

博士論文

活動刺激による骨格筋の  
ミオグロビン濃度の変化

平成10年度

東京大学大学院農学系研究科

増田 和 実

博士論文

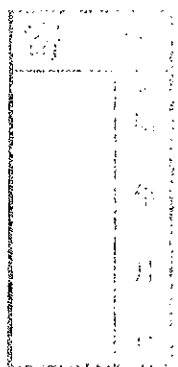
活動刺激による骨格筋の  
ミオグロビン濃度の変化

平成10年度

筑波大学大学院 体育科学研究科

増田 和実

指導教官 勝田 茂 教授



# 目次

略語と記号	----- vi
I. 緒言	----- 1
II. 先行研究	----- 4
1. ミオグロビンの構造と物性	----- 4
2. 酸素運搬の概略	----- 7
3. ミオグロビンの機能	----- 10
(1) 酸素貯蔵機能	----- 12
(2) 酸素促通拡散機能	----- 13
(3) 酸素運搬機能	----- 13
(4) 酸化的リン酸化の促進機能	----- 15
(5) 酸素濃度均等化機能	----- 17
4. ミオグロビンの合成・分解過程	----- 17
5. ミオグロビンの局在	----- 18
6. ミオグロビン含量に影響を与える要因	----- 21
(1) 発育・加齢の影響	----- 21
(2) 環境の影響	----- 21
(3) トレーニングの影響	----- 21
(4) 食事の影響	----- 24
(5) 病理的影響	----- 24
III. 研究目的および研究課題	----- 25

IV. ヒトの骨格筋のミオグロビン濃度と有酸素的代謝能力との関係ートレーニング状態の影響ー	
(実験1)	-----26
1. 目的	-----26
2. 方法	-----27
(1) 被験者	-----27
(2) 運動負荷テスト	-----27
(3) 呼気ガス分析	-----29
(4) 筋摘出の方法	-----29
(5) 生化学的分析および組織化学的分析	-----29
(6) 統計処理	-----30
3. 結果	-----30
4. 考察	-----31
5. 要約	-----38
V. 持久性トレーニングによる骨格筋ミオグロビン濃度の変化 (実験2)	-----40
1. 目的	-----40
2. 方法	-----41
(1) 被験者	-----41
(2) 運動負荷テスト	-----41
(3) 呼気ガス分析	-----41
(4) トレーニングプロトコール	-----41
(5) 生化学的分析および組織化学的分析	-----43
(6) 統計処理	-----43
3. 結果	-----43

4. 考察	----- 45
5. 要約	-----50
VI. 持久性トレーニングによるラットの骨格筋ミオ グロビン濃度の変化ー強度・時間・期間の影響ー （実験3）	----- 51
1. 目的	----- 51
2. 方法	----- 52
(1) 被験動物およびトレーニングプログラム	----- 52
(2) 生化学的分析	----- 55
(3) 統計処理	----- 56
3. 結果	----- 56
4. 考察	----- 65
5. 要約	-----70
VII. レジスタンストレーニングが骨格筋ミオグロビ ン濃度に及ぼす影響（実験4）	----- 72
1. 目的	----- 72
2. 方法	----- 73
(1) 被験者	----- 73
(2) パフォーマンステスト	----- 74
(3) トレーニングプロトコール	----- 74
(4) 筋の摘出	----- 76
(4) 生化学的分析および組織化学的分析	----- 76
(5) 統計処理	----- 76
3. 結果	----- 76

4. 考察	----- 78
5. 要約	----- 83
VIII. 代償性筋肥大の過程における骨格筋ミオグロビン濃度の変化（実験5）	----- 85
1. 目的	----- 85
2. 方法	----- 85
(1) 被験動物	----- 85
(2) 生化学的分析および組織化学的分析	----- 86
(3) 統計処理	----- 86
3. 結果	----- 86
4. 考察	----- 88
5. 要約	----- 92
IX. 不活動モデルにおける骨格筋ミオグロビン濃度の変化（実験6）	----- 94
1. 目的	----- 94
2. 方法	----- 95
(1) 被験動物	----- 95
(2) 尾部懸垂モデルおよび脊髄切断モデル	----- 96
(3) 生化学的分析	----- 97
(4) 統計処理	----- 97
3. 結果	----- 97
4. 考察	----- 99
5. 要約	----- 106

X. 討論	-----108
XI. 総括	-----116
謝辞	-----120
引用文献	-----121

## 略語と記号

本研究で用いる主要な略語と記号は以下の通りである。

allosteric effect:	アロステリック効果 複数のサブユニットから成るタンパク質の特定部位に、ある低分子の補酵素が結合すると、そのタンパクのサブユニット間の協同的な相互作用が生じること
ATP	: adenosine triphosphate アデノシン三リン酸
CD	: capillary density 毛細血管密度 単位面積当たりの毛細血管数 (本/mm <sup>2</sup> )
CDA	: capillary domain area 毛細血管拡散領域 毛細血管1本当たりの拡散面積
C/F ratio	: capillary to fiber ratio 筋線維1本当たりの毛細血管数
CSA	: cross sectional area 横断面積
CO	: carbon monoxide 一酸化炭素
CO-Mb	: 一酸化炭素と結合したミオグロビン
CS	: citrate synthase クエン酸合成酵素
cytochrome c	: チトクロム c
DO <sub>2</sub>	: 酸素拡散能力 DO <sub>2</sub> はヘマトクリット、赤血球の移動速度、Hb-O <sub>2</sub> の解離速度などによって影響を受けるが、その他にも毛細血管数や拡散距離、Mbの存在によって影響される
ΔP <sub>O<sub>2</sub></sub>	: delta partial pressure of oxygen 酸素分圧勾配



$\Delta P_{mbo_2}$	: ミオグロビンと平衡した酸素分圧の勾配
Deoxy-Mb	: 脱酸素化ミオグロビン 酸素と結合していないミオグロビン
溶存酸素	: 溶液中に溶解込んでいる酸素
促通拡散	: facilitated diffusion 担体輸送 ある物質に対して特異性をもつ担体はその物質に結合して拡散すること。単純拡散とは異なり、促通拡散ではある物質が低濃度であっても拡散初速度が速い。
Hb	: hemoglobin ヘモグロビン
Ht	: hematocrit ヘマトクリット
His	: histidine ヒスチジン
<i>in situ</i>	: その位置のまま
<i>in vitro</i>	: 試験管内で
<i>in vivo</i>	: 生体内で
isometric	: 等尺性
Mb	: myoglobin ミオグロビン
Mb-O <sub>2</sub>	: ミオグロビンに結合した酸素
mRNA	: メッセンジャーRNA
Oxy-Mb	: 酸素化ミオグロビン 酸素と結合したミオグロビン

$P_{\text{capO}_2}$	: 毛細血管での平均酸素分圧
$P_{\text{mbo}_2}$	: ミオグロビンと平衡した酸素分圧
$P_{\text{O}_2}$	: partial pressure of oxygen 酸素分圧
$P_{50}$	: 飽和度 50 % の時の分圧
RT	: resistance training レジスタンストレーニング
SDH	: succinate dehydrogenase コハク酸脱水素酵素
torr	: 気圧の単位 地球上の平均大気圧の1/760の圧力が1 torr この単位を用いると、標高や天体の違い（地球上あるいは月面上）の影響を受けない
Type I 線維	: 収縮速度は遅いが、疲労耐性の高い筋線維
Type IIa 線維	: 収縮速度は速く、疲労耐性の高い筋線維
Type IIb 線維	: 収縮速度は速く、疲労耐性の低い筋線維
$\dot{V}_E$	: 換気量
$\dot{V}_{\text{CO}_2}$	: $\text{CO}_2$ の排出量
VL	: vastus lateralis muscle 外側広筋
$\dot{V}_{\text{O}_2}$	: 1分間当たりの酸素摂取量
$\dot{V}_{\text{O}_2\text{max}}$	: 最大酸素摂取量（特に全身的な運動中に記録した最大値）

本論文は、以下の原著論文と総説に未発表の実験結果を加筆、修正して構成したものである。

1. Masuda K, Kano Y and Katsuta S: Adaptation of myoglobin in compensatory hypertrophied rat muscle. *Acta Physiol. Scand.* 160: 327-331, 1997.
2. 増田和実, 勝田 茂: ミオグロビンの特性と運動への関わり. *いばらき健康・スポーツ科学* 16: 7-17, 1998.
3. 増田和実, 狩野 豊, 中野裕史, 稲木光晴, 勝田 茂: 持久性トレーニングによるラットの骨格筋ミオグロビン濃度の変化－運動強度、時間、期間の影響－. *体力科学* 47: 561-572, 1998.
4. Masuda K, Choi JY, Shimojo H and Katsuta S: Maintenance of myoglobin concentration in human skeletal muscle after heavy resistance training. *Eur. J. Appl. Physiol.* in press.

## 1. 緒言

スポーツ科学の領域では、競技力向上のための研究が盛んに行われてきた。特に持久系競技においては、そのパフォーマンスの向上を目指して代謝あるいは酸素運搬の側面からの研究が盛んに行われてきた。しかし、そのような研究の中においてミオグロビン（Mb）に注目したものは少ない。

有酸素的代謝能力は持久系競技種目の競技力に密接に関係しており、それは肺からミトコンドリアまでの酸素運搬能力によって一部規定される。筋組織への酸素運搬は血流、毛細血管、ヘマトクリット（Ht）、Hbの酸素飽和度、酸素拡散率などを含む様々な要因によって制御されている（Popel 1989）。この複雑なメカニズムの中で、Mbは筋細胞内において酸素の貯蔵（Theorell 1934）、促進拡散（Wittenberg 1970）、細胞内の酸素均等化（Gayeski et al. 1985）などの役割を担っていると考えられている。しかしながら、実際の生体内でMbに結合した酸素がどのように利用されているのか、あるいは、Mbがどのように筋細胞内への酸素流入に寄与しているのかについては未だ推測の域を脱していない。

1900年初頭、August Kroghによって酸素拡散概念が発表された。この概念は毛細血管を単純なシリンダーに例え、酸素はそこから単純拡散するというものであった。さらに、微小循環における酸素運搬のモデルはいくつかの単純化された推測を基に作られており、その単純化の1つとして、Mbの役割は無視されている（Popel 1989）。Mbの省略の理由は、Mbが実際に酸素運搬機構にどう関わっているのか、あるいは、モデル化される組織中でのMbの濃度や分布状況が十分に解明されていないためである。しかし、Mbの機能を解明していく研究の中で、毛細血管から筋細

胞への酸素流入はKroghの酸素拡散概念とは異なり、非常に大きな酸素勾配 ( $\Delta P_{O_2}$ ) をもった拡散によるものであることがわかってきた (Honig et al. 1984)。さらに、筋細胞内では $P_{O_2}$ が低く保たれ、細胞内の $\Delta P_{O_2}$ が非常に小さいこともわかってきた (Honig et al. 1984)。このように筋細胞内における低い $P_{O_2}$ 状態と緩やかな $\Delta P_{O_2}$ 状態を引き起こすのは筋細胞内にMbが存在しているためである (Groebe & Thews 1990)。また、Mbの酸素結合をCOによって阻害した場合には、CO濃度に比例して筋の $\dot{V}O_2$ が低下している (Wittenberg & Wittenberg 1987)。このような事実は、Mbが筋細胞への酸素流入に対して密接な関連性を持っていることはもちろんのこと、酸素と結合可能なMbの量によって筋の有酸素的代謝が影響されることを示唆している。

Mbは1つのヘム環を含むタンパクであり、通常、生体内では1つのMbに対し酸素1分子が結合する。したがって、MbはHbのようにアロステリック効果を持たないので、Mbの濃度と細胞内の酸素張力がわかれば筋細胞内の酸素流量をおおよそ把握することができる。したがって、Mbの機能レベルを知るためには筋内のMbの濃度を知る必要がある。

かつて筋は色覚的に赤筋と白筋に分類されていたように、筋の赤色化は筋細胞内のMbの量に依存している。Mbは有酸素的代謝能力に優れた筋あるいは筋線維に高濃度で存在することや (Nemeth & Lowry 1984)、成長や運動 (c.g. Wittenberg & Wittenberg 1989)、栄養状態 (McDonald et al. 1984, 中谷と榎 1992)、環境 (Reynafarje 1962, Wittenberg 1970) などに変化する可能性が示唆されている。これらのことは、Mb濃度の変化に伴って、筋細胞内の酸素運搬能力が変化する可能性を意味している。

運動には負荷のかけ方や手段によって様々なタイプがあり、選択された運動によって生体に引き起こされる適応も異なってくる。これまでに

運動条件が異なった時のMbの適応については詳細に検討されていない。

Mbは筋細胞内での酸素運搬に関わり、その濃度の変化は筋内の酸素流量を変化させる可能性があることから、Mb濃度の上昇は筋の有酸素的代謝能力の向上につながり、結果的に持久性パフォーマンスが改善すると考えられる。したがって、様々な活動条件によるMb濃度の変化を明らかにすることは、筋の酸素運搬の機序を解明する点や、筋の有酸素的代謝能力の向上のためのトレーニング方法の開発にとって意義のあることと考えられる。

## II. 先行研究

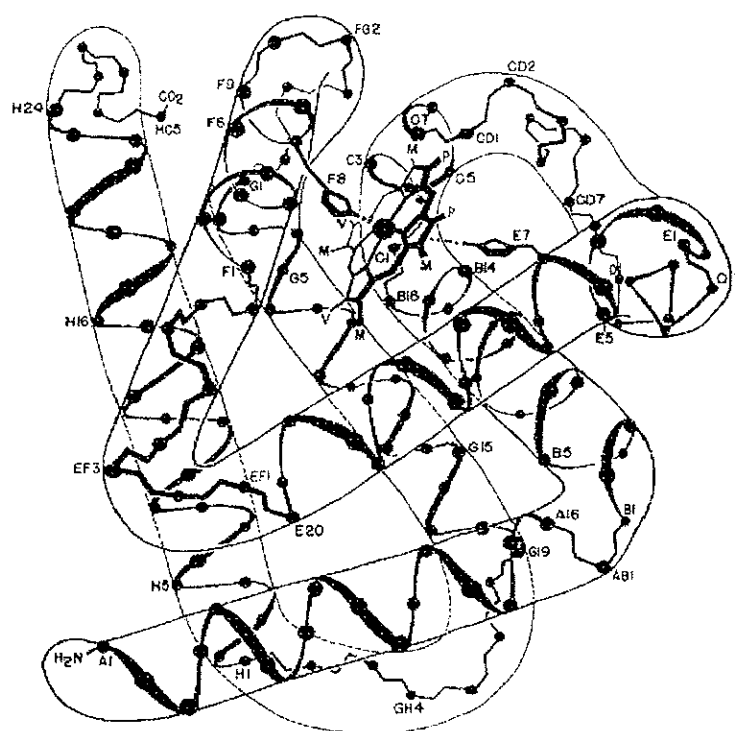
### 1. ミオグロビンの構造と物性

Mbは骨格筋に存在する分子量約17000の単量体で、1分子当たりプロトヘム（テトラピロール環）1個を含む（表Ⅱ-1）。このことはヘム環を4個含んでいるHbと構造上大きく異なる点である。ヘムタンパクは鉄ポリフィリン錯体を含み、ヘムという活性中心を持つ。哺乳類のMbは153個のアミノ酸残基からなる1本のポリペプチドであり、その立体構造はX線結晶解析により明らかにされた（Kagen 1973; 図Ⅱ-1）。図Ⅱ-1のようにポリペプチド鎖はA~Hの8箇所（セグメント）において $\alpha$ らせん構造をとり、7箇所の非らせん部分で屈曲し、全体として扁平な球状の構造をとっている。ヘムはEらせんとFらせん空間（ヘムポケット）にはさまれ、ヘム鉄の第5配位座は上記のF8 His のイミダゾール窒素と結合し、第6配位座はE7 Hisに近接している（図Ⅱ-1）。酸素は鉄が2価（ $\text{Fe}^{2+}$ ）の時、第6配位座に結合するとともに遠位 His との間に水素結合を形成する。Mbの酸素化には鉄原子の移動が伴うため、酸素化によってMbタンパクの形状が部分的に変化する（Kagen 1973）。

Mbの酸素解離曲線はHbのものとは異なり、直角双曲線状を示すことから明らかであるように、Mbの酸素に対する親和性はHbより高い（Theorell 1934; 図Ⅱ-2）。またMbはHbのようにヘム間の相互作用（Hbの4つのヘム鉄の内の1つに酸素が結合すると残りのヘム鉄の酸素親和性が増大すること。ホモトロピック作用の典型）やボーア効果などのアロステリック効果を示さないが、その酸素平衡機能は温度の上昇に対して右偏する（Antonini 1965, 河瀬 1979, 中谷 1993）。さらにMbは、Hbと同

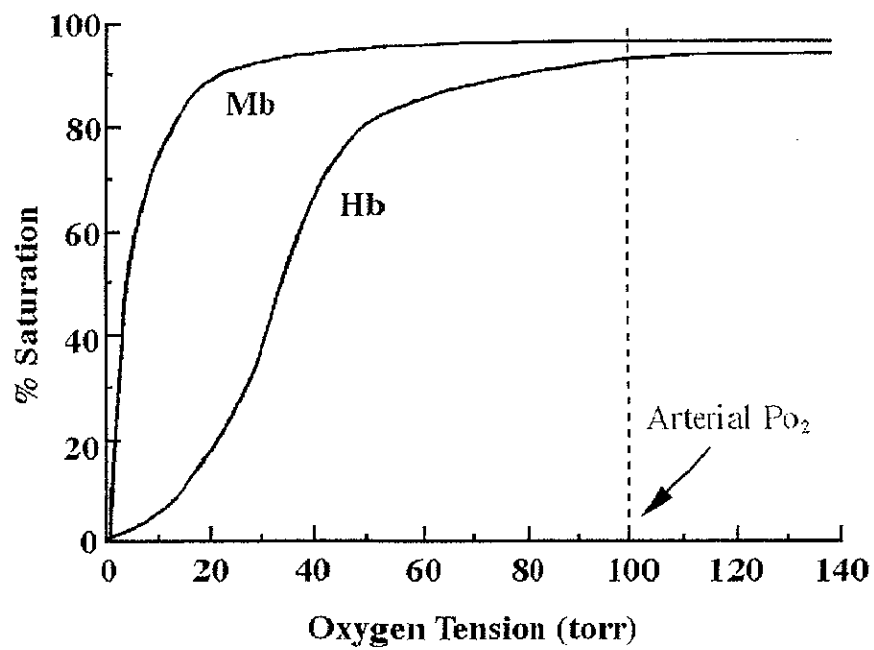
**Table II -1.** Molecular weight of myoglobin in several animal species.

animals	molecular weight	references	published year
human	17,450	Antonini	1965
horse	18,800	Antonini	1965
canine	17,200	河瀬	1979
mouse	17,800	中谷	1993



**Figure II -1.**  $\alpha$ -carbon diagram of myoglobin molecule. (Kagen, 1973)



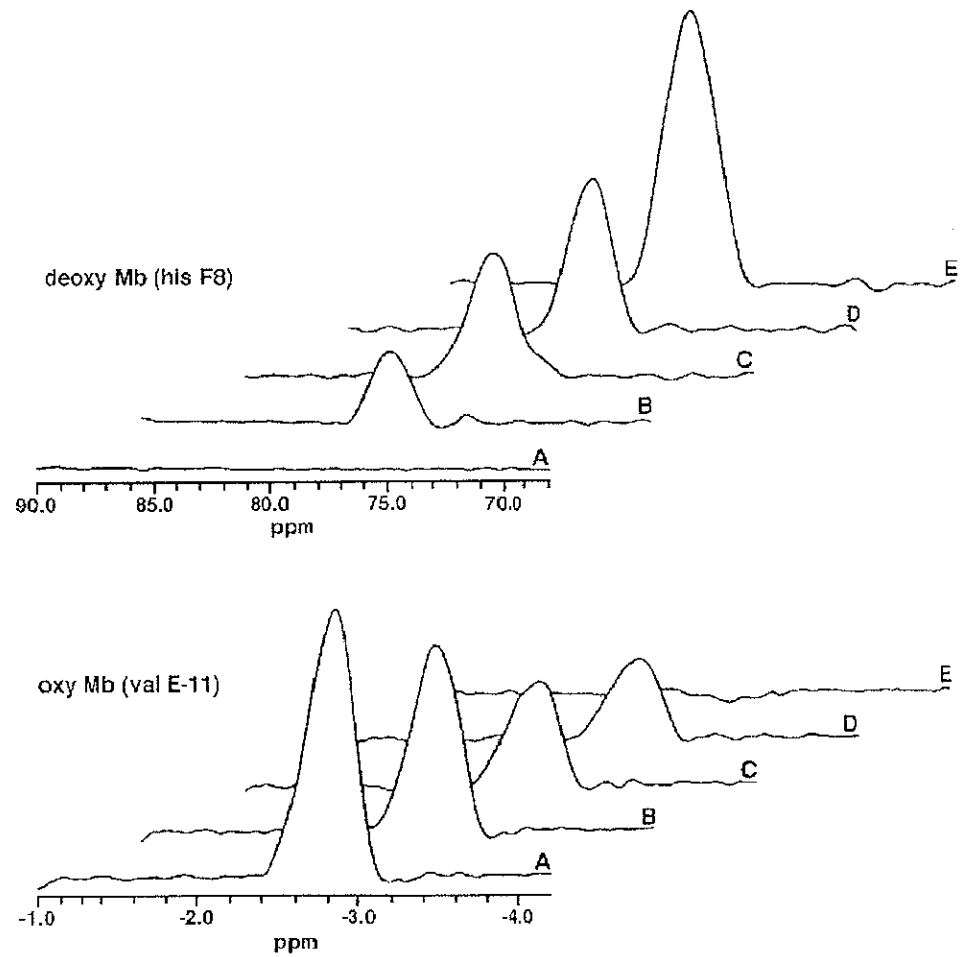


**Figure II -2.** Oxygen dissociation curve for myoglobin (Mb) and hemoglobin (Hb).  
 $P_{50}$  of Mb is  $< 5$  torr.

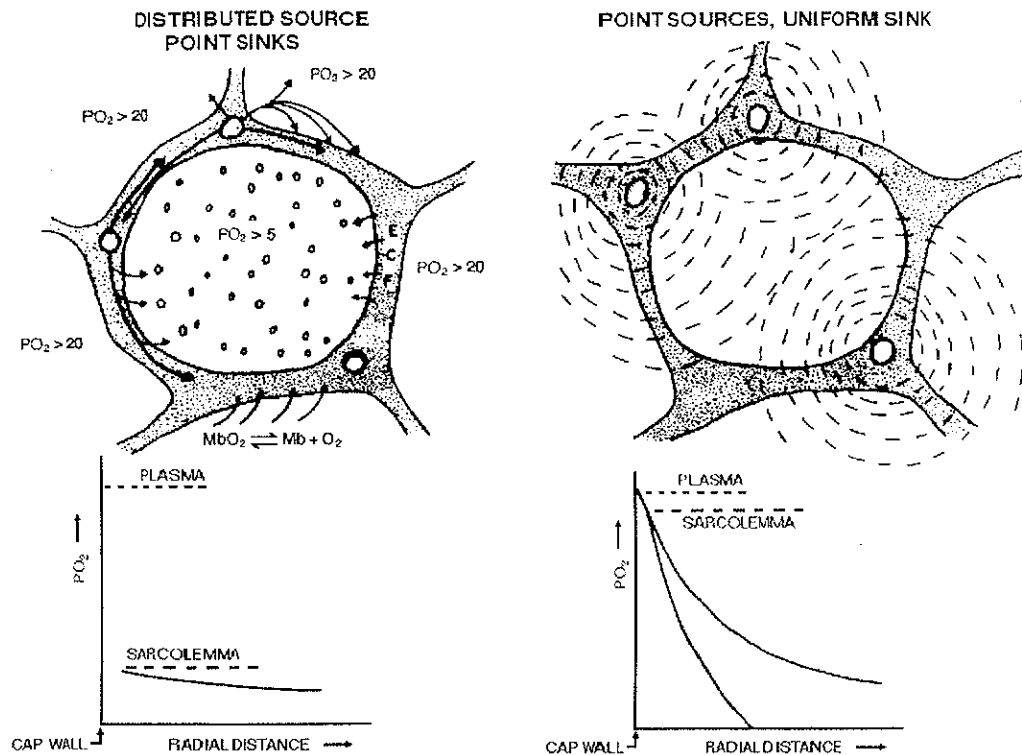
様に2価鉄状態ではCOと結合するが、その親和性はHbより低い。これはMb分子中の遠位 HisがCOとヘム鉄とが結合するのを立体的に阻害しているためである (Kagen 1973)。鉄が酸化されてメトミオグロビン (met myoglobin; ヘム鉄が $\text{Fe}^{3+}$ の時) になると $\text{Fe}^{2+}$ 状態の時の能力を失い、その代わり、 $\text{CN}^-$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{N}_3^-$ などと結合する。これら誘導体の吸収はHbに類似している (Kagen 1973)。近年、 $^1\text{H}$ -NMRによってF8 His とE11 Val のシグナルを検出できるようになり、Mbの酸素化状態を知ることができる (Jue 1994; 図 II -3)。

## 2. 酸素運搬の概略

酸素は肺で、そのほとんどがHbと結合した  $\text{Hb-O}_2$  として、またごく一部が血漿に溶けた溶存酸素として末梢組織へ運搬されてくる。末梢では微小循環網が発達しており、それによって酸素は筋細胞内へ効率よく輸送される (Honig et al. 1992)。これまで毛細血管から筋細胞内への酸素移動は単純な拡散と考えられてきた (Krogh の概念)。Krogh の拡散概念では、血液はHbの溶液として考えられており、Hbでの化学反応と拡散との相互作用は無視されている。また、酸素拡散はHbからミトコンドリアまでの拡散経路を通して一様 (拡散係数が一定) で、毛細血管の空間的分布も均一と仮定されている (Honig et al. 1984; 図 II -4)。そのため、Krogh の概念では、毛細血管から筋細胞への $\Delta\text{Po}_2$ は緩やかである (Honig et al. 1984)。しかし、その後、*in situ* の個々の骨格筋細胞 (Gayeski & Honig 1986, 1988)、*in vitro* の心筋細胞 (Wittenberg & Wittenberg 1985) を用いた実験より、赤血球から酸素が放出されるために必要な $\Delta\text{Po}_2$ はKrogh が考えているものより大きいことが示された (図



**Figure II -3.** Histidyl NH/Val E11 signals from myocardium (Jue 1994).  
心筋に11、3、2、1、0 ml·min<sup>-1</sup>で灌流した時のMb-O<sub>2</sub>とDeoxy-Mbの<sup>1</sup>H-NMRシグナル。灌流量が減るにしたがい、E11 Valのシグナル強度が低下し、逆にF8 Hisのシグナル強度が上がる。

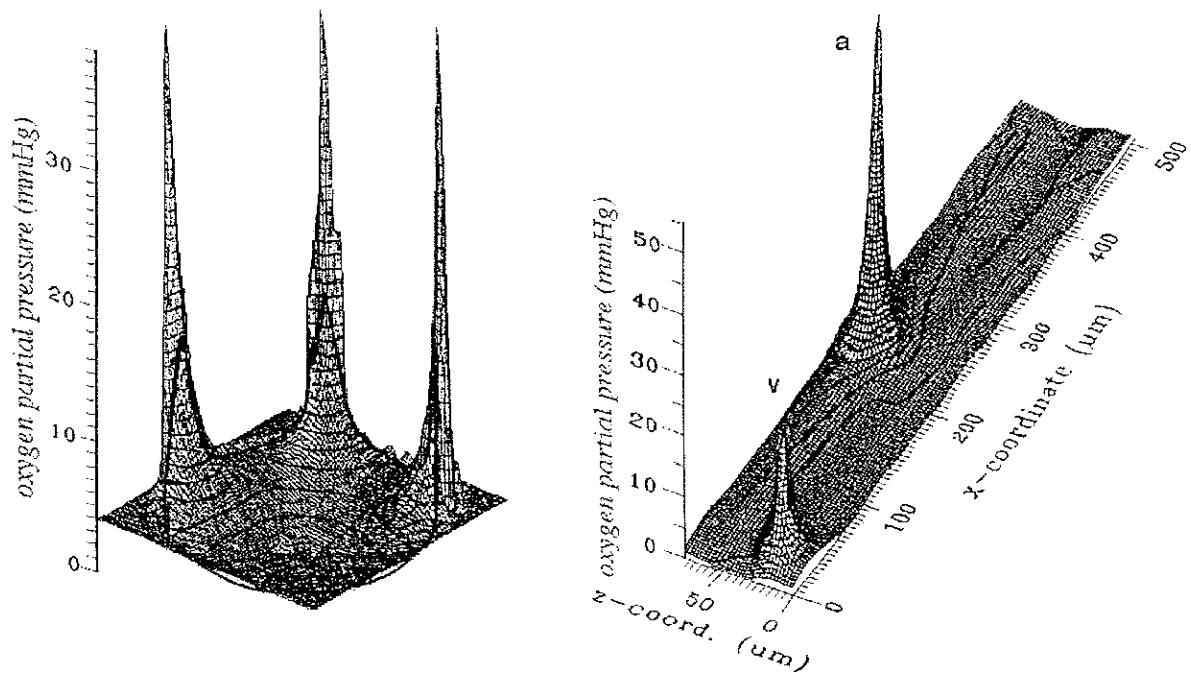


**Figure II -4.** Schematic comparison of Kroghian concept (right) and new concept (left). Kroghのモデルでは拡散係数が一定なため、酸素勾配 ( $PO_2$ の傾き) が緩やかに一定であるが、新たなモデルはサルコレンマからの急激な勾配と細胞内のわずかな勾配の二相から成る。(Honig et al. 1984)

II-4)。また、数学的な分析 (Clark & Clark 1986, Groebe 1990, Groebe & Thews 1986) によっても赤血球から筋細胞への大きな $\Delta P_{O_2}$ が示されている (図 II-5)。血液から組織の間には、酸素輸送体がないため、このように大きな  $\Delta P_{O_2}$ は、血液から組織への酸素運搬に重要な役割を担っている (Honig et al. 1984)。細胞に達した酸素は拡散によってミトコンドリアへ入るが、細胞質とミトコンドリアの間の $\Delta P_{O_2}$ は非常に小さい ( $1 \times 10^{-2}$  torrのオーダー; Clark et al. 1987)。そこで、細胞質中にあるMbが酸素の貯蔵・運搬役を担い、酸素拡散を促進していると考えられている (Honig et al. 1992)。

### 3. ミオグロビンの機能

Mbの物性を利用してMbの酸素結合を阻害し、その時の筋の収縮特性や代謝特性の変化を検討した研究が報告されている。Cole (1982, 1983) は*in situ* でイヌの腓腹筋と足底筋について一定負荷の等尺性収縮を持続させた時に過酸化水素を灌流させ、Mbと酸素の結合を阻害した結果、等尺性張力と $\dot{V}O_2$ がともに低下したことを報告した。このことは、通常の生理的条件下の筋でもMbが筋収縮機能を支え、酸素をミトコンドリアまで運搬していることを示唆している。同様に、Mbの筋収縮機構への貢献を示唆する興味深い研究がある (Bailey & Driedzic 1986)。この研究では、Mb濃度の高い魚類の心臓とその濃度の低いものが用いられている。灌流液の $P_{O_2}$ を低下させるとMb濃度の低い心臓では $\dot{V}O_2$ の低下が生じたが、Mb濃度の高い心臓ではその低下が生じなかった。また、ヒドロキシルアミンによってMbと酸素の結合を阻害すると、Mb濃度の高い心臓に $\dot{V}O_2$ の



**Figure II -5.** Calculated  $P_{O_2}$  distribution around three capillaries in heavy working red fiber (A).  $P_{O_2}$  distribution in plane that bisects the fiber along its axis (B). The plane is 20  $\mu\text{m}$  from capillary. a and v; a terminal arteriole and venule. (Groebe 1990, Groebe & Thews 1990)

低下が生じた。このことは、Mbが筋の酸素摂取に関与しており、Mbの濃度の高さが筋の酸素摂取に重要であることを示唆している（Bailey & Driedzic 1986）。

これまでに考えられてきているMbの機能には酸素貯蔵（Theorell 1934）、酸素の促進拡散（Wittenberg 1970）、酸素運搬（Wittenberg & Wittenberg 1975）、細胞内の酸素濃度の均等化（Gayeski et al. 1985）、酸化的リン酸化への貢献（Doellier & Wittenberg 1991, Wu et al. 1972）などが挙げられる。以下でそれらについて触れる。

### **(1) 酸素貯蔵機能**

Mbの酸素親和性はHbのそれより約5倍高く、 $P_{50}$ は<5 torr と非常に低いことから、Mbは酸素貯蔵の役割を担っていると考えられてきた（Theorell 1934）。

組織中に存在する酸素は、主として2種類の型で存在している。それらは、溶存酸素とMbと結合した酸素（Mb-O<sub>2</sub>）である。Mb-O<sub>2</sub>量は溶存酸素量の約30倍以上であり（Wittenberg & Wittenberg 1989）、心筋の場合には100倍に達する（Wittenberg & Wittenberg 1987）。溶存酸素とMb-O<sub>2</sub>の割合については研究者間で異なっているが、Tamuraら（1978）は、心筋の溶存酸素とMb-O<sub>2</sub>の割合は3  $\mu$ M: 100  $\mu$ M（心筋のMb含量を200  $\mu$ Mとし、その50%が酸素と飽和している場合）と報告している。

これらのことから、筋細胞内の酸素のほとんどがMbと結合しており、Mbは筋細胞内で酸素貯蔵役を担っていると考えられる。このMbに蓄えられた酸素は、実際、高強度の筋収縮によって毛細血管が閉塞され、酸素供給が制限されるような状況において利用されると考えられる（Popel 1989）。

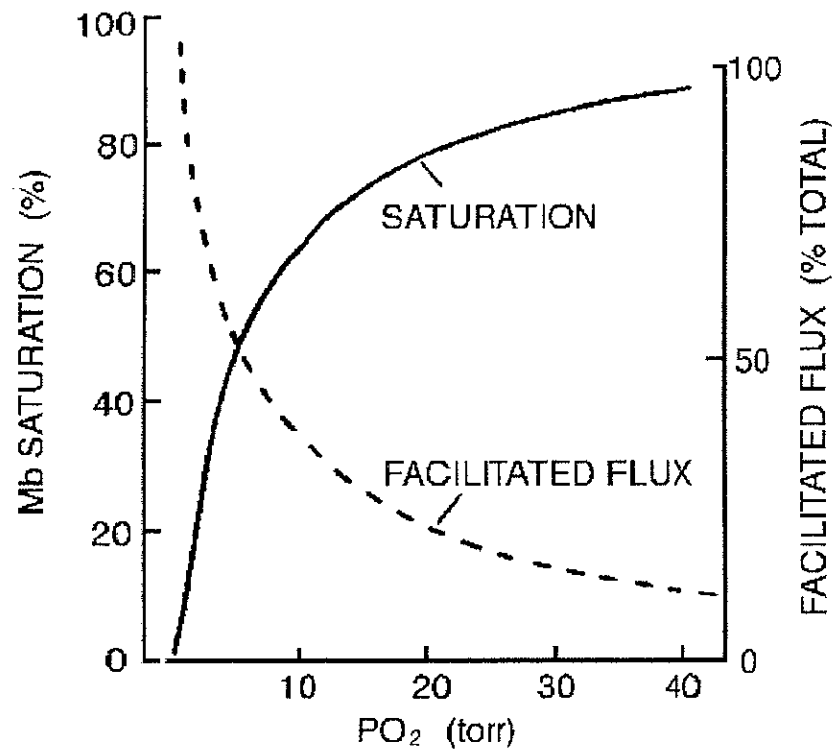
## (2) 酸素促通拡散機能

筋細胞内で酸素化Mb (Oxy-Mb) が拡散することによって、Mbに結合している酸素の拡散につながることをMbの酸素促通拡散 (Myoglobin facilitated oxygen diffusion) という (Wittenberg 1970)。Mbの拡散速度は溶存酸素のその1/10~1/20 足らずであるが (Ellsworth & Pittman 1984, Jürgens et al. 1994, Papadopoulos et al. 1995)、Mb-O<sub>2</sub> の濃度は溶存酸素の30倍以上であるため、両者の酸素流量はほぼ同程度か (Wittenberg & Wittenberg 1989)、あるいはそれ以上と考えられている (Kennedy & Jones 1986)。促通拡散による酸素流量が溶存酸素の流量を越えるためには3つの条件が必要であると考えられている—① Mbが十分な濃度で存在していなければならない (Federspiel 1984)、② Mbは完全に酸素と飽和してはならない (Gayeski & Honig 1983; 図 II -6)、③ Mbは筋細胞内で自由に移動し拡散しなければならない (Wittenberg & Wittenberg 1989)。①と②の条件は心筋や骨格筋で確認されているが、③についてはMbの rotational diffusion (Livingston et al. 1983) が報告されているものの未だ十分に解明されていない。

## (3) 酸素運搬機能

ここで述べるMbによる酸素運搬 (Myoglobin mediated vectorial oxygen transport) とは、Mbが毛細血管から筋線維内への酸素流入を促進させるように働くことである (Wittenberg & Wittenberg 1975)。この酸素流入量はMbが筋内に存在することによって筋細胞内Po<sub>2</sub>が下がり、筋細胞内外のPo<sub>2</sub>の差が大きくなることに依存する。また、これはMbの酸素促通拡散機能によって成し得るものと考えべきである (Braulin et al. 1986,



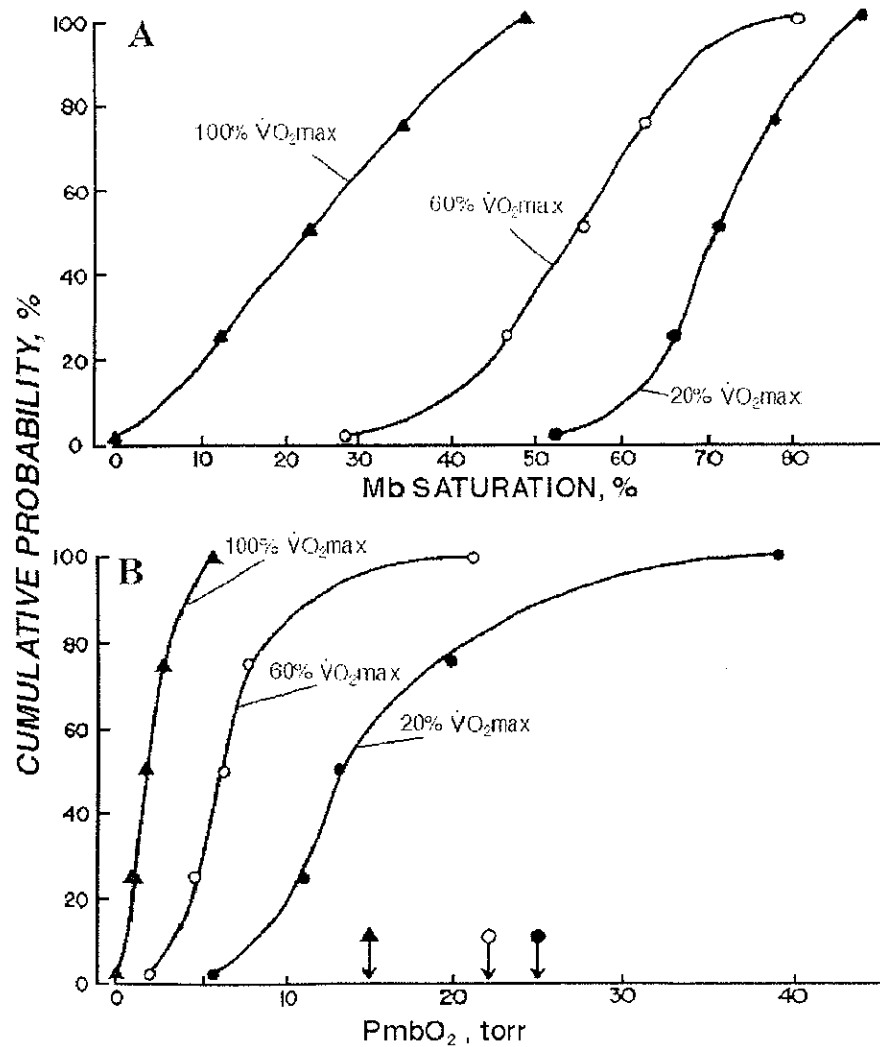


**Figure II -6.** Estimated relationship myoglobin saturation and facilitated flux. Solid line is myoglobin oxygen dissociation curve. Dashed line indicates the influence of  $PO_2$  on myoglobin-facilitated transport. (Honig et al. 1991)

Wittenberg & Wittenberg 1989)。De Koningら(1981)は鳥の砂嚢を用いて、COによるMb機能の阻害の有無によって酸素運搬がどのように変化するのかを数学的に検討した結果、Mbが機能している場合に細胞内への酸素流量が多かったことからMbが酸素運搬を促進していると結論づけた。Braunlinら(1986)は子猫の乳頭筋においてMb機能を阻害した結果、筋細胞内の $P_{O_2}$ が上昇したことからMbが筋細胞方向への酸素流入に関与していることを示唆した。WittenbergとWittenberg(1975)は、Mbの存在は筋束の酸素摂取量を促進させるが、Mbの酸素結合能力が阻害された時、筋細胞内の $P_{O_2}$ が50 torrに上昇し、毛細血管と筋細胞の間の $\Delta P_{O_2}$ が小さくなるために細胞への酸素拡散が制限されることを示した。

#### (4) 酸化のリン酸化の促進機能

チトクロムの代謝回転を維持するために必要なMbの $P_{O_2}$ は $P_{mbo_2} > 0.5$  torrである(Gayeski et al. 1987)。このように低い $P_{mbo_2}$ の条件下でミトコンドリアへの酸素流量を多くするためには、ミトコンドリア内で高いレベルの還元状態が維持されていなければならない(Wittenberg & Wittenberg 1989)。筋細胞内の酸素はほとんどMbと結合しており、Mbの促進拡散以外の付加的な酸素流量はほとんど得られない。摘出された心筋細胞のミトコンドリア酵素の代謝回転に必要な $P_{O_2}$ はせいぜい1 torrである(Wittenberg & Wittenberg 1985)。生体内では運動強度に比例して $P_{mbo_2}$ は低下するが(図II-7)、この低い $P_{mbo_2}$ はミトコンドリア酵素の代謝回転に最低必要な $P_{O_2}$ をほとんど下回らない。WittenbergとWittenberg(1987)の実験で用いられた $P_{O_2}$ はチトクロムオキシダーゼの代謝回転に必要な $P_{O_2}$ の20~200倍に達する。このような条件下でチトクロムオキシダーゼに影響を与えずにMbの一部をCOと結合させると $\dot{V}O_2$ が1/3に減っ



**Figure II -7.** Frequency distribution of myoglobin saturation (A) and PmbO<sub>2</sub> (B) in muscle cells. 20、60、100% $\dot{V}O_{2max}$ の仕事量で収縮させている時のMb飽和度とPmbO<sub>2</sub>。矢印は各収縮条件時の静脈P<sub>O<sub>2</sub></sub>を示している。Mb飽和度とPmbO<sub>2</sub>は仕事量が上がるにつれ低下する。(Honig et al. 1991)

た。この呼吸の低下はCO-Mbの量の割合と直接的に比例していた。Mbによる酸素流入の促進はミトコンドリアの呼吸鎖を通る電子流量に依存し、ATPの合成を支えている。WittenbergとWittenberg（1987）は心筋の場合、ミトコンドリアが同時に2つの酸素流入を受けていると考えている。すなわち、チトクロムオキシダーゼへの溶存酸素とミトコンドリア電子伝達系へのMb-O<sub>2</sub>である。後者をMbのミトコンドリアへの酸素供給（myoglobin mediated oxygen delivery to mitochondria）という。特にMb-O<sub>2</sub>は筋が最大作業を行っている時により貢献するであろうと考えられている（Wittenberg & Wittenberg 1987）。この他にも、Mbに対する阻害剤を用いた時の代謝の変化を調べた研究があり（Doeller & Wittenberg 1991, Wu et al. 1972）、いずれもMbの酸化リン酸化への貢献を示唆している。

#### (5) 酸素濃度均等化機能

GayeskiとHonig（1983）は、個々の筋細胞のPmbo<sub>2</sub>を凝固点分光法（cryomicrospectroscopy）を用いて測定した。彼らはその結果、個々の筋線維の縦断面及び横断面のPmbo<sub>2</sub>のばらつきは少なく、ΔPmbo<sub>2</sub>もわずかであったことから、Mbは組織内の酸素分布を均等にする働きをしていると考えた（Gayeski & Honig 1986, 1988）。

#### 4. ミオグロビンの合成・分解過程

ヒトにグリシンを投与した実験によって、ヘムの合成は主にミトコンドリアと細胞質で起こることが明らかにされた（Maclean 1978）。また、*in situ* hybridization によって、Mb mRNAはリボゾームが多く存在するA帯に分布していることも確認されている（Mitsui et al. 1993）。Åkesonら

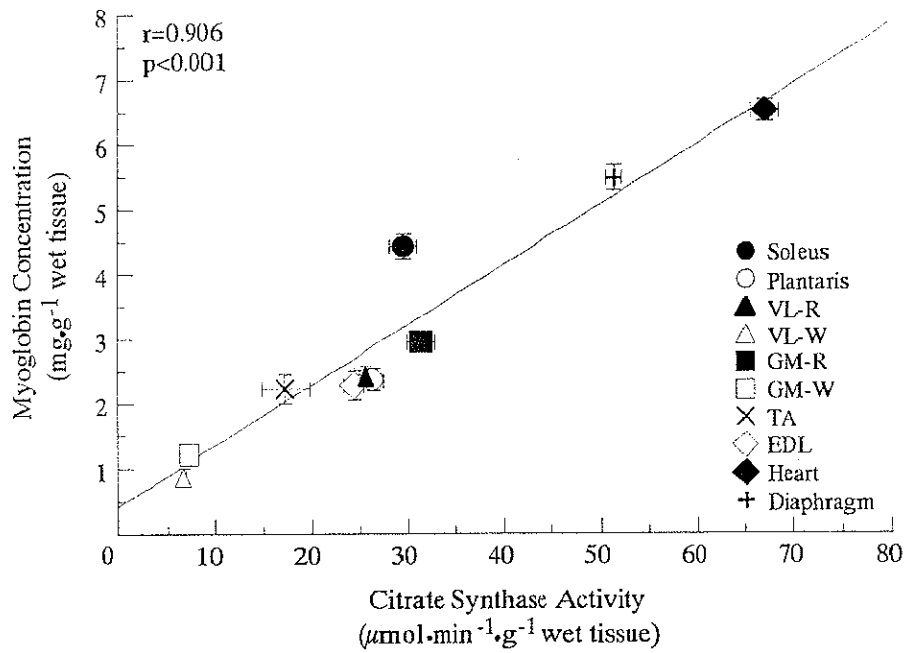
(1960) は、Mbの合成/分解に関して $^{14}\text{C}$ でラベルしたグリシンを用いて検討し、ラット骨格筋のMbの半減期は80~90日と報告している。また、Dalyら(1967) はハムスターのMbについて、約6カ月と比較的長い半減期を報告している。

MbはHbに比べて分子量が小さいので腎閾値も $15\sim 20\text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ 血漿と低い。そのため筋組織の崩壊、壊死により血中に放出されると容易に尿中に排出される(川井 1991)。このようなことから、血中のMb濃度は筋損傷や心疾患のマーカーとしてしばしば臨床で用いられている(川井 1991)。

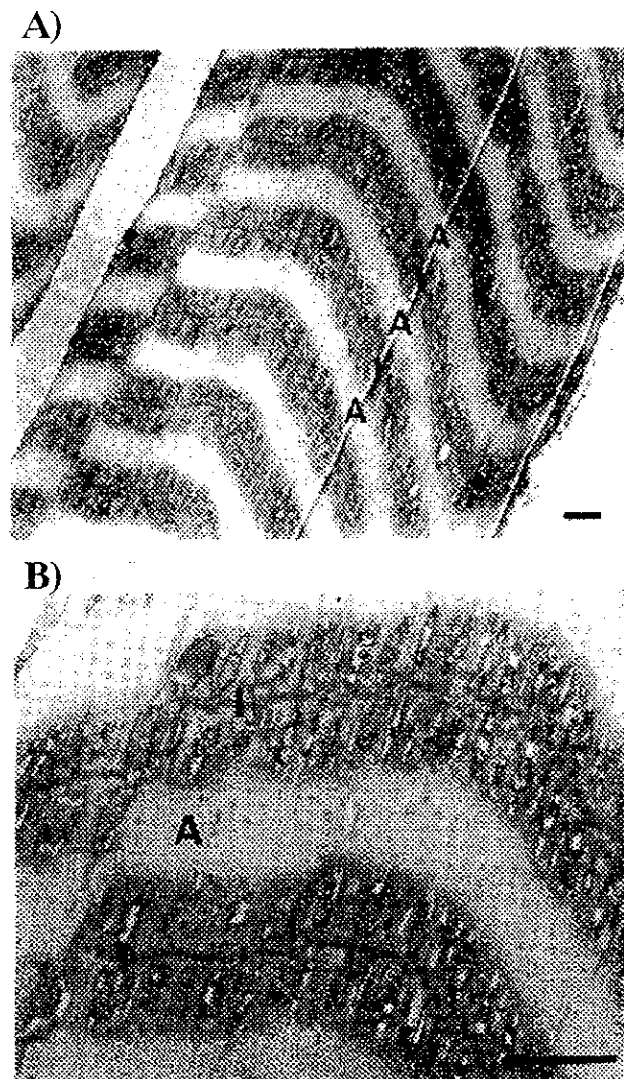
## 5. ミオグロビンの局在

Mbは主に心筋細胞や骨格筋細胞内に存在している。筋がかつて赤筋・白筋と色覚的に分類されていたように、筋の赤色化の程度は筋が有するMb濃度の高低を反映している。一般的に心筋、横隔膜、ヒラメ筋などの持続的な筋収縮に優れている筋にMb濃度が高い(図Ⅱ-8)。また、稀に鳥類の砂囊(平滑筋)にもMbが高濃度で存在している。ヒトの場合、筋線維レベルでも有酸素的代謝に優れている遅筋線維は速筋線維よりMbを多く有する(Kunishige et al. 1996, Nemeth & Lowry 1984)。さらに筋線維の縦断的組織化学切片から、Mb分子はI帯に多く存在していることが確認されている(Kawai et al. 1987; 図Ⅱ-9)。加えて、Mb濃度とミトコンドリアの酸化系酵素活性との間(中谷 1993, Wittenberg 1970; 図Ⅱ-8)、毛細血管密度との間(Reis & Wooten 1970)に密接な関係が認められている。

以上のことは、筋が持続的な収縮活動を行う際には、より多くのMbを必要とし、Mbが筋の有酸素的代謝に対して密接に関与していることを



**Figure II -8.** Myoglobin concentrations in various muscles. VL-W; white portion of m. vastus lateralis, VL-R; red portion of m. vastus lateralis, GM-W; white portion of m. medial gastrocnemius, GM-R; red portion of m. medial gastrocnemius, TA; m. tibial anterior, EDL; m. extensor digitrum longus. (増田&勝田 1998)



**Figure II -9.** Localization of myoglobin using electron microscopy at low (A) and at higher magnification (B). I-bandsが一定間隔で染色されているが、A-bandとM-lineは染色されていない。 Bar= $1\mu\text{m}$  (Kawai et al. 1987)

示唆している。

## 6. ミオグロビン含量に影響を与える要因

### (1) 発育・加齢の影響

生後1~3週齢ほどのラットの下肢の骨格筋群を観察すると、それらは非常に白色化しており、Mb濃度が非常に低いことがうかがい知れる。ラットの場合、生後に非常に低いMb濃度が（ $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ wet tissue}$ 前後）、発育に伴い上昇し（Beyer & Fattore 1984, Meng et al. 1993, 中谷 1988）、加齢とともにやや低下する（Beyer & Fattore 1984）ことが報告されている。筋の種類によっても加齢に伴うMb濃度の変化の程度が異なり、有酸素的代謝に優れる筋ではそうでない筋と比較して変化の程度が大きく、最終的に高値を示す（中谷 1988）。ヒトにおいては加齢によってMb濃度のわずかな上昇が報告されている（Möller & Brandt 1982, Möller & Sylvén 1981）。

### (2) 環境の影響

高地住民のMb濃度が高い（Reynafarje 1962, Wittenberg 1970）ことや、低圧環境下のトレーニングによってMb濃度が上昇する（Terrados et al. 1990）ことが報告されている。これらの事実は組織の低酸素化がMb濃度の上昇のトリガーとなっていることを示唆している。

### (3) トレーニングの影響

持続的収縮活動能力や有酸素的代謝能力に優れた筋にMb濃度が高いことから、Mb濃度について日常のトレーニングレベルによる横断的な比較



や、実際にトレーニングを行ったときの縦断的な検討が報告されている（Beyer & Fattore 1984, Harms & Hickson 1983, Hickson 1981, Jacobs et al. 1987, Jansson & Sylvén 1981, Jansson et al. 1982, Möller & Brandt 1982, 中谷 1988, Sylvén et al. 1984, Terrados et al. 1986）。

BeyerとFattore（1984）が成熟ラットに持久性運動を行わせたところ、腓腹筋でMb濃度が上昇したことを報告した。Hicksonらのグループは、ラットを用いて持久性トレーニングの頻度（Hickson 1981）、強度（Harms & Hickson 1983）、脱トレーニング（Hickson et al. 1984）に対するMb濃度の変化を研究した。その結果、外側広筋の赤色部ではトレーニング頻度と強度に比例してMb濃度が上昇した。しかし、ヒラメ筋のMb濃度は上昇したものの、その変化に頻度および強度依存性は認められなかった。また、外側広筋白色部のMb濃度はいずれのトレーニング条件でも変化しなかった。さらにHicksonら（1984）はラットを対象に6回/週の水泳トレーニングを行った後、それをトレーニング頻度の異なる数グループに分け（4回/週、2回/週、0回/週）、 $\dot{V}O_{2max}$ 、CS活性およびMb濃度に対する脱トレーニングの影響を観察した。その結果、脱トレーニング期間中の各指標の低下の程度は頻度依存적であったが、Mb濃度や $\dot{V}O_{2max}$ の低下速度はCS活性のそれに比べて遅かった。このことから彼らは、Mbが $\dot{V}O_{2max}$ の維持に関与している可能性があると考えた。このような脱トレーニング期間におけるMb濃度とミトコンドリアの酵素活性の反応の不一致を認めている研究が他にも報告されている（Hickson & Rosenkoetter 1981, Nemeth et al. 1983, 中谷 1988）。

JanssonとSylvén（1981）はヒトを対象に、Mb濃度とCS活性との関連性を調べたが、両者の間に密接な関係はなく、鍛錬者と非鍛錬者との間にMb濃度の差は認められなかったと報告した。また彼らは同様な実験

(Sylvén et al. 1984) の中で筋線維の形態の影響を検討するため、Mb濃度と筋線維直径の比を用いて鍛錬者と非鍛錬者を比較したが、両者の間に有意な差を認めなかった。Janssonら(1982)は、競技自転車選手のMb濃度は非鍛錬者に比べて低い傾向にあった(5.05 vs 5.38 mg·g<sup>-1</sup> wet tissue)と報告し、翌年(Jansson et al. 1983)、エリート長距離走者と非鍛錬者の比較において、エリート長距離走者は非鍛錬者に比べ高い毛細血管密度、筋線維組成(% Type I 線維)および酸化系酵素活性を有していたが、高いMb濃度を有していなかったと報告している。

高齢者を対象に6週間の持久性トレーニングを行った研究(Möller & Brandt 1982)や、一般成人を対象に75% $\dot{V}O_2$ max強度の自転車トレーニングを8週間行った研究(Svedenhag et al. 1983)が報告されているが、いずれの研究においてもMb濃度は変化していない。

Terradosら(1986)は、これまでのラットとヒトのMb濃度に関する研究結果の不一致がトレーニング強度に原因があるとし、ヒトを対象に低酸素環境下で高強度トレーニングを行ったところ、平均筋線維横断面積とMb濃度は低下したが毛細血管密度は上昇したと報告した。これらのことから、彼らはトレーニングに対する末梢の適応がMb濃度の変化より毛細血管の新生に現れると考え、さらにトレーニングによるヒトと動物におけるMbの適応の違いは種の違いによるものと考えた。Jacobsら(1987)は、高地住民や海で生活する哺乳類のMb濃度が高いことから(Reinafarje 1962, Wittenberg 1970)、組織中の酸素不足がMbの合成を刺激すると仮説を立てた。そこで彼らは、ヒトを対象に組織が酸素不足に陥ると考えられるスプリントトレーニングを行ったが、Mb濃度は仮説に反して低下した。このMb濃度の減少の理由として、Type I 線維が減少しType IIa 線維が増加する傾向にあったこと、筋損傷に伴うMbの漏出などの原因を挙

げている。

以上のように、ヒトと実験動物を用いた研究の間でMb濃度の適応変化について一致した見解が得られていない。この点を再確認することは酸素運搬におけるMbの意義を考える上でも重要と思われる。

#### **(4) 食事の影響**

鉄摂取量を制限すると、血中-Hb、Htの減少のみならず、Mb濃度の低下が生じることが動物実験によって示されている（McDonald et al. 1984, 中谷&榎 1992）。

#### **(5) 病理的影響**

川井らは筋疾患患者を対象に筋生検を行い、Mb分子とMb-mRNAの局在化を組織化学的に分析した（Kawai et al. 1987, 1991, 川井 1991, Mitsui et al. 1993）。その結果、筋線維の病変状態によってMbやMb-mRNAの染色様相が異なることが認められ、それぞれの筋疾患によって、Mbの局在化に特徴があることが確認された。

### Ⅲ．研究目的および研究課題

Mb濃度は筋細胞内の酸素流量を規定する。したがって、酸素運搬の機序の解明や有酸素的代謝能力を規定する因子を探る上で、活動条件によるMb濃度の変化を知ることは重要である。そこで本研究では以下の研究課題を設定し、異なる活動刺激に対するMbの量的変化を明らかにすることを目的とした。

- ① ヒトの骨格筋Mb濃度のレベルと有酸素的作業能力および筋の有酸素的代謝能力との関連性および持久性トレーニングの影響  
ヒトの骨格筋Mb濃度と有酸素的作業能力や筋の酸化能力との関連性について横断的に検討し（実験1）、その関連性が持久性トレーニングによって生じるのかについて検討する（実験2）。さらに、持久性トレーニングプロトコルの違いがMb濃度の変化に与える影響について検討する（実験3）。
- ② 高強度（高負荷）の活動刺激が骨格筋のMb濃度に及ぼす影響  
筋肥大をもたらすような活動刺激に対してMb濃度はどのように変化するかを明らかにする（実験4）。また、その筋肥大の過程におけるMb濃度の変化をラットの骨格筋を用いて検討する（実験5）。
- ③ 活動量の減少が骨格筋のMb濃度に及ぼす影響  
活動刺激が減少した場合のMb濃度の変化を、張力負荷の減少と神経活動の減少の2つの側面（動物実験モデル）から検討する（実験6）。

#### IV. ヒトの骨格筋のミオグロビン濃度と有酸素的代謝能力との関係－トレーニング状態の影響－（実験1）

##### 1. 目的

有酸素的運動を行うに際し、酸素の運搬と利用能力は重要な要因である。Mbは筋細胞内において酸素の貯蔵や運搬に関わっていると考えられているものの、実際に報告されている酸素運搬モデルの中にはMbを無視したものが多い（Popel 1989）。このことは、Mbが実際の生体の中でどのように酸素運搬機構に関わっているのか明らかとなっていないためである。また、Mbを考慮できない他の理由は、運動などに対するMbの量的応答が動物種によって異なっていたためである。Mbは有酸素的代謝能力に優れる筋（Wittenberg 1970）や速筋線維よりも遅筋線維（Kunishige et al. 1996, Nemeth & Lowry 1984）に多く含まれていると報告されている。このことは、有酸素的代謝能力に優れる者、あるいは遅筋線維の割合の高い筋線維組成を有する者の骨格筋のMb濃度は、そうでない者に比べて高いことを推測させる事実である。それにも関わらず、ヒトの骨格筋のMb濃度を横断的に検討した研究では、有酸素的作業能力に優れている者が高いMb濃度を有しているわけではない。例えばJanssonら（1982）の研究において、 $\dot{V}O_{2\max}$  ( $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) が約40と約58の一般成人と長距離系選手を比較した結果、Mb濃度の両群間の差は認められなかった。これに類似した事実は同グループの研究者によって報告されている（Jansson & Sylvén 1981, Jansson et al. 1982, 1983, Sylvén et al. 1984）。また、持久的なトレーニングを行ってもヒトのMb濃度が上昇するという報告はない（Möller & Brandt 1982, Svedenhag et al. 1983）。しかし、齧歯類

の骨格筋では、有酸素的代謝に優れる筋やトレーニングに対するMbの応答が確認されている（Beyer & Fattore 1984, Harms & Hickson 1983, Hickson 1981）。このようなMbに関する動物種間の矛盾は、筋への酸素運搬機序を研究する上でも非常に研究者を混乱させている。したがって、有酸素的能力とMb濃度の関係をヒトの骨格筋において確認することは、今後の酸素運搬機序の研究の上でも非常に意義深いものと考えられる。

以上のように有酸素的代謝能力の差がヒトの骨格筋のMb濃度の差に反映されない理由として、対象となった被験者の有酸素的代謝能力の差が小さかったことが考えられる（e.g. Jansson et al. 1982）。そこで本実験では、様々なレベルの有酸素的作業能力を有する被験者を対象として、外側広筋のMb濃度のレベルと自転車運動中の換気パラメータ、あるいはミトコンドリアの酸化能力との関係を明らかにすることを目的とした。

## **2. 方法**

### **(1) 被験者**

被験者には、陸上長距離と長距離自転車競技（ENDUR）、陸上短距離（SPRINT）の専門的なトレーニングを行っている選手および、一般成人男性を対象とした。一般成人男性は、週に数回、趣味としてスポーツ活動を行う者（Active）と、日常、全くスポーツ活動を行わない者（non-Active）とに分類した。被験者には、実験の主旨や測定項目、予想される結果について十分に説明を行い、実験参加の同意を得た。被験者の身体的特徴を表IV-1に示した。

### **(2) 運動負荷テスト**

**Table IV-1.** Physical characteristics of the subjects and muscle fiber compositions in each group.

	n	<u>Age</u>	<u>Weight</u>	<u>Height</u>	<u>VO<sub>2</sub>max</u>	<u>Muscle Fiber Compositions (%)</u>		
		(years)	(kg)	(cm)	(ml·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	Type I	Type IIa	Type IIb
non-Active	8	20.3±1.2	65.1±13.1	170.3±6.4	36.2±4.1	34.3±6.2	33.6±12.4	27.2±7.0
Active	15	20.1±1.6	64.3±4.3	169.4±5.6	51.5±6.8**§§	38.8±9.0	40.1±12.6	22.9±11.9
ENDUR	5	22.8±2.4	58.4±5.0	167.2±4.4	63.1±8.1**	49.2±6.9*	34.6±8.6	16.2±5.3
SPRINT	9	21.9±0.6	65.2±8.5	173.3±9.4	51.5±4.7 **§	35.9±9.0	38.7±9.1	25.4±12.4

All data are means±SD. ENDUR: endurance athletes, SPRINT: sprinters. An asterisk is representing a significant difference among the groups (\*\*: P<0.01 vs non-Active, §: P<0.05 vs ENDUR, §§: P<0.01 vs ENDUR).

運動負荷テストはMONARK製（Sweden）の自転車エルゴメータ「ERGOMEDIC 818E」を用いた。運動負荷テストでは、漸増負荷式のプロトコールを採用した。プロトコールは自転车上での3分間の安静休息後、30 Watts（0.5 kp×毎分60回転）で4分間のウォーミングアップ駆動後、1分間に30 Wattsずつ漸増し、被験者が疲労困憊に至った時点で運動を停止した。

### **(3) 呼気ガス分析**

呼気ガス分析には呼気ガス分析機「OXYCON-γ」（MIJNHARDT, Holland）を使用した。酸素および二酸化炭素濃度を漸増負荷運動中、連続的に計測した。分析器は測定開始前に標準ガスを使用してキャリブレーションした。

### **(4) 筋摘出の方法**

筋サンプル摘出は針生検法（Bergström 1962）に従い、整形外科医によって行った。対象は右脚外側広筋であり、膝関節上部約10 cm部分よりサンプルを採取した。摘出した筋サンプルは直ちに液体窒素で瞬間凍結され、分析が行われるまで -80℃下で保存された。

### **(5) 生化学的分析および組織化学的分析**

約10-20 mgの筋サンプルを氷冷したリン酸緩衝液内でホモジナイズした。そのホモジナイズ溶液内のMb濃度の測定試薬には血漿Mb濃度測定用キット（Mb-ラテックス「生研」, デンカ生研株式会社, 東京）を用いた。この方法の原理は、Mbの抗原抗体反応を用いたものである。抗Mb



抗体を吸着させたラテックス粒子と検体とを反応させると、検体中のMbとラテックス粒子に吸着した抗Mb抗体が抗原抗体反応を起こし、ラテックス粒子が凝集する。この凝集反応を572 nmの波長の吸光度変化として捉える。変化量は検体中のMb濃度に比例するので、濃度既知の標準検体を用いて検量線を作成し、検体中のMb濃度を求めることができる。測定機器は、Biochemical Analyzer TBA-30R (TOSHIBA, 日本) を使用した。

ミトコンドリアの酵素の代表としてTCA回路の律速酵素であるCSを選択し、その活性値を測定した。CS活性の測定にはSrere (1969) の生化学的手法を用いた。

筋線維タイプの同定にはBrookeとKaiser (1970) のactomyosin ATPase染色 (pre-incubation pH 4.6, 10.3) を行い、Type I 線維、Type IIa 線維、Type IIb 線維を同定した。

## (6) 統計処理

統計量は平均値±標準偏差で示した。パラメータ間の相関関係を検討するためにピアソンの相関係数を求めた。グループ間の比較には一元配置の分散分析を行い、分散に有意差が認められた場合に Scheffé の post-hoc testを行った。有意水準を5%未満に設定した。

## 3. 結果

$\dot{V}O_{2max}$ に関してはENDUR群が最も高く、non-Active群が最も低い値であった (表IV-1)。また、SPRINT群とActive群の $\dot{V}O_{2max}$ との間には有意差は認められなかった (表IV-1)。筋線維組成はENDUR群において、Type I 線維の割合が他の群と比較して高い傾向を示した。他の筋線維タ

タイプの比率にはグループ間の有意差は認められなかった（表Ⅳ-1）。

各グループにおけるMb濃度（ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  wet tissue）は、non-Active群（ $4.19\pm0.34$ ）、Active群（ $4.59\pm0.44$ ）、SPRINT群（ $4.53\pm0.47$ ）、ENDUR群（ $4.99\pm0.54$ ）となり、non-Active群とENDUR群の間のみで有意差が認められた（ $P<0.05$ , 図Ⅳ-1）。一方、CS活性はENDUR群とSPRINT群の間を除くグループ間に有意差が認められた（ $P<0.01-0.05$ , 図Ⅳ-1）。

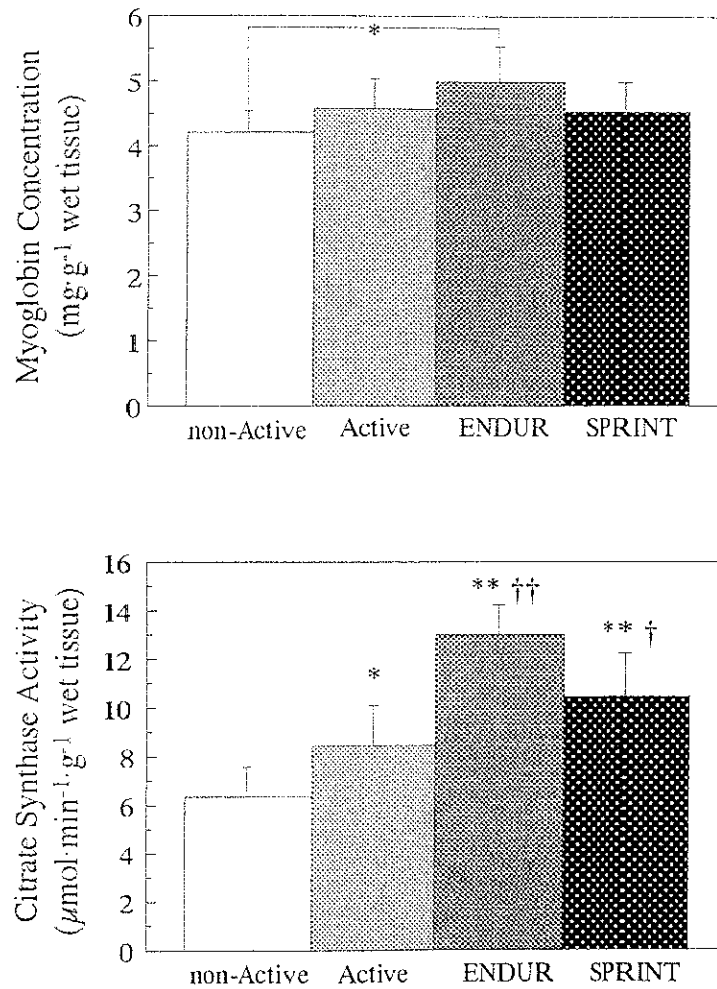
Mb濃度、 $\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ 、CS活性の間の相関関係を図Ⅳ-2に示した。Mb濃度と $\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ との間（ $r=0.451$ ,  $p<0.01$ ）、Mb濃度とCS活性との間（ $r=0.441$ ,  $p<0.01$ ）に有意な相関関係が認められた。また、 $\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ とCS活性との間にも有意な相関関係が認められた（ $r=0.831$ ,  $p<0.01$ ）。

$\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ を基準に被験者を4つのランク（ $\sim 40$ 、 $40\sim 50$ 、 $50\sim 60$ 、 $60\sim \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ ）に分類し、Mb濃度とCS活性の比較を行った（図Ⅳ-3）。Mb濃度については、 $\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ が $\sim 40$ 群と $60\sim$ 群との間に有意差が認められた（ $P<0.05$ ）。CS活性においては、 $\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ の高い群ほど、CS活性が高い傾向を示し、 $\sim 40$ 群と $40\sim 50$ 群の間を除く群間において有意差が認められた（ $P<0.01-0.05$ ）。

Mb濃度と筋線維組成（%Type I 線維）ならびにCS活性と%Type I 線維との間にそれぞれ、 $r=0.422$ （ $p<0.01$ , %Type I 線維 = Mb濃度  $\times 7.921 + 2.506$ ）、 $r=0.359$ （ $p<0.05$ , %Type I 線維 = CS活性  $\times 1.274 + 26.961$ ）の有意な相関関係が認められた。

#### 4. 考察

持久性トレーニングによってラットの骨格筋Mb濃度の上昇が確認され



**Figure IV-1.** Companions of myoglobin concentration, citrate synthase activity and peak oxygen uptake between the groups. A significant difference of myoglobin concentration is observed between non-Active and ENDUR ( $P < 0.05$ ). Significant differences are observed except between ENDUR and SPRINT in citrate synthase activity (\*:  $P < 0.05$  vs non-Active, \*\*:  $P < 0.01$  vs non-Active, †:  $P < 0.05$  vs Active, ††:  $P < 0.01$  vs Active). Values are means  $\pm$  SD.

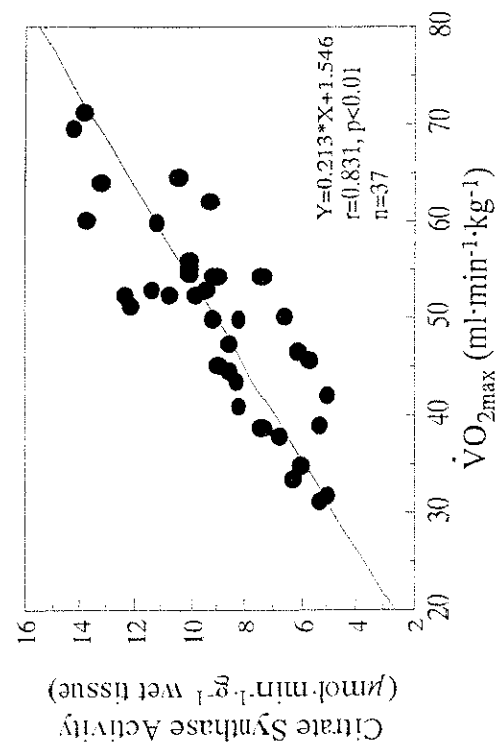
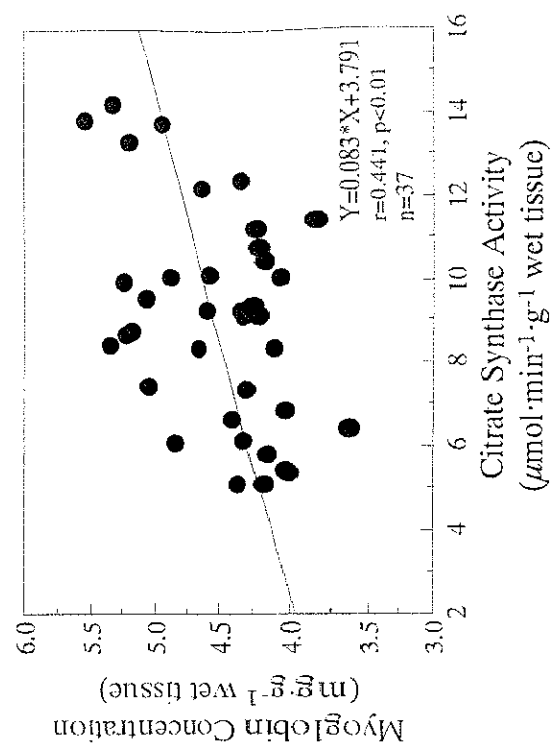
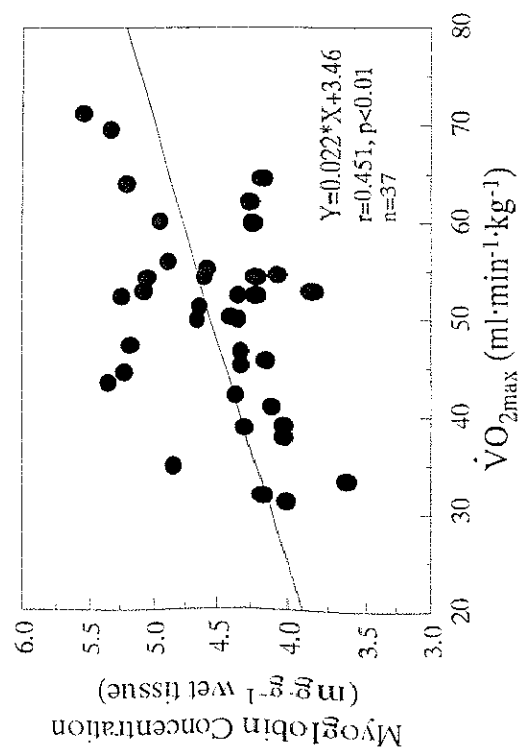
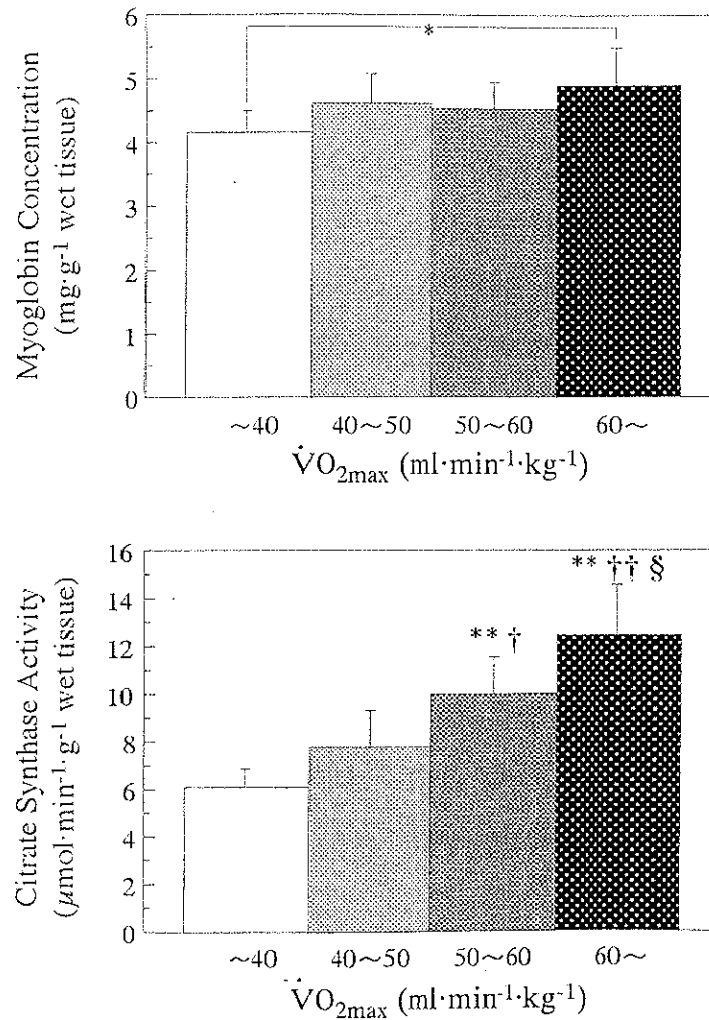


Figure IV -2. Relationships between myoglobin concentration, citrate synthase activity and maximal oxygen uptake.



**Figure IV-3.** Comparisons of myoglobin concentration, citrate synthase activity according to the level of maximal oxygen uptake. A significant difference of myoglobin concentration is observed between ~40 and 60~ (\*:  $P < 0.05$ ). Significant differences are observed except between ~40 and 40~50 in citrate synthase activity (\*\*:  $P < 0.01$  vs ~40, †:  $P < 0.05$  vs 40~50, ††:  $P < 0.01$  vs 40~50, §:  $P < 0.05$  vs 50~60). Values are means  $\pm$  SD.

ている (Beyer & Fattore 1984, Harms & Hickson 1983, Hickson 1981)。しかしながら、ヒトの骨格筋に関して、高度にトレーニングされたヒトのMb濃度が、そうでないヒトと比較して高いという報告はこれまでなかった (Jansson & Sylvén 1981, Jansson et al. 1982, 1983, Sylvén et al. 1984)。そこで本実験では、専門的なトレーニングを重ねている長距離系競技選手と短距離系選手および一般成人を対象に、外側広筋のMb濃度の比較検討およびMb濃度と有酸素性作業能力との関係を横断的に検討した。その結果、 $\dot{V}O_{2\max}$ に代表されるトレーニングレベルが高い者ほど、高いMb濃度レベルを有するという相関関係を得た (図IV-2)。さらにMb濃度は、ミトコンドリアのTCA回路の律速酵素であるCS活性と有意な正の相関関係を示した (図IV-2)。Mb濃度と $\dot{V}O_{2\max}$ の正の相関関係が得られる一方で、 $\dot{V}O_{2\max}$ を基準にカテゴリー別に区分した結果、 $\dot{V}O_{2\max}$ の最も高い群 ( $60 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上) と最も低い群 ( $40 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 未満) との間に有意な差が認められた (図IV-3)。さらに、競技種目別のMb濃度の比較においては、長距離系の種目の選手と運動習慣のほとんどない一般成人との間に有意差が認められた (図IV-1)。これらの結果は、ヒトの骨格筋に関する初めての知見であり、Mbがヒトの有酸素的運動能力に関わっていることを示唆するものである。

先行研究の中で、本実験のようなMb濃度の横断的な比較検討を行ったものがいくつかある (Jansson & Sylvén 1981, Jansson et al. 1982, 1983, Sylvén et al. 1984)。それらの研究の中では、トレーニング状態の高い者のMb濃度は一般成人と比較して高くなかった。本実験の結果は、これらの先行研究の結果と異なっている。実験結果の相違は、本実験では、他の研究よりも多数の被験者を対象としたこと、また、その被験者のトレーニング状態 (有酸素的作業能力) の幅をできるだけ大きくするようにし

たことによるものと考えられる。ちなみにJanssonら（1982）の比較対象となった被験者の $\dot{V}O_{2\max}$ （平均体重によって相対値に換算すると）は、約40 ml $\cdot$ min $^{-1}\cdot$ kg $^{-1}$  vs 約58 ml $\cdot$ min $^{-1}\cdot$ kg $^{-1}$ であった。

Mb濃度の上昇を引き起こす因子には、筋活動による酸素需要の増大と、それに伴う筋細胞内の低酸素状態化（Reynafarje 1962, Wittenberg 1970）が考えられる。本実験の長距離選手の結果は、Mbの合成促進因子が筋活動による酸素需要である可能性を支持した。ただし、短距離選手において、CS活性がActive群やnon-Active群よりも高かったにも関わらず、Mb濃度のレベルには差が認められなかった。Mb-O<sub>2</sub>は運動開始十数秒で利用され、Mbの飽和度が低下する（Richardson et al. 1995）ことから、短距離走の場合でも細胞内の酸素が利用されていることは十分に考えられる。しかも、短距離走中のエネルギー産生は有酸素的代謝エネルギー産生量を超えるものである（Inbar et al. 1976）。そこで、短距離走中には筋が短時間の間に低酸素状態に追い込まれることが予想され、そのことがMbの合成刺激となりうると予想された。しかしながら本実験の結果は、短距離系の運動がもたらす筋の低酸素化はミトコンドリアの酸化能力を向上させるが、Mbの合成を促進させないことを示唆した。

Mb濃度と $\dot{V}O_{2\max}$ 、Mb濃度とCS活性の相関関係は、 $\dot{V}O_{2\max}$ とCS活性のものよりも弱かった。また、 $\dot{V}O_{2\max}$ のレベル別と競技別に比較したMb濃度の差は $\dot{V}O_{2\max}$ の最も高い持久性競技選手と $\dot{V}O_{2\max}$ の最も低い非鍛錬者との間のみであった。これとは対照的にCS活性は $\dot{V}O_{2\max}$ と密接な相関関係を示していた。持久性トレーニングによって全身あるいは筋の $\dot{V}O_{2\max}$ は上昇し（Saltin & Gollnick 1983）、またミトコンドリアの酵素活性は活動量に敏感に適応反応を示す（Saltin & Gollnick 1983）。すなわち、 $\dot{V}O_{2\max}$ やミトコンドリアは活動刺激に対して変化しやすいパラメー

タである。それ故に $\dot{V}O_{2max}$ とCS活性の間には密接な相関関係が得られたと考えられる。一方Mbに関しては、Mb濃度の範囲が $4\sim 5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ wet tissue}$ の範囲であり、CS活性に比べてグループ間、あるいは $\dot{V}O_{2max}$ レベルの比較において差が認められにくい傾向であった。ラットの様々な筋のMb濃度を調べたところ、有酸素的代謝能力に優れている筋のMb濃度はそうでない筋に比べて高く、そのような筋では約 $4\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ wet tissue}$ 前後のMb濃度であった（e.g. II章; 増田&勝田 1998）。したがって、ヒトの骨格筋には運動習慣のない者においても比較的高いレベルでMbが含まれていると考えられる。さらに本実験のMbのデータは、高度にトレーニングを行わない限り、Mb濃度が高くなる可能性を示唆している。Mb濃度とCS活性あるいは $\dot{V}O_{2max}$ との間の相関係数が低かったことは、Mb濃度が鍛錬度の違いによって変化しにくいもの（変化量が僅か）であるためと推測される。さらに、トレーニングによって向上する有酸素的作業能力はMbよりもミトコンドリアのATP生成能力の向上の方が密接に関与している可能性が高い。

筋線維組成との関連性では、Mb濃度と%Type I 線維との間に弱い相関関係が認められた。長距離系の選手の筋線維組成は遅筋線維優位の構成比であり、一方、短距離系の選手は速筋線維優位の構成比であることが知られている（Fox 1979）。本実験の結果もそのような筋線維タイプの構成比の特徴が観察された（表IV-1）。Mbは速筋線維よりも遅筋線維に多く分布していることから（Kunishige et al. 1996, Nemeth & Lowry 1984）、筋線維組成とMb濃度との有意な相関関係は、長距離系の選手が多くの遅筋線維を有していたためと考えられる。筋線維構成比は先天的に決定されているという認識があったが（Komi et al. 1977）、近年、ヒトの筋線維組成が持久性トレーニング（Howald et al. 1985, Simoneau et al. 1985）、



スプリントトレーニング (Allemeier et al. 1994)、筋力トレーニング (Adams et al. 1993, Staron et al. 1994) によって変化することが報告されている。したがって、長距離系の選手の高いMb濃度は、トレーニングに対する適応なのか、あるいは元々高い割合で遅筋線維を有していたためなのか、本実験の結果のみでは判断し難い。

本実験はあくまでも様々なトレーニング状態のヒトの骨格筋Mb濃度に関する横断的な比較である。本実験で得られた $\dot{V}O_{2max}$ が高い者ほどMb濃度が高いという結果が、トレーニングなどによる後天的な影響のためなのか、それとも先天的な要素の強い筋の収縮特性（遅筋型）のためなのかは結論できない。したがって今後、実際にヒトを対象にトレーニングを行い、その際のMb濃度の変化について検討する必要がある。

## 5. 要約

本実験は、有酸素的作業能力の異なる被験者を対象にし、骨格筋のMb濃度レベルと自転車運動中の $\dot{V}O_{2max}$ 、あるいはミトコンドリアの酸化能力との関係を明らかにすることを目的とし、以下の結果を得た。

- ① 持久性競技選手のMb濃度は、運動習慣のない一般成人のものよりも高い値であった。
- ② Mb濃度と自転車運動時の $\dot{V}O_{2max}$ 、およびCS活性との間に有意な相関関係が認められた。
- ③  $\dot{V}O_{2max}$ をランク別にカテゴリー分けした場合のMb濃度には、 $\dot{V}O_{2max}$ が最も高い群と最も低い群との間に有意差が認められた。
- ④  $\dot{V}O_{2max}$ は持久性競技選手 > 短距離選手 = 一般成人 > 運動習慣のない

一般成人の順に高値を示した。

- ⑤ CS活性は持久性競技選手>短距離選手>一般成人>運動習慣のない一般成人の順に高値を示した。また、CS活性は $\dot{V}O_2\max$ と有意な相関関係を示した。
- ⑥ 持久性競技選手の筋線維組成は他の群と比較してType I 線維の割合が高かった。

以上のことから、骨格筋のMb濃度のレベルはヒトにおいても有酸素的作業能力、ならびにミトコンドリアの酸化能力と関連性を持ち、Mbが骨格筋の有酸素的代謝能力を支える要因の1つである可能性が示唆された。

## V. 持久性トレーニングによる骨格筋ミオグロビン濃度の変化（実験2）

### 1. 目的

実験1において、ヒトの骨格筋においてもMb濃度と有酸素的代謝能力との間に相関関係が認められた。このことは、高度にトレーニングされたヒトにおいては高いMb濃度を有する可能性を示唆している。しかしながら、実験1で観察されたMb濃度の高いヒトがトレーニングによる後天的なものなのか、あるいは元々、筋の収縮特性が遅筋型であるためなのか不明である。持久性トレーニングを行った先行研究（Möller & Brandt 1982, Svendsen et al. 1983, Terrados et al. 1986）では、Mb濃度は変化していない。また、唯一、ヒトのトレーニング実験でMb濃度の上昇が観察された研究は、Terradosら（1990）の低圧環境下での持久性トレーニングである。ただし彼らの実験では、低圧下と常圧下のトレーニングにおいて運動強度（絶対値）が統一されていた点に注意する必要がある。低圧環境下では $\dot{V}O_{2\max}$ の低下が生じ、運動強度が常圧環境に比べて相対的に高くなる（浅野 1997）。すなわち、Terradosら（1990）が報告したMb濃度の上昇は、低圧環境によって相対的運動強度が高くなったためであり、低酸素環境のためではないかもしれない。そこで本実験では、日常定期的な運動を行っていない男性成人を対象に、8週間の持久性トレーニングによる骨格筋Mb濃度の変化を検討することを第一の目的とした。さらに、低圧環境と常圧環境での運動強度を相対的に同一にし、低酸素化環境がMb濃度を上昇させる因子となりうるのかについても検討した。

## 2. 方法

### (1) 被験者

被験者には日常定期的に運動を行っていない成人男性（14名）とした。被験者には、実験の主旨や測定項目、予想される結果について十分に説明を行い、実験参加の同意を得た。被験者を常圧環境下トレーニング群（Norm）と低圧環境下トレーニング群（Hypo）にランダムに分けた。両群の被験者の身体特性を表V-1に示した。

### (2) 運動負荷テスト

トレーニングに先立ち、運動負荷テストを行い、被験者の $\dot{V}O_{2\max}$ 、換気性閾値（VT）を評価した。運動負荷テストのプロトコルや使用機器は実験1と同様である。

### (3) 呼気ガス分析

呼気ガス分析には呼気ガス分析機「OXYCON- $\gamma$ 」（MIJNHARDT, Holland）を使用した。酸素および二酸化炭素濃度を漸増負荷運動中、連続的に計測した。分析器は測定開始前に標準ガスを使用してキャリブレーションした。

VTは、 $\dot{V}E$ 、 $\dot{V}E/\dot{V}O_2$ 、 $\dot{V}E/\dot{V}CO_2$ の換気パラメータを基に決定した（Davis et al. 1979, Wasserman et al. 1973）。ピースワイズ直線回帰分析によって換気パラメータのプロットを回帰し、換気パラメータの屈曲点を求めた（Vieth 1989）。

### (4) トレーニングプロトコル

**Table V -1.** Physical characteristics of the subjects and expired gas parameters in each group.

			Age	Height	Weight	%fat
n			(years)	(cm)	(kg)	(%)
Norm	7	<i>pre</i>	20.3±1.1	168.0±6.9	58.0±3.8	16.8±2.6
		<i>post</i>	–	–	57.6±4.8 (-0.7%)	15.8±2.1 (-6.0%)
Hypo	7	<i>pre</i>	19.9±1.1	169.9±5.5	59.6±7.3	16.8±5.1
		<i>post</i>	–	–	59.0±7.0 (-1.0%)	15.3±5.0 (-8.9%)

Norm: training group under normobaric condition, Hypo: training group under hypobaric condition. All data are means±SD.

トレーニング環境は常圧環境と低圧環境の2つを設定した。常圧環境は通常の室内で行うものとした。一方、低圧環境は、Terradosら（1990）の報告を参考にして、低圧シミュレータ内で標高2500 m（560 torr）に相当する高所環境をシミュレートした。両トレーニング群ともに、全8週間、週3~4回（計28回）の自転車トレーニングを行った。1回のトレーニング時間は1時間とした。運動強度は運動負荷テストで得られた $\dot{V}O_{2\max}$ を基準（Hypo群は低圧室で得られた $\dot{V}O_{2\max}$ を基準）に、第1週目を60% $\dot{V}O_{2\max}$ 、2週目以降を70% $\dot{V}O_{2\max}$ とした。

#### (5) 生化学的分析および組織化学的分析

Mb濃度とCS活性の測定および筋線維タイプの同定には、実験1と同様の手法を用いた。また、Amylase-PAS染色（Andersen 1975）によって毛細血管を同定し、その数と筋線維数の比（capillary to fibre ratio: C/F ratio）を算出した。

#### (6) 統計処理

統計量は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。グループ間の比較には、対応なしのStudent t-testを行い、また、トレーニング前後の比較には対応ありのStudent t-testを行った。有意水準を5%未満に設定した。

### 3. 結果

表V-2にはトレーニング前後に行った運動負荷テストにおいて得られた $\dot{V}O_{2\max}$ とVTを、絶対値、相対値（体重比、除脂肪体重比）で表した。8週間のトレーニングによって両群の $\dot{V}O_{2\max}$ やVTは上昇したが、それぞれの上昇率にはトレーニング環境の違いは認められなかった（表V-2）。

**Table V -2.** Maximal oxygen uptake and ventilatory threshold during the cycling exercise test in each group.

n	$\dot{V}O_{2max}$ (ml·min <sup>-1</sup> )	$\dot{V}O_{2max}/W$ (ml·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	$\dot{V}O_{2max}/LBM$ (ml·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	$\dot{V}O_2@VT$ (ml·min <sup>-1</sup> )	$\dot{V}O_2@VT/W$ (ml·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	$\dot{V}O_2@VT/LBM$ (ml·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	% $\dot{V}O_2@VT$ (%)
Norm 7 <i>pre</i>	2572.3±487.4	44.7±9.7	53.7±11.8	1625.9±300.5	28.2±5.9	34.0±7.2	60.4±6.4
7 <i>post</i>	2986.0±413.5*	52.1±7.8**	61.8±8.6*	1938.6±242.9**	33.8±4.6**	40.1±5.1*	65.2±5.5
	(+16.1%)	(+16.6%)	(+15.1%)	(+19.2%)	(+19.9%)	(+17.9%)	(+7.9%)
Hypo 7 <i>pre</i>	2672.9±398.7	45.3±7.8	54.3±7.6	1623.3±327.2	27.4±5.8	33.0±6.5	60.4±6.4
7 <i>post</i>	2986.3±366.6*	50.9±5.8**	60.0±5.3*	1997.6±310.0*	33.9±4.2*	40.1±5.0*	66.8±6.1*
	(+11.7%)	(+12.4%)	(+10.5%)	(+23.1%)	(+23.7%)	(+21.5%)	(+10.6%)

Norm: training group under normobaric condition, Hypo: training group under hypobaric condition

$\dot{V}O_{2max}$ : maximal oxygen consumption during cycling exercise, W: body weight, LBM: lean body mass, VT: ventilatory threshold.

Asterisks represent significant differences from the pre values (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01).

All data are means±SD.

表V-3には、筋線維組成の変化について示した。両群の筋線維組成は持久性トレーニングによって、%Type IIb線維が減少し、%Type IIa線維が増加する傾向にあったが、統計的に有意な変化ではなかった。

図V-1には、Mb濃度、C/F ratio、CS活性の変化について示した。C/F ratioやCS活性は両群において、同程度にトレーニングによって有意に上昇したにも関わらず、Mb濃度には有意な変化が認められなかった（<Mb濃度> Norm: +4.4%, Hypo: +5.8%, <CS活性> Norm: +24.4%, Hypo: +32.9%, <C/F ratio> Norm: +45.5%, Hypo: +32.7%, 図V-1）。

#### 4. 考察

本実験では、実験1で得られたMb濃度と有酸素性代謝能力との関係がトレーニングによって生じるのかを明らかにするために、日常運動習慣のない成人男性を対象に8週間の持久性トレーニングを行った。さらに低酸素環境がMbの合成を亢進させる（Reynafarje 1962, Terrados et al. 1990, Wittenberg 1970）ことが示唆されていることから、2500 m相当の低圧環境の影響についても検討を加えた。

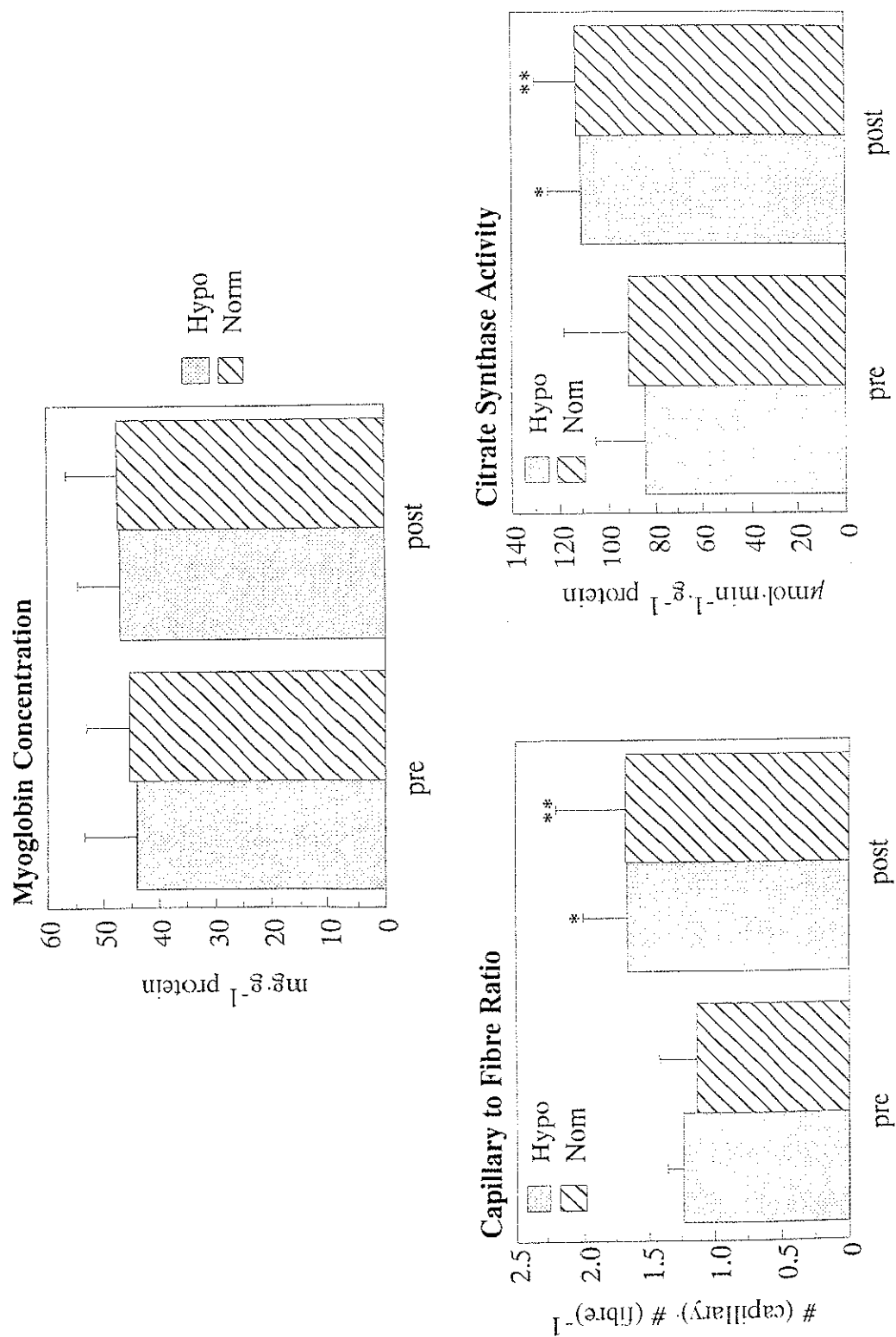
トレーニング実験を行った先行研究では、常圧環境下においてMb濃度は変化していない（Svedenhag et al. 1983, Terrados et al. 1986）。これは、被験者のトレーニング状態が高いヒトを対象にトレーニングを負荷したため、その効果が現れにくいのではと考えられた（Terrados et al. 1986）。そこで、本実験では日頃運動習慣のない成人男性を対象にトレーニングを実施した。しかしながら、8週間のトレーニングによってCS活性や毛細血管数の増加が認められたにも関わらず、Mbに対する効果は得られなかった（図V-1）。したがって、持久性トレーニングによってMb濃度が



**Table V -3.** Muscle fibre compositions before and after the endurance training.

			% muscle fibre compositions (%)		
	n		Type I	Type IIa	Type IIb
Norm	7	<i>pre</i>	41.3±11.4	40.7±8.9	18.0±8.5
		<i>post</i>	39.3±10.1	44.4±11.8	16.3±4.9
			(-4.8%)	(+9.1%)	(-9.4%)
Hypo	7	<i>pre</i>	37.7±4.2	43.1±6.9	19.2±9.0
		<i>post</i>	35.9±7.4	50.0±9.9	14.1±5.5
			(-4.8%)	(+16.0%)	(-26.6%)

Norm: training group under normobaric condition, Hypo: training group under hypobaric condition. All data are means±SD.



**Figure V -1.** Changes in myoglobin concentration, capillary to fibre ratio and citrate synthase activity induced by the 8-week endurance training.

Norm: normobaric condition, Hypo: hypobaric condition. An asterisk represents a significant difference from pre value in each group (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ). Values are mean  $\pm$  SD.

変化しなかった別の理由を考察しなくてはならない。

運動中にMbと結合している酸素の利用の様子が<sup>1</sup>H-NMRで観察することができる (Jue 1994)。かつて*in situ* のイヌの薄筋において運動強度の上昇に伴ってMbの飽和度の低下が観察されたように (Honig et al. 1991)、ヒトの*in vivo* においても<sup>1</sup>H-NMRのDeoxy-Mbシグナル強度が高くなることが確認されている (Richardson et al. 1995)。このMbの脱酸素化は、運動によってミトコンドリアでの酸素利用が亢進したためと思われるが、Mbが脱酸素化する生理的意義は少なくとも2点考えられる。1点目は、Mbが脱酸素化することによって筋細胞内の $P_{O_2}$ が非常に低くなることである (e.g. Mbの酸素解離曲線, Theorell 1934)。このことによって、毛細血管と筋細胞内の間に $P_{O_2}$ の勾配が生じ、筋細胞内への酸素の拡散流入が促進される (Braulín et al. 1986, Wittenberg & Wittenberg 1975)。2点目は、Mbと結合して拡散する酸素の流量 (Mbの促進拡散) を増やすことである (Honig et al. 1991)。したがって、本実験の70% $\dot{V}O_{2max}$ 相当の自転車運動時でもDeoxy-Mbが存在し、Mbが先に述べた2つの生理的役割を行っていたことは十分に考えられる。

生体は活動刺激に対する補償作用として適応を生じさせる。8週間のトレーニングによってMb濃度に変化が生じなかったことは、前段で述べたMbによる酸素流量が設定運動条件 (強度: 70% $\dot{V}O_{2max}$ , 運動時間: 1時間) を行うことの限定要因ではなかったと考えられる。そのことが結果的に、Mbが持続的パフォーマンス改善に対して貢献しなかったことを示唆している。Wagner (1988) は、 $\dot{V}O_2$ を $\dot{V}O_2 = DO_2 \times k \times P_{capO_2}$  (Fickの拡散法則;  $DO_2$ : 酸素拡散能力,  $k$ : 定数,  $P_{capO_2}$ : 毛細血管での平均 $P_{O_2}$ ) と表したときの $DO_2$ の重要性を示唆し、Rocaら (1992) は $\dot{V}O_{2max}$ の上昇には $DO_2$ の上昇が関与していることを報告した。 $DO_2$ はHbに関連する要因

(Ht、赤血球の移動速度、Hb-O<sub>2</sub>の酸素解離速度など)によって影響を受けるが、その他にも毛細血管数や拡散距離、Mbの存在によって影響される(Kurdak et al. 1995)。このことをふまえながら、毛細血管数やCS活性の上昇(図V-1)が生じたことを考えると、本実験の被験者では毛細血管数の新生による酸素運搬(血流量)の増大によってDO<sub>2</sub>が増大し、さらにミトコンドリアでのATP合成能力の向上によって $\dot{V}O_{2\max}$ が改善された可能性が高い。

筋細胞内の低酸素化と継続的なトレーニングはMbの合成を亢進させることが示唆されている(Terrados et al. 1990)。本実験では、低圧環境の影響をより明らかにしたいという意図の下、低圧環境と常圧環境で行うトレーニング強度を相対的に統一した。しかしながら、低圧環境でのトレーニングにおいてもMb濃度は変化しなかった(図V-1)。さらに他のパラメータ( $\dot{V}O_{2\max}$ , VT, C/F ratio, CS活性)にも環境の違いは認められなかった(表V-2, 図V-1)。このことは、2500 m相当の低圧環境がもたらす組織の低酸素化はMb、あるいはその他のパラメータに対して影響を及ぼすものではなかったと考えられる。Terradosら(1990)は2300 m相当の低圧環境下でトレーニングさせるとMb濃度が上昇したことを認めたが、彼らが行ったトレーニングは異なる環境下において運動負荷が固定されており、常圧環境で測定した最大運動強度を基準にしていた。低圧環境下では持続的な運動パフォーマンス( $\dot{V}O_{2\max}$ )が低下する(浅野1997)ことを考えると、Terradosら(1990)の研究結果は低圧環境によって相対的運動強度が高くなっていたためであり、低圧環境がもたらす組織の低酸素化が原因ではないと考えられる。もし、本実験とTerradosら(1990)の相違が生体負荷の違いによるものだとするならば、Mb濃度の変化を引き起こすようなトレーニング条件に関して再検討する必要がある。

ある。本実験の結果は、Terradosの結果を一部否定し、相対的運動強度を常圧と低圧環境で統一することによって、2500 m相当の低圧環境はMbには影響を与えない可能性を示唆した。

## 5. 要約

本実験では日常定期的な運動を行っていない男性成人を対象に、8週間の持久性トレーニングによる骨格筋Mb濃度の変化を観察し、さらに、低酸素化環境がMb濃度を上昇させる因子となりうるのかについて検討した。その結果、以下のような知見を得た。

- ① 自転車運動時の $\dot{V}O_2\text{max}$ （絶対値、相対値）は常圧・低圧の持久性トレーニングによって有意に上昇した。
- ② Mb濃度は持久性トレーニングによって有意に変化しなかった。
- ③ CS活性と毛細血管数（C/F ratio）は持久性トレーニングによって有意に増加した。
- ④ 筋線維組成は有意に変化しなかった。
- ⑤ いずれの測定項目においても、トレーニング環境の違いは適応（変化率）に影響しなかった。

以上のことから、70% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の持久性トレーニングによって全身的な有酸素性作業能力が向上するものの、Mb濃度は上昇しにくいことが明らかとなった。また、常圧環境と相対運動強度を等しくした場合、2500 m相当の低圧環境はMb濃度の上昇を引き起こすほどの低酸素刺激ではなかったことが示唆された。

## VI. 持久性トレーニングによるラットの骨格筋ミオグロビン濃度の変化－強度・時間・期間の影響－（実験3）

### 1. 目的

実験2において、持久性トレーニングによってMb濃度が変化しなかったことが、トレーニングの条件設定のためであった可能性が考えらる。骨格筋の動員様式は運動の条件によって変化するために（Hodgson 1983, Hutchinson et al. 1989, Jasmin & Gardiner 1987, Pierotti et al. 1989, Roy et al. 1991b, 征矢ら 1998）、骨格筋は異なる適応を生じさせることが知られており（Saltin & Gollnick 1983）、有酸素的代謝能力の変化も例外ではない。

例えば、Dudleyら（1982）は、持久的運動の強度と運動時間を変えた数種類の運動プロトコルをラットに負荷し、様々な筋のミトコンドリアの酸化系酵素活性について検討した。その結果、ミトコンドリアの酸化系酵素活性の変化は、その運動中の筋の動員様式と密接に関係していることを示唆した。このことから、Mbの適応も運動強度や運動時間などの運動条件によって異なると考えられる。これまでに持久性トレーニングによる骨格筋Mb濃度の上昇が報告されているものの（Beyer & Fattore 1984, Harms & Hickson 1983, Hickson 1981, 中谷 1988）、運動条件の違いによるMbの適応を詳細に検討したものはない。そこで、運動条件の違いからMb濃度の適応について詳細に検討することは、持久性トレーニングによる骨格筋内の酸素運搬や貯蔵能力の変化を把握するためにも重要であると思われる。

そこで本研究では、持久性トレーニングがラットの下肢筋群（ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋）のMb濃度に与える影響について①運動強度、②運

動時間の条件を変えて検討し、さらに、上記の結果をふまえて、③トレーニングによって引き起こされるMb濃度の経時的変化についても検討を加えた。また、筋の有酸素的代謝能力の指標の一つとして、ミトコンドリアの酸化系酵素活性の変化についても測定し、Mb濃度の変化との比較検討を行った。

## 2. 方法

### (1) 被験動物およびトレーニングプログラム

被験動物には3週齢のウイスター系雄性ラット105匹を用いた。ラットは $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ で12時間の明暗サイクルに管理されている飼育室において、1ケージ3-4匹ずつ飼育した。飼料（動物実験用標準固形飼料MF, オリエンタル酵母工業, 日本）と水はそれぞれ自由摂取させた。走行トレーニングには小動物用トレッドミル（KN-73, 夏目製作所, 日本）を用いた。表VI-1にラットのグルーピングおよび形態特性としてそれらの平均体重とヒラメ筋、足底筋、腓腹筋の平均筋重量を示した。

トレーニング群のラットは4週齢時に予備トレーニングを開始した。規定の運動時間・運動強度のランニングが行えるように週に5回の頻度で3週間かけて速度と運動時間を漸増した。3週間の予備トレーニング後は、規定の運動プログラムを週5回の頻度で9週間行った（図VI-1参照）。

#### 運動強度について

運動強度は20, 30, 40  $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ の3つを設定した。一回の運動時間は60分間であった。これらのトレーニングを行うラットの平均体重と筋重量を表VI-1に示した（T20/60-9・T30/60-9・T40/60-9; 図VI-1-A）。

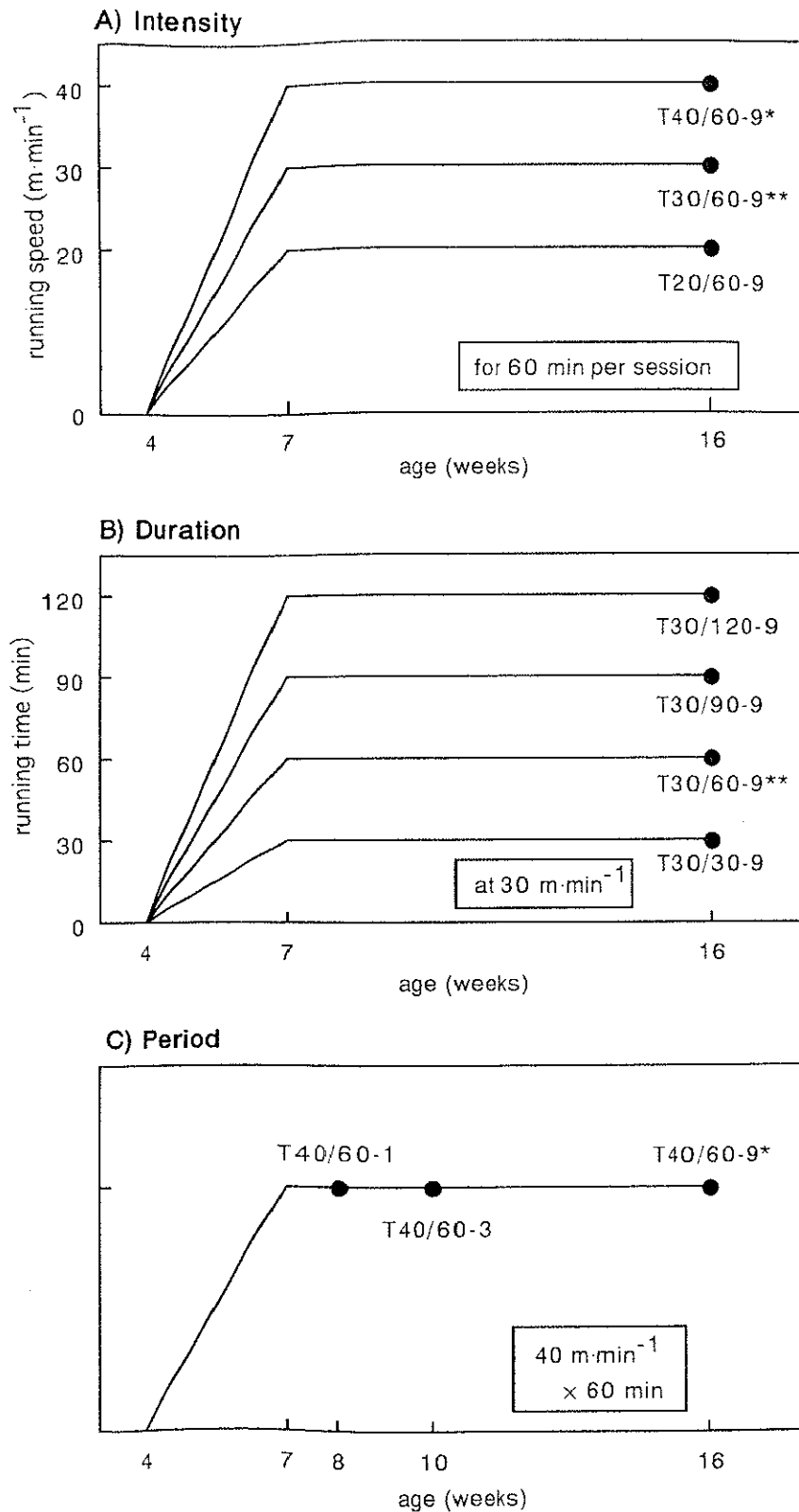
**Table VI-1.** Grouping of the rats and their mean body mass and muscle mass.

groups	n	age (weeks)	intensity (m·min <sup>-1</sup> )	duration (min)	body mass (g)	muscle wet weight (mg)		
						m. soleus	m. plantaris	m. gastrocnemius
Cont-7	10	7	0	0	226.0±10.7	80.6±10.4	141.2±17.7	1034.9±69.5
Cont-8	10	8	0	0	290.2±13.6	114.2±6.4	237.6±28.1	1282.8±90.3
Cont-10	10	10	0	0	366.6±18.1	133.1±8.9	312.1±24.6	1599.9±59.1
Cont-16	10	16	0	0	466.8±26.3	175.3±18.9	354.0±49.0	1905.0±93.4
T20/60-9	10	16	20	60	402.7±23.1	177.2±18.1	328.0±29.1	2003.1±92.8
T30/30-9	7	16	30	30	392.4±25.8	171.4±5.1	352.8±31.4	1861.0±93.9
T30/60-9	7	16	30	60	396.9±20.8	178.5±9.4	353.6±26.3	1896.2±66.0
T30/90-9	7	16	30	90	389.6±12.3	176.6±7.4	347.0±13.8	1852.0±87.0
T30/120-9	7	16	30	120	386.0±19.2	174.2±7.9	361.8±21.6	1882.5±96.2
T40/60-1	9	8	40	60	247.6±13.9	98.8±11.7	225.5±17.4	1234.7±57.2
T40/60-3	9	10	40	60	299.4±15.6	113.7±10.6	274.3±22.7	1632.2±53.4
T40/60-9	9	16	40	60	398.4±17.9	178.4±23.0	384.4±24.0	2036.6±83.6

Values are means±SD.

Cont: control rats, T: training rats. The training rats were named "intensity / duration - training period".





**Figure VI-1.** Schematic illustration of the protocols of rat endurance training. A protocol for a study about training intensity; A, about training duration; B, and about training period; C. All training rats started the 3-week pre-training session at 4 weeks of age toward the target speed and duration. All trainings were carried at 5 times per week. An asterisk represents duplicated group between two studies. The training rats were named "intensity / duration - training period".

注) 表記: 例: T20/60-9, T: トレーニング群, 20: 運動強度, 60: 運動時間, 9: トレーニング期間

#### 運動時間について

運動時間の影響を検討するために、一回の運動時間を30分、60分、90分、120分の4種類で行うトレーニング群を設けた。運動強度は $30 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ であった。ラットの平均体重と筋重量を表VI-1に示した (T30/30-9・T30/60-9・T30/90-9・T30/120-9, 図VI-1-B)。

#### 経時的変化について

運動強度は $40 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ であり、運動時間は60分でトレーニングする群を対象に経時的変化を検討した。本トレーニング開始1週間後、3週間後、9週間後に筋を摘出し、分析を行った (T40/60-1・T40/60-3・T40/60-9, 図VI-1-C)。

## (2) 生化学的分析

トレーニング期間終了翌日、麻酔下でラットのヒラメ筋、足底筋、腓腹筋を摘出した。摘出した筋サンプルは、液体窒素にて直ちに瞬間凍結し、分析が行われるまで  $-80^{\circ}\text{C}$  下で保存した。なお、腓腹筋の分析には腓腹筋外側頭を用いた。Mb濃度の測定にはReynafarje (1963) の生化学的手法を用いた。サンプルをCOで飽和させたリン酸緩衝液 (0.04 M, pH 6.6) 内で混和した後、 $15000 \text{ g}$  で遠心分離した。遠心分離によって得られた上清の吸光度を538 nmと568 nmの波長で測定し、それらの吸光度の差よりMb濃度を算出した。

ミトコンドリアの酸化系酵素では、CS活性値を測定した。CS活性の

測定にはSrere (1969) の生化学的手法を用いた。

### (3) 統計処理

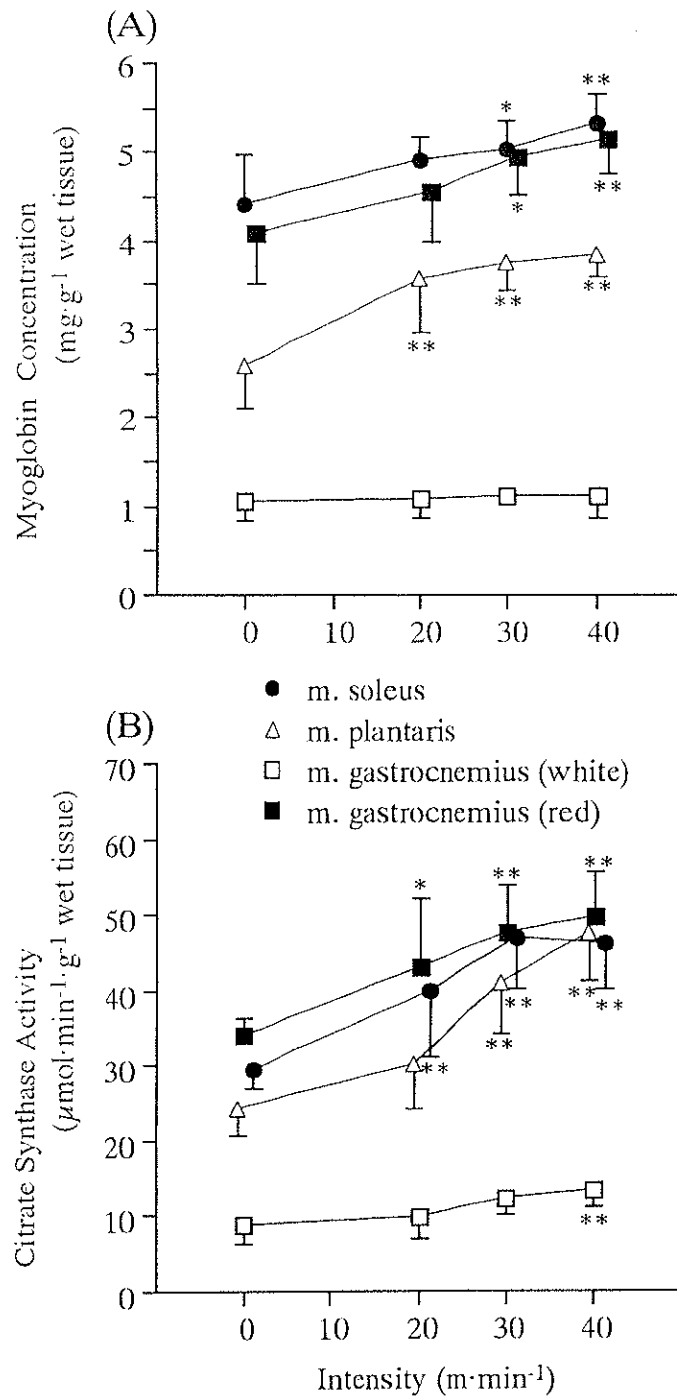
統計量は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。運動強度と運動時間の検討に際し、グループ間の比較には筋別により一元配置の分散分析を行い、分散に有意差が認められた場合にはpost-hoc testとしてShefféの有意差検定を行った。また、経時的变化を検討するに当たり、コントロール群のラインとトレーニング群のラインの比較および時間毎の比較には二元配置の分散分析を行い、分散に有意差が認められた場合にはpost-hoc testとしてShefféの有意差検定を行った。有意水準を危険率5%未満に設定した。

## 3. 結果

各群の平均体重(g)とヒラメ筋、足底筋、腓腹筋の平均筋重量(mg)を表VI-1に示した。トレーニング群のラットの体重がコントロール群のラットのものよりも低い傾向にあった。また、筋重量については、同一週齢のグループ間に統計的な有意差は認められなかった。

### 運動強度について

異なる運動強度のトレーニングによるMb濃度の変化を図VI-2-Aに示した。ヒラメ筋のMb濃度は、強度依存的に上昇する傾向が見られたが、統計的に有意が認められたのは $30 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  (+14.0%;  $P<0.05$ ) と  $40 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  (+20.5%;  $P<0.01$ ) でトレーニングした場合であった。足底筋のMb濃度については、 $20 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ の低強度トレーニングによって約38.3%の有意な上昇を示し、さらに $30 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ のトレーニングでは45.7%、 $40 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ では



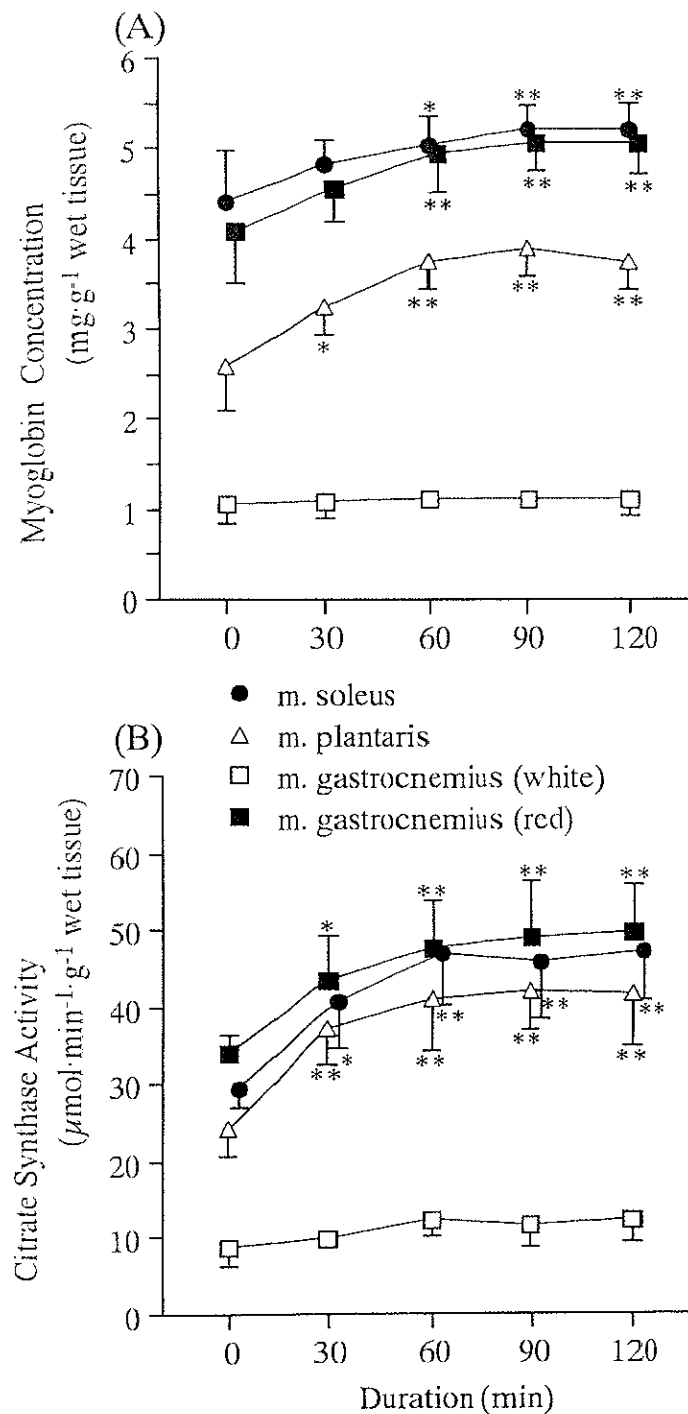
**Figure VI-2.** Changes in myoglobin concentration (A) and citrate synthase activity (B) according to the training intensity. The training rats were trained for 60 min of duration at three different intensities. Zero of intensity corresponds to the control group. ●: m. soleus, △: m. plantaris, ■: m. gastrocnemius (red portion), □: m. gastrocnemius (white portion). Values are mean±SD. An asterisk represents a significant difference of training rat from age-matched control (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ ).

48.3%の高値を示した（全て $P<0.01$ ）。しかし、足底筋の強度の上昇に伴うMb濃度の上昇は直線的ではなく、高強度トレーニングでは、適応が頭打ちになる傾向を示した。腓腹筋の深層部のMb濃度は強度の上昇に伴って上昇し、その程度は $20\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ によって11.7%、 $30\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ によって21.0%（ $P<0.05$ ）、 $40\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ によって26.9%（ $P<0.01$ ）であった。一方、腓腹筋表層部のMb濃度はどの運動強度でトレーニングしてもほとんど変化が認められなかった。

異なる運動強度のトレーニングによるCS活性の変化を図VI-2-Bに示した。ヒラメ筋のCS活性は、 $20\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ のトレーニング群において35.5%（ $P<0.01$ ）、 $30\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ では58.7%（ $P<0.01$ ）、 $40\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ では56.2%（ $P<0.01$ ）の高値を示した。足底筋のCS活性については、 $30\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ と $40\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ でトレーニングした群においてそれぞれ68.6%（ $P<0.01$ ）、95.2%（ $P<0.01$ ）の有意な高値が認められた。腓腹筋の深層部のCS活性は強度依存的に上昇し、その程度は $20\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ によって27.2%（ $P<0.05$ ）、 $30\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ によって40.8%（ $P<0.01$ ）、 $40\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ によって46.0%（ $P<0.01$ ）であった。一方、腓腹筋表層部のCS活性は $40\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ の運動強度でトレーニングした群のみで50.9%の有意な高値が認められた（ $P<0.05$ ）。

#### 運動時間について

運動時間の違いによるMb濃度の変化を図VI-3-Aに示した。運動時間が長くなることによってMb濃度も高くなる傾向が、腓腹筋表層部を除く筋で認められた。ヒラメ筋のMb濃度は30分間、60分間、90分間、120分間のトレーニングによって、それぞれ9.2%、14.0%（ $P<0.05$ ）、17.9%（ $P<0.01$ ）、17.9%（ $P<0.01$ ）の上昇を示した。足底筋のMb濃度は30分間、60分間、90分間、120分間のトレーニングによって、それぞれ25.3%



**Figure VI-3.** Changes in myoglobin concentration (A) and citrate synthase activity (B) according to the exercise duration. The training rats were trained at 30 m·min<sup>-1</sup> of intensity for four different durations. Zero of duration corresponds to the control group. ●: m. soleus, △: m. plantaris, ■: m. gastrocnemius (red portion), □: m. gastrocnemius (white portion). Values are mean±SD. An asterisk represents a significant difference of training rat from age-matched control (\*: P<0.05, \*\*: P<0.01).

( $P<0.05$ )、45.7% ( $P<0.01$ )、51.7% ( $P<0.01$ )、45.8% ( $P<0.01$ ) の上昇を示した。腓腹筋深層部のMb濃度は30分間、60分間、90分間、120分間のトレーニングによって、それぞれ11.6%、21.0% ( $P<0.01$ )、24.4% ( $P<0.01$ )、24.1% ( $P<0.01$ ) と上昇した。腓腹筋表層部のMb濃度は運動時間の変化によって有意な変化を示さなかった。

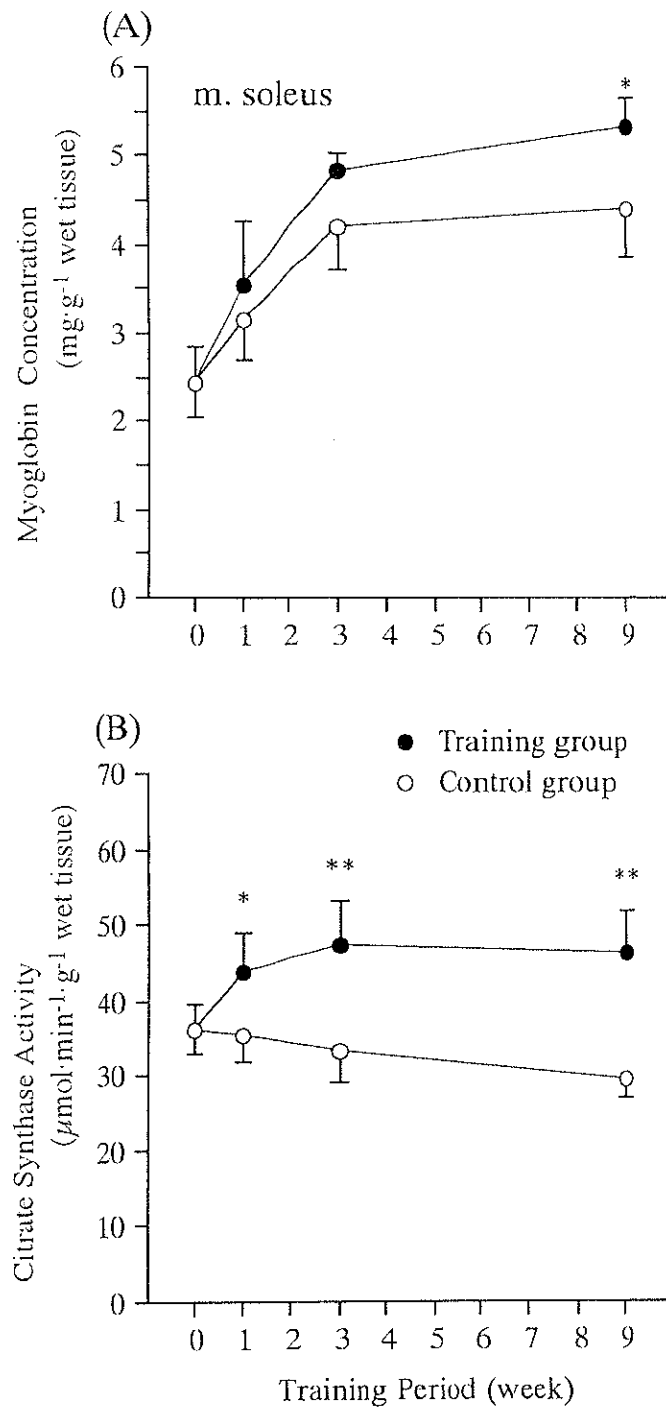
運動時間の違いによるCS活性の変化を図VI-3-Bに示した。運動時間が長くなることによってCS活性も高くなる傾向が、Mbと同様に腓腹筋表層部を除く筋で認められた。ヒラメ筋のCS活性は30分、60分、90分、120分のトレーニングによって、それぞれ37.8% ( $P<0.05$ )、58.7% ( $P<0.01$ )、55.2% ( $P<0.01$ )、60.2% ( $P<0.01$ ) の上昇を示した。足底筋のCS活性は30分、60分、90分、120分のトレーニングによって、52.4%、68.6%、72.7%、71.7%上昇した(全て $P<0.01$ )。腓腹筋深層部のCS活性は30分、60分、90分、120分のトレーニングによって、28.3% ( $P<0.05$ )、40.8% ( $P<0.01$ )、44.6% ( $P<0.01$ )、46.6% ( $P<0.01$ ) 上昇した。

#### 経時的変化について

トレーニング開始からの経時的な変化を図VI-4-A-図VI-6-Aに示した。ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋(深層のみ)ともにトレーニングが進むにつれMb濃度が徐々に上昇した。

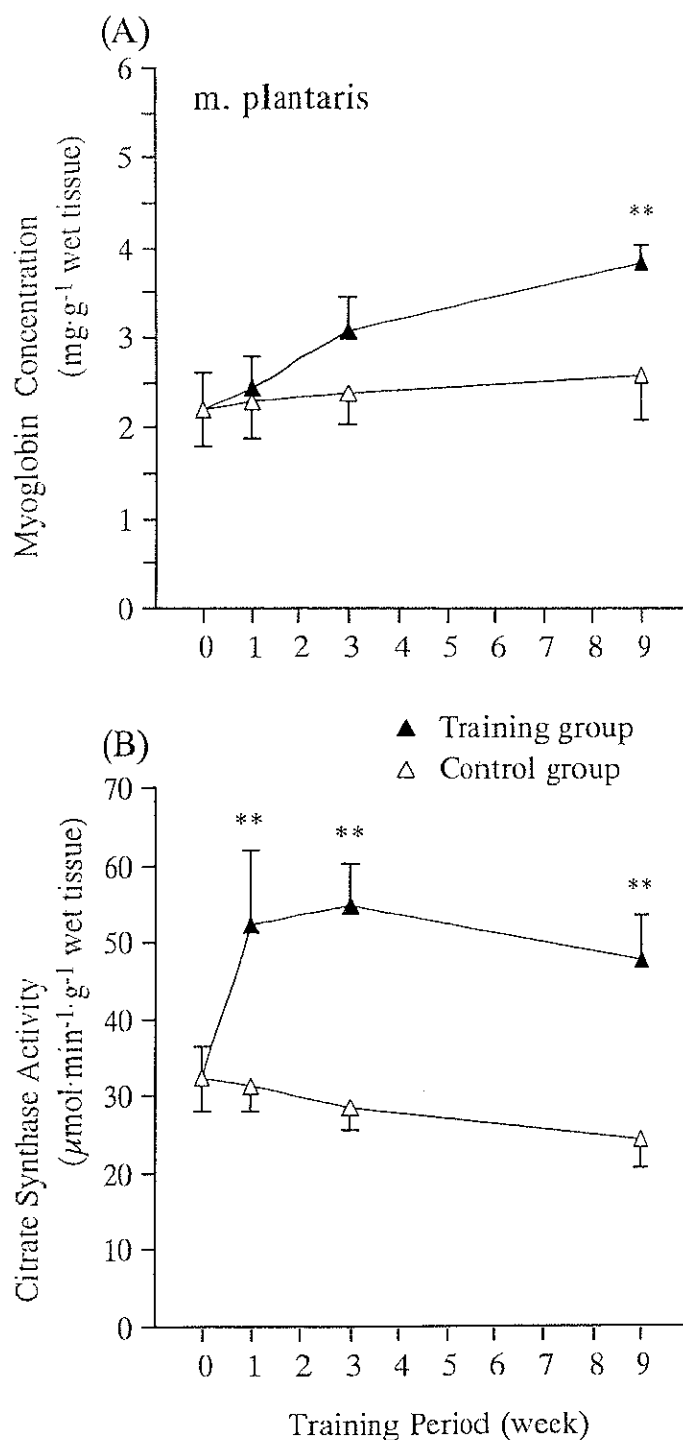
トレーニング群のヒラメ筋のMb濃度は、同週齢のコントロールに対してトレーニング開始1週間後、3週間後および9週間後において11.9%、15.6%、20.5%の高値を示し、統計的に有意差が認められたのは9週間後であった( $P<0.05$ , 図VI-4-A)。

足底筋のMb濃度は同週齢のコントロールに対して、トレーニング開始

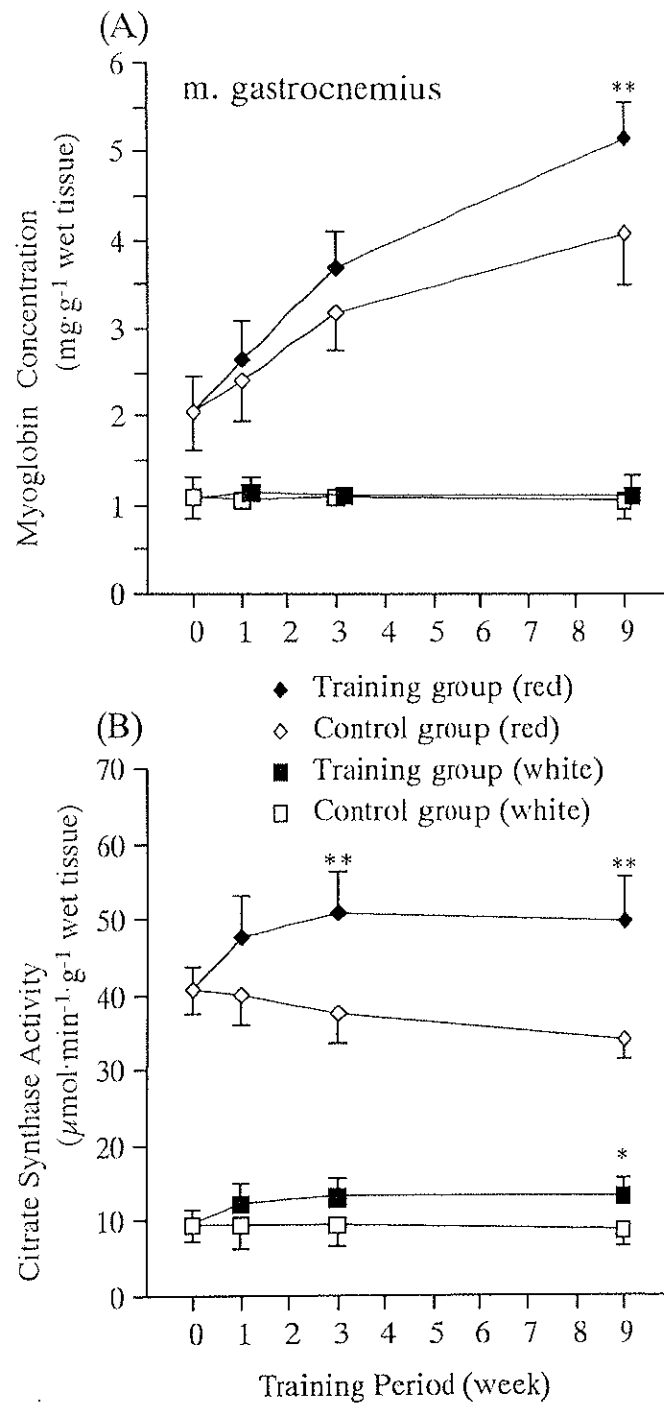


**Figure VI-4.** Time course changes in myoglobin concentration (A) and citrate synthase activity (B) of m. soleus. The training rats were trained at 40 m·min<sup>-1</sup> of intensity for 60 min of duration. ●: training rat, ○: control rat. Values are mean±SD. An asterisk represents a significant difference of training rat from age-matched control (\*: P<0.05).





**Figure VI-5.** Time course changes in myoglobin concentration (A) and citrate synthase activity (B) of m. plantaris. The training rats were trained at 40 m·min<sup>-1</sup> of intensity for 60 min of duration. ▲: training rat, △: control rat. Values are mean±SD. An asterisk represents a significant difference of training rat from age-matched control (\*: P<0.05, \*\*: P<0.01).



**Figure VI-6.** Time course changes in myoglobin concentration (A) and citrate synthase activity (B) of m. gastrocnemius. The training rats were trained at  $40 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$  of intensity for 60 min of duration. ■: training rat (white portion), □: control rat (white portion), ◆: training rat (red portion), ◇: control rat (red portion). Values are mean  $\pm$  SD. An asterisk represents a significant difference of training rat from age-matched control (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ ).

1週間後、3週間後および9週間後において6.8%、28.6%、48.3%の高値を示し、統計的に有意差が認められたのは9週間後であった（ $P<0.01$ , 図VI-5-A）。

腓腹筋深層部のMb濃度はコントロール筋に対し、トレーニング開始1週間後、3週間後および9週間後において9.9%、15.9%、26.9%の高値を示し、統計的に有意差が認められたのは9週間後であった（ $P<0.01$ , 図VI-6-A）。また、同筋表層部のMb濃度はどの時点においてもトレーニング群とコントロール群との間に統計的な有意差は認められなかった（図VI-6-A）。

トレーニング開始からのCS活性の経時的な変化を図VI-4-B~図VI-6-Bに示した。ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋（表層・深層）ともにトレーニングが進むにつれCS活性が上昇した。トレーニング群のヒラメ筋のCS活性では、同週齢のコントロールに対してトレーニング開始1週間後、3週間後および9週間後において23.5%（ $P<0.05$ ）、42.4%（ $P<0.01$ ）、56.2%（ $P<0.01$ ）の高値を示した（図VI-4-B）。足底筋のCS活性では、同週齢のコントロールに対してトレーニング開始1週間後、3週間後および9週間後においてそれぞれ、66.8%（ $P<0.01$ ）、91.7%（ $P<0.01$ ）、95.2%（ $P<0.01$ ）の高値を示した（図VI-5-B）。腓腹筋深層部のCS活性は、コントロール筋に対し、1週間後では19.7%、3週間後では34.5%（ $P<0.01$ ）、9週間後において46.0%（ $P<0.01$ ）の高値を示した。腓腹筋表層部のCS活性は、コントロール筋に対し、9週間後のみにおいて50.9%（ $P<0.05$ ）の高値を示した（図VI-6-B）。

9週間後のMb濃度の変化率を100%として基準化した場合、3週間後ではヒラメ筋において76.1%、足底筋では59.2%、腓腹筋深層部では59.1%の適応が生じていた。一方、同様に9週間後のCS活性の変化率で基準化

すると、3週間後ではヒラメ筋において75.4%、足底筋では96.3%、腓腹筋深層部では75.0%、表層部では80.2%の適応が生じていた。

#### 4. 考察

本研究では持久性トレーニングによって腓腹筋表層部を除くすべての筋においてMb濃度が上昇し、ラットを用いた先行研究（Beyer & Fattore 1984, Harms & Hickson 1983, Hickson 1981）と同様に、持久的な筋活動量の増加はMbの合成を促進するための一要因であることが示唆された。さらに、本研究の目的は持久性トレーニングに対するMbの適応が運動条件の違いによってどのように影響されるのかを検討することであった。

##### 運動強度の影響

走運動では速度の増加に対して遅筋線維から速筋線維へと動員される筋線維が移行する（Hodgson 1983）。Dudleyら（1982）は様々なプロトコルの持久性トレーニングによってラット下肢筋群のチトクロームc活性の変化を検討した結果、その酵素活性の変化が運動強度の違いによる筋の動員様式（Hutchinson et al. 1989, Jasmin & Gardiner 1987, Pierotti et al. 1989, Roy et al. 1991b, Saltin & Gollnick 1983, 征矢ら 1998）とほぼ一致していることを示唆した。本研究におけるCS活性もDudleyら（1982）の報告と同様の傾向が観察された（図VI-2-B）。一方、Mb濃度は腓腹筋表層部を除く全ての筋において強度依存的に上昇する傾向が認められた（図VI-2-A）。

対照群（Cont-9）のMb濃度は、ヒラメ筋や腓腹筋深層部において足底筋よりも高く、腓腹筋表層部は足底筋よりもさらに低かった。トレーニ

ングによってそれらの筋（腓腹筋表層部を除く）のMb濃度は上昇し、本研究の運動条件で得られた変化率は、ヒラメ筋で20.5%、腓腹筋深層部で26.9%、足底筋で48.3%であった（図VI-2-A）。

変化率を比較した場合、遅筋型のヒラメ筋や腓腹筋深層部で変化率が小さく、速筋型の足底筋において大きかった。ただし、足底筋の場合、変化率は大きかったものの、Mb濃度の絶対値はヒラメ筋や腓腹筋深層部レベルに達していなかった（図VI-2-A）。このようなMbの変化には、普段の筋活動レベル（Hutchinson et al. 1989, Roy et al. 1991）や動員の程度（Hodgson 1983, Hutchinson et al. 1989, Jasmin & Gardiner 1987, Pierotti et al. 1989, Roy et al. 1991, 征矢ら 1998）、筋の収縮特性（Delp & Duan 1996）、あるいは元々のMb濃度レベル（増田&勝田 1998）が影響しているかもしれない。

ヒラメ筋は抗重力筋として働いているため、姿勢保持状態においても筋の活動レベルは高い（Hutchinson et al. 1989）。また、その活動レベルは走運動を行ってもほとんど変化することはない（Hutchinson et al. 1989, Pierotti et al. 1989, Roy et al. 1991b）。一方、足底筋の姿勢保持状態における筋活動量は、ヒラメ筋などに比べて少ない（Jasmin & Gardiner 1987）。しかしながら、足底筋はその90%以上が速筋線維によって構成される速筋型の筋（Delp & Duan 1996）であるにも関わらず、その活動電位の振幅は、トレッドミル歩行（ $14.4 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ ）において、姿勢保持状態と比較して約2.5倍に上昇することが観察されている（Jasmin & Gardiner 1987）。さらに本研究で設定した低強度運動と同程度の運動によっても足底筋支配運動ニューロンの*c-fos* mRNAの増加（征矢ら 1998）や、その運動強度のトレーニングによって足底筋の毛細血管数の増加（Kano et al. 1997b）が認められている。したがって、ヒラメ筋や腓腹筋深層部のMb合成の促

進に対する持久性トレーニングの活動刺激が、上述のような筋の動員様式の特徴によって弱められた可能性が考えられる。これに対して、足底筋では持久性トレーニングの活動刺激がMbの合成を大きく亢進させたと考えられる。

ヒラメ筋や腓腹筋深層部のMb濃度は足底筋やその他の骨格筋よりも高い ( $4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ wet tissue}$  以上, e.g. 増田&勝田 1998)。このような事実と本研究での変化率の傾向から、ヒラメ筋や腓腹筋深層部のMbは適応レンジの上限に近い濃度で存在しており、一方、足底筋はそれよりも低い濃度で存在しているものと考えられる。したがって、Mb濃度の高い筋では、持久的運動刺激によってMb濃度が上昇しにくく、その変化率が小さいのかもしれない。ラットに持久性トレーニングを行った他の研究 (Beyer & Fattore 1984, Harms & Hickson 1983, Hickson 1981) においても、本研究と同様に、ヒラメ筋や外側広筋深層部などではMb濃度の変化率が足底筋などに比べて小さかったことが報告されている。

腓腹筋の表層部のMbに関しては、どの運動強度のトレーニングによっても変化が認められなかった。その一方で、 $40 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$  のトレーニングによって同部位のCS活性は上昇していた。このことは、筋線維組成の類似する足底筋と異なる適応であった。HarmsとHickson (1983) は本研究の最高運動強度よりも高い運動強度 ( $44 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1} + \text{傾斜} 5^\circ$ ) でラットにトレーニングさせても、外側広筋の白色部位のMb濃度が変化しなかったことを報告し、さらにDudleyら (1982) は外側広筋の白色部位のチトクロームcの変化が生じるのは $60 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$  以上のトレーニングであると報告している。以上のことから、腓腹筋表層部のMbの増加にはその部位の筋線維が動員されながらも、さらに高い運動強度の活動刺激が必要なかもしれない。

### 運動時間の影響

運動時間の影響を検討するにあたり、本研究では運動強度を $30 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ に設定し、運動時間に30分、60分、90分、120分を設けた。この設定は $30 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ の運動強度が腓腹筋表層部を除く全ての筋においてMb濃度の変化させた強度であったからである。Mb濃度の上昇が観察された筋では90分間トレーニング時に増加率が最も高かった（図VI-3）。また、Mb濃度の増加程度は足底筋、腓腹筋深層部、ヒラメ筋、腓腹筋表層部の順に大きかった。CS活性の変化もMb濃度とほぼ同様の傾向を示し、90分のトレーニングによって適応のピークであった（図VI-3）。MbとCSの適応が並行していたことは興味深い点である。

心筋や横隔膜などのように継続的に収縮を行う筋ではMb濃度のレベルが高い（増田&勝田 1998）。そのような事実は、運動時間の長時間化が下肢骨格筋のMb濃度の合成亢進に寄与する可能性を示唆するものである。しかしながら、Mb濃度はCS活性同様、90分の運動時間によって適応のピークを示し、それ以上の120分の運動時間によってさらに上昇する傾向は観察されなかった。Dudleyら（1982）はミトコンドリアの酵素活性の適応はある程度の運動時間があれば十分であり、運動時間よりもむしろ運動強度の方がミトコンドリアの酵素活性の変化には影響を与えていると報告している。このことは、運動時間よりも運動強度の方が筋あるいは運動単位の動員を変化させる成因である（Hodgson 1983, Hutchinson et al. 1989, Jasmin & Gardiner 1987, Pierotti et al. 1989, Roy et al. 1991b, 征矢ら 1998）ためであろう。MbとCSの適応が並行していたことから、Mbの適応もミトコンドリア同様、ある程度の運動時間で十分であり（本研究では90分）、さらなる適応を引き起こすためには運動強度を上昇させな

くてはならないのであろう。

#### 経時的变化について

Mbの適応がトレーニング開始後のいつ頃から生じるのかについて検討した。Mb濃度の経時的变化を検討するにあたり、運動強度と運動時間の実験結果を参考に強度と時間を設定した。運動強度 $40 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ 、運動時間60分は、Mb濃度の増加が観察された筋のほぼ最大の適応を導いた運動強度と運動時間であった（図VI-2と図VI-3）。

経時的变化の観察を通して、すべての筋において、発育によるMb濃度の上昇が見られたことに注意を払う必要があるだろう（腓腹筋表層部を除く；図VI-4～図VI-6）。特にヒラメ筋や腓腹筋深層部において、発育による変化がより大きかった（図VI-4と図VI-6）。発育に伴って、ヒラメ筋や腓腹筋深層部の遅筋線維の割合が増加することから（石原ら 1984）、発育期に観察されたヒラメ筋や腓腹筋深層部のMb濃度の上昇は筋線維の収縮特性の変化が原因となっている可能性が考えられる。

トレーニングに対するMb濃度とCS活性の増加について、その経時変化を比較すると、9週間後の変化率を100%として基準化した場合、トレーニング3週間後においてMb濃度は腓腹筋深層部と足底筋の約59%～ヒラメ筋の約76%に対して、CS活性は同じ3週間後において約75%（ヒラメ筋と腓腹筋深層部）～約96%（足底筋）の適応が示された。これらの結果はMb濃度よりもCS活性において9週間後の変化率がいずれの筋でも大きいにも関わらず（結果参照）、CSはMbよりも早く適応することを示唆している。これらのことから、ミトコンドリアの酵素活性は活動量の増加に対して時間的に早く適応を生じさせるが、Mbはそれよりも長い時間を要することが考えられる。



最後に、持久性トレーニングによる筋活動量の増加はその運動中に筋のエネルギー需要を高めるため、筋細胞内により多くの酸素流量が必要となる。Mbの役割を考えると、Mb濃度の上昇という適応は、トレーニング中に高められた酸素需要を満たすための適応であったと考えられる。筋細胞内の酸素流量はMbの濃度が規定していると考えられる（Federspiel 1984, Therorell 1934, Wittenberg 1970, Wittenberg & Wittenberg 1985）ので、Mb濃度の上昇は細胞内の酸素流量や貯蔵量の増大をもたらし、結果的に有酸素的代謝能力を向上させるであろう。本研究によって異なる運動条件によるMb濃度の適応の違いが明らかとなった。そしてこの事実は、持久性トレーニングによる骨格筋内の酸素運搬や貯蔵能力の変化を把握するためにも重要であると思われる。

## 5. 要約

本実験では、ラットを対象に持久性ランニングトレーニングを処方し、ラットの骨格筋Mb濃度の運動強度、運動時間の影響および経時的変化の現象を明らかにすることを目的とし、さらにミトコンドリアの酸化系酵素活性の変化との比較を行った。得られた結果は以下の通りである。

- ① 腓腹筋表層部を除く全ての筋（ヒラメ筋、腓腹筋深層部、足底筋）において、運動強度依存的にMb濃度が上昇した。（運動強度の検討）。
- ② CS活性は、ヒラメ筋、腓腹筋深層部では低強度運動から、足底筋や腓腹筋表層部ではより高い運動強度によって上昇した（運動強度の検討）。

- ③ 腓腹筋表層部を除く筋（部位）においてMb濃度およびCS活性が運動時間の増加に伴って漸増し、90分の運動時間によって十分な適応が得られた（運動時間の影響）。
- ④ Mb濃度はCS活性と比較して最大適応を得るためのトレーニング期間が長い傾向であった（期間の検討）。

以上のことから、ラットに持久性トレーニングを行わせた場合、①運動強度の違いによるMbの変化は強度依存的に生じ、その様相はミトコンドリア酵素活性とは異なること、②Mb濃度の最大の増加率を得るためには、1回に90分の運動時間が必要であること、③Mb濃度の増加には、ミトコンドリア酵素活性の増加と比較してより長い期間が必要であることが明らかになった。

## VII. レジスタンストレーニングが骨格筋のミオグロビン濃度に及ぼす影響（実験4）

### 1. 目的

レジスタンストレーニング（resistance training; 以下RT）はバーベルなどの器具を用いて、それらの外的負荷に対して筋力を発揮する運動であり、多くの競技選手によって、筋量の増大や運動単位の動員の改善を目的として盛んに行われている。RTのプロトコルは、運動の様式、順序、強度、反復回数およびセット数、休息时间によって様々である（Kraemer et al. 1988）。したがって、どのようなプロトコルのRTを行うかによって、生体の生理的な適応が変わってくる（Kraemer & Fleck 1988）。

RTのトレーニングの違いによる骨格筋の特異的な適応の典型例は、ボディビルダーとパワーリフターに観察される（Westcott 1995）。ボディビルダーは筋肥大を主な目的として、軽度から中程度の重量を用いて挙上回数を多くし、セット間の回復時間を短くとる。一方、パワーリフターは運動単位の動員を主たる目的として、高重量で挙上回数を少なくし、回復時間を長くとる。Teschら（1984）はオリンピックに出場したパワーリフターの毛細血管密度が一般成人よりも低く、一方、ボディビルダーの毛細血管密度が一般成人とほぼ同程度であり、筋線維周辺の毛細血管数が多かったことを報告した。また、RTによって低下すると考えられているミトコンドリアの酸化系酵素活性が、ボディビルダーではその低下が抑制され、一般人と同程度かそれ以上であることも報告されている（Tesch 1988）。また、崔ら（1998a）は、一般成人に対し、ボディービ

ルダー型とパワーリフター型の異なるプロトコルのRTを8週間行い、毛細血管の新生がパワーリフター型のRTよりもボディービルダー型のRTの方でより多く生じていることを報告した。これらのことは、ボディービルダーが行うRTのプロトコルはパワーリフターのものと比較して、筋の酸素運搬能力や有酸素的代謝能力を制御する因子を刺激し、筋の有酸素的代謝能力を維持する可能性を示唆している。

これまではMbが有酸素的代謝に貢献するものであると考えられていたために、Mbに対する持続的な運動刺激の影響を調べる研究が主流であった。したがって、RTに対するMbの適応については検討されていない。

一般的に、RTによって筋肥大が生じ、それに伴ってミトコンドリア酵素活性と毛細血管密度が相対的に低下するとされている（Tesch 1988）。しかし、先述のように、RTのプロトコルによっては、酸素運搬に寄与する毛細血管の新生（Tesch et al. 1984）や、酸化系酵素活性の上昇（Tesch 1988）が生じる場合がある。したがって、筋細胞内の酸素運搬や貯蔵に関わるMb濃度もRTによって変化し、RTのプロトコルの違いによってその濃度変化に違いが生じる可能性がある。

そこで本実験では、2種類のプロトコルのRTを行い、骨格筋のMb濃度が8週間のRTによってどのように変化するのか、また、RTのプロトコルによる適応の違いが観察されるのかについて検討した。

## 2. 方法

### (1) 被験者

定期的な運動を行っていない11名の成人男性が実験に参加した。実験に先立ち、被験者には、実験の主旨や測定項目、予想される結果につい

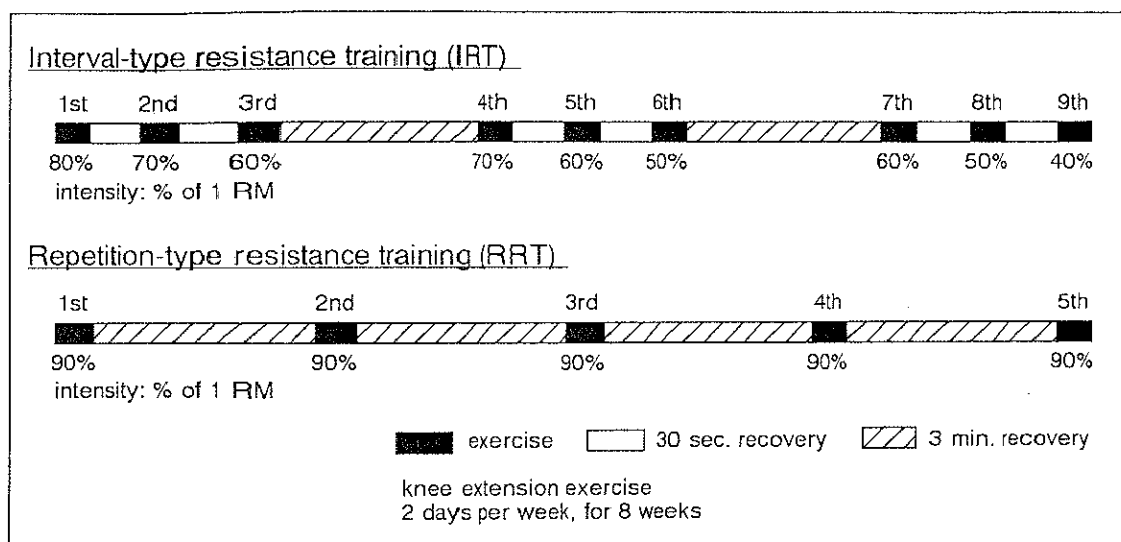
て十分に説明を行い、実験参加の同意を得た。11名の被験者はパワーリフター型のRTを行う群（Repetition-type resistance training group, 以下 RRT群, n=5）とボディービルダー型のRTを行う群（interval-type resistance training group, 以下 IRT群, n=6）に分けられた。被験者の年齢、身長、体重は、RRT群において、 $27.6 \pm 3.7$ 歳、 $173.6 \pm 6.1$  cm、 $69.8 \pm 5.1$  kgであり、IRT群においては、 $28.5 \pm 4.0$ 歳、 $173.5 \pm 1.6$  cm、 $70.7 \pm 5.0$  kgであり、身体特性に関するグループ間の差は認められなかった。

## (2) パフォーマンステスト

RTに先立ち、各被験者の1回最大挙上重量（1 RM）を測定した。運動形式は右脚の膝関節の伸展動作であり、被験者は測定用の椅子に座って筋力発揮を行った。さらに、筋持久力の評価として、崔ら（1998b）に従い、等速性筋力計（Biodex, Biodex Co., USA）を用いて毎秒 $180^\circ$ の角速度で50回の連続膝関節伸展運動を行った。1回目のトルクを基準に50回目のトルクの低下率を疲労耐性の指標として算出した。

## (3) トレーニングプロトコール

トレーニングプロトコールは、FleckとKraemer（1987）、Westcott（1995）を参考に設定した。RRT群のトレーニングプロトコールは1 RMの90%に相当する重量を疲労困憊まで行い、それを5回行うものであった。一方、IRT群のプロトコールは1 RMの80~40%に相当する重量を疲労困憊まで行うものであった。各試技間の休息時間はRRT群で3分、IRT群で30秒~3分であった。トレーニング頻度および期間は、毎週2回、8週間であった。両群のプロトコールは図VII-1にまとめた。



**Figure VII-1.** The experimental interval-type and repetition-type resistance training protocols.

#### (4) 筋の摘出

筋サンプルは針生検法 (Bergstöm 1962) により、右脚外側広筋より摘出した (実験1参照)。

#### (5) 生化学的分析および組織化学的分析

Mb濃度、CS活性および筋線維タイプの同定には、実験1と同様の手法、方法を用いた。

#### (6) 統計処理

統計量は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。グループ間の比較には、対応なしのStudent t-testを行い、また、トレーニング前後の比較には対応ありのStudent t-testを行った。有意水準を5%未満に設定した。

### 3. 結果

最大随意筋力の結果を表VII-1に示した。1 RMは8週間のトレーニングによってIRT群において+34.8% ( $p<0.01$ )、RRT群において+43.2% ( $p<0.01$ ) 上昇した。等尺性筋力もIRT群で+19.3%、RRT群で+36.2%の有意な上昇を示した (いずれも $p<0.01$ )。筋力の上昇はRRT群がIRT群よりも大きい傾向にあった。50回の連続収縮のトルク低下率は、RRT群で有意に変化しなかった ( $68.9\pm4.6\%$ から $67.2\pm6.6\%$ ) が、IRT群では有意にトルク低下率が小さくなった ( $62.4\pm6.9\%$ から $51.2\pm6.4\%$ ,  $p<0.05$ )。

IRT群のMb濃度 ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  wet tissue) は、トレーニング前 $4.63\pm0.63$ からトレーニング後 $4.47\pm0.72$ へ変化し、一方、RRT群のそれは、 $4.49\pm1.05$ から $4.14\pm0.74$ の低下傾向を示したものの、トレーニング前後では統計的

**Table VII-1 .** Maximal voluntary forces, and muscle endurance performance, myoglobin concentration and citrate synthase activity before and after the 8-week resistance training.

n		<u>1 RM</u>		<u>Iso. Force</u>		<u>Ratio of torque decrement</u>		<u>Mb concentration</u>		<u>CS activity</u>	
		(kg)		(Nm)		(%)		(mg·g <sup>-1</sup> wet tissue)		(μmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> wet tissue)	
IRT 6	pre	52.9±6.8		252.9±49.0		62.4±6.9		4.63±0.63		5.27±1.45	
	post	71.3±6.3**		301.8±53.5**		51.2±6.4*		4.48±0.72		4.49±1.48*	
RRT 5	pre	59.0±8.2		255.7±60.2		68.9±4.6		4.47±0.75		5.33±2.09	
	post	84.5±12.4**		348.5±78.3**		67.2±6.6		4.24±0.80		4.85±1.87*	

All data are means±SD. An asterisk is representing a significant difference from pre-training (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01).

IRT: interval-type resistance training, RRT: repetition-type resistance training, RM: repetition maximal force,

Iso: isometric, Ratio of torque decrement: relative change of torque during 50 repetitive contraction,

Mb: myoglobin, CS: citrate synthase.



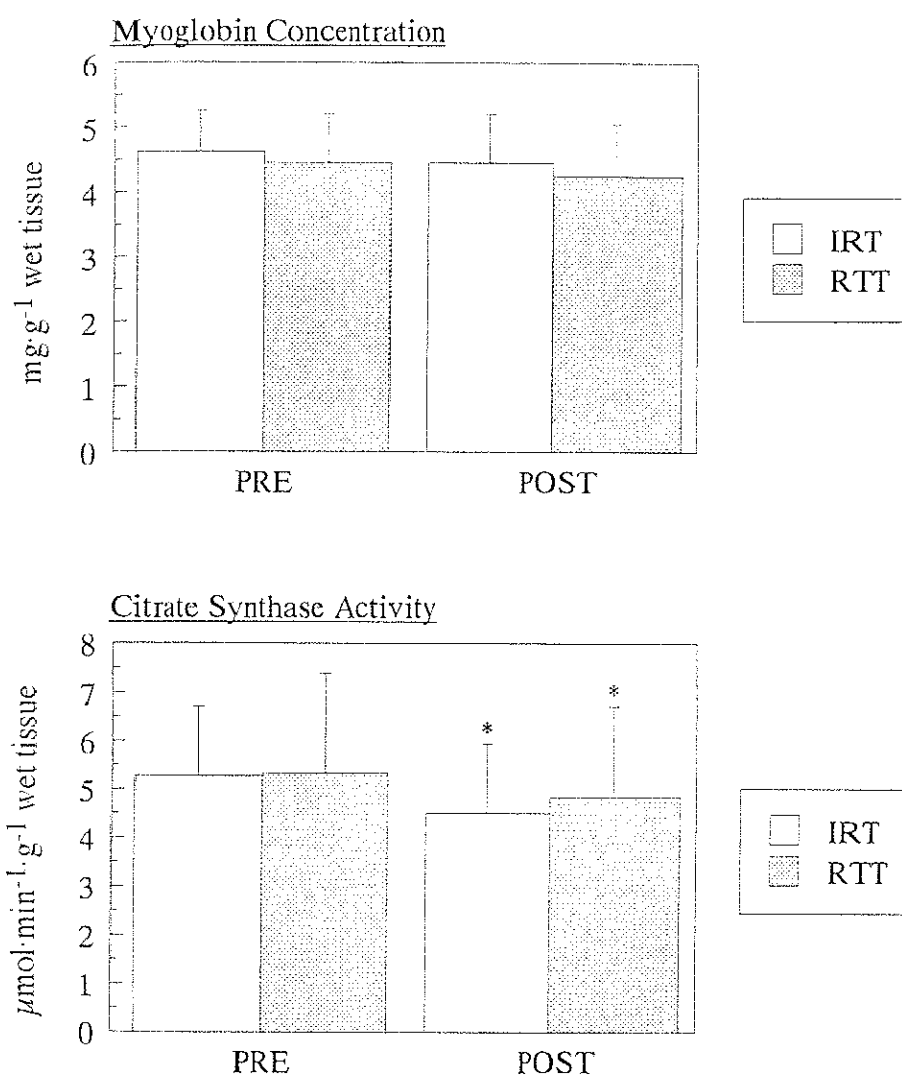
な有意差は認められなかった（表Ⅶ-1, 図Ⅶ-2）。CS活性はIRT群で-14.8%、RRT群で-9.0%の有意な低下を示した（ $p<0.05$ , 表Ⅶ-1, 図Ⅶ-2）。

表Ⅶ-2には各群の筋線維組成および筋線維横断面積の結果を示した。RRT群およびIRT群の筋線維組成にはトレーニングによる変化は認められなかった。Type I線維の横断面積はIRT群において13.5%、RRT群において8.3%の有意な上昇が認められた（ $p<0.05$ ）。また、Type IIa線維の横断面積はIRT群で18.5%、RRT群で15.2%の有意な上昇が認められた（ $p<0.05$ ）。Type IIb線維の横断面積はIRT群において+15.5%、RRT群において+11.8%の有意な上昇が観察された（ $p<0.05$ ）。筋線維横断面積の変化率はIRT群の方がRRT群よりも大きい傾向にあった。

#### 4. 考察

これまでにRTによる骨格筋の適応について多くの研究が報告されてきた（e.g. Kraemer et al. 1996）。しかし、それらの中で骨格筋内のMb濃度に関する情報はない。

RTに対する骨格筋の適応はトレーニング様式（強度・頻度・反復回数・休息时间）によって、筋の肥大率や筋力、毛細血管、酵素活性の変化率に差が生じてくるため（Kraemer & Fleck 1988）、RTのプロトコールの違いによるMbの適応を検討する必要があった。本実験において8週間のRTを行った結果、Mb濃度は有意に変化しなかった。しかも、筋線維横断面積や、同様なRTプロトコールによる毛細血管数の変化率（崔ら 1998a）はプロトコールの違いによって異なっていたにも関わらず、MbにはRTプロトコールの差も観察されなかった。以上のことは、RTによる筋肥大と平衡してMbタンパクが合成されたことを意味するものであるが、RT



**Figure VII -2.** Changes in myoglobin concentration and citrate synthase activity induced by different types of resistance training. IRT: interval-type resistance training, RRT: repetition-type resistance training. An asterisk represents a significant difference as compared with pre value (\*:  $p < 0.05$ ).

**Table VII -2 .** Muscle fibre composition and muscle fibre CSA before and after the 8-week resistance training.

n		Muscle fibre composition (%)			Muscle fibre CSA ( $\mu\text{m}^2$ )		
		Type I	Type IIa	Type IIb	Type I	Type IIa	Type IIb
IRT 6	pre	32.0 $\pm$ 11.4	44.9 $\pm$ 4.1	23.1 $\pm$ 11.4	4461.8 $\pm$ 1261.1	4685.8 $\pm$ 1404.7	4189.2 $\pm$ 1439.9
	post	37.2 $\pm$ 9.7	42.8 $\pm$ 8.8	20.1 $\pm$ 8.0	5063.1 $\pm$ 1143.2*	5551.0 $\pm$ 1132.9*	4838.2 $\pm$ 1282.2*
RRT 5	pre	30.4 $\pm$ 20.3	51.2 $\pm$ 8.8	18.3 $\pm$ 11.5	5596.3 $\pm$ 837.6	4945.0 $\pm$ 511.5	3990.2 $\pm$ 951.0
	post	32.0 $\pm$ 4.6	48.5 $\pm$ 5.5	19.6 $\pm$ 4.3	6063.5 $\pm$ 812.6*	5698.9 $\pm$ 628.2*	4459.9 $\pm$ 1149.4*

All data are means $\pm$ SD. An asterisk is representing a significant difference from pre training (\*: p<0.05).

IRT: interval-type resistance training, RRT: repetition-type resistance training, CSA: cross-sectional area.

のプロトコールによってMb濃度の反応に差が生じると予想した本実験の仮説を支持するものではなかった。したがって、RTによってMb濃度が維持された原因を、2つのプロトコールに共通する要因の中から考えなくてはならない。

本実験の興味深い点は、肥大した筋において希釈効果と考えられるCS活性の低下 (Ianuzzo & Chen 1979) が生じていたにも関わらず、Mb濃度が変化しなかったことである。このような酵素活性に対する希釈効果は、他のミトコンドリア酵素やミトコンドリア密度にも認められている (MacDougall et al. 1979, Tesch 1988)。毛細血管数に関しては、IRTタイプを行った方が、RRTタイプを行った場合よりも毛細血管数の増加率は大きかった (崔ら 1998a)。しかしながら、筋の肥大率と併せて考えると、毛細血管数の増加は筋の肥大率よりも低かった (崔ら 1998a)。このことは、毛細血管拡散領域 (capillary domain area: CDA) がRT後に拡大していることを意味しており、毛細血管からの酸素供給能力が低下していることを示唆している。したがって、毛細血管からの酸素供給量の減少をMbによる細胞内への酸素拡散によって代償するために、筋はMb濃度を維持した可能性が考えられる。さらに、Mb、毛細血管、ミトコンドリアの変化は同じように生じるものではなく、異なった因子によって制御されていると考えられる。

ではRTの際にどのような要因がMbの合成を亢進させるたのであろうか。筋組織の低酸素化は主たる要因の1つかもしいない。高地住民の骨格筋Mb濃度が高いこと (Reynafarje 1962, Wittenberg & Wittenberg 1970) や低酸素環境での持続性トレーニングによってMb濃度が上昇する (Terrados et al. 1990) ことが示されている。高強度のRTの場合、活動筋の筋肉圧が非常に高くなるために毛細血管が圧縮され、一時的に酸素供

給が絶たれる（Zwarts & Arendt-Nielsen 1988）。阻血状態に類似したこのような状態では、筋が利用できる酸素は筋細胞内に貯蔵されたMb-O<sub>2</sub>であり、運動中にATPを生成するためのさらなる酸素を得ることが困難となると予想される。したがって、RTによってMbが増加することは、筋細胞内の酸素貯蔵量を増加させ、酸素供給が制限される状況下での筋細胞内の酸素不足を代償するためなのかもしれない。

また、筋細胞の肥大による酸素拡散領域の拡大も、Mbの合成の亢進に関与しているかもしれない。仮に肥大した筋でMbの量に変化しなければ、Mb濃度は低下してしまい、相対的に筋内の酸素貯蔵量や酸素流量が減少してしまう。また、そうした場合のMb濃度の低下はMbによる酸素の促進拡散を阻害する可能性がある（Federspiel 1984, Wittenberg & Wittenberg 1989）。したがって、筋肥大、すなわち酸素の拡散領域が拡大した場合にもMbによる酸素運搬能力を維持するためには、Mb濃度を一定に保つようにMbタンパクが合成されなければならなかったと考えられる。

MbはType II線維よりもType I線維に多く存在しているので（Jansson & Sylvén 1983, Nemeth & Lowry 1984, Kunishige et al. 1996）、筋線維組成の変化もMb濃度に影響を与えるかもしれない。myosin ATPase染色による筋線維タイプの分類は基本的に筋線維の収縮特性を示しており、筋線維のタイプ移行によって代謝的な要因も移行するのかは検討の余地がある。しかし、交叉神経支配モデルの研究（McPherson & Tokunaga 1967）のように、収縮特性の変化がトリガーとなってMb濃度が増減する場合もある。したがって、もしRTによって%Type I線維が増加すれば、Mb濃度の変化はその影響を受ける可能性がある。長期間（8週間以上）のRTによって筋線維タイプのType IIb線維からType IIa線維への移行が観察されている（Hather et al. 1991, Staron et al. 1994）が、Type IIからType Iへの移行はほ

とんど観察されていない。本実験では筋線維組成の変化は観察されておらず、このことは、本実験のRTの期間が短く、活動刺激が筋線維タイプを変化させるには十分でなかった可能性が考えられる。したがって、本実験のMb濃度の維持には筋線維組成の変化の影響はほとんど関与していないと考えられる。

結論として、8週間のRTによって筋線維が肥大し、ミトコンドリアの酵素活性が低下したにも関わらず、Mb濃度は維持されていた。また、このようなMbの現象はRTのプロトコルの違いによるものではない。

## 5. 要約

本実験では、8週間のRTを行い、骨格筋のMb濃度の変化を検討した。また、RTのプロトコルの違いがMb濃度の変化に影響を及ぼすのかについても検討を加えた。得られた結果は以下の通りである。

- ① Mb濃度は、トレーニング前後でRRT群、IRT群の両群において有意に変化しなかった。
- ② CS活性はIRT群で-14.8%、RRT群で-9.0%の有意な低下を示した。
- ③ 各筋線維タイプの横断面積は、RTによって有意に増大し、その肥大率は、IRT群がRRT群よりも大きい傾向を示した。
- ④ 筋線維組成の変化は両群において認められなかった。
- ⑤ 最大随意筋力はIRT群とRRT群のいずれにおいても上昇したが、その上昇率はRRT群よりもIRT群において大きい傾向であった。
- ⑥ 50回の連続収縮時のトルク低下はRRT群で変化しなかったが、IRT群では有意にトルクの低下率が小さくなった。

これらのことから、肥大した筋においてMb濃度が維持されたことは、RTによってMbの合成が亢進したためと考えられる。したがって、RTによって肥大した筋細胞においてもMbによる酸素流量、貯蔵量は変化しないことが示唆された。

## VIII. 代償性筋肥大の過程における骨格筋ミオグロビン濃度の変化（実験5）

### 1. 目的

実験4において、RTによって引き起こされた筋肥大に対して骨格筋のMb濃度のレベルが維持されていた。このことは、筋の肥大率に相当する分のMbが増加したことを意味している。ただし、筋肥大の過程においても、このMbタンパクの増加が筋肥大（酸素拡散領域の拡大）と並行して生じるのかについては不明である。代償性筋肥大モデルは、ラットの腓腹筋を切除することによって、残った共同筋（足底筋やヒラメ筋）に過負荷を与え、筋肥大を誘発させるものであり、動物の筋肥大モデルとして一般的に用いられているモデルである（Timson 1990）。そこで本研究では代償性筋肥大モデルを用いて、筋肥大の過程におけるMb濃度の経時的变化を観察し、筋肥大とMb濃度との関連性を検討した。

### 2. 方法

#### (1) 被験動物

被験動物には9週齢のウイスター系雄性ラット42匹を用いた。ラットは $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ で12時間の明暗サイクルに管理されている飼育室において、1ケージ3～4匹ずつ飼育された。飼料（動物実験用標準固形飼料MF, オリエンタル酵母工業, 日本）と水はそれぞれ自由摂取させた。ラットを筋切除後7日目群（Ab-7）、21日目群（Ab-21）、42日目群（Ab-42）に分類し、9週齢時のコントロール（Cont-0）を含め、各術後経過日数時のコ



ントロール（Cont-7、Cont-21、Cont-42）を設けた（各グループ7匹）。9週齢時に麻酔下において筋切除群（Ab群）の両脚の腓腹筋をほぼ完全に切除し、縫合する手術を行った。この手術によって、共同筋である足底筋には力学的な過負荷が生じる。一方、コントロール群の両脚に対して麻酔下で腓腹筋を露出するまでの偽手術を施した。

## （2）生化学的分析および組織化学的分析

腓腹筋切除後、各グループの経過日数目において、両群のラットに対して麻酔下で左足底筋を摘出した。筋は摘出後直ちに液体窒素で瞬間凍結され、分析が行われるまで -80℃下で保存された。

Mb濃度、CS活性の測定ならびに筋線維タイプの同定には実験3と同様の方法を用いた。

## （3）統計処理

統計量は平均値±標準誤差で示した。グループ間の比較には、2元配置の分散分析を用い（時間・Ab群 vs Cont群）、分散に有意差が認められた場合にはpost-hoc testとしてShefféの有意差検定を行った。有意水準を5%未満に設定した。

## 3. 結果

各グループの体重、筋重量ならびに筋線維横断面積を表VIII-1に示した。

体重については、各週齢時のコントロールと筋切除群の間に有意差は認められなかった。

筋重量について、筋切除1週間目でAb-7は、Cont-7に比べて+25.3%、

**Table VIII -1.** Characteristics of the plantaris muscle in each group.

		<u>Days-</u> <u>Postsurgery</u>	<u>Body Weight</u> (g)	<u>Muscle Weight</u> (mg)	<u>Muscle Fibre CSA</u> ( $\mu\text{m}^2$ )	<u>Protein Concentration</u> ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ wet tissue)
Cont-0	(n=7)	0	349.9 $\pm$ 6.0	286.9 $\pm$ 9.6	1807.7 $\pm$ 96.3	91.62 $\pm$ 3.48
Cont-7	(n=7)	7	369.9 $\pm$ 7.5	315.6 $\pm$ 8.9	1928.4 $\pm$ 59.8	94.55 $\pm$ 4.14
Ab-7	(n=7)	7	356.9 $\pm$ 4.0	359.5 $\pm$ 11.2	2180.1 $\pm$ 80.5	77.95 $\pm$ 5.04
Cont-21	(n=7)	21	399.7 $\pm$ 3.9	315.6 $\pm$ 8.9	2066.1 $\pm$ 67.5	92.60 $\pm$ 5.97
Ab-21	(n=7)	21	414.6 $\pm$ 6.7	407.0 $\pm$ 10.8 **	2967.1 $\pm$ 181.1 **	84.79 $\pm$ 4.58
Cont-42	(n=7)	42	481.6 $\pm$ 16.8	380.2 $\pm$ 14.6	2409.5 $\pm$ 73.2	93.58 $\pm$ 3.48
Ab-42	(n=7)	42	464.0 $\pm$ 9.4	486.0 $\pm$ 12.6 **	3275.6 $\pm$ 164.7 **	92.56 $\pm$ 5.38

Cont: control groups, Ab: ablation groups, CSA: cross-sectional area. All data are means $\pm$ SE.  
 An asterisk is representing a significant difference between ablation group and its age-matched control group (\*\*:  $p<0.01$ ).

Ab-21ではCont-21に比べて+28.8% ( $P<0.01$ )、Ab-42ではCont-42に比べて+27.9% ( $P<0.01$ ) の高値を示した。

筋線維横断面積については、筋切除1週間目でAb-7は、Cont-7に比べて+13.3%、Ab-21ではCont-21に比べて+43.6% ( $P<0.01$ )、Ab-42ではCont-42に比べて+35.9% ( $P<0.01$ ) の高値を示した。

各群の筋湿重量当たりのタンパク濃度を表VIII-1に示した。筋切除後7日目 (Ab-7) において、-12.1%の低下傾向を示した (n.s.) もの、それ以降の測定期間においては、Ab群とCont群の間には有意差は観察されなかった。

各群の筋湿重量当たりのMb濃度を表VIII-2に示した。対応する週齢のCont群とAb群の間に統計的な有意差は認められなかったが、Ab-7 (-12.1%) とAb-21 (-10.3%) の値はそれぞれのCont群よりも低値を示す傾向にあった (表VIII-2, 図VIII-1)。また、タンパク重量当たりのMb濃度には実験期間を通じて、統計的にAb群とCont群の間の有意差は認められなかった (表VIII-2, 図VIII-1)。

各群の筋湿重量当たりのCS活性を表VIII-2に示した。Ab-7がCont-7に比べ-31.4% ( $P<0.01$ ) の有意な低値を示したが、それ以降にはAb群とCont群の間に有意差は認められなかった。

#### 4. 考察

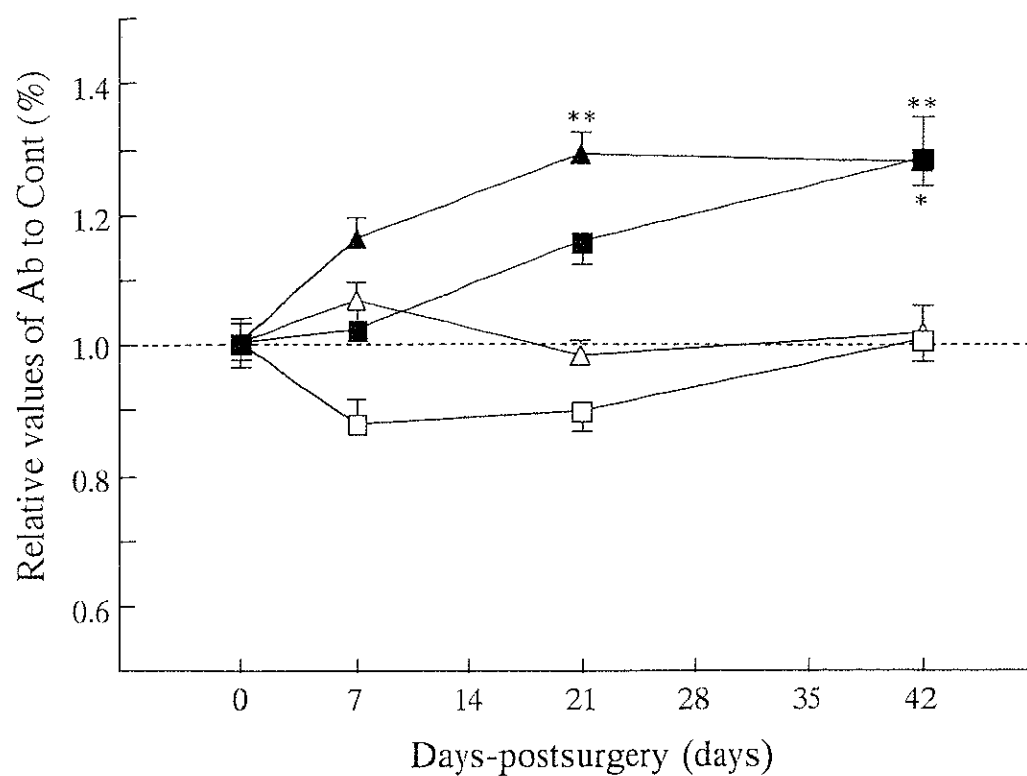
代償性筋肥大に対する骨格筋Mb濃度に関する先行研究はない。筋肥大は筋細胞内の酸素運搬に対して酸素の拡散領域を拡大させ、仮に、筋細胞内に存在するMbのタンパクの増加がなければ、肥大した筋細胞内の酸素流量が減少することが予想される。WittenbergとWittenberg (1989) は

**Table VIII-2.** Myoglobin concentration and citrate synthase activity of the plantaris muscle.

			<u>Myoglobin Concentration</u>		<u>Citrate Synthase Activity</u>	
<u>Days- Postsurgery</u>			(mg·g <sup>-1</sup> wet tissue)	(mg·g <sup>-1</sup> protein)	( $\mu$ mol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> wet tissue)	( $\mu$ mol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> protein)
Cont-0	(n=7)	0	1.73±0.07	18.89±0.78	31.11±1.78	339.58±19.27
Cont-7	(n=7)	7	2.02±0.05	21.36±0.53	29.94±1.20	339.58±19.27
Ab-7	(n=7)	7	1.78±0.08	22.78±0.96	20.53±1.07 **	263.31±13.72
Cont-21	(n=7)	21	2.27±0.08	24.47±0.91	28.15±1.24	304.01±13.34
Ab-21	(n=7)	21	2.03±0.08	23.97±0.93	22.96±1.19	270.82±14.05
Cont-42	(n=7)	42	2.95±0.06	31.49±0.63	26.48±1.42	282.99±15.16
Ab-42	(n=7)	42	2.96±0.13	31.96±1.38	26.69±1.26	288.24±13.60

Cont: control groups, Ab: ablation groups. All data are means±SE.

An asterisk is representing a significant difference between ablation group and its age-matched control group (\*\*: p<0.01).



**Figure VIII -1.** Relative changes in muscle weight and myoglobin content in plantaris muscle during compensatory hypertrophy. Values are expressed as means $\pm$ SE standardized by values of age-matched controls. Closed triangle: muscle weight, open triangle: myoglobin concentration over protein weight, open square: myoglobin concentration over muscle wet weight, closed square: total myoglobin content in whole plantaris muscle. An asterisk is representing a significant difference from control line (\*:P<0.05, \*\*: P<0.01).

骨格筋のMb濃度の方が心筋のMb濃度よりも高いと述べている。彼らはその理由として、骨格筋細胞は心筋細胞よりも大きく、毛細血管からの酸素拡散領域が大きいからだと考えていた（Wittenberg & Wittenberg 1989）。この論理から考えると、大きな筋細胞はより多くのMbを有し、その濃度も高いということになる。しかし、Mb濃度が酸素の促進拡散や貯蔵能力の規定要因となるので（Federspiel 1984, Wittenberg 1970, Wittenberg & Wittenberg 1989）、肥大した筋細胞においてMbの濃度が高くなる必要はなく、コントロールのレベルを維持すれば、Mbによる酸素拡散や貯蔵能力は維持されるはずである。本実験の結果はWittenberg と Wittenberg（1989）の説を支持するものではなく、我々の仮説を支持した。我々の結果と Wittenberg と Wittenberg（1989）の説の相違は、彼らが異なる筋細胞におけるMb濃度の比較を行ったためかもしれない。

代償性筋肥大の初期には、筋細胞内外の浮腫や結合組織の増加による筋肥大が生じると言われている。そのような影響は、筋湿重量当たりのタンパク濃度の低下（Goldspink et al. 1983, Timson 1990）や、希釈効果としての酵素活性の低下（Ianuzzo & Chen 1979）に現れる。本実験でも術後7日目において、タンパク濃度の低下傾向が観察された（表Ⅷ-1）。したがって、術後7日目に観察されたMb濃度の低下傾向（表Ⅷ-2, 図Ⅷ-1）もタンパク濃度と同様に、急性の過負荷による浮腫の影響を受けた可能性が十分に考えられる。

タンパク重量当たりのMb濃度がコントロールレベルからほとんど変化しなかったことから、長期の代償性の刺激に対してMbは収縮タンパクの増加とともに合成を亢進させたと考えられる（図Ⅷ-1）。タンパクの増加を伴う筋肥大は術後7日目以降に始まり（Goldspink et al. 1983）、その後約2週間でプラトーになる（Timson 1990）と報告されている。Ianuzzo

とChen (1979) は、代償的に肥大した骨格筋の生化学的特性を検討した結果、筋肥大は術後30日まで生じ、その後100日目まではその肥大を維持すると報告した。したがって、本実験の42日間という期間は最大の代償性筋肥大を得るには十分であり、仮に、実験期間を延長したとしても、Mb濃度はコントロールレベルを維持するであろう。

筋切除モデルを用いた先行研究 (Iannuzzo & Chen 1979, Goldspink et al. 1983, Kano et al. 1997b) では、筋線維の肥大や遅筋線維の割合の上昇が観察されている。このような筋の適応は代償的な筋活動が、慢性的（持続的）でかつ、過負荷であることを示唆している。齧歯類の骨格筋のMbが持久性トレーニングによって増加する (Beyer & Fattore 1984, Harms & Hickson 1983, Hickson 1981, Hickson et al. 1984) ことから、筋肥大に伴うMbタンパクの増加は代償性筋活動の持続的要素のためかもしれない。しかし、筋肥大という物理的な変化が酸素の拡散領域を拡大するために、その補償作用としてMbタンパクが合成された可能性もある。

長期の筋切除期間によって、Mb濃度がコントロールレベルに維持された足底筋では、筋細胞内の酸素の拡散や流量は肥大する前の筋と同様のレベルである。また、先行研究 (Degens et al. 1993, Kano et al. 1997a) は、筋切除モデルの足底筋の毛細血管網（毛細血管密度）がコントロールレベルを維持していたことを示した。ミトコンドリアの酵素活性（CS活性）もコントロールレベルを維持していたことから、血液からミトコンドリアまでの酸素運搬経路の機能レベルは、代償的に肥大した筋でも変化しないと考えられる。

## 5. 要約

筋肥大が生じる過程において、筋内の酸素運搬、貯蔵能力がどのように変化するのかを明らかにするために、9週齢のラットを用いて、腓腹筋切除による代償性筋活動が足底筋のMb濃度に及ぼす影響を経時的（術後7、21、42日目）に検討した。得られた結果は以下の通りである。

- ① 筋湿重量当たりのMb濃度は筋切除7日目で低下する傾向を示したが、42日目にはコントロールレベルまで回復した。
- ② タンパク重量もMb濃度と同様に、筋切除初期には低下傾向を示し、42日目にはコントロールレベルまで回復した。
- ③ タンパク重量当たりのMb濃度は実験期間を通してコントロールと同様であった。
- ④ CS活性は筋肥大初期には有意に低下したが、42日目にはコントロールレベルに回復した。

以上のことから、筋切除初期に観察された筋湿重量当たりのMb濃度の低下は、筋の浮腫による希釈が原因と推察される。しかし、タンパクの合成を伴う筋の肥大の程度に見合った分のMbが合成されたために、最終的にMb濃度はコントロールのレベルに達した。したがって、筋肥大の過程において、筋内の酸素運搬、貯蔵能力は筋肥大初期にはやや低下するものの、最終的にはコントロールレベルに維持されと考えられる。



## IX. 不活動モデルにおける骨格筋ミオグロビン濃度の変化 (実験6)

### 1. 目的

実験2から実験5では活動量の増加によるMb濃度の変化について検討してきた。しかし、実際、競技選手であれば怪我や障害によって休息しなければならないケースは少なくない。活動量が低下することは、これまで高められた筋の収縮力や代謝的能力を低下させることになる。不活動あるいは不使用における研究が多く報告されているものの（Appell 1990）、そのことに関連したMbの情報は不十分である。不活動によって、筋の収縮特性は速筋型へ移行したり（Crockett & Edgerton 1975, Fischbach & Robbins 1969）、有酸素的代謝能力が低下する（Desplanches et al. 1987, Fell et al. 1985, Simard et al. 1985）ことによって、筋の疲労耐性が低下する。Mbも有酸素的代謝に関わるタンパクであるので、不活動によって生じる筋の疲労耐性の低下にはMb濃度の低下が原因の一つとして考えられるが、この点については明らかにされていない。

速筋と遅筋の神経を交叉神経支配させると、遅筋のMb濃度は低下し、速筋のMb濃度は上昇する（McPherson & Tokunaga 1967）。このことは、相同性のインパルスパターンによってMb濃度が低下し、緊張性の場合にMb濃度は高くなる可能性を示唆している。また、除神経によって神経から筋へのインパルスを遮断した場合には、Mb濃度は高くなり、再神経支配により初期レベルに戻ったことが報告されている（Askmark et al. 1984）。以上の報告のみでは、不活動によるMb濃度の変化が十分に明らかにされていないと考えられる。特に除神経モデルは、神経を切断することによ

てインパルスだけではなく、神経由来の栄養因子などの軸索輸送も除外してしまうことになり、得られる現象の解釈が複雑化する。したがって、インパルスを減少させるためには他のモデルを用いなければならないだろう。

脊髄切断モデルは軸索輸送を維持したまま上位中枢から脊髄への遠心性インプットを遮断し、切断部位より尾側のニューロンから支配される筋の電気的活動をほぼ消滅させることから、脊髄ニューロンの電気的活動を減少させるモデルとして用いられている（Alaimo et al. 1984）。

尾部懸垂モデルは、宇宙空間シミュレーションモデルとして一般的に用いられるものであり、非侵襲的に後肢骨格筋の体重支持活動を減少させる。このモデルの体重支持活動の減少には筋収縮活動の減少と張力負荷の減少の2つの要因が複合されている。ただし、尾部懸垂モデルによって筋収縮活動の変化が生じるのかという問題に対しては肯定的な報告（Blewett & Elder 1993, Riley et al. 1990）と否定的な報告（Alford et al. 1987, Roy et al. 1991a, 1991b）がある。

これらのモデルを用いることによって、Mbに対する活動量の減少の影響を検討することが可能であり、さらに、活動量の減少の主要因である張力負荷と筋収縮活動（神経活動）のどちらがMbに影響を強く及ぼすのかについて検討を加えられるはずである。そこで本実験では、ラットの尾部懸垂と脊髄切断の処置を行い、その際のMb濃度の変化を検討することを目的とした。

## 2. 方法

### (1) 被験動物

被験動物にはウイスター系雄性ラット、70匹を用いた。ラットは $22\pm 2$ °Cで12時間の明暗サイクルに管理されている飼育室において、1ケージ3~4匹ずつ飼育された。飼料（動物実験用標準固形飼料MF, オリエンタル酵母工業, 日本）と水はそれぞれ自由摂取させた。

## (2) 尾部懸垂モデルおよび脊髄切断モデル

### 尾部懸垂モデル

尾部懸垂にはMorey-HoltonとWronski（1981）の方法を改良したものを  
用いた。6週齢のラットの尾部を傷つけないために伸縮性テープを尾の  
中央付近まで巻いた。その上からさらに針金とともに伸縮性テープを巻  
いた。ラットの後肢が地面に届かない高さで針金を飼育用ケージの天井  
中央に固定した。針金とケージの固定部分に寄り戻しをつけることによ  
って、ラットは前肢を使用し自由にケージ内を360° 動くことが可能であ  
った。尾部懸垂の期間は1週間と3週間とした。

### 脊髄切断モデル

脊髄切断の方法はRoyら（1984）やSmithら（1982）の方法を参考にし  
た。麻酔下において3週齢のラットの背部を切開し、脊髄を露出させた。  
脊髄切断ではT12と13の間を切断した。手術後に脊髄の癒着を防ぐため  
に、滅菌したプラスチック板を切断部位に挿入した。術後、傷口を絹糸  
で縫合し、傷口が化膿しないようにペニシリンを注射した。コントロー  
ルに対しては脊髄を露出するまでの偽手術を行った。脊髄切断後の飼育  
期間は3週間とした。3週間後に脊髄切断群の解剖を行った際に、脊髄の  
癒着がないことと、ヒラメ筋と足底筋の筋重量が低下していることを確  
認した。

### (3) 生化学的分析

尾部懸垂モデルならびに脊髄切断モデルにおいて、分析の対象とした筋はヒラメ筋と足底筋であった。各処置期間終了後、ヒラメ筋と足底筋を摘出した。それぞれの筋重量を測定した後、液体窒素にて直ちに瞬間凍結を行い、 $-80^{\circ}\text{C}$ 下で保存した。Mb濃度の測定には実験3と実験5と同様の方法を用いた。

### (4) 統計処理

統計量は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。グループ間の比較には、二元配置の分散分析を用い（時間、処置群 vs コントロール群）、分散に有意差が認められた場合にはpost-hoc testとしてShefféの有意差検定を行った。有意水準を5%未満に設定した。

## 3. 結果

### 尾部懸垂モデル

尾部懸垂モデルにおける、各群のヒラメ筋および足底筋の筋重量を表IX-1に示した。ヒラメ筋の筋重量は尾部懸垂1週間目において同週齢のコントロールに対して-28.3% ( $P<0.01$ )、3週間目において-58.1% ( $P<0.01$ )の有意な低値を示した。また、足底筋は尾部懸垂1週間目、3週間目において、コントロールに対してそれぞれ、-22.3%、-31.0%の有意な低値を示した。体重に対する筋重量の割合 ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) は、ヒラメ筋において懸垂3週間目で有意な低下を示した (-48.7%,  $P<0.01$ )。一方、足底筋のそれも懸垂3週間目において-15.9%の有意な低下を示した ( $P<0.01$ )。

**Table IX-1.** Mean body mass and mean muscle mass in the hindlimb suspension study.

<u>groups</u>	<u>n</u>	<u>age</u> (weeks)	<u>body mass</u> (g)	<u>muscle mass (mg)</u>		<u>muscle mass/body weight (mg·g<sup>-1</sup>)</u>	
				m. soleus	m. plantaris	m. soleus	m. plantaris
Cont-0	10	6	328.5±27.7	122.9±11.0	290.6±22.3	0.38±0.02	0.89±0.04
Cont-1	10	7	366.0±18.1	133.1±8.9	312.1±24.6	0.37±0.03	0.86±0.08
Cont-3	10	9	386.8±17.1	148.5±6.0	337.6±14.4	0.39±0.03	0.88±0.07
Sus-1	7	7	297.9±11.5**	95.4±12.4**	242.6±8.7**	0.32±0.05	0.82±0.04
Sus-3	9	9	316.4±10.8**	62.2±9.3**	233.1±15.3**	0.20±0.03**	0.74±0.05**

Values are means±SD. m: muscle, Cont: control rats, Sus: hindlimb suspended rats.

An asterisk is representing a significant difference between Sus group and its age-matched control group (\*\*: P<0.01).

ヒラメ筋のMb濃度は尾部懸垂1週間目において+12.2%、3週間目においては+6.3%の高値を示したが統計的な有意差は認められなかった（図IX-1）。一方、足底筋のMb濃度は懸垂1週間目において+20.0%の有意な高値（ $P<0.05$ ）を示したものの、懸垂3週間目の+13.1%の高値には有意差が認められなかった（図IX-1）。

筋全体に含まれるMbタンパクの総量の変化を図IX-2に示した。ヒラメ筋のMb含量は尾部懸垂3週間目において-55.4%の有意な低値を示した（ $P<0.01$ ）。また、足底筋のMb含量も懸垂3週間目において-21.7%の有意な低値を示した（ $P<0.01$ ）。

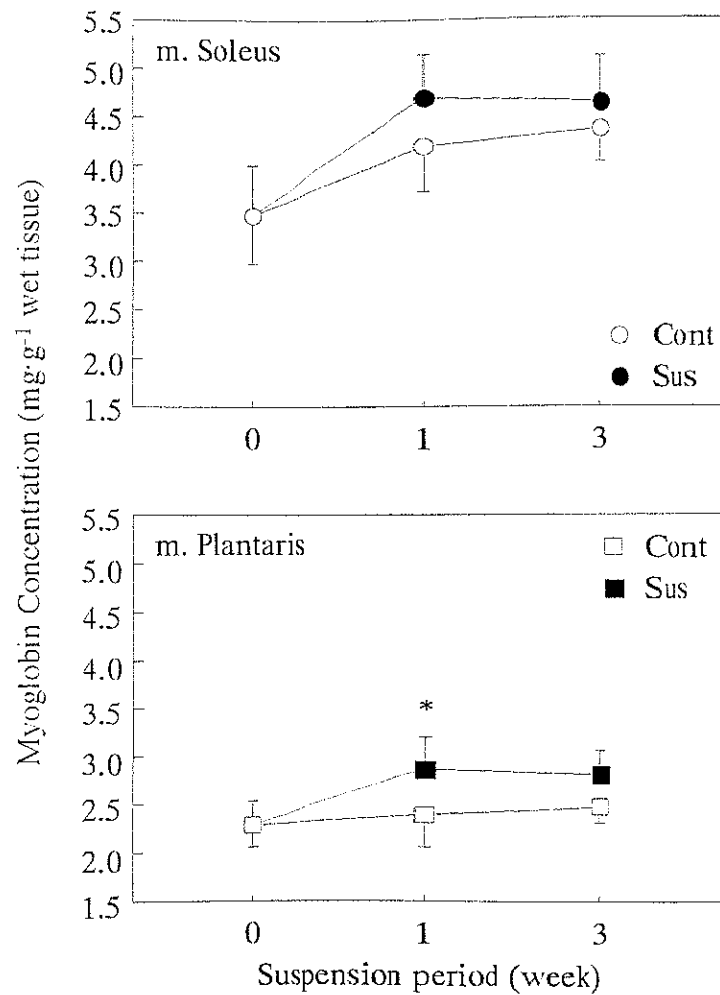
#### 脊髓切断モデル

各群のヒラメ筋および足底筋の筋重量を表IX-2に示した。ヒラメ筋および足底筋の筋重量は脊髓切断によってそれぞれ、-70.5%、-72.5%の有意な低値を示した（ $P<0.01$ ）。また、STの体重に対する筋重量の割合（ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ）は、ヒラメ筋において-60.0%（ $P<0.01$ ）、足底筋において-64.0%（ $P<0.01$ ）の有意な低下を示した。

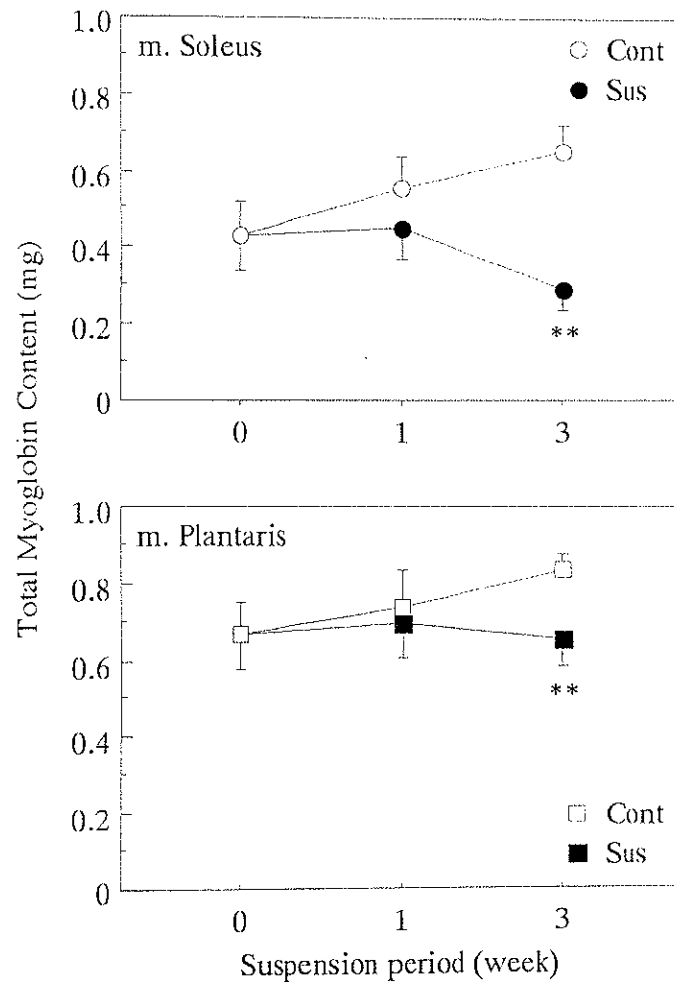
Mb濃度はヒラメ筋、足底筋においてそれぞれ-17.2%（ $P<0.05$ ）、-22.9%（ $P<0.05$ ）の有意な低値を示した（図IX-3）。筋全体に含まれるMb量は、ヒラメ筋において-74.8%（ $P<0.01$ ）、足底筋において-77.8%（ $P<0.01$ ）の有意な低下を示した（図IX-4）。

#### 4. 考察

尾部懸垂や脊髓切断によって、収縮特性や代謝特性の変化が生じる（Roy et al. 1991a）。その中でも筋の萎縮は最も代表的な変化の1つで



**FigureIX -1.** Changes in myoglobin concentration of m. soleus and m. plantaris induced by the hindlimb suspension. Cont: control group, Sus: hindlimb suspended rat. An asterisk is representing a significant difference between Sus group and its age-matched control group (\*:  $P < 0.05$ ). Values are means  $\pm$  SD.



**FigureIX-2.** Changes in total myoglobin content of m. soleus and m. plantaris induced by the hindlimb suspension. Cont: control group, Sus: suspended rat. An asterisk is representing a significant difference between Sus group and its age-matched control group (\*\*:  $P < 0.01$ ). Values are means  $\pm$  SD.

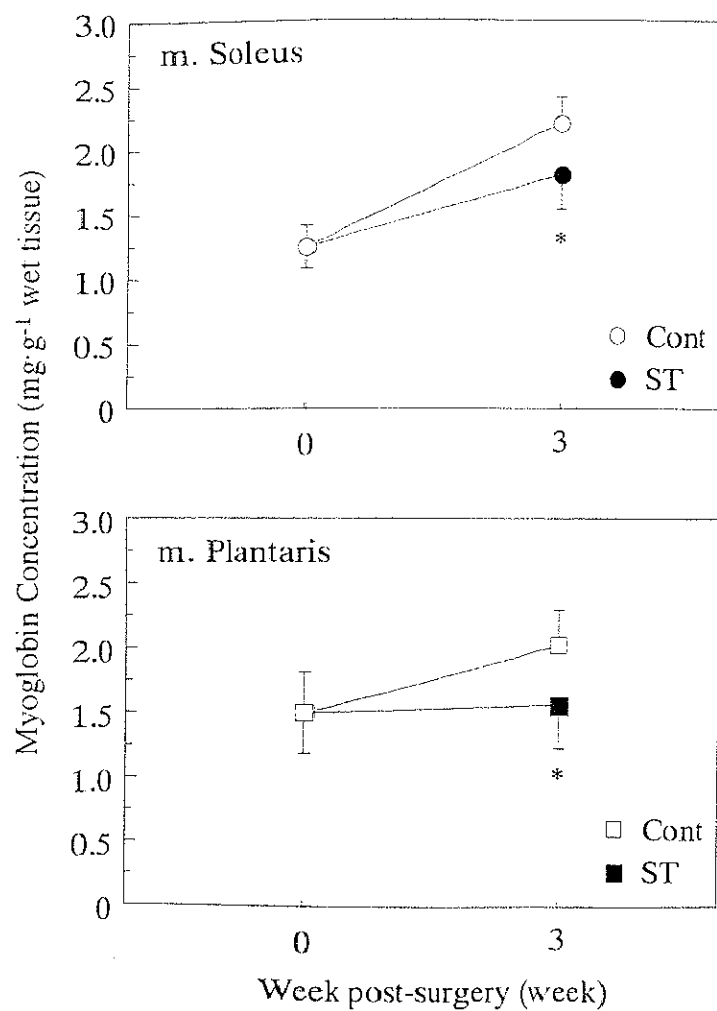


**Table IX-2.** Mean body mass and mean muscle mass in the spinal transection study.

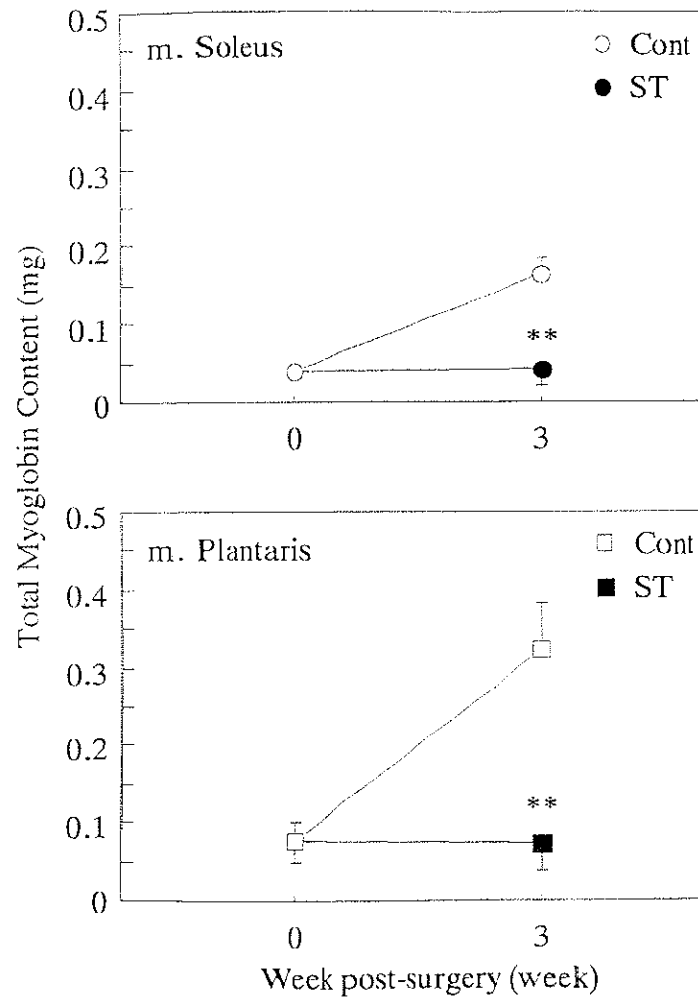
groups	n	age (weeks)	body mass (g)	muscle mass (mg)		muscle mass/body weight (mg·g <sup>-1</sup> )	
				m. soleus	m. plantaris	m. soleus	m. plantaris
Cont-0	6	3	37.0±2.0	30.6±3.4	49.1±10.2	0.83±0.11	1.32±0.26
Cont-3	9	6	212.7±6.7	73.8±5.3	160.0±14.4	0.35±0.02	0.75±0.04
ST-3	9	6	160.4±14.5**	21.8±9.4**	44.0±12.3**	0.14±0.06**	0.27±0.07**

Values are means±SD. m: muscle, Cont: control rats, ST: spinal transected rats

An asterisk is representing a significant difference between ST group and its age-matched control group (\*\*: P<0.01).



**Figure IX-3.** Changes in myoglobin concentration of m. soleus and m. plantaris induced by the 3-week spinal transection. Cont: control group, ST: spinal transected rat. An asterisk is representing a significant difference between ST group and its age-matched control group (\*:  $P < 0.05$ ). Values are means  $\pm$  SD.



**Figure IX-4.** Changes in total myoglobin content of m. soleus and m. plantaris induced by the 3-week spinal transection. Cont: control group, ST: spinal transected rat. An asterisk is representing a significant difference between ST group and its age-matched control group (\*\*:  $P < 0.01$ ). Values are means  $\pm$  SD.

ある。本実験でも、尾部懸垂ならびに脊髄切断によって筋の萎縮が生じ、それに伴って筋に含まれるMbタンパク量が減少した（図IX-2と図IX-4）。さらに筋重量当たりのMb濃度は尾部懸垂モデルではコントロールよりも一時的に高くなる傾向を示し、その後、3週目においてコントロールレベルに帰着する傾向を示した（図IX-1）。このことは、尾部懸垂3週間目において、筋全体に含まれるMbタンパクの総量は萎縮の程度と同等に減少したことを示唆している。一方、脊髄切断によるMb濃度の変化は、その処置によって発育によるMb濃度の上昇を有意に抑制するという結果であった（図IX-4）。

尾部懸垂と脊髄切断によるMbの変化の違いはどうして生じたのであろうか？尾部懸垂は神経活動は維持されたまま、筋への機械的負荷（体重支持）がなくなる（Roy et al. 1991a）。また、筋線維タイプが速筋方向へ移行することからも、インパルスパターンが緊張性から相同性へ変化する可能性も示唆されている（Blewett & Elder 1993, Riley et al. 1990）。そのような変化は日常、緊張性のインパルスを受けているヒラメ筋で生じるであろう。一方、脊髄切断モデルは、その処置によって筋への遠心性インパルスはほとんど消滅する（Roy et al. 1984）。したがって、尾部懸垂と脊髄切断の大きな違いの1つには神経活動の有無が挙げられる。さらに、本実験の結果から判断すると、Mbタンパクの合成/分解には筋の張力負荷よりも神経活動の方が強く影響を及ぼしている可能性が考えられる。すなわち、神経活動が維持されているならばMbタンパクの分解が加速しにくいと思われる。また、たとえインパルスパターンが緊張性から相同性へ変化したとしても、Mbに対するその影響力はインパルスが消失することよりも小さいのかもしれない。McPhersonとTokunaga（1967）は6ヶ月間の交叉神経支配によって元々遅筋だった筋のMb濃度

が減少したことを報告し、支配神経の特性が筋の生化学的特性も変化させることを示唆した。したがって、仮に尾部懸垂によって、インパルスのパターンが変化していたとしても本実験で行った3週間という懸垂期間はMb濃度に影響を及ぼすには短かったと考えられる。

遅筋型のヒラメ筋と速筋型の足底筋のMbの変化について比較してみると、尾部懸垂による筋重量の変化は足底筋よりもヒラメ筋の方が大きかった。しかし、脊髄切断による筋重量の変化は両方の筋で同程度であった。Mbタンパクの量の変化についても同様の傾向であった。これらのことは、通常、ヒラメ筋は抗重力筋として非常に活動レベルが高い（Hutchinson et al. 1989, Saltin & Gollnick 1983）ために、遅筋型の筋の筋重量やMbタンパクの方が不活動の影響を受けやすいことを示唆している。

## 5. 要約

本実験では、尾部懸垂と脊髄切断による張力負荷および神経筋活動の減少が、ラットの下肢骨格筋のMb濃度に及ぼす影響を検討した。得られた結果は以下の通りである。

- ① 筋重量は尾部懸垂、脊髄切断の両処置によって減少した。
- ② 尾部懸垂によるヒラメ筋のMb濃度は、懸垂1週間目において高値を、その後コントロールレベルに戻る傾向を示したが、統計的有意差は認められなかった。ただし、懸垂3週間目において、ヒラメ筋に含まれるMbの総量はコントロールよりも低値を示した。
- ③ 尾部懸垂による足底筋のMb濃度は懸垂1週間目においてコントロールよりも有意に高値を示したが、3週間目ではコントロール値と同

様であった。また、足底筋に含まれるMbの総量は、懸垂3週間目においてコントロールよりも低値を示した。

- ④ 3週間の脊髄切断によるヒラメ筋と足底筋のMb濃度はコントロールに比べ有意に低下した。また、ヒラメ筋や足底筋に含まれるMbの総量も脊髄切断群において有意に低値を示した。

以上の結果より、不活動によって、骨格筋のMbタンパクの減少が生じ、Mb濃度の低下を引き起こす可能性が示唆された。また、張力負荷と筋収縮活動（神経活動）のうち、筋収縮活動の減少の方がMbタンパクの減少をより大きく引き起こす可能性が示唆された。そして不活動は、速筋型の筋よりも遅筋型の筋のMbへより大きく影響を及ぼすであろう。

## X. 討論

組織への酸素運搬についての研究は古くから行われてきた。August Kroghは1900年初頭に酸素拡散概念を発表し、酸素は毛細血管から筋細胞内へ単純拡散すると唱えた。しかしながら、筋組織への酸素運搬は血流、毛細血管、Ht、Hbの酸素飽和度、酸素拡散率などを含む様々な要因によって制御されており（Popel 1989）、近年発表された微小循環における酸素運搬のモデル（Bicudo et al. 1996, Clark & Clark 1986, Groebe 1990, Hoofd & Turek 1994, 1996）は、それらの要因をできるだけ考慮して作られている。しかしながら、今日においても末梢での酸素運搬モデルはいくつかの単純化された推測を基に作られており、その単純化の1つとしてMbの役割が無視されている。このことは、Mbが筋細胞内において酸素の貯蔵（Theorell 1934）、促進拡散（Wittenberg 1970）などの役割を担っていると考えられているものの、実際の生体内でMbに結合した酸素がどのように利用されているのか、あるいはMbがどのように筋細胞内への酸素流入に寄与しているのか、さらには組織中でのMbの濃度や分布状況について十分に解明されていないためである。したがって、本研究では活動条件によるMb濃度の変化を明らかにすることを目的とし、Mbの量的変化の側面から組織での酸素運搬に対するMbの重要性を示唆しようとした。

本研究から得られた新しい知見は、①Mb濃度が全身の有酸素的作業能力、あるいは筋の酸化能力と関わりを持っていること（実験1）、②適切な設定条件の持久的走トレーニングによってMb濃度は上昇すること（実験2, 3）、③トレーニングによって肥大した筋においてもMb濃度が維持されていること（実験4, 5）、④張力負荷の減少に神経筋活動の減

少が加わるとMbの分解が加速し、Mb濃度の低下が生じること（実験6）、である。これらの知見から、Mb濃度は筋の活動刺激に応じて制御されていると結論づけられる。

#### *Mbを増加させる要因*

Mbのタンパク発現を引き起こす要因には、低酸素化（Reynafarje 1962, Terrados et al. 1990, Wittenberg 1970）や持続的な筋収縮（Beyer & Fattore 1984, Harms & Hickson 1983, Hickson 1981）などが考えられているものの、実際にどういう機序によってMbの合成が行われているのかについてはほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では、筋の活動刺激によるMb濃度の変化について検討し、Mbの合成に関与する因子を間接的に探ることも目的としていた。持久的筋活動（実験1-3）、あるいは筋肥大を誘発するような高強度筋活動（実験4, 5）ではMbタンパクの合成が亢進する可能性が示唆され、反対に活動量の減少（実験6）ではMbタンパクの合成の抑制（分解の亢進）が示唆された。では、活動刺激由来のなにがMbの遺伝子プロモーターに作用するのであろうか？

1つ目はインパルスの量・頻度・パターンである。交叉神経支配モデルで速筋に遅筋型の神経を支配させるとその速筋内のMb濃度が上昇する（McPherson & Tokunaga 1967）。また、最近、カルシウム情報伝達にもインパルスのパターンが影響を及ぼしている可能性が示唆され、そのことに起因して筋線維タイプが決定される可能性が報告されている（Chin et al. 1998）。その中で、緊張性のインパルスパターンを受けた筋（遅筋線維）においてMbの遺伝子プロモータが活性化していることが明らかにされた（Chin et al. 1998）。したがって、持久的な筋活動を行うこと（実験3）によって筋は緊張性のインパルスを受け、そのことによって



Mb濃度の上昇が引き起こされると考えられる。

2つ目は筋細胞内の低酸素化（酸素不足化）である。筋収縮中に運動強度の上昇に伴ってMbの飽和度の低下が生じる（Honig et al. 1991, Richardson et al. 1995）。そして、Mbの脱酸素化は運動開始直後から生じる（Richardson et al. 1995）。このMbの脱酸素化は、運動によってミトコンドリアでの酸素利用が亢進したためと考えられるが、Mbの脱酸素化は次の点で意義深いものと考えられる。

①筋細胞内の $P_{O_2}$ が非常に低くなる（e.g. Theorell 1934）

②Mbの促通拡散による酸素流量を増す（Honig et al. 1991）

Hbから筋細胞内までの間には血漿、内皮細胞、細胞外液、筋細胞膜などがあり、それぞれには酸素を輸送する担体が存在しないため、Hbによって運ばれた酸素は筋細胞内へ入るために単純拡散しなければならない（Honig et al. 1984）。単純拡散には濃度勾配が必要であるため、 $P_{capO_2}$ よりも筋細胞内の $P_{O_2}$ は低くならなければならない。そこで酸素と特異的に結合するMbの存在が重要となる。Mbの酸素解離曲線から理解できるように、Mbが脱酸素化する $P_{O_2}$ は非常に低い（Theorell 1934）。したがって、Mbの脱酸素化によって毛細血管と筋細胞内の間に大きな $\Delta P_{O_2}$ が生じ、筋細胞内への酸素の拡散流入が促進されるのである（Braulin et al. 1986, Wittenberg & Wittenberg 1975）。

また、Mbの重要な役割である酸素促通拡散は、Mbが完全飽和している状態では行われず（Wittenberg 1970）。促通拡散が行われるためには、ある物質（例えば酸素）に特異的な担体（この場合はMb）が自由でなければならない（結合してはならない）、しかも、担体が高濃度であるほど拡散初速度は速くなる。したがって、Mbによって運ばれる酸素をより多くするためには、活動筋内に高濃度でMbが存在し、かつ、Mb

が脱酸素化していることが酸素運搬の機序にとって重要なことと考えられる。

ところで、末梢組織内の酸素不足状態はミトコンドリアでの酸素需要に対して毛細血管やMbによる酸素供給量に不均衡が生じたときに起こりうると考えられる。毛細血管はその数を増加させたり、その内腔面積を拡大することによって筋線維との接触面積を拡大し、毛細血管から筋細胞内への酸素拡散流入を容易にするように適応を生じさせる（狩野 1997）。ミトコンドリアは代謝経路の諸酵素のタンパクを増加させ、その活性値を上昇させることによってエネルギー産生を円滑にするように適応する（Saltin & Gollnick 1983）。それに対し、Mbはそのタンパクの量を増やすことによって酸素の貯蔵量を増し、Mbによる酸素の担体輸送能力も向上させることによって、酸素需要に応えようとする（実験3）。 $\dot{V}O_2$ は $DO_2$ や $P_{capO_2}$ に影響され（Wagner 1988）、 $DO_2$ は $\dot{V}O_{2max}$ の上昇に関与している（Roca et al. 1992）。 $DO_2$ はHbに関連する要因の他、毛細血管数や拡散距離、そしてMbによって影響される（Kurdak et al. 1995）。トレーニングを行った結果、酸素を運搬、利用する諸器官のどこに適応が生じるのかは、筋の特性によって異なると考えられるが、この点は今後明らかにされていかなければならない問題と思われる。

実験2では低圧環境下でのトレーニングを行い、2500 m相当の低酸素状態がMbに及ぼす影響を検討したが、Mbに適応は生じなかった。対照的に、 $\dot{V}O_{2max}$ やミトコンドリア、毛細血管数が上昇した。しかしながら、高地住民のMb濃度が高い（Reynafarje 1962, Wittenberg 1970）ことから、低酸素化がMbの合成刺激である可能性は否定できない。今後、より高い標高でのトレーニングと、その環境に、より長期間暴露した時のMbの変化について検討しなければならないだろう。

### 有酸素的代謝能力とMb濃度、および持久的な筋活動の影響

哺乳類の異なる骨格筋を調べた結果、Mb濃度とCS活性との間（増田&勝田 1998）および毛細血管密度との間（Reis & Wooten 1970）に密接な関係が認められている。これらは、筋の有酸素的代謝能力が高い筋ほどMb濃度が高いことを示唆しているものであるが、動物の様々な筋を横断的に調べた結果なのでヒトの特定の骨格筋（例えば外側広筋）に直接当てはめることには問題があると思われる。そこで、有酸素的作業能力に差があると思われる成人男性を対象に、外側広筋のMb濃度を測定した（実験1）。その結果、有酸素的代謝能力の高い者ほど、骨格筋Mb濃度が高いという傾向が認められた。この事実は、Mbに関しての初めての知見である。さらにこの知見は、スポーツ科学領域において、Mb濃度に対する筋活動の影響を検討する意義を提示してくれている。

Mb濃度と有酸素的代謝能力の横断的な関係（実験1）がトレーニングによって生じたものなのか、あるいは先天的に決定されているものなのかを明らかにする必要がある。そこで、非鍛錬者を対象に8週間に渡って、70% $\dot{V}O_2$ max強度の持久性トレーニングを行ったが、持久性トレーニングによって $\dot{V}O_2$ max、毛細血管数、CS活性の上昇が生じたにも関わらず、Mb濃度は変化しなかった。このことは、70% $\dot{V}O_2$ max強度の持久的筋活動はMb濃度を上昇させるには不十分であった可能性がある。さらに、ヒトの骨格筋Mb濃度は他の動物の骨格筋（参照: 先行研究, 実験3）のものと比較しても高いレンジにある。このことは、ヒトの外側広筋は元々高濃度のMbを含有し、Mbの適応レンジの上限に近い状態にあるとも解釈できる。したがって、トレーニング刺激がMbの遺伝子プロモーターに作用しにくいのかかもしれない。この時の有酸素的作業能力の向上はMbよ

りもミトコンドリアでのATP産生能力の向上や毛細血管数の増加による筋組織への灌流能力の向上が関与していることを示唆している。

Mb濃度を上昇させる至適運動条件を見つけだすために、運動強度、時間、期間を変えてトレーニングを行った（実験3）。その結果、運動強度、運動時間の増加に伴ってMb濃度が上昇した。さらにMbの適応期間はミトコンドリアの酸化系酵素活性の適応よりも遅延する傾向にあった。さらに、筋間で比較してみると、元々Mb濃度の高い筋（赤筋）はそれとは反対に濃度の低い筋（白筋）に比べて変化率が小さい傾向にあった。すなわち、元々Mb濃度が高いレベルにある赤筋では、Mbがその適応レンジの上限に近い濃度で存在しており、持続的な活動刺激を加えても変化しにくいことが考えられる。もしそうだとすると、ヒトの骨格筋のMb濃度が増えなかったこと（実験2）は、対象としたヒトのMb濃度が高かったことが原因の1つに考えられる。持久性トレーニングに参加した被験者のMb濃度は約 $4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ wet tissue}$ 以上であり（実験2）、このレベルは実験3で変化しにくかった赤筋のMb濃度レベルに相当する。また8週間というトレーニング期間もMb濃度の変化を生じさせなかった原因かもしれない。ラットの走トレーニング（実験3）では、Mb濃度の適応が生じるにはより長い期間が必要であった。ラットのライフスパンを考えると（藤原 1966）、ラットに行ったトレーニング期間はヒトのトレーニング期間に直接応用することは困難であるが、ヒトの何倍も長い期間に相当すると考えられる。したがって、実験2で行った運動条件よりもより高強度で、しかも長期間に渡って行えば、ヒトのMb濃度も増える可能性はあるだろう。

*Mb濃度に対する高強度な筋活動の影響*

高強度運動を継続的に行うと、その適応の1つとして筋肥大が生じる（Kraemer & Fleck 1988）。筋の肥大は物理的に筋内の酸素拡散領域を拡大する。また、筋の形態変化が生じる場合においてMbのタンパク量が変化しなかったら、その筋細胞内のMb濃度が変動し、それとともにMbによる酸素運搬・貯蔵能力が影響されることが考えられる。このことは、筋の $\dot{V}O_2$ に影響を及ぼす $DO_2$ （Wagner 1988）を変化させると考えられる。先行研究ではMbの濃度変化は持久的な筋活動について調べたものが多く、本研究のように筋の形態的变化を伴うような筋活動についてMbを研究したものはない。ヒト（実験4）、ラット（実験5）の骨格筋において、肥大した筋においてもMb濃度が維持されていた。肥大した筋においてもMbによる酸素運搬能力が維持されていることを示唆しており、末梢での酸素運搬機序を研究する上で、重要な知見であると思われる。

#### *Mb濃度に対する活動量の減少の影響*

活動量の増加（実験2, 3）あるいは高負荷の活動刺激（実験4, 5）に対してMbはそのタンパク量を増加させていた。したがって、活動量の減少にともなってMbタンパクが減少し、その濃度低下が生じることは想像に易い。本研究ではそのことを確かめるためにラットの実験モデルを使用した（実験6）。1つ目のモデルは尾部懸垂モデルであり、主に張力負荷を減少させるモデルである（Morey-Holton & Wronski 1981）。このモデルでは神経筋の連結は正常であり、懸垂中に収縮活動も行われている。もう1つは脊髄切断モデルであり、神経筋の結合は正常であるが、遠心性のインパルスのお大半が消失する（Roy et al. 1984）。実験の結果、尾部懸垂モデルではMb濃度の有意な低下は観察されなかったが、脊髄切断によってMb濃度の低下が生じた。このことは張力の負荷の減少のみでは、

Mbの分解が加速されず、収縮タンパクの減少と並行して生じていることを示唆するものである。一方、脊髄切断のモデルの結果は、Mb濃度の維持にはインパルスの有無が強く関与していることを示唆するものである。すなわち、遠心性のインパルスが消失することによって生じたMb濃度は、その生体が必要な酸素貯蔵量、あるいは酸素を拡散運搬するのに必要な最低限度のレベルであることが考えられる。

最後に、本研究は実験の制約上、ヒトの骨格筋で得られた現象をラットの骨格筋でより詳細に検討するという手段を用いた。動物実験の結果をヒトに応用するには注意が必要と思われるが、将来的に、本研究で得られたMbの量的変化の知見がスポーツ科学の発展に寄与することを願わずにはいられない。

## XI. 総括

本研究では活動刺激が骨格筋のMb濃度に及ぼす影響を検討することを目的として、以下の実験を行った。

### 実験1. ヒトの骨格筋のミオグロビン濃度と有酸素的代謝能力との関係－トレーニング状態の影響－

本実験は骨格筋のMb濃度レベルと有酸素的作業能力、あるいはミトコンドリアの酸化能力との関係を明らかにすることを目的として、以下の結論を得た。

持久性競技選手のMb濃度は、運動習慣のない一般成人のものよりも高値であり、さらにMb濃度と $\dot{V}O_2\text{max}$ 、およびCS活性との間に有意な正の相関関係が認められた。これらのことにより、ヒトの骨格筋においてもMb濃度は、有酸素的代謝能力を支える要因の1つである可能性が示唆された。

### 実験2. 持久性トレーニングによる骨格筋ミオグロビン濃度の変化

本実験では、70% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の持久性トレーニングが非鍛錬者のMb濃度を上昇させるか、さらに、低圧環境がMb濃度を上昇させる因子となりうるのかについて検討した。

持久性トレーニングによってCS活性と毛細血管数（C/F ratio）は有意に増加したものの、Mb濃度は変化しなかった。さらに、いずれの測定項目の変化率に対してもトレーニング環境の違いは影響しなかった。以上のことから、70% $\dot{V}O_2\text{max}$ 強度の持久性トレーニングでは、全身的な有酸素性作業能力が向上するものの、Mb濃度は上昇しにくいことが明らかと

なった。さらに、2500 m相当の低圧環境はMb濃度の上昇を引き起こすほどの低酸素刺激ではなかったことが示唆された。

### **実験3. 持久性トレーニングによるラットの骨格筋ミオグロビン濃度の変化－強度・時間・期間の影響－**

本実験では、持久性トレーニングの条件（強度・時間・期間）がラット下肢筋のMb濃度の変化に与える影響を明らかにすることを目的とし、以下の結論を得た。

ヒラメ筋、腓腹筋深層部、足底筋において、強度と時間に対して依存的にMb濃度が上昇した。また、Mb濃度はCS活性と比較して最大適応を得るためのトレーニング期間が長くなる傾向にあった。以上のことから、Mbの最大適応を得るためには走運動の強度をより高く、時間と期間をより長く設定する必要があることが明らかとなった。

### **実験4. レジスタンストレーニングが骨格筋のミオグロビン濃度に及ぼす影響**

本実験では、レジスタンストレーニング（RT）を行い、骨格筋のMb濃度の変化を検討した。また、RTのプロトコルの違いがMb濃度に及ぼす影響についても検討した。

RTによって各タイプの筋線維は肥大し、その肥大率にはプロトコルの違いが現れた。また、CSには筋の肥大による希釈効果と考えられる活性値の低下が生じていたが、Mb濃度はRT前後で有意に変化しなかった。これらことから、肥大した筋においてMb濃度が維持されていたことは、RTによってMbの合成が亢進したためと考えられる。



## 実験5. 代償性筋肥大の過程における骨格筋ミオグロビン濃度の変化

筋肥大が生じる過程におけるMb濃度の変化を明らかにするために、ラットの代償性筋肥大モデルを用いてMb濃度の経時的变化を観察し、以下の結論を得た。

筋切除初期には筋の浮腫の影響を受けたと思われるMb濃度（筋湿重量当たり）の低下傾向が観察された。しかし、術後42日目にはコントロールレベルまで回復した。また、タンパク重量当たりのMb濃度は実験期間を通してコントロールと同様であった。これらのことから、収縮タンパクの合成に並行してMbが合成されていたことが明らかとなった。さらに、筋肥大の過程において、筋内の酸素運搬、貯蔵能力はコントロールレベルに維持されると考えられる。

## 実験6. 不活動モデルにおける骨格筋ミオグロビン濃度の変化

本実験では、尾部懸垂と脊髄切断による張力負荷および神経筋活動の減少が、ラットの下肢骨格筋のMb濃度に及ぼす影響を検討し、以下の結論を得た。

尾部懸垂によってヒラメ筋と足底筋の萎縮が生じたにも関わらず、Mb濃度は変化しなかったが、脊髄切断においてはより大きな筋萎縮とMb濃度の低下が認められた。以上のことより、張力負荷の減少のみではMbの分解が促進されないものの、神経活動の減少はMbの分解を加速させる可能性が示唆された。

以上の実験から得られた新しい知見は、①Mb濃度が全身の有酸素的作業能力、あるいは筋の酸化能力と関わりを持っていること、②適切な設定条件の持久的走トレーニングによってMb濃度は上昇すること、③トレーニングによって肥大した筋においてもMb濃度が維持されていること、④張力負荷の減少に神経筋活動の減少が加わるとMbの分解が加速し、Mb濃度の低下が生じること、である。これらの知見から、Mb濃度は筋の活動刺激がもたらす、酸素需要、形態、神経筋活動（インパルス）の変化に応じて制御されていると結論づけられる。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始懇切丁寧な御指導を賜りました筑波大学体育科学系 勝田 茂 教授に深甚なる謝意を表します。また、本稿の作成に際して御校閲を賜りました筑波大学体育科学系 浅野勝己 教授、西平 賀昭 助教授に心から感謝の意を表します。さらに、筋生検において執刀して頂いた筑波大学体育科学系 下條仁士 講師、本稿に対する多くの御助言を賜りました西南女学院大学保健福祉学部 稲本光晴 講師、電気通信大学保健体育学教室 狩野 豊 講師、中村学園大学家政学部 中野裕史 助手をはじめ諸先生方に厚く御礼申し上げます。最後に、実験に際して御協力を頂いた横浜市立大学理学部 野坂和則 助教授ならびに勝田研究室の皆様心から御礼申し上げます。

## 引用文献

- Adams GR, Hather BM, Baldwin KM and Dudley GA (1993) Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J. Appl. Physiol.* 74: 911-915.
- Alaimo MA, Smith JL, Roy RR and Edgerton VR (1984) EMG activity of slow and fast ankle extensors following spinal cord transection. *J. Appl. Physiol.* 56: 1608-1613.
- Alford EK, Roy RR, Hodgson JA and Edgerton VR (1987) Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension. *Exp. Neurol.* 96: 635-649.
- Allemeier CA, Fry AC, Johnson P, Hikida RS, Hagerman FC and Staron RS (1994) Effects of sprint cycle training on human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 77: 2385-2390.
- Andersen P (1975) Capillary density in skeletal muscle of man. *Acta Physiol. Scand.* 95: 203-205.
- Antonini E (1965) Interrelationship between structure and function in hemoglobin and myoglobin. *Physiol. Rev.* 45: 123-170.
- Appell HJ (1990) Muscular atrophy following immobilization. A review. *Sports Med.* 10: 42-58.
- 浅野勝己 (1997) 高所トレーニングはなぜ有効か. *遺伝* 51: 22-29.
- Askmark H, Carlon M and Roxin LE (1984) Myoglobin in rat hind limb muscles after denervation and during reinnervation. *Muscle Nerve* 7: 656-661.
- Åkeson Å, Ehrenstein GV, Hevesy G and Theorell H (1960) Life span of myoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* 91: 310-319.
- Bailey JR and Driedzic WR (1986) Function of myoglobin in oxygen consumption by isolated perfused fish hearts. *Am. J. Physiol.* 251: R1144-

R1150.

Bergström J (1962) Muscle electrolytes in man. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 68: 11-13.

Beyer RE and Fattore JE (1984) The influence of age and endurance exercise on myoglobin concentration of skeletal muscle of the rat. *J. Gerontol.* 39: 525-530.

Bicudo JEPW, Longworth KE, Jones JH, Taylor CR and Hoppeler H (1996) Structural determinants of maximal O<sub>2</sub> transport in muscles of exercising foxes. *Respir. Physiol.* 103: 243-251.

Blewett C and Elder GCB (1993) Quantitative EMG analysis in soleus and plantaris during hind limb suspension and recovery. *J. Appl. Physiol.* 74: 2057-2066.

Braunlin EA, Wahler GM, Swayze CR, Lucas RV and Fox IJ (1986) Myoglobin facilitated oxygen diffusion maintains mechanical function of mammalian cardiac muscle. *Cardiovasc. Res.* 20: 627-636.

Brooke MH and Kaiser KK (1970) Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.* 23: 369-379.

Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R and Williams RS (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes. Dev.* 12: 2499-509.

崔 鳥淵, 増田和実, 村岡 誠, 下條仁士, 高松 薫 (1998a) 「パワーアップ型」と「バルクアップ型」筋力トレーニング手段のトレーニング効果の相違 (2) —筋の組織化学的特性および毛細血管分布に着目して—. *体力科学* 47: 189-198.

崔 鳥淵, 高橋英幸, 板井悠二, 高松 薫 (1998b) 「パワーアップ型」と「バルクアップ型」筋力トレーニング手段のトレーニング効果の相違 —筋断面積、筋力、無氣的パワーおよび無氣的持久力に着目して—. *体力科学* 47: 119-130.

- Clark AJ and Clark PAA (1986) The end-points of the oxygen path: transport resistance in red cells and mitochondria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 200: 43-47.
- Clark AJ, Clark PAA, Connett RJ, Gayeski TEJ and Honig CR (1987) How large is the drop in  $P_{O_2}$  between cytosol and mitochondrion? *Am. J. Physiol.* 252: C583-C587.
- Cole RP (1982) Myoglobin function in exercising skeletal muscle. *Science* 216: 523-525.
- Cole RP (1983) Myoglobin function in exercising skeletal muscle in hypoxia. *Biochem. Exerc.* 13: 815-820.
- Crockett JL and Edgerton VR (1975) Exercise and restricted activity effects on reinnervated and cross-innervated skeletal muscles. *J. Neurol. Sci.* 25: 1-9.
- Daly JFC, Little JM, Troxler RF and Lester R (1967) Metabolism of  $^3H$ -myoglobin. *Nature* 216: 1030.
- Davis JA, Frank MF, Whipp BJ and Wasserman K (1979) Anaerobic threshold alterations caused by endurance training in middle-aged man. *J. Appl. Physiol.* 46: 1039-1046.
- De Koning L, Hoofd JC and Kreuzer F (1981) Oxygen transport and the function of myoglobin. Theoretical model and experiments in chicken gizzard smooth muscle. *Pflügers Arch.* 389: 211-217.
- Degens H, Veerkanp JH, Van Moerkerk HTB, Turek Z, Hoofs LJC and Binkhorst RA (1993) Metabolic capacity, fibre type area and capillarization of rat plantaris muscle. Effects of age, overload and training and relationship with fatigue resistance. *Int. J. Biochem.* 25: 1141-1148.
- Delp MD and Duan C (1996) Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J. Appl. Physiol.* 80: 261-270.
- Desplanches D, Mayet MH, Sempore B and Flandrois R (1987) Structural and functional responses to prolonged hindlimbs suspension in rat muscle. *J. Appl. Physiol.* 63: 558-563.

- Doeller JE and Wittenberg BA (1991) Myoglobin function and energy metabolism of isolated cardiac myocyte: effect of sodium nitrite. *Am. J. Physiol.* 261: H53-H62.
- Dudley GA, Abraham WM and Terjung RJ (1982) Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 53: 844-850.
- Ellsworth M and Pittman R (1984) Heterogeneity of oxygen diffusion through hamster striated muscles. *Am. J. Physiol.* 246: H161-H167.
- Federspiel WJ (1984) The effect of myoglobin concentration on muscle cell  $Po_2$  gradients. *Adv. Exp. Med. Biol.* 180: 539-543.
- Federspiel WJ (1986) A model study of intracellular oxygen gradients in a myoglobin-containing skeletal muscle fiber. *Biophys. J.* 49: 857-868.
- Fell RD, Steffen JM and Musacchia XJ (1985) Effect of hypokinesia - hypodynamia on rat muscle oxidative capacity and glucose uptake. *Am. J. Physiol.* 249: R308-R312.
- Fleck SJ and Kraemer WJ (1987) *Resistance training sports. Designing resistance training programs*: Human Kinetics Book, USA. 215-233.
- Fishbach GD and Robbins N (1969) Changes in contractile properties of disused skeletal muscles. *J. Physiol.* 201: 305-320.
- 藤原 弘 (1966) マウス、ラットのdoubling timeについて. *獣医畜産新報* 430: 971-973.
- Fox EL (1979) *Sports Physiology*: W.B. Saunders Company, USA. 1-383.
- Gayeski TEJ, Connett RJ and Honig CR (1985) Oxygen transport in rest-work transition illustrates new functions for myoglobin. *Am. J. Physiol.* 248: H914-H921.
- Gayeski TEJ, Connett RJ and Honig CR (1987) Minimum intracellular  $Po_2$  for maximum cytochrome turnover in red muscle in situ. *Am. J. Physiol.* 252:

H906-H915.

- Gayeski TEJ and Honig CR (1983) Direct measurement of intracellular O<sub>2</sub> gradients: role of convection and myoglobin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 159: 613-621.
- Gayeski TEJ and Honig CR (1986) O<sub>2</sub> gradients from sarcolemma to cell interior in red muscle at maximal  $\dot{V}O_2$ . *Am. J. Physiol.* 251: H789-H799.
- Gayeski TEJ and Honig CR (1988) Intracellular Po<sub>2</sub> in long axis of individual fibers in working dog gracilis muscle. *Am. J. Physiol.* 254: H1179-H1186.
- Goldspink DF, Garlick PJ and McNurlan MA (1983) Protein turnover measured in vivo and in vitro in muscles undergoing compensatory growth and subsequent denervation atrophy. *Biochem. J.* 210: 89-98.
- Groebe K (1990) A versatile model of steady state O<sub>2</sub> supply to tissue – application to skeletal muscle. *Biophys. J.* 57: 485-498.
- Groebe K and Thews G (1986) Theoretical analysis of oxygen supply to contracted skeletal muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 200: 495-514.
- Groebe K and Thews G (1990) Calculated intra- and extracellular Po<sub>2</sub> gradients in heavily working red muscle. *Am. J. Physiol.* 259: H84-H92.
- Harms SJ and Hickson R (1983) Skeletal muscle mitochondria and myoglobin, endurance, and intensity of training. *J. Appl. Physiol.* 54: 798-802.
- Hather BM, Tesch PA, Buchanan P and Dudley GA (1991) Influence of eccentric actions on skeletal muscle adaptations to resistance training. *Acta Physiol. Scand.* 143: 177-185.
- Hickson RC (1981) Skeletal muscle cytochrome *c* and myoglobin, endurance and frequency of training. *J. Appl. Physiol.* 51: 746-749.
- Hickson RC, Overland SM and Dougherty KA (1984) Reduced training frequency effects on aerobic power and muscle adaptation in rats. *J. Appl. Physiol.* 57: 1834-1841.



- Hickson RC and Rosenkoetter MA (1981) Separate turnover of cytochrome *c* and myoglobin in red types of skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 241: C140-C144.
- Hodgson JA (1983) The relationship between soleus and gastrocnemius muscle activity in conscious cats – A model for motor unit recruitment. *J. Physiol.* 337: 553-562.
- Honig CR, Connett RJ and Gayeski TEJ (1992) O<sub>2</sub> transport and its interaction with metabolism; a systems view of aerobic capacity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24: 47-53.
- Honig CR, Gayeski TEJ, Federspiel W, Clark JA and Clark P (1984) Muscle O<sub>2</sub> gradients from hemoglobin to cytochrome: new concepts, new complexities. *Adv. Exp. Med. Biol.* 169: 23-38.
- Honig CR, Gayeski TEJ and Groebe K (1991) Myoglobin and oxygen gradients. *In The Lung. Scientific Foundations*: RG Crystal, JB West, PJ Barnes, NS Cherniack and ER Weibel (Eds), Raven Press, USA. 2: 1489-1496.
- Hoofd L and Turek Z (1994) The influence of flow redistribution on the calculated pO<sub>2</sub> in rat heart tissue. *Adv. Exp. Med. Biol.* 345: 275-282.
- Hoofd L and Turek Z (1996) Realistic modeling of capillary spacing in digastric muscle greatly influences the heterogeneity of calculated tissue oxygen pressures. *Adv. Exp. Med. Biol.* 388: 333-340.
- Howald H, Hoppeler H, Claassen H, Mathieu O and Straub R (1985) Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflügers Arch.* 403: 369-376.
- Hutchinson DL, Roy RR, Hodgson JA and Edgerton VR (1989) EMG amplitude relationships between the rat soleus and medial gastrocnemius during various motor tasks. *Brain Res.* 502: 233-244.
- Ianuzzo CD and Chen V (1979) Metabolic character of hypertrophied rat muscle. *J. Appl. Physiol.* 46: 738-742.
- Inbar O, Bar OO and Dotan R (1976) Aerobic and anaerobic components of a

thirty second supramaximal cycling task. *Med. Sci. Sports Exerc.* 8: S51.

石原昭彦, 勝田 茂, 藤田紀盛 (1984) 発育にともなうラット神経、筋組織の組織化学的特性の変化について. *体育学研究* 29: 125-133.

Jacobs I, Esbjörnsson M, Sylvé C, Holm I and Jansson E (1987) Sprint training effects on muscle myoglobin, enzymes, fiber types, and blood lactate. *Med. Sci. Sports Exerc.* 19: 368-374.

Jansson E and Sylvé C (1981) Myoglobin in human heart and skeletal muscle in relation to oxidative potential as estimated by citrate synthase. *Clin. Physiol.* 1: 596-597.

Jansson E, Sylvé C and Nordevang E (1982) Myoglobin in the quadriceps femoris muscle of competitive cyclists and untrained men. *Acta Physiol. Scand.* 114: 627-629.

Jansson E, Sylvé C and Sjodin B (1983) Myoglobin concentration and training in humans. *Biochem. Exerc.* 13: 821-825.

Jasmin BJ and Gardiner PF (1987) Patterns of EMG activity of rat plantaris muscle during swimming and other locomotor activities. *J. Appl. Physiol.* 63: 713-718.

Jue T (1994) Measuring tissue oxygenation with the  $^1\text{H}$  NMR signals of myoglobin. In *NMR in Physiology and Biomedicine*: RJ Gillies (Ed), Academic Press, USA. 199-207.

Jürgens KD, Peters T and Gros G (1994) Diffusivity of myoglobin in intact skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3829-3833.

Kagen LJ (1973) *Myoglobin. Biochemical, Physiological and Clinical Aspects*: Columbia University Press, USA. 1-151.

狩野 豊 (1997) トレーニングが筋組織の毛細血管数とその内腔形態に及ぼす影響. 平成8年度筑波大学体育科学研究科博士論文 . 1-107.

Kano Y, Shimegi S, Masuda K, Ohmori H and Katsuta S (1997a) Morphological adaptation of capillary network in compensatory hypertrophied rat plantaris

- muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* 75: 97-101.
- Kano Y, Shimegi S, Masuda K, Sakato H, Ohmori H and Katsuta S (1997b) Effects of different intensity endurance training on the capillary network in rat skeletal muscle. *Int. J. Microcirc.* 17: 93-96.
- 川井尚臣 (1991) 筋疾患とミオグロビン. *Ann. Rev. 神経*, 297-308.
- Kawai H, Nishino H, Nishida Y, Masuda K and Saito S (1987) Localization of myoglobin in human muscle cells by immunoelectron microscopy. *Muscle Nerve* 10: 144-149.
- Kawai H, Sebe T, Nishino H, Nishida Y and Saito S (1991) Light and electron microscopic studies on localization of myoglobin in skeletal muscle cells in neuromuscular diseases. *Muscle Nerve* 14: 342-347.
- 河瀬雅夫 (1979) トレーニング効果の生理学的基礎に関する研究—特に骨格筋ミオグロビンに関して—I. イヌ骨格筋ミオグロビンの単離・純化とその特性について. *日本生理誌* 41: 509-521.
- Kennedy F and Jones D (1986) Oxygen dependence of mitochondrial function in isolated rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 250: C374-C383.
- Komi PV, Viitasalo JHT, Havu M, Thorstensson A, Sjödén B and Karlsson J (1977) Skeletal muscle enzyme activities in monozygous and dizygous twins of both sexes. *Acta Physiol. Scand.* 100: 385-392.
- Kraemer WJ and Fleck SJ (1988) Resistance training: exercise prescription. *Phys. Sportsmed.* 16: 69-81.
- Kraemer WJ, Fleck SJ and Deshenses M (1988) A review: factors in exercise prescription of resistance training. *Nat. Strength Cond. Assoc. J.* 10: 36-41.
- Kraemer WJ, Fleck SJ and Evans WJ (1996) Strength and power training: physiological mechanisms of adaptation. In *Exercise and Sport Sciences Reviews*: JO Holloszy (Ed), Williams and Wilkins, USA. 24: 363-397.
- Kunishige M, Mitsui T, Akaike M, Shono M, Kawai H and Saito S (1996) Localization and amount of myoglobin and myoglobin mRNA in ragged-red

- fibers of patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Muscle Nerve* 19: 175-182.
- Kurdak SS, Grassi B, Wagner PD and Hogan MC (1995) Effect of [Hb] on blood flow distribution and O<sub>2</sub> transport in maximally working skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 79: 1729-1735.
- Livingston D, La Mar G and Brown W (1983) Myoglobin diffusion in bovine heart muscle. *Science* 220: 71-73.
- MacDougall JD, Sale DG, Moroz JR, Elder GCB, Sutton JR and Howard H (1979) Mitochondrial volume density in human skeletal muscle following heavy resistance training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 11: 164-166.
- Maclean N (1978) *Heamoglobin*: 山上 健次郎 訳, Asakura-Arnold Biology 23. 朝倉書店, 東京. 1-83.
- 増田和実, 勝田 茂 (1998) ミオグロビンの特性と運動への関わり. *いばらき健康・スポーツ科学* 16: 7-17, 1998.
- McDonald R, Hegenauer J, Sucec A and Saltman P (1984) Effects of iron deficiency and exercise on myoglobin in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 52: 414-419.
- McPherson A and Tokunaga J (1967) The effects of cross-innervation on the myoglobin concentration of tonic and phasic muscles. *J. Physiol.* 188: 121-129.
- Meng H, Bentley TB and Pittman RN (1993) Myoglobin content of hamster skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* 74: 2194-2197.
- Mitsui T, Kawai H, Naruo T, Nishino H and Saito S (1993) *In situ* hybridization of myoglobin mRNA: results on the skeletal muscles of normal subjects and patients with neuromuscular diseases. *Acta Neuropathol.* 86: 313-318.
- Morey-Holton E and Wronski TJ (1981) Animal model for simulating weightlessness. *Physiologist* 24: S45-S48.
- Möller P and Brandt R (1982) The effect of physical training in elderly subjects

with special reference to energy-rich phosphagens and myoglobin in leg skeletal muscle. *Clin. Physiol.* 2: 307-314.

Möller P and Sylvén C (1981) Myoglobin in human skeletal muscle. *Scand. J. Lab. Invest.* 41: 479-482.

中谷 昭 (1993) マウスミオグロビンの諸特性と骨格筋ミオグロビン含量について. *運動生化学* 5: 77-83.

中谷 昭, 榎 泰義 (1992) 鉄欠乏がマウス骨格筋及び心筋ミオグロビン (Mb) 含量に及ぼす影響. *体力科学* 41: 406.

中谷 昭 (1988) 加齢ならびに運動とマウス骨格筋、心筋ミオグロビン含量の変動. *日本生理誌* 50: 709-718.

Nemeth PM, Chi MML, Hintz CS and Lowry OH (1983) Myoglobin content of normal and trained human muscle fibers. *Biochem. Exerc.* 13: 826-831.

Nemeth PM and Lowry OH (1984) Myoglobin levels in individual human skeletal muscle fibers of different types. *J. Histochem. Cytochem.* 32: 1211- 1216.

Papadopoulos S, Jürgens KD and Gros G (1995) Diffusion of myoglobin in skeletal muscle cells – dependence on fibre type, contraction and temperature. *Pflügers Arch.* 430: 519-525.

Pierotti DJ, Roy RR, Gregor RJ and Edgerton VR (1989) Electromyographic activity of cat hindlimb flexors and extensors during locomotion at varying speeds and inclines. *Brain Res.* 481: 57-66.

Popel AS (1989) Theory of oxygen transport to tissue. *Crit. Rev. Biomed. Engin.* 17: 257-321.

Reis DJ and Wooten GF (1970) The relationship of blood flow to myoglobin, capillary density, and twitch characteristics in red and white skeletal muscle in cat. *J. Physiol.* 210: 121-135.

Reynafarje B (1962) Myoglobin content and enzymatic activity of muscle and altitude adaptation. *J. Appl. Physiol.* 17: 301-305.

- Reynafarje B (1963) Simplified method for the determination of myoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 61: 138-145.
- Richardson RS, Noyszewski EA, Kendrick KF, Leigh JS and Wagner PD (1995) Myoglobin O<sub>2</sub> desaturation during exercise. Evidence of limited O<sub>2</sub> transport. *J. Clin. Invest.* 96: 1916-1926.
- Riley DA, Slocum GR, Bain JLW, Sedlak FR, Sowa TE and Mellender J (1990) Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J. Appl. Physiol.* 69: 58-66.
- Roca J, Agusti AG, Alonso A, Poole DC, Viegas C, Barbera JA, Rodriguez RR, Ferrer A and Wagner PD (1992) Effects of training on muscle O<sub>2</sub> transport at  $\dot{V}O_{2\max}$ . *J. Appl. Physiol.* 73: 1067-1076 .
- Roy RR, Baldwin KM and Edgerton VR (1991a) The plasticity of skeletal muscle: Effects of neuromuscular activity. In *Exercise and Sports Sciences Reviews*, JO Holloszy (Ed), Williams and Wilkins, USA. 19: 269-312.
- Roy RR, Hutchison DL, Pierotti DJ, Hodgson JA and Edgerton VR (1991b) EMG patterns of rat ankle extensors and flexors during treadmill locomotion and swimming. *J. Appl. Physiol.* 70: 2522-2529.
- Roy RR, Sacks RD, Baldwin KM, Short M and Edgerton VR (1984) Interrelationships of contraction time,  $V_{\max}$ , and myosin ATPase after spinal transection. *J. Appl. Physiol.* 56: 1594-1601.
- Saltin B and Gollnick PD (1983) Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In *Handbook of Physiology: Skeletal Muscle*: M Bethesda (Ed), Am Physiol Soc, USA. 555-631.
- Simard C, Lacaille M and Vallieres J (1985) Enzymatic adaptations to suspension hypokinesia in skeletal muscle of young and old rats. *Mech. Age Develop.* 33: 1-9.
- Simoneau JA, Lortie G, Boulay MR, Thibault MC and Bouchard C (1985) Human skeletal muscle fiber type alteration with high-intensity intermittent training. *Eur. J. Appl. Physiol.* 54: 250-253.

- Smith JL, Smith LA, Zernicke RF and Hoy M (1982) Locomotion in exercised and nonexercised cats cordotomized at two or twelve weeks of age. *Exp. Neurol.* 76: 393-413.
- 征矢英昭, 大森武則, 川島 均, 中野裕史, 斉藤 剛 (1998) 走運動時に動員されるラットの下肢筋支配ニューロンの同定法: c-fosの*in situ* hybridization組織化学からの検討. 三重大学教育学部研究紀要 49: 39-47.
- Srere PA (1969) Citrate synthase. *Methods in Enzymology*, 13: 3-6.
- Staron RS, Karapondo DL, Fry AC, Gordon SE, Falkel JE, Hagerman FC and Hikida RS (1994) Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. *J. Appl. Physiol.* 76: 1247-1255.
- Svedenhag J, Henriksson J and Sylvén C (1983) Dissociation of training effects on skeletal muscle mitochondria enzymes and myoglobin in man. *Acta Physiol. Scand.* 117: 213-218.
- Sylvén C, Jansson E and Böök K (1984) Myoglobin content in human skeletal muscle and myocardium: relation to fibre size and oxidative capacity. *Cardiovasc. Res.* 18: 443-446.
- Tamura M, Oshino N, Chance B and Silver I (1978) Optical measurements of intracellular oxygen concentration of rat heart in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* 191: 8-22.
- Terrados N, Jansson E, Sylvén C and Kaijser L (1990) Is hypoxia a stimulus for synthesis of oxidative enzymes and myoglobin? *J. Appl. Physiol.* 68: 2369-2372.
- Terrados N, Melichna J, Sylvén C and Jansson E (1986) Decrease in skeletal muscle myoglobin with intensive training in man. *Acta Physiol. Scand.* 128: 651-652.
- Tesch PA (1988) Skeletal muscle adaptations consequent to long-term heavy resistance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 20: S132-S134.

- Tesch PA, Thorsson A and Kaiser P (1984) Muscle capillary supply and fiber type characteristics in weight and power lifters. *J. Appl. Physiol.* 56: 35-38.
- Theorell H (1934) Kristallinisches myoglobin. *Biochem. Z.* 268: 73-82.
- Timson BF (1990) Evaluation of animal models for study of exercise-induced muscle enlargement. *J. Appl. Physiol.* 69: 1935-1945.
- Vieth E (1989) Fitting piecewise linear regression functions to biological responses. *J. Appl. Physiol.* 67: 390-396.
- Wagner PD (1988) An integrated view of the determinants of maximum oxygen uptake. In *Oxygen Transfer from Atmosphere to Tissue*: NC Gonzalez and MR Fedde (Eds), Plenum, USA. 254-256.
- Wasserman K, Whipp BJ, Koyal SN and Beaver WL (1973) Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J. Appl. Physiol.* 35: 236-243.
- Westcott W (1995) *Bodybuilding and strength building. Strength fitness*: Brown and Benchmark, USA. 115-122.
- Wittenberg BA and Wittenberg JB (1975) Role of myoglobin in the oxygen supply to red skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 10: 9038-9043.
- Wittenberg BA and Wittenberg JB (1985) Oxygen pressure gradients in isolated cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.* 260: 6548-6554.
- Wittenberg BA and Wittenberg JB (1987) Myoglobin-mediated oxygen delivery to mitochondria of isolated cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7503-7507.
- Wittenberg BA and Wittenberg JB (1989) Transport of oxygen in muscle. *Ann. Rev. Physiol.* 51: 857-878.
- Wittenberg JB (1970) Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle. *Physiol. Rev.* 50: 559-636.
- Wu CSC, Duffy P and Brown WD (1972) Interaction of myoglobin and



cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* 247: 1899-1903.

Zwarts MJ and Arendt-Nielsen L (1988) The influence of force and circulation on average muscle fiber conduction velocity during local muscle fatigue. *Eur. J. Appl. Physiol.* 58: 278-283.

筑波大学附属図書館



1 00990 12399 1

本学関係

---