

# クレンブテロール投与がラット内側腓腹筋の異なる部位の萎縮筋線維の回復に及ぼす影響

鈴木 英樹<sup>1)</sup>・辻本 尚弥<sup>2)</sup>・北浦 孝<sup>3)</sup>

キーワード:  $\beta_2$ -作動薬, ギブス固定, 筋萎縮, 回復促進作用

## Effects of clenbuterol administration on recovery of atrophied muscle fiber of different compartments in rat medial gastrocnemius muscle

Hideki SUZUKI, Hisaya TSUJIMOTO and Takashi KITAURA

We used immunohistochemistry to determine whether clenbuterol ( $\beta_2$ -agonist) treatment accelerates the recovery of fixation-induced atrophy in the rat medial gastrocnemius muscle.

Adult male Sprague-Dawley rats were assigned to control (CON), casted-immobilization (IMM), casted-immobilization following recovery control (RCON) and casted-immobilization following recovery with CLE-administration (RCLE) groups. Nine days of immobilization induced muscle fiber atrophy in both the proximal and the distal compartments of medial gastrocnemius muscle.

After a 2-week recovery period, the cross-sectional area of each type of muscle fiber at both sites tended to be higher in the RCON group than in the IMM group. The cross-sectional area of each type of fiber in the proximal compartment tended to be higher in RCLE than in the RCON group, but not in the distal compartment.

These results suggest that CLE accelerate the recovery of atrophied fiber in the proximal compartment of medial gastrocnemius muscle, and that responses to CLE in both compartments may be different.

**Keywords:**  $\beta_2$ -agonist, cast-immobilization, muscle atrophy, accelerated recovery

### 緒 言

ラット内側腓腹筋には二本の神経枝が入り込んでおり、それらの神経枝は筋内の近位部と遠位部をそれぞれ支配している (De Ruiter et al. 1995a, Vanden Noven et al. 1994)。さらに、近位部と遠位部は組織化学的、生理学的特性が異なることも報告されている (De Ruiter et al. 1995a, 1995b, 1996, Vanden Noven et al. 1994)。これらは内側腓腹筋の近位部と遠位部は機能的役割が異なることを示し

1) 愛知教育大学保健育講座  
Department of Health and Physical Education, Aichi University of Education

2) 久留米大学人間健康学部スポーツ医科学科  
Department of Sports Medicine and Science, Faculty of Human Health, Kurume University

3) 福山大学経済学部  
Faculty of Economics, Fukuyama University



固定はペントバルビタールナトリウム (45 mg / 体重 1 kg) 麻酔下で、包帯式ギプスのスコッチキャスト (3-J; 3M Health Care, Tokyo, Japan) を用いて足関節が底屈 0 度の状態で行った。9 日間のギプス固定期間後、CON 群と IMM 群のラットより内側腓腹筋 (MG) を摘出し、直ちに液体窒素で冷却したイソペンタン中にて急速凍結した。凍結した筋サンプルは分析まで -80°C で保存した。RCLE 群のラットには、ギプス固定解放後の 2 週間の回復期間中に、CLE (1 mg / 体重 1 kg / 日) を頸背部に皮下注射により投与した。CLE (Sigma, St. Louis, MO, USA) は 0.9% NaCl 溶液にて 0.1% CLE 溶液に調製した。この投与量は骨格筋の肥大を誘発することがすでに確認されているため (Yamazaki, 2005)、この投与により筋線維の萎縮後の回復を促進すると予想された。RCON 群のラットには、RCLE 群と等量の 0.9% NaCl 溶液を同様な方法で同期間投与した。回復期間の後、RCON 群および RCLE 群のラットより、CON 群と IMM 群と同様に被験筋を摘出して保存した。

筋線維タイプ同定のために免疫組織染色を行った。本研究で使用した一次抗体は次のとおりであった: mouse monoclonal anti-slow myosin (タイプ I 線維のマーカー; 1:4000; Sigma, St. Louis, MO, USA), mouse monoclonal anti-fast myosin (タイプ II 線維のマーカー; 1:400; Sigma, St. Louis, MO, USA)。免疫組織染色のために、-25°C でミクロトームにて、筋腹部より厚さ 10 $\mu$ m の連続筋線維横断切片を作成し、切片を剥離防止加工されたスライドガラス上に張り付けた。始めに、切片を 0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline PBS, pH 7.4) で調整した 4% パラホルムアルデヒド中にて 15 分間固定した後、0.1 M PBS (pH 7.4) で洗浄した。次に、非特異的免疫反応性をブロックするために、切片を 10% 血清および 1% Triton X-100 を含む 0.1 M PBS で 1 時間インキュベートした。一次抗体を 5% 血清および 0.3% Triton X-100 を含む 0.1 M PBS で希釈して反応させた後、二次ビオチン化抗マウス IgG 抗体およびアビジン-ビオチン複合体とそれぞれ 1 時間反応させ、ペルオキシダーゼ基質キット (2V-0001-10; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を使用して染色した。染色サンプルは光学顕微鏡 (BH-2; オリンパス, 東京, 日本) にて 400 倍で CCD カメラ (DP-21; オリンパス, 東京, 日本) を介してパーソナルコンピューターに保存した。

筋線維のタイプ分類は、取り込んだ画像をプリントアウトして行った。近位部と遠位部の識別は中村ら (2006) の方法に従った。各部位の画像において隣接した少なくとも 150 本以上の筋線維を、タイプ I (抗 slow myosin に陽性)、タイプ II (抗 fast myosin に陽性)、およびタイプ I + II (抗 slow myosin と抗 fast myosin の双方に陽性) に分類した。各筋線維の横断面積は、タイプ分類を行ったすべての筋線維について、画像処理システム (Image-J; NIH, USA) を使用して計測した。

各データは平均および標準偏差 (SD) で示した。体重および骨格筋重量のデータ分析には一元配置分散分析を用いた。筋線維横断面積のデータ分析には二元配置分散分析 (処置群  $\times$  骨格筋の存在部位) を用いた。両検定とも群間の多重比較には Tukey-Kramer の検定を用いた。なお、有意水準は危険率 5% 未満とした。すべての統計分析には、IBM SPSS Statistics (ver. 19.0 IBM Japan, Ltd. Tokyo, Japan) を使用した。

## 結 果

Table 1 に各群の体重および筋重量を示した。IMM 群および RCON 群の体重は、CON 群に比べ有意な差は見られなかった。RCLE 群の体重は IMM 群に比べて有意に高値を示した。IMM 群の筋重量は CON 群よりも約 39% 低値を示し有意差が認められた。RCON 群の筋重量は IMM 群に比べて

Table 1. Body weight, muscle weight and relative muscle weight in each group

	CON	IMM	RCON	RCLE
Body weight (g)	292 ± 9	266 ± 29	297 ± 19	320 ± 26 <sup>b</sup>
Muscle weight (mg)	715 ± 34	436 ± 45 <sup>a</sup>	592 ± 52 <sup>b</sup>	675 ± 187 <sup>b</sup>
Relative muscle weight (mg/g B.W.)	2.4 ± 0.1	1.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.5

Values are presented as the mean ± SD.

Statistic: <sup>a</sup> $P < 0.05$  (vs. CON); <sup>b</sup> $P < 0.05$  (vs. IMM).

Table 2. Cross-sectional area in each typed fiber of medial gastrocnemius muscle

	CON	IMM	RCON	RCLE
Proximal portion				
Type I fiber	1979 ± 293	1366 ± 91 <sup>a</sup>	1566 ± 291 <sup>a</sup>	1849 ± 299 <sup>b</sup>
Type I + II fiber	1544 ± 311	1074 ± 110 <sup>a</sup>	1262 ± 263	1502 ± 223 <sup>b</sup>
Type II fiber	2150 ± 106	1546 ± 191	2110 ± 277	2467 ± 108 <sup>b</sup>
Distal portion				
Type II fiber	3053 ± 650	1440 ± 617 <sup>a</sup>	2802 ± 872	2875 ± 840

Values are presented as the mean ± SD.

Statistic: <sup>a</sup> $P < 0.05$  (vs. CON); <sup>b</sup> $P < 0.05$  (vs. IMM).

有意に高値を示した。RCLE 群の筋重量も IMM 群に比べて有意に高値を示した。IMM 群の相対的筋重量は CON 群よりも約30%低値を示し有意差が認められた。RCON 群の相対的筋重量も CON 群より有意に低値を示した。RCLE 群の相対的筋重量は CON 群と違いはなかった。

Table 2に各群の筋線維横断面積を筋線維タイプ別に示した。近位部において、IMM 群のタイプ I 線維の横断面積は CON 群に比べて約31%有意に低値を示した。RCON 群のタイプ I 線維の横断面積は CON 群に比べて約21%有意に低値を示した。RCLE 群のタイプ I 線維の横断面積は IMM 群より約26%も有意に高値を示した。IMM 群のタイプ I + II 線維の横断面積は CON 群に比べて約30%有意に低値を示した。RCON 群のタイプ I + II 線維の横断面積は IMM 群および CON 群と有意な差は認められなかった。RCLE 群のタイプ I + II の横断面積は IMM 群よりも有意に約28%高値を示した。IMM 群のタイプ II 線維の横断面積は CON 群と有意な差は認められなかった。RCON 群のタイプ II 線維の横断面積は IMM 群および CON 群と有意な差は認められなかった。RCLE 群のタイプ II の横断面積は IMM 群よりも有意に約37%高値を示した。

遠位部において、IMM 群のタイプ II 線維の横断面積は CON 群に比べて約53%有意に低値を示した。RCON 群のタイプ II 線維の横断面積は IMM 群との間に有意差は認められなかった。RCLE 群のタイプ II の横断面積も IMM 群および RCON 群との間に有意差は認められなかった。

## 考 察

本研究では、後肢固定により萎縮した内側腓腹筋の回復期に CLE を投与し、その同化作用が筋萎縮からの回復を促進するかを筋内の異なる部位において組織化学的に比較検討した。

筋重量および相対的筋重量の結果より、ギプス固定により内側腓腹筋は萎縮したことが認められた。また、ギプス解放後の 2 週間の回復期間で筋重量は増加し回復を示した。さらに回復期間での増加量は、RCON 群（筋重量約 36%，相対的筋重量約 16%）に比べ RCLE 群（筋重量約 55%，相対的筋重量約 22%）が大きく、CLE 投与の影響がみられた。CLE は速筋に選択的に作用すると報告されていることから（Rajab et al. 2000, Kitaura et al. 2001, Sato et al. 2008）、本研究の結果は速筋である内側腓腹筋において CLE の同化作用が萎縮からの回復を促進したと考えられた。

本研究で用いたギプス固定により、近位部と遠位部の筋線維共に顕著な萎縮を示し、これらの結果はギプス固定モデルを用いた以前の研究結果と一致していた（Tomanek and Lund 1974, Edgerton et al. 1975）。一方で、内側腓腹筋の近位部の筋線維はギプス固定により 30% 前後萎縮していたのに対して、遠位部の筋線維は約 50% の萎縮を示した。これらの結果は、固定による筋線維の萎縮は内側腓腹筋の遠位部と近位部で同等だったとする我々の先の研究結果と異なっていた（鈴木ら 2012）。先の研究では足関節はナチュラルポジション（底屈約 10 度）で固定されていたが、本研究では足関節を底屈 0 度で固定していた。筋線維の萎縮の程度は固定時の筋長で異なることが報告されている（Tabary et al. 1972, Goldspink et al. 1977）。したがって、関節固定角度の違いによる筋長の違いにより、これらの固定による萎縮の違いが生じた可能性がある。さらに、底屈動作に動員される内側腓腹筋では近位部と遠位部では機能的に底屈動作へ寄与の度合いも異なる可能性がある（De Ruiter et al. 1995a, 1995b, 1996, Vanden Noven et al. 1994）。そのため、内側腓腹筋の両部位間の筋線維の緊張が異なる足関節角度の固定により生じた可能性も考えられた。

回復期間後、筋線維横断面積は近位部、遠位部共に回復を示したが、タイプ I および I + II 線維に比べてタイプ II 線維の回復の程度が大きかった。一般的に筋線維は運動強度が高くなるに伴いタイプ I, IIa, IIb 線維の順で動員されると考えられている（Walmsley et al. 1978）。したがって、固定により萎縮して脆弱した骨格筋では、固定前に比べて固定解放後の通常活動が過負荷となり、タイプ II 線維が優先的に動員されていた可能性が考えられた。

回復期に CLE を投与した場合、投与なしに比べて近位部のいずれのタイプの筋線維横断面積も回復の程度が大きく、IMM 群の筋線維横断面積と比べても顕著な回復を示した。一方で、遠位部の筋線維の横断面積は CLE 投与の有無で回復の程度に大きな差はみられなかった。内側腓腹筋の支配神経由来のそれぞれの部位は生理学的特性と組織化学的特性から、近位部は持続的な活動を、遠位部は相同的な活動を担っていると考えられている（De Ruiter et al. 1995a, 1995b）。したがって、固定解放後の回復期の姿勢維持のような持続活動で、遠位部に比べて近位部の筋線維、特にタイプ II 線維がより頻繁に動員されたことは、CLE の同化作用をより刺激した可能性を示していた。

以上のことから、萎縮した内側腓腹筋の筋線維の回復は近位部と遠位部では異なること、さらに CLE を投与した場合の回復促進作用も両部位間で異なることが示唆された。



## 付 記

本研究は令和元年度科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金，基盤研究 C，課題番号：19K11519，研究代表者：鈴木英樹）の交付を受けて行った研究である。

## 文 献

- Booth, F.W. and Kelso, J.R. (1973) Production of rat muscle atrophy by cast fixation. *J. Appl. Physiol.*, 34: 404-406. doi: 10.1152/jappl.1973.34.3.404
- De Ruiter, C.J., De Haan, A., and Sargent, A.J. (1995a) Physiological characteristics of two extreme muscle compartments in gastrocnemius medialis of the anaesthetized rat. *Acta Physiol. Scand.*, 153: 313-324. doi: 10.1111/j.1748-1716.1995.tb09869.x
- De Ruiter, C.J., De Haan, A., and Sargent, A.J. (1995b) Repeated force production and metabolites in two medial gastrocnemius muscle compartments of the rat. *J. Appl. Physiol.*, 79: 1855-1861. doi: 10.1152/jappl.1995.79.6.1855
- De Ruiter, C.J., Habets, P.E.M.H., De Haan, A., and Sargent, A.J. (1996) In vivo IIX and IIB fiber recruitment in gastrocnemius muscle of the rat is compartment related. *J. Appl. Physiol.*, 81: 933-942. doi: 10.1152/jappl.1996.81.2.933
- Edgerton, V.R., Barnard, R.J., Peter, J.B., Maier, A., and Simpson, D.R. (1975) Properties of immobilized hind-limb muscles of the galago senegalensis. *Exp. Neurol.* 46: 115-131. doi: 10.1016/0014-4886(75)90036-9
- Goldspink, D.F. (1977) The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J. Physiol. (London)*, 264: 267-282. doi: 10.1113/jphysiol.1977.sp011667
- Kitaura, T., Tsunekawa, N., and Hatta, H. (2001) Decreased monocarboxylate transporter 1 in rat soleus and EDL muscle exposed to clenbuterol. *J. Appl. Physiol.*, 91: 85-90. doi: 10.1152/jappl.2001.91.1.85
- Lynch, G.S., and Ryall, J.G. (2008) Role of  $\beta$ -adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol. Rev.*, 88: 729-767. doi: 10.1152/jappl.2001.91.1.85
- 日本生理学会. (2002) 生理学領域における動物実験に関する基本的指針 平成13年3月30日改訂（解説）. *日本生理学雑誌*. 64 (7-8) : 140-146.
- 中村和誉, 幸篤武, 辻本尚弥, 春日規克, 鈴木英樹 (2006) ラット内側腓腹筋における異なる部位での形態および組織化学的酵素活性の適応変化. *東海保健体育科学*, 第28巻 : 11-19.
- Rajab, P., Fox, J., Riaz, S., Tomlinson, D., Ball, D., and Greenhaff, P.L. (2000) Skeletal muscle myosin heavy chain isoforms and energy metabolism after clenbuterol treatment in the rat. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 279: R1076-R1081. doi: 10.1152/ajpregu.2000.279.3.R1076
- Sato S, Nomura S, Kawano F, Tanihata J, Tachiyashiki K, Imaizumi K. (2008) Effects of  $\beta_2$ -agonists clenbuterol on  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptor mRNA expression of rat skeletal and left ventricle muscle. *J. Pharmacol. Sci.*, 107: 393-400. doi: 10.1254/jphs.08097FP
- 鈴木英樹, 藤沢良史, 辻本尚弥 (2003) ラット内側腓腹筋の異なる部位の持久性トレーニングに対する適応変化. *愛知教育大学研究報告*, 第52輯 : 31-34.
- 鈴木英樹, 辻本尚弥 (2012) ラット内側腓腹筋における異なる部位の形態的・組織化学的適応変化. *愛知教育大学研究報告*, 第61輯 : 37-39.
- Suzuki, H., Tsujimoto, H., Shirato, K., Mitsuhashi, R., Sato, S., Tachiyashiki, K., and Imaizumi, K. (2014) Clenbuterol attenuate immobilization-induced atrophy of type II fibers in the fast-twitch Extensor Digitorum Longus but not in the slow-twitch soleus muscle. *Glob. J. Hum. Anat. Physiol. Res.*, 1: 10-17.
- Suzuki, H., Yoshikawa, Y., Tsujimoto, H., Kitaura, T., and Muraoka, I. (2020) Clenbuterol accelerates recovery after immobilization-induced atrophy of rat hindlimb muscle. *Acta Histochemica.*, 122: 151453. doi: 10.1016/j.acthis.2019.151453

- Tabary, J.C., Tabary, C., Tardieu, C., Tardieu, G., Goldspink, D.F. (1972) Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. *J. Physiol.*, 224: 231-244. doi: 10.1113/jphysiol.1972.sp009891
- Tomanek, R. J., and Lund, D. (1974) Degeneration of different types of skeletal muscle fiber. II. Immobilization. *J. Anat.*, 118: 531-541.
- Vanden Noven, S., Cardner, P.F. and Seburn, K.L. (1994) Motoneurons innervating two regions of rat medial gastrocnemius muscle with differing contractile and histochemical properties. *Acta Anat.*, 150: 282-293. doi: 10.1159/000147631
- Walmsley, B., Hodgson, J.A., Burke, R.E. (1978) Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *J. Neurophysiol.*, 41: 1203-1216. doi: 10.1152/jn.1978.41.5.1203
- Yamazaki, T. (2005) Effects of intermittent weight-bearing and clenbuterol on disuse atrophy of rat hindlimb muscles. *J. Jpn. Phys. Ther. Assoc.*, 8: 9-20. doi: 10.1298/jjpta.8.9

(2021.9.14. 受付 2021.9.24. 受理)