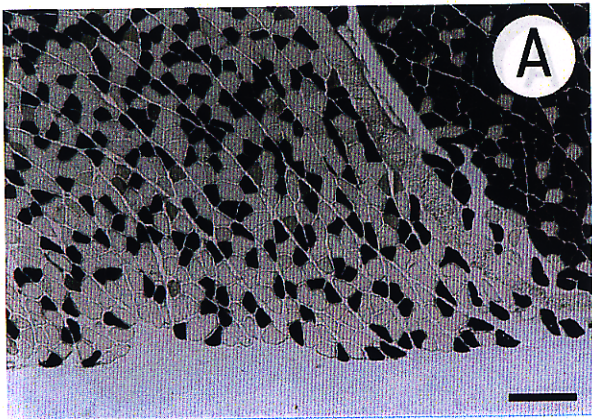


Figure 18. Transverse sections of gastrocnemius muscles. The sections were stained for ATPase activity after preincubation at pH 10.3. Light and dark fibers on the muscle sections are type I and type II fibers, respectively. A: control. B: FFDR. C: control-denervated. D: FFDR-denervated. Bar, 200 μ m.

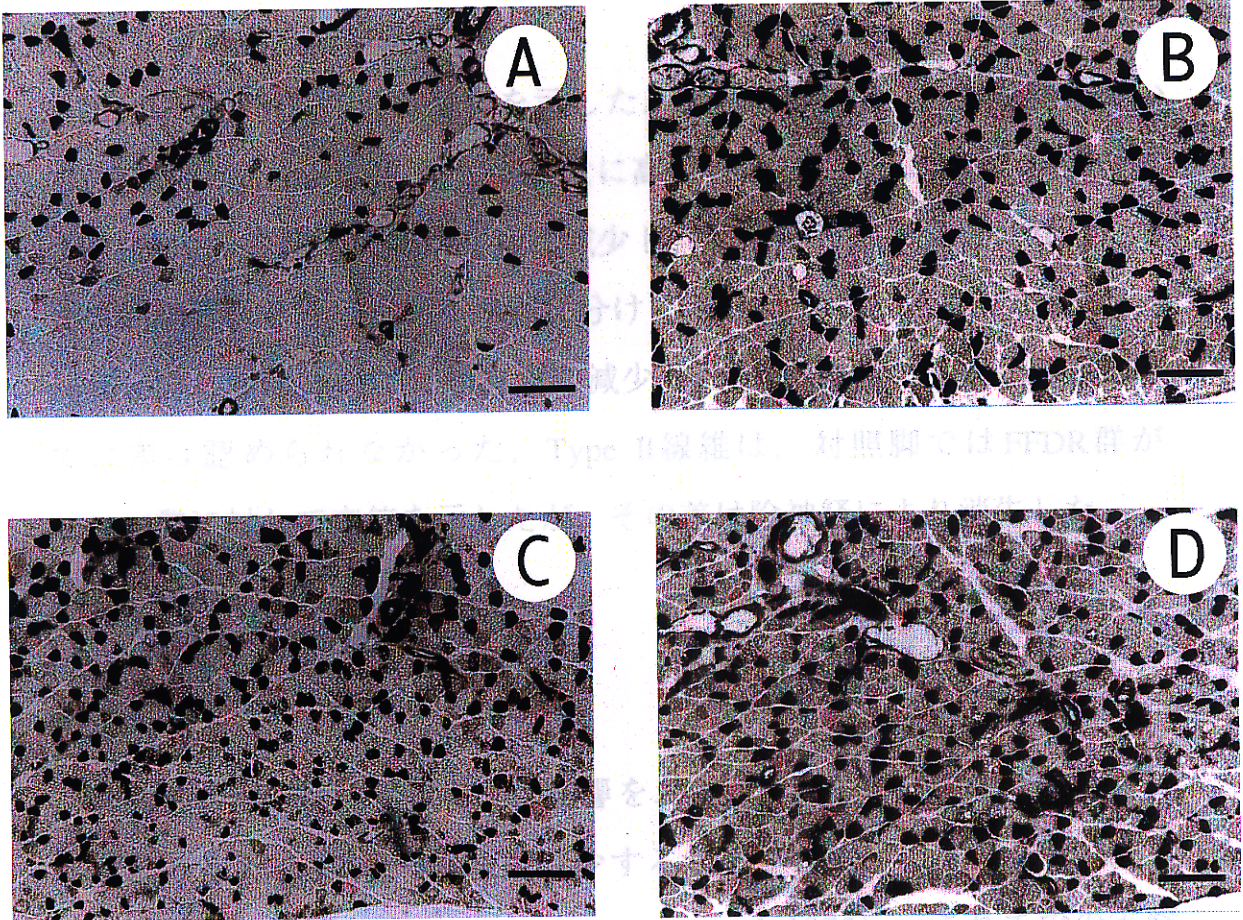


Figure 19. Transverse sections of soleus muscles. The sections were stained for ATPase activity after preincubation at pH 10.3. Light and dark fibers on the muscle sections are type I and type II fibers, respectively. A: control. B: FFDR. C: control-denervated. D: FFDR-denervated. Bar, 200 μ m.

図20に腓腹筋とヒラメ筋の%type I線維を示した。腓腹筋とヒラメ筋で全く同じ結果が得られた。対照脚，除神経脚ともFFDR群がcontrol群に対して有意に低値を示した。また，control群では除神経により%type I線維が減少したが，FFDR群では除神経による変化は見られなかった。

(3) ヒラメ筋の筋線維数

図21にヒラメ筋の筋線維数を示した。総筋線維数では，対照脚においてFFDR群がcontrol群に対して有意に高値を示した。しかし，除神経によりFFDR群の筋線維数は有意に減少し，対照群と差が見られなくなった。筋線維数を筋線維タイプ別に分けると，type I線維はFFDR群，control群とも除神経により有意に減少したがFFDR群とcontrol群との間では差は認められなかった。Type II線維は，対照脚ではFFDR群がcontrol群に対して高値を示したが，その差は除神経により消失した。

4. 考察

神経性の因子は筋線維組成に影響をおよぼす。先行研究では除神経によりヒラメ筋の%type I線維が減少することが報告されている (Dhoot and Perry 1983, Girlanda et al. 1982, Jeweed et al. 1975)。これまでの実験からFFDR群のヒラメ筋と腓腹筋の%type I線維はcontrol群より低いことが明らかとなっているが，これらのことから，神経性の因子の影響の発現の遺伝的プログラムがFFDR群とcontrol群とで異なるのではないかという仮説を生じさせる。

本研究では7週齢時から9週齢時までの2週間にかけて，FFDR群とcontrol群の坐骨神経を切除することにより下腿三頭筋への神経性の因子

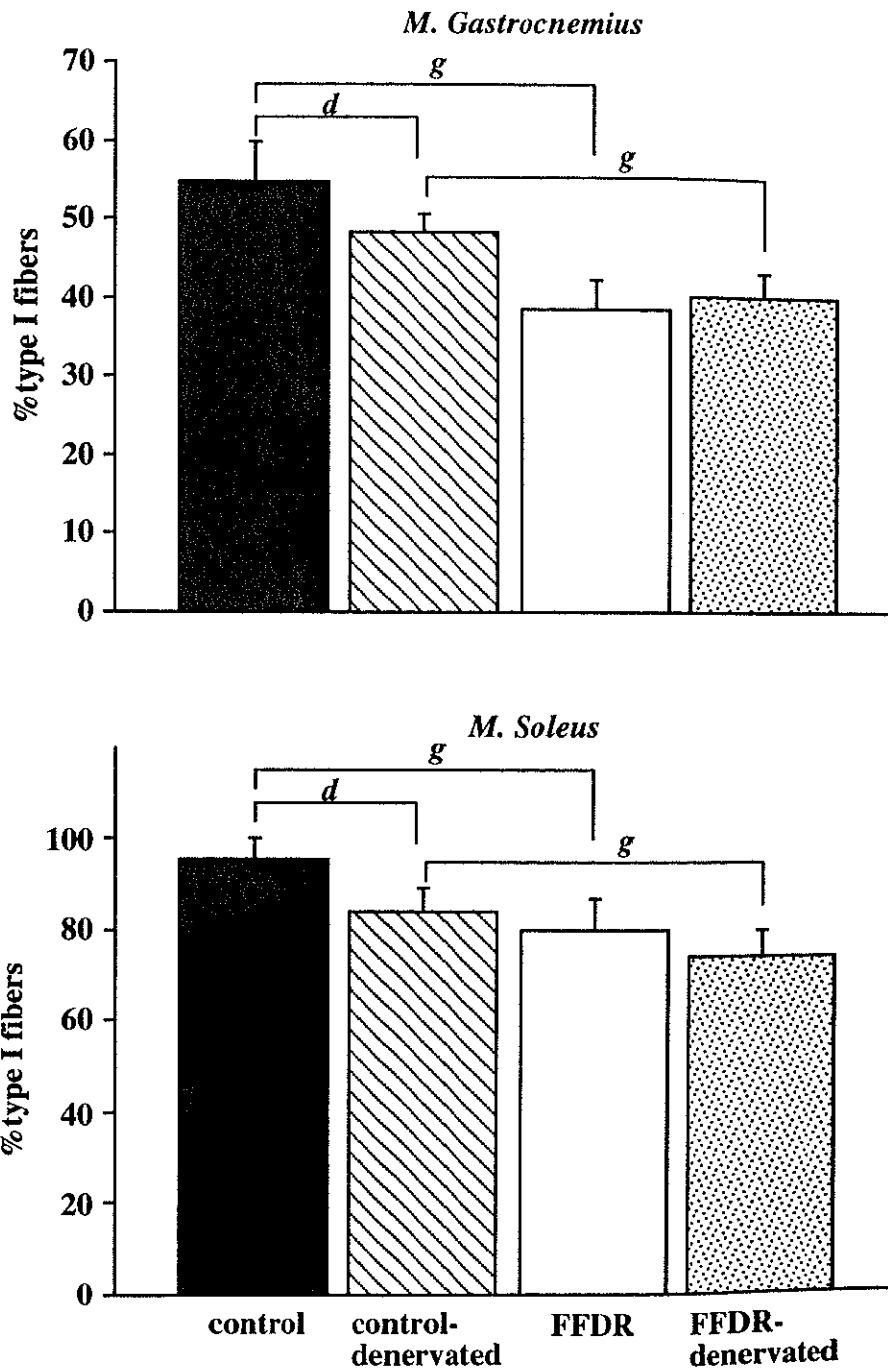


Figure 20. Percentage of type I fibers in gastrocnemius and soleus muscles. Data are expressed as mean \pm SD. *g* : $P < 0.05$ genetic effect (vs. control within same neural state). *d* : $P < 0.05$ denervation effect (vs. innervation within same genetic state).

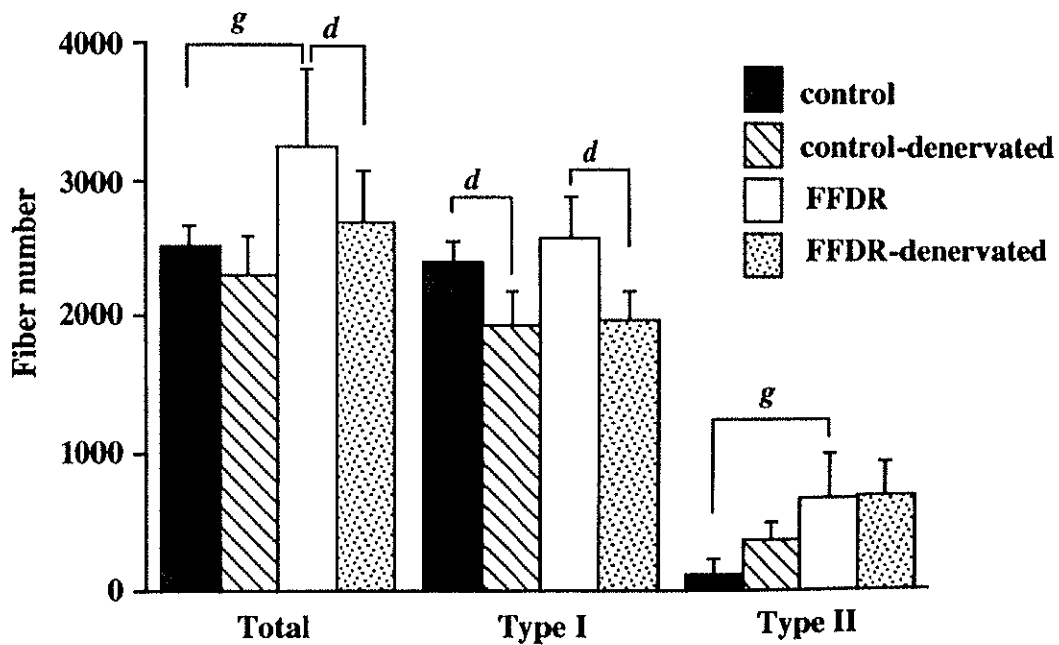


Figure 21. Fiber number of the cross sections in the soleus muscles. Data are expressed as mean \pm SD. *g*: $P < 0.05$ genetic effect (vs. control within same neural state). *d*: $P < 0.05$ denervation effect (vs. innervation within same genetic state).

の影響を排除し、筋線維組成や筋線維数の変化の差を調べた。その結果、control群では先行研究と同様に%type I線維が減少したが、FFDR群では有意な変化は認められなかった(図20)。この結果から、FFDR群とcontrol群とで筋線維組成に対して神経性の因子の影響が異なっているか、あるいはFFDR群はもともとの%type I線維が高いために除神経による変化が起きなかったのではないかという二通りの解釈ができる。

本研究ではヒラメ筋については横断面上の全ての筋線維を分析に用いた。そこで、筋線維数についても検討を試みた(図21)。総筋線維数は、FFDR群がcontrol群に対して有意に高値を示した。また、除神経によりFFDR群は総筋線維数が減少しcontrol群と同レベルとなったが、control群では変化は認められなかった。筋線維数を筋線維タイプ別に分けて考えてみると、type I線維は両群とも除神経により減少するが、FFDR群とcontrol群との間では差は見られなかった。一方、type II線維ではFFDR群はcontrol群に対して有意に高値を示し、この差は除神経により消失した。このことから、FFDR群で総筋線維数が多いのはtype II線維が多いためであり、さらにこの違いは除神経により消失することが明らかとなった。つまり、FFDR群の%type I線維が低いのは遺伝的にtype II線維の数が多いことによって生じており、またこの違いは神経性の因子の影響に遺伝的な違いが存在していることにより引き起こされていることが示唆された。

FFDR群では除神経により筋線維数が減少したがcontrol群では除神経による筋線維数の変化は生じなかった。長期間の除神経では筋線維数が減少することがあり得るが(Anzil and Wernig 1989, Tews et al. 1994)、本実験のような短期間の除神経で筋線維数が減ったという報告はない(Midrio et al. 1988)。この原因は明らかではないが、FFDR群では筋線

維数が過剰であるため、神経性の因子の消失という非常事態においては過剰な筋線維が淘汰されるのかもしれない。また、そのような過剰な筋線維にとっては神経性の因子の有無が生死に関わるのであろう。

FFDR群とcontrol群の対照脚において筋線維数を比較すると、type I線維には差がないのに対し、type II線維はFFDR群の方が多いことが明らかとなった。これは、筋発生中の筋線維の増殖の過程で差が生じたためであると考えられる。骨格筋線維は筋芽細胞が融合して筋管となり、筋管が筋線維へと分化することによって作られる。筋管は分裂能をもっておらず、筋線維の分裂も一般的ではないことから、FFDR群では筋芽細胞の融合により筋管が生じる頻度が高かったのであろう。ラットでは筋芽細胞が融合して筋管が形成される過程は2回現れる（Wilson and Harris 1993）。1回目はprimary myogenesisと呼ばれ、胎齢14-16日に見られる。2回目はsecondary myogenesisと呼ばれ、胎齢17日以降に見られる。ラットヒラメ筋では、primary myogenesisに由来する筋線維は全てtype I線維となり、secondary myogenesisに由来する筋線維はtype I線維とtype II線維のどちらにも分化する（Zhang and McLennan 1998）。このことから、FFDR群はcontrol群よりもsecondary myogenesisが盛んである可能性がある。

結論として、FFDR群とcontrol群に2週間の除神経を行ったところ、FFDR群の%type I線維が低いのは遺伝的にtype II線維の数が多いことによって生じており、またこの違いは神経性の因子の影響に遺伝的な違いが存在していることにより引き起こされていることが示唆された。

5. 要約

先天的な筋線維組成の差が神経性の因子の影響の差によって引き起こされているのかについて検討することを目的として、選択交配によって得られた%type II線維の高いFFDR群とランダム交配によって得られたcontrol群の片脚に除神経を施して筋線維組成と筋線維数の変化を比較した。得られた結果は以下の通りである。

- (1) FFDR群の腓腹筋、ヒラメ筋の%type I線維はcontrol群に対して有意に低値を示した。
- (2) 腓腹筋、ヒラメ筋ともFFDR群では除神経による%type I線維の変化は生じなかったが、control群では除神経により%type I線維が有意に減少した。
- (3) ヒラメ筋において、FFDR群の筋線維数はcontrol群に対して有意に高値を示したが、除神経によりその差は消失した。また、この筋線維数の差はtype II線維の数の差によるものであった。

以上の結果から、先天的な筋線維組成の差はtype II線維の数が多いことによって生じており、またこの違いは神経性の因子の影響に遺伝的な違いが存在していることにより引き起こされていることが示唆された。