

ラットの骨格筋に及ぼす
固定および固定解除後の
持久的トレーニングの影響

所属学科目 体カ学
著者 堀田 昇
論文指導教員 石河利寛

昭和56年3月3日

論文審査委員
石田 詢子
教授 小坂 浩
河野 信弘

目次	頁
緒言	1
関連文献の考証	5
(1) 骨格筋線維の生化学的特徴	5
(2) 骨格筋線維の組織化学的特徴	
および分類	7
(3) 固定による影響	12
(4) 運動に対する骨格筋の生化学的	
および組織化学的応答	23
実験方法	28
(1) 実験対象	28
(2) 飼育方法	29
(3) 固定方法	30
(4) トレーニング方法	31
(5) 分析方法	31
① 組織化学的分析方法	31
1) Myosin ATPase 染色法	33
2) SDH 染色法	34
② 生化学的分析方法	34
1) Actomyosin 抽出法	34

2) Actomyosin ATPase 活性測定法	35
(6) 骨格筋線維の分類	36
① Myosin ATPase 染色による分類	36
② SDH 染色による分類	36
(7) 筋線維面積の測定	37
(8) 統計処理	37
(9) 実験条件	38
実験結果	39
(1) 体重	39
(2) 筋重量	40
1) 固定による影響	40
2) トレーニングによる影響	40
(3) 筋線維構成への影響	41
1) 固定による影響	41
2) トレーニングによる影響	42
(4) 各筋線維面積への影響	42
1) 固定による影響	42
2) トレーニングによる影響	43
(5) 線維面積の占める相対的な割合 への影響	44

緒言

哺乳類の骨格筋線維は, myosinATPase 染色により Fast-twitch(FT) 線維および Slow-twitch(SO) 線維に分類される。さらに, myosinATPase の pH に対する安定性⁷⁾²⁰⁾, 複数の酸化酵素染色を用いる方法²⁸⁾⁵⁰⁾, またはその両者を併用する方法により, 筋線維を Fast-twitch-glycolytic(FG), Fast-twitch-oxidative-glycolytic(FOG) および Slow-twitch-oxidative(SO) 線維に分類している⁴³⁾。骨格筋は, 上記の3種類の筋線維から構成されているが, 骨格筋の種類に応じて筋線維の相対的な割合あるいは生化学的にみた酵素活性値は異なり, それらについてのいくつかの報告がある⁴⁾³²⁾。

骨格筋はギブスなどの固定によりそれらの筋線維が萎縮したり, 持久的トレーニングや筋カトレーニングにより肥大が生ずることはよく知られている¹¹⁾³³⁾。

Karpati, G と W. K. Engel²⁶⁾ は, モルモットを用いて3日から120日間にわたって筋を固定した結果, ST および FT 線維ともほぼ同じ

割合で萎縮が生じたと述べているが、モルモット(4週間固定)、ネコあるいはサル(5〜6ヶ月間固定)を用いた別な研究者たちの報告^{12) 35) 36)}によるとFT線維よりもST線維の方が急速にかつ著しく萎縮が生ずると述べている。Booth, F. W. と J. R. Kelso⁵⁾は、ラットの脚を4週間にわたり固定した結果、ヒラメ筋の収縮スピードが増加したことを観察した。彼らは、この収縮スピードが増加した原因は固定によりST線維がFT線維より早く萎縮したためであると考えた。以上のように萎縮については、固定の期間あるいは用いた動物などによるちがいがから必ずしも一致した結果は得られていない。さらに、関節の角度をかえて筋の長さをかえて固定を行なうことにより萎縮の程度は異なる。Boyes, G. と I. Johnston⁶⁾は、3週間にわたりラットの膝関節を伸展位および屈曲位で固定し、中間広筋に生ずる変化を検討したところ、SO線維の面積は、伸展位および屈曲位とも正常なものに

くらべ約50%減少した。一方、FOG線維の面積は屈曲位より伸展位の方が著しく減少したと報告している。

また、固定した筋では生化学的に酸化能力が著しく減少したという報告がある。Rifentberick, D. H. ら⁴⁶⁾は、固定した筋では malate dehydrogenase および cytochrome oxidase 活性は正常な筋のそれぞれ40および65%であったと報告している。

一方、持久的トレーニングを行なうことによつて、Edgerton, V. R. ら¹³⁾は、足底筋については高い酸化能力をもった線維(FOG線維)の割合が増加したがヒラメ筋では変化がなかったと報告している。同様に、Faulkner, J. A. ら¹⁴⁾もモルモットに8週間に行なう持久的トレーニングを行なわせたところ足底筋において高い酸化能力をもった線維(FOG線維)の割合が増加することを示したが、トレーニング期間と同じ8週間トレーニングを中止するとともにもどる割合も足底筋の方が著しかつ

たと報告している。

このように固定による萎縮は、固定の際の関節角度、固定期間あるいは用いた動物などにより異なってくる。さらに、固定によって萎縮した筋をトレーニングさせて、組織化学的および生化学的に回復する過程を調べた報告は少ない^{33) 34)}。

したがって、本研究では成熟した Sprague-Dawley 系ラットを用いて筋線維タイプの全く異なる足底筋とヒラメ筋について、(1) 関節の角度をかえることにより筋の長さを変えて固定した場合、筋の長さや足底筋およびヒラメ筋の萎縮との関係がどのようなものか、また(2) 固定と同期間持続的トレーニングを行なった場合に両筋における回復がどの程度であるのかについて、組織化学的および生化学的に検討することを目的とする。

関連文献の考証

骨格筋には肉眼的に色調の白い筋肉と赤い筋肉があることは1698年Lorenziniにより示されたと言われている⁵⁶⁾。そして、全筋の色調のちがいが収縮特性の差異と関係があることは1874年Ranvier, L.⁴⁴⁾⁴⁵⁾によりはじめて報告された。彼はうさぎの下肢筋の特徴を調べ、赤筋(M. rouges)が白筋(M. pales)よりも収縮がおそいことを示した。しかし、1878年、Kuffler, S.W.³¹⁾により赤筋でも速い収縮特性をもった筋のあることも報告されている。

その後、白筋と赤筋は2つあるいは3つの筋線維から成っていることが明らかになり、その生化学的あるいは組織化学的特徴についての研究がはじめられるようになってきた。

(1) 骨格筋線維の生化学的特徴

Bárány, M.³⁾は、筋の収縮速度がmyosinATPase活性と比例することを報告した。彼は14種類の異なる収縮速度をもつ筋を用いて、うさぎのヒラメ筋あるいは中間広筋という赤筋は、

腓腹筋あるいは長趾伸筋といった白筋よりも ATPase 活性が 2~3 倍低いことを示した。特に, actin および Ca^{++} により活性化される myosin ATPase 活性が筋の収縮速度に関連することを示した。すなわち, 長趾伸筋から抽出した actin により活性化される myosin ATPase 活性は中間広筋の 2.3 倍, ヒラメ筋の 3.2 倍高かった。また, 長趾伸筋の Ca^{++} により活性化される myosin ATPase 活性も中間広筋の 2.2 倍, ヒラメ筋の 2.4 倍高いことを示した。

また, Sreter, F. A. ら⁴⁹⁾ はうさぎから採取した赤筋(ヒラメ筋, 中間広筋)は白筋(外側広筋, 大内転筋)よりも myosin ATPase 活性が低いことを示した。彼は, この2つの筋から抽出したミオシンに構造上の差があると述べた。すなわち, 赤筋のミオシンに触媒を及ぼす Ca^{++} によって活性化する myosin ATPase 反応の活性エネルギーが高いこと, および, 赤筋から得たミオシンはトリプシン吸収率が低いことがあげられている。また, スルフヒドリ

ル試薬による ATPase 活性のパターンにも差が生じた。赤筋のミオシンは低イオン強度では N-エチルマレインにより活性化されるが、白筋のミオシンは何ら影響を受けない。一方、高イオン強度では両方のミオシンとも活性化されると報告している。

Peter, J. B. ら⁴³⁾ は、同様に actomyosin ATPase 活性はヒラメ筋にくらべ、外側広筋赤色部では 4 倍、外側広筋白色部では約 7 倍も高く、筋線維タイプにより異なることを示したが、myosin ATPase 活性については、ヒラメ筋と外側広筋赤色部および白色部とで活性値で 2 倍しかちがわぬことを示した。また、彼らは酸化酵素であるコハク酸脱水素酵素 (Succinic dehydrogenase : 以後 SDH) について調べ、SDH は ATPase 活性と反対に外側広筋赤色部およびヒラメ筋では外側広筋白色部の 2~3 倍高い活性値をもっていると報告している。

(2) 骨格筋の組織化学的特徴および分類

Denny-Brown, D.¹⁰⁾ は、赤筋には Sudan 赤染色

(脂肪染色)で濃く染色される筋線維が多く、白筋にはうすく染色される線維が多いことを見出した。

また、Bulland, H. H.³⁸⁾は、Sudan Black IIIを用いて腓腹筋、ヒラメ筋および横隔膜の骨格筋線維を染色し、暗色、中間色および明色の3種類の筋線維のあることを示した。また、同時に各骨格筋の筋線維構成を観察し、腓腹筋と横隔膜は明色、中間色および暗色の3種類の筋線維で構成されているが、ヒラメ筋においては暗色と中間色に染色される筋線維で構成されていると報告している。

また、筋線維の分類には一種又は複数の酸化酵素染色を用いる方法がある。

Seligman, A. M. と A. M. Rutenburg⁴⁸⁾ および Padykula, H. A.⁴⁰⁾ は、酸化酵素である SDH に対して組織染色を行なった。その結果、SDH 染色で明色、中間色および暗色の3種類に分かれることを観察し、筋線維には代謝様式の異なる3つの線維があることが明らかになった。

同様に, Nishiyama, A.³⁹⁾ は, SDH 染色を用いてラットの骨格筋を染色し赤筋線維はむらさき色, 白筋線維は明色, 中間筋線維は深紫色に染まることを観察し, その色のちがいはSDHの活性値のちがいによるものであり, SDH活性の高い部分は深紫色に染まるがSDH活性の低い部分は明色に染まることを示した。

Padykula, H.A. と E. Herman⁴¹⁾ は, 速筋と遅筋のATPaseの活性値のちがいによりATPase染色を行なった。その結果, myosin ATPase染色により骨格筋は明色と暗色の二種類に分類されることを示した。また, Guth, L. ら¹⁹⁾ は, ラットの速筋(長趾伸筋)は組織化学的にATPase染色で暗く染まる筋線維が多く, 生化学的にactomyosin ATPase活性が高いことを示した。一方, 遅筋(ヒラメ筋)は, 明色に染まる筋線維が多く, 生化学的にactomyosin ATPase活性が低いことを観察し, 組織化学的にみたATPase染色と生化学的にみた活性値とで一致することを確認した。さらに, Brooke, M.H. と K.K.

Kaiser⁷⁾は、myosin ATPase の pH に対する安定性に着眼し、フレインキューベーションすることによりさらに明確に筋線維を分類できることを示した。

先の Bárány, M.³⁾ あるいは Guth, L.¹⁹⁾ の研究から組織化学的染色で分類された筋線維の生化学的あるいは収縮特性の検討がなされるようになった。張力の維持は、一つには直接のエネルギー源である ATP の再合成能力に大きく依存する。ATP の再合成は無気的条件下では解糖に、有気的条件下では酸化によるので、張力の維持は筋線維のエネルギー代謝様式に依存するといえる。そのため解糖系酵素および酸化酵素の組織化学的染色により、張力持続の能力を推定することが出来る。つまり ATPase あるいは酸化酵素染色の組織化学的証明から推定できることになる。

この方法にもとづき、Barnard, R. J.⁵⁾ はラットのヒラメ筋、腓腹筋、長趾伸筋、屈曲母趾長筋および屈指長筋の組織化学的特性、生

化学的特性および収縮特性について調べ、骨格筋線維の分類を行なった。その結果、主に白筋線維からなっている長趾伸筋は収縮特性も速くかつ actomyosin ATPase 活性および myosin ATPase 活性も高いが、一方、組織化学的にほとんど赤筋線維でなっているヒラメ筋は収縮時間もおそく、ATPase 活性も低かったことを報告している。

また、Peter, J.⁴³⁾ は組織化学的にほとんど単一の筋線維からなっているモルモットのヒラメ筋および外側広筋の白色部、またウサギのヒラメ筋と半膜様筋の収縮特性および生化学的特性を調べて骨格筋線維を分類した。その結果、収縮特性のおそい筋線維の ATPase 活性は低い、反対に SDH 活性は高かったことを示した。彼らは、骨格筋の筋線維の分類の基準として、(1)筋線維の収縮時間、(2)解糖能力および(3)酸化能力をあげている。彼らは、それらの基準を用いて、骨格筋線維を

Fast-twitch-glycolytic (FG)

Fast-twitch-oxidative-glyco-

lytic(FOG) および Slow-twitch-oxidative(SO) 線維に分類される。

従来から、骨格筋線維の分類にはいろいろの用語が用いられているが、実験結果として出てきた特性を基礎に考えると、分類用語として生化学的および生理学的特徴を示している Peter, J. B. 5⁴³⁾ の分類用語が適切であると思われる。本実験では Peter, J. B. 5⁴³⁾ の分類用語を用いた。

(3) 固定による影響

関節を固定し筋を使用しないことによる骨格筋に及ぼす影響が生理学的、組織化学的および生化学的に調べられている。

Maier, A. 5³⁶⁾ は、420~650g という成熟したモルモットの後肢を静止長にて4週間にわたってギプスで固定を行なった。その結果、固定したヒラメ筋において、ヒーク張力までに要する時間が固定を行なわなかった反対側の脚より30%短縮したが、腓腹筋のそれには有意な差はなかったことを示した。しかし、腓

腹筋の筋重量は30%も減少し、ピーク強縮張力は有意に低下しなかつたため、筋重量で補正すると固定した腓腹筋で有意に大きくなることを示した。また、固定した腓腹筋はヒラメ筋よりも筋原線維たんぱく (mg/g. muscle) は減少が著しかった。そして、myosin ATPase 染色で筋線維をSTおよびFT線維に分類した場合、ST、FT線維ともどちらも萎縮が生じたが、よりST線維の萎縮の程度が大きかったことを報告している。

また、Fischbach, G.D. および N. Robbins¹⁵⁾ はラットを用いてヒラメ筋を2週間および4週間固定した時の筋の収縮特性について調べた。さらに、彼らは長期間の固定により固定を行なっている脚と行なっていない脚との筋電図を記録し、そのちがいを調べた。その結果、膝および足首の関節を固定することにより、対照群にくらべヒラメ筋の筋電図活動は5~15%減少した。その結果、tonicな発火パターンから phasicな発火パターンに移行したこと

を示した。また、4週間の固定により筋重量は42%も減少し、強縮張力も有意に減少したと報告している。

生理学的特性以外に、固定した筋の持続的能力については、人間以外の筋を用いていくつかの生化学的パラメーターについて示されている。

Mann, W.S. および B. Salafsky³⁷⁾ は、出生時から18週齢までのネコを用いていくつかの生理学的パラメーター（収縮時間、 $\frac{1}{2}$ 弛緩時間および最大強縮張力）と2種類の解糖系酵素（アルドラーゼおよびピルビン酸キナーゼ）および酸化酵素（リンゴ酸脱水素酵素およびイソクエン酸脱水素酵素）について調べた。その結果、固定をして筋を使用しないことによって、18週齢で前脛骨筋（速筋）、ヒラメ筋（遅筋）とも反対側の脚にくらべ萎縮が生じたことを示した。固定したヒラメ筋の収縮時間は反対側の脚よりわずかに速くなったが、前脛骨筋の収縮時間には変化は生じなかった。

2つの固定した筋の解糖系および酸化酵素の活性に変化はなかったが、固定した前脛骨筋の解糖系酵素(ピルビン酸キナーゼ)の活性が正常なものより高かったと報告している。

また、Rinfenberick, D. H. ⁴⁶⁾ は萎縮した筋において、りんご酸脱水素酵素および4トクローム酸化酵素といった酸化酵素が、正常な筋のそれぞれ約40および65%まで低下したことを示したが、これらの酵素活性値を筋1g当たりで示した場合、活性値は変化していないと報告している。

また、Booth, F. W. と J. R. Kelso ⁵⁾ は固定が骨格筋の収縮および組織化学的特性に及ぼす影響について調べた。彼らはラットの後肢を4週間固定し、筋切片をmyosin ATPase およびNA DH-diaphomase染色した。固定した脚のヒラメ筋は対照群よりも線維数が有意に少なくなった。特に、SO線維の割合が少なくなり有意に収縮スピードが速くなったことを示した。反対に、大腿直筋(速筋)はSO線維の割合およ

び収縮特性については有意な変化はなかったと報告している。

固定に際して、筋の長さの影響については Tabary, J. C.⁵¹⁾ の報告がある。彼らは成熟したネコを用いてヒラメ筋を伸展位および短縮位の両方で4週間ギプス固定した。2種類の筋長条件下で、passiveな長さ-張力曲線を求めた。その結果、伸展位で固定した筋は長さ-張力曲線は正常な筋と差はなかったが、短縮位で固定した筋では伸張性(extensibility)にかなり減少があったことを示した。また、彼らは筋線維の長さ、筋節の長さおよび1本の筋線維にそって存在する筋節の数を調べ、伸展位で固定した筋は正常な筋より20%も直列の筋節が多くあるが、反対に短縮位のそれは正常な筋の40%も少なかったことを観察した。また、短縮位で固定した筋もギプス解除後4週間で長さ-張力曲線関係および筋節の数とも正常な筋のそれにもどったことを示した。彼らは直列の筋節の数が変化したことは筋節

の長さがその新しい機能的な長さへ適応した
ことであると結論づけている。

また, Boyes, G. と I. Johnston⁶⁾ も筋の長さを
かえて固定した場合の筋線維構成の変化につ
いて調べた。彼らは, ラットの片脚の膝を完
全に伸展あるいは屈曲させた状態で3週間ギ
プスで固定し, 中間広筋を myosin ATPase およ
び SDH 染色した。その結果, SO 線維の面
積は1本当たり伸展位および屈曲位とも対照
群の約50%小さくなったことを示した。FOG
線維は屈曲位より伸展位の方の萎縮が大きか
ったことを示した。3週間の固定により筋線
維の総数は変化しなかったが伸展位では myosin
ATPase 活性の高い線維 (FOG) の数が65%,
屈曲位では83%増えたため, 筋線維構成に変
化が生じたことを観察した。

Tomanek, R. J. と R. R. Cooper⁵³⁾ は, 腱切断に
より筋を使用しない場合の ST および FT 線
維の構造上の変化について調べた。彼らはモ
ルモットのヒラメ筋 (Slow-twitch) と外側広筋

(Fast-twitch) の腱を切断した。その結果、ヒラメ筋のST線維は外側広筋のFT線維よりも急速にかつ著しい萎縮が生じたことを示した。また、ST線維はZ線および収縮フィラメントの分裂が生じ、さらにはミトコンドリアおよび筋鞘にも変化が生じたことを観察した。一方、FT線維にはそれらの変化は認められなかった。彼らは、これらの結果から腱切断に対して線維間に変動はあるが、筋線維タイプによつて異なる特異的な応答があると報告している。

同様に、Józsa, L.ら¹⁾はラットを用いてアキレス腱切断後および固定後の腓腹筋の毛細血管密度を調べた。彼らは、毛細血管数を筋線維1000本当たりで示し、腱切断後7日目では対照群の値から35%、14日目および21日目では31および32%毛細血管の数が減少したことを示した。一方、固定した筋では毛細血管の数の減少は腱切断後よりゆっくりにしたものであり、7日目では23%、14日目および21日目ではそ

れぞれ33および28%であることを示した。これらの結果から、固定あるいは腱切断によって、筋組織の毛細血管密度は著しく減少することを示している。

Goldspink, D. F.⁽¹⁷⁾は、ラットの長趾伸筋とヒラメ筋を短縮位で固定した場合と伸展位で保持した場合のたんぱく質転換の変化について調べた。彼は、長趾伸筋、ヒラメ筋とも短縮位で固定した場合には萎縮が生じ、組織のたんぱく質が減成したことを示した。この萎縮はたんぱく質合成の低下とたんぱく質分解の増加によって生じたものであるとした。また、この2つの筋を伸ばした状態を保持した場合、対照群の筋より筋重量が増加したことを示した。この急速な成長は主に、たんぱく質合成の割合が増加したことによるものであり、たんぱく質転換の際にリボゾームが積極的に関与しているためであるとした。これらから、積極的な伸展と伸展反射に対する等尺性張力発揮は、たんぱく質合成を刺激する因子となる

と考えた。一方、これらの因子は短縮位で固定した場合には作用せず、それらの固定した筋の活動レベルが低下したために線維に萎縮が生じたと報告している。

また、Krieger, D. A.³⁰⁾ は、従来から行なわれていたミトコンドリア抽出法を補正し、筋鞘下ミトコンドリアと筋原線維ミトコンドリアを抽出し、それぞれの呼吸量を測定する方法を確立し、固定の影響を調べた。彼は、筋を2日間固定することにより筋鞘下ミトコンドリアの State III の呼吸量が対照群に比べて約37%有意に減少したが、一方筋原線維のミトコンドリアの State III の呼吸量に変化は生じなかったことを示した。また、筋鞘下ミトコンドリアの SDH 活性も有意に減少したことを示した。これらの結果から、固定に対して筋原線維ミトコンドリアよりも筋鞘下ミトコンドリアの応答が早いことを報告している。

また、Cooper, R. R.⁹⁾ は、ネコの脚の筋を22週間固定したところ腓腹筋、ヒラメ筋とも筋

量は対照群の30%減少し、特に筋線維の大きさは腓腹筋よりヒラメ筋の方が萎縮が大きかったことを観察した。また、構造的に、萎縮の大きかったヒラメ筋の核が顕著に増加したと報告している。

人間の骨格筋を使用しない場合においての研究も数多くなされている。

Patel, A. N.⁴²⁾ は、脚に障害を負った患者14名を用いて、正常な脚と障害を負っている脚とを比較した。その結果、正常な脚と固定した筋とで、SDH染色には差がなかったが、萎縮は4例中5例に顕著であり筋線維の直径が有意に小さくなることを示した。しかし、固定の期間と萎縮の程度あるいは固定した脚の周囲の長さとの間に相関はなかったことを示した。また、萎縮した筋線維において相対的に核が増したと報告している。

また、Sargeant, A. J.⁴⁷⁾ も7名の患者を用いて53～213日間ギプスで脚を固定し、筋線維をmyosin ATPase活性に対して組織化学的に

染色した。その結果、STおよびFT両線維とも反対側の脚にくらべ有意に筋横断面積は減少したが、特にST線維の方がFT線維よりも萎縮の程度が大きかったと報告している。

人間の骨格筋をギアス固定し、その後トレーニングを行ない回復の過程を調べた研究がいくつかある。

MacDougall, J. D. ³³⁾ は、7名の健康な男子被験者を用いて5～6ヶ月間の固定およびウエイトトレーニングを行ない、筋線維面積について調べた。固定によりFT線維面積は30%、ST線維面積は25%減少したが、トレーニングによりFT線維は17%、ST線維は15%有意に増加したことを示した。しかし、その筋線維構成は変化しなかった。また、固定した筋において、線維に対する核の比が10%増加したことを示した。

また、同様な手順で MacDougall, J. D. ³⁴⁾ は、固定と筋カトトレーニングが筋の生化学的適応に及ぼす影響について調べた。固定により、

クレアチンリン酸が25%、グリコーゲンが40%有意に減少したが、トレーニングによりクレアチンが39%、クレアチンリン酸が22%、ATPが18%およびグリコーゲンが66%増加したと報告している。

(4) 運動に対する骨格筋の生化学的および組織化学的応答

筋力あるいは持続的トレーニングによって筋線維が肥大したり、筋の酵素活性が変化することは知られている²¹⁾。

Kowalski, K. ら²⁹⁾は、雌のラットに毎日4〜10 kmの自由運動と、200 gのおもりを持ち上げるウエイトトレーニングを行なわせた。その結果、アスファリラーゼ活性はウエイトトレーニングより持続的トレーニングにおいて増加が大きかったが、SDHおよびチトクロームオキシダーゼ活性は両トレーニングともほぼ同じ程度活性値が増加したと報告している。

また、Holloszy, J. O.²²⁾は、雄のラットに1日に2回、トレッドミルを用いて2時間のト

トレーニングを12週間にわたり行なわせた。その結果、トレーニング初期の運動強度の弱い時にはSDH活性に変化はなかったが、トレーニング強度が強くなるとSDH、チトクローム酸化酵素などは2倍も増加し、ミトコンドリアのたんぱく含量が60%増加したことを示した。彼らは、呼吸酵素の活性値が増加したことは、持続的トレーニングによりこのミトコンドリアのたんぱく含量が増加したためであると報告している。

また、Jablecki, C. と S. Kaufman²⁴⁾ はラットの足底筋の腱を切断することによりヒラメ筋に労作性肥大を生じさせ、骨格筋のミオシンに及ぼす影響について調べた。労作性肥大にともないヒラメ筋のミオシン量は増加するが肥大したヒラメ筋のmyosin ATPase活性は対照群より約11%低下したことを観察した。また、ミオシンのライトチェーンについては変化がなかったことを示した。これらから、労作性肥大を生じた筋のmyosin ATPase活性の低下は

その肥大に依存するものであると考えた。

Bagby, G. J. ら²⁾ は, ラットに持久的トレーニングあるいはスプリントトレーニングを行なわせ, 運動を行なわせないグループと比較して, myosin ATPase 活性および筋線維構成に及ぼす影響について調べた。その結果, 腓腹筋の赤色部および白色部を myosin ATPase 染色し, 筋線維を分類した場合, 持久的トレーニングおよびスプリントトレーニングを行なってもともに筋線維構成に変化は生じなかった。また, 両部位の myosin ATPase 活性値にも変化はなかったと報告している。

しかし, トレーニングに伴なう筋線維構成あるいは酵素活性値の変化について相反する研究報告もある。

Edgerton, V. R. ら¹³⁾ は, 雄のラットを用いて週に6日間水泳を52日間にわたり行なわせた。水泳は, 30分間の水泳を1セットとして1日に1あるいは2セット行なわせた。その結果, 足底筋においては高い酸化能力をもった FOG

線維の割合が増加したことを示した。一方、ヒラメ筋においては筋線維構成に変化はみられなかったと報告している。

Barnard, R. J. ら⁴⁾ は、雄のモルモットに週5日の頻度で9週間および18週間にわたり、トレッドミルを用いてスピード漸増法による持続的トレーニングを行なった。その結果、18週間トレーニングを行なったグループの筋のミトコンドリアたんぱく含量が増加したことを観察した。また、筋線維タイプを myosin ATPase および NADH-diaphorase 染色により分類したところ、腓腹筋の赤色部および白色部とも NADH 活性の高い ST 線維の割合が増加したと報告している。

Faulkner, J. A. ら⁴⁾ は、生後6週のモルモットを用い、1日60分間の持続的トレーニングを8週間にわたり行なわせ、筋線維タイプの異なる足底筋と横隔膜への影響と、トレーニングを中止したときの影響について調べた。その結果、持続的トレーニングにより足底筋

におけるST線維の占める割合の増加が横隔膜における増加より大きかったことを示した。しかし、同期間の脱トレーニングにより足底筋のST線維の占める割合は、対照群の値までもどってしまっただが、横隔膜のST線維の占める割合の低下は足底筋よりゆっくりした応答であることを示した。従って、持久的トレーニングにより筋線維構成は変化するが、同期間トレーニングを中止するとトレーニング前値にもどってしまうと報告している。

このように固定あるいは持久的トレーニングが骨格筋線維に及ぼす影響についてはさまざまな結果が出ている。また、固定を行ない萎縮した筋にトレーニングを行なわせた研究は少ない³³⁾³⁴⁾。したがって、本研究では筋の長さをかえた状態で固定を行ない組織化学的および生化学的に骨格筋線維へ及ぼす影響とトレーニングによる回復について検討する。

実験方法

(1) 実験対象

実験対象として、雄の Sprague-Dawley系ラット（生後8週）を60匹購入した。8週齢時の体重は $195.0 \sim 230.0$ g（平均 197.5 ± 8.85 g）であった。

実験対象を新しい環境に適応させるために1週間の適応期間をおいた。その後、無作為に2群、すなわち固定群（42匹）と対照群（18匹）とに分類した。さらに、固定群は足首の関節を背屈させ後肢の下腿背面の筋（足底筋およびヒラメ筋）を伸ばした状態で固定した群（21匹：以後I-ST群）と足首の関節を足底屈させ足底筋およびヒラメ筋を短縮位で固定した群（21匹：以後I-SH群）に分類した。対照群、I-ST群およびI-SH群の体重はそれぞれ 225.8 ± 6.72 , 226.3 ± 13.69 および 228.9 ± 9.16 gであった。

4週間の固定後、ギプスを取りはずし実験対象としてそれぞれ9匹ずつをI-STおよび

I-SH群として用い、残りがさらに4週間のトレーニングを開始した。伸長位で固定し、さらにトレーニングを行なった群(12匹)をI-T-ST群、短縮位固定後トレーニングを行なった群(12匹)をI-T-SH群とした。

なお、実験開始時の年齢は9週齢であり、I-STおよびI-SH群の固定終了時の年齢は13週齢であり、I-T-STおよびI-T-SH群のトレーニング終了時の年齢は17週齢であった。

また、Cont.群は9, 13および17週齢のものを用了。I-T-STおよびI-T-SH群ともトレーニング開始時にはそれぞれ12匹ずつであったがトレッドミルでの走行ができないものがあり最終的にはI-T-ST群7匹、I-T-SH群8匹であった。なお、各群の実験対象の数については表1に示した。

(2) 飼育方法

実験対象を2~3匹ずつ幅22×奥行32×高さ13cmおよび幅18×奥行28×高さ15cmのゲージ内で飼育した。この飼育条件は規定士れて

いる実験条件の範囲内に入っており適切なものであった⁵²⁾。飼料には、飼育用オリエンタル固型飼料(CE-2)を用い、1匹につき1日30gの飼料を与え、水は自由に摂取できるようにした。固型飼料の主成分は、100g中、粗たんぱく質24.5%、粗脂肪4.5%、可溶性無窒素物52.4%でありカロリーは348.1 Cal/100gであった。また、すべての群とも1週間ごとに体重測定を行なった。体重測定には秤量計(谷本社製:10g精度)を用いた。

(3) 固定方法

固定にはパッドをつけたギプス包帯(東京衛材研究所製)を用い、麻酔用エタノールで麻酔した後、片側の足首の関節を背屈させ下腿背部の筋(足底筋およびヒラメ筋)が完全に伸長するように固定した(I-ST群)。また、足首の関節を足底屈させ、下腿背部の筋が完全に短縮するように固定した(I-SH群)。両群とも固定した脚に血行障害がおこらないように足先はギプスから出し毎日観察した。

また、動物がギプスを取らないようにギプス包帯にピクリン酸をぬった。

(4) トレーニング方法

トレーニングは、マウス・ラット兼用トレッドミル(トキワ科学社製: T-804型)を用いて、週5日行なった。トレーニングに先がけ固定終了時の4日前から実験動物をトレッドミル上に毎日5~10分間のせ、新しい環境に適應させた。トレッドミルには上り勾配8度の傾斜をつけ、1週目の前半は $12\text{m}/\text{分} \times 5$ 分間の歩行からはじめ、以後速度と時間は表2に示したように、段階的に漸増してゆき4週目には $25\text{m}/\text{分}$ のスピードで30分間の持久走ができるようになった。

トレーニングは毎日できるだけ一定時刻に行なうようにした。また、実験動物がトレッドミル上をっづけて走行できるようにトレッドミル背面の電気ショック(60V)を用いた。

(5) 分析方法

① 組織化学的分析方法

実験動物は、腹腔内にペントバルビタールナトリウム(3~4mg/100g)を注入し麻酔した後、下腿の毛を散髪した。出血をなるべくさせないように下腿の足底筋およびヒラメ筋を摘出し、生理食塩水中でできるかぎり表面の血液および結合組織を取り除いた後、ろ紙上で水分を取り、筋腹中央部からアキレス腱側5mmの部位の試料をとり組織化学的分析のサンプルとした。残りを生化学的分析のためのサンプルとし、各々1mg精度の電子ビーム天秤(島津製作所製:ED-200型)を用いて計量し、ドライアイスで冷却したアセトン内(-80°C)で瞬間凍結させた。その後、直ちにアセトンから取り出し分析まで-80°Cのフリーザー(日本フリーザー社製:60ℓ用)で保存した。

組織化学的分析の試料を-25°Cのクリオスタット内で、クリオフォームとクリオクイックを用いて試料台に固定し、厚さ8μmの新鮮連続切片を2枚作成した。スライドガラスに

付着した切片を室温でドライヤーを用いて5分間乾燥させた。

なお、筋摘出から凍結までの過程を3分以内に行なった。

1) Myosin ATPase 染色

Myosin ATPase 染色は、Khan 法²⁷⁾を用いて行なった。

乾燥した切片を1%カルシウムホルマリン(0~4°C)の中に3分間浸漬した後、蒸留水(0~4°C)で3分間ずつ3回水洗した。この切片をA液^{註1}とB液^{註2}を混ぜ、1Nの水酸化ナトリウム溶液でpH9.4に調整した基質液(37°C)の中に17分間浸漬した。次に、基質液から取り出した切片を蒸留水で2分間ずつ3回水洗した後、室温で2%塩化コバルト溶液の中に3分間浸漬し、蒸留水で2分間ずつ3回水洗した。その後、1%硫化アンモニウム溶液中で50秒~1分間発色させ、蒸留水で2分間ずつ2回水洗した後、ポリビニルピロリドンを用いて切片を封入した。

註1 A液: 塩化カルシウム 320 mg, クエン酸 60 mg, ATP 100 mg を 0.1 M トリスマリン酸塩緩衝液 (pH 7.4) 30 ml に溶解したもの

註2 B液: ゼラチン 800 mg を 0.1 M トリスマリン酸塩緩衝液 (pH 7.4) 10 ml に溶解したもの

2) SDH 染色

SDH 染色には, Nachlas, M.M⁵³⁾の方法を用いた。

乾燥した切片を基質液^{註1}(37°C)に60分間浸漬した。その後, 蒸留水で2分間ずつ2回水洗した後ポリビニルピドリドンを用いて切片を封入した。

② 生化学的分析方法

1) Actomyosin の抽出法⁵⁴⁾

生化学的分析のために用いる凍結サンプル500 mg にあらかじめ冷やしておいた Weber-Edsall 溶液を加え, 氷の入ったビーカー内でポリトロンホモジナイザー(KINEMATICA社製: PT 10/35型)を用いて, 約20秒間ホモジナイズした。その後, 4°Cのコールドルームにて24時間放置した。24時間放置後, 上清に0.6 M KClを3 ml加え, よくかはんした後4°C, 18000gで5分間遠心した。その後, 上清部分に3倍量の蒸留水を徐々に加え, かはんした後, 4°C, 18000gでさらに10分間遠

註1 0.2 M コハク酸ナトリウム 5ml, リン酸緩衝液 5ml (pH 7.6)
および ニトロテトラゾリウム 10 ml (1 ml/mg) を混ぜたもの

心した。この沈殿に最終濃度が 0.5 M KCl となるように計算して 2 M KCl を加え、よくかくはんした後、サンプルと等量のグリセリンを混ぜ冷凍保存した。冷凍保存から actomyosin ATPase 活性測定までの期間は7日以内とした。

2) Actomyosin ATPase 活性測定

Actomyosin ATPase 活性を測定するために Fiske-Subbarow 法¹⁾ によるリン定量から求めた。すなわち、ATPase 反応液^{註1} 0.8 ml に 10 mM の ATP 0.1 ml を加え、 37°C の浴槽中に73分間加温した後、蒸留水にて5倍希釈した actomyosin 0.1 ml を加える。ここで反応を開始させ30秒毎に5分目までタイムカーブをとり、 10% 過塩素酸 (PCA) 1.0 ml を加えることにより ATP からのリンの遊離反応を中止させる。PCA を加えた後、ただちに氷冷中へ移し、さらに 2000 回転/分に73分間遠心する。その上清 1.0 ml に A.M. Working Molybdate^{註2} を 1.0 ml , ANS^{註3} を 0.1 ml と蒸留水 0.4 ml を混ぜた溶液を加え 37°C の浴槽中に715分間あたためた。その後、光電

註1 0.5 M トリス塩酸緩衝液 10 ml , 0.1 M MgCl_2 3 ml , 2 M KCl 2.25 ml たらに蒸留水を 54.75 ml 加え全量を 80 ml としたもの

註2 A液: 2.5% dl Anm. Molybdate を 5 N H_2SO_4 に溶かしたもの
B液: 2.5% dl Anm. Molybdate を蒸留水に溶かしたもの
A液 10 ml , B液 10 ml と蒸留水 60 ml を混ぜたもの

比色計 (KLETT-SUMMERSON 社製 : 800-3 型)

フィルターを用いて 640 nm での吸光度を読みとった。最も直線性のある 3 分目までの値を用いて次の式

$$\Delta P_i = \frac{5 (r)}{140} \times \frac{1}{31 (g)} \times \frac{2 \times (\text{読み-ブランクの読み})}{\text{たんぱく濃度 (mg)}} \times \frac{1}{3 (\text{分})}$$

により遊離したリンを求めた。なお、たんぱく濃度はビウレット法⁵⁵⁾を用いた。

(6) 骨格筋線維の分類

1) Myosin ATPase 染色による分類

Myosin ATPase 染色により, myosin ATPase 活性の高い筋線維は暗色に染まり, 活性の低い筋線維は明色に染色される。前者を Fast-twitch (FT) 線維後者を Slow-twitch (SO) 線維として分類した。

2) SDH 染色による分類

SDH 染色により筋線維は 3 種類に染色される。SDH 活性の高い線維, すなわち酸化能力のすぐれた線維は暗色, 活性の低い線維は明色および中間のものは中間色に染色される。

Myosin ATPase および SDH 染色した 2 枚の連続切

註3 ANS 0.5g, NaHSO₃ 30.3g, Na₂SO₃ 1.0g を蒸留水 200 ml に溶解したもの

片を同一倍率でかつ 0.01 mm の目盛を定規として、光学顕微鏡下で写真をとリ、同一筋線維をみつけ表3のように両染色の線維を組み合せ、骨格筋線維を3種類に分類した。分類用語は Peter, J. B. 5⁴³⁾ の定めた Fast-twitch-glycolytic (FG), Fast-twitch-oxidative-glycolytic (FOG) および Slow-twitch-oxidative (SO) 線維として分類した。

また、筋線維構成は全線維数に対する各線維タイプの百分率として求めた。

(7) 筋線維面積の測定

光学顕微鏡写真を同一倍率でひき伸ばし、各線維タイプごとにプラニメーター(武藤工業社製: Model G. デジグラマ)を用いて筋線維1本当たりの横断面積を求めた。また、各筋線維面積の相対的な割合は全面積に対する百分率として求めた。

(8) 統計処理

固定群において、伸長位群と短縮位群を対照群に対し、またトレーニング群についても同様に平均値の差の検定は Student の t 検定

を用いて行なった。また、固定およびトレーニング群とも伸長位と短縮位群との間で同様の方法で有意差検定を行なった。

なお、相対的な筋繊維タイプあるいは相対的な線維面積などの百分率を用いたものの統計処理は、まず χ^2 検定を行ない、そこで有意性が認められたものについて、さらにt検定を行なった。有意差は $P < 0.05$ 以下のものを有意と考えた。

(9) 実験条件

実験期間は、昭和55年9月29日から11月23日までであった。その期間の飼育室およびトレーニング室の温度および湿度はそれぞれ、 16.7 ± 2.4 °C、 65.3 ± 6.4 % および 18.2 ± 2.2 °C、 69.4 ± 7.1 % であった。また、飼育室での毎日の最高気温と最低気温は、それぞれ 19.2 ± 3.8 °C および 13.4 ± 2.2 °C であった。この実験条件は規定されている飼育および実験条件⁵²⁾の範囲内に入っており、適切なものであったと思われる。

結果

(1) 体重

固定およびトレーニングに伴なう体重の変化を図1に示した。実験開始時の体重はI-ST群 226.3 ± 13.69 g, I-SH群 228.9 ± 9.16 g および対照群 225.8 ± 6.72 g であり, 2種類の固定群はともに対照群と統計的に有意な差はなかった。4週間の固定後に対照群は 331.6 ± 16.50 g と約46.9%増加したのに対し, I-ST群では 284.4 ± 13.89 g とその増加は25.7%であった。また, I-SH群では 282.8 ± 17.01 g と23.5%の増加であった。4週間の固定によりI-ST, I-SH群とも対照群よりそれぞれ14.2および14.7%体重が軽く, ともに0.1%水準で有意な差が生じた。しかし, I-ST群とI-SH群との間に統計的に有意な差は認められなかった。その後, 両固定群は4週間の持続的トレーニングを行ない, 4週目でI-T-ST群では体重が27.8%, I-T-SH群で34.1%増加し, それぞれ 363.6 ± 18.07 , 379.3 ± 29.50 g となった。

一方、対照群の増加は18.1%にとどまり391.7±37.6gとなった。対照群と両固定群との間に統計的に有意な差はなかった。また、I-T-ST群とI-T-SH群との間にも有意な差は認められなかった。

(2) 筋重量

1) 固定による影響

表3に示すように固定により、足底筋は対照群に対して両固定群とも約38%軽くなり、ともに対照群との間に0.1%水準で有意な差が生じた。

一方、ヒラメ筋については、I-ST群において約49%、I-SH群では約54%それぞれ対照群より軽くなり、統計的に0.1%水準で有意な差が生じた。しかし、伸展位と短縮位固定群との間に有意差は認められなかった。

従って、足底筋、ヒラメ筋とも4週間の固定により筋重量は低下したが、伸展位および短縮位固定群との間に差は認められなかった。

2) トレーニングによる影響

表4に示すようにトレーニングにより足底筋の筋重量の回復はI-T-ST群よりI-T-SH群の方が悪く、I-T-SH群は対照群と統計的に5%水準で有意に少ない筋重量であった。また、ヒラメ筋においても足底筋と同様の傾向であった。

従って、足底筋、ヒラメ筋ともトレーニングによる筋重量の回復は短縮位より伸長位固定群の方が早かった。

(3) 筋線維構成への影響

1) 固定による影響

表6および図2に示すように、短縮位および伸長位群とも足底筋のFG線維の割合が減少し、FOG、SO線維の割合が増加する傾向にあったが統計的に有意な差は生じなかった。

また、ヒラメ筋についても両固定群とも筋線維構成は変わらなかった。

従って、4週間の伸長位および短縮位固定により、足底筋およびヒラメ筋の筋線維構成は変化しなかった。

2) トレーニングによる影響

表6および図3に示すように2種類の条件下での固定後のトレーニングによって筋線維構成は変わりなかった。

また、ヒラメ筋についてもトレーニングによって線維構成は変わりなかった。

従って、伸展位、短縮位固定後、トレーニングを行っても足底筋、ヒラメ筋とも筋線維構成は変化しなかった。

(4) 各筋線維面積への影響

1) 固定による影響

表7および図6に実験開始時の各筋線維面積を示した。対照群は、9週から13週齢にかけて各筋線維面積とも増加する傾向にあった。また、4週間の固定による変化を図7に示した。I-ST群の足底筋のFG線維は対照群の約46%、FOG線維は約50%およびSO線維は約48%まで筋線維面積は小さくなった。これに対して、I-SH群の筋線維面積はFG、FOGおよびSO線維とも対照群の約38、41、およ

び39%小さくなり、どの筋線維ともI-SH群の方が統計的に5%水準で有意に筋線維の萎縮は大きかった。

また、ヒラメ筋についてもI-ST群のFG、FOGおよびS0各筋線維は対照群の面積の約57、59および54%まで小さくなった。

一方、I-SH群の各筋線維は対照群のそれぞれ約50、55および52%まで小さくなった。

従って、足底筋、ヒラメ筋とも筋線維面積で筋の萎縮をみると伸展位固定群より短縮位固定群の方が萎縮が大きかった。

2) トレーニングによる影響

表7および図8にトレーニングによる筋線維面積の変化を示した。

4週間のトレーニングによりI-T-ST群の足底筋のFG、FOGおよびS0線維は対照群のそれぞれ約83、82および80%まで回復したがともに対照群と5%水準で有意に小さかった。また、I-T-SH群のそれは対照群の約75、74および72%であり、対照群と0.1%水準で

有意な差が生じた。これから、筋線維面積は、どの線維とも伸長位群の回復が早かったが、回復率で見ると両固定群ともほぼ同じであった。

また、I-T-S-T群のヒラメ筋のFG, FOGおよびSO各線維面積はそれぞれ対照群の約89, 92および94%まで回復した。しかし、I-T-S-H群の各線維面積はそれぞれ約62, 65および62%であり、どの筋線維とも伸長位の筋線維面積の回復は早かった。

(5) 線維面積の占める相対的な割合(% fiber area)への影響

1) 固定による影響

各筋線維面積が全筋線維面積に占める相対的な割合について表8および図4に示した。足底筋は伸長位および短縮位で固定を行なっても各線維の相対的な割合に変化はみられなかった。また、ヒラメ筋についても両固定群と対照群との間で相対的な筋線維面積の割合に変化はみられなかった。

従って、足底筋およびヒラメ筋とも各筋線維面積の占める相対的な割合が両固定群と対照群との間に差がないことから、伸展位、短縮位固定による差は認められず、各筋線維ともほぼ同じ程度小さくなった。

2) トレーニングによる影響

相対的な各筋線維面積を表8および図5に示した。両固定群の足底筋、ヒラメ筋とも相対的な筋線維面積の占める割合に変化は生じなかった。

従って、伸展位および短縮位両固定群の足底筋およびヒラメ筋の各筋線維面積の占める相対的な割合はトレーニングによって変化しなかった。

(6) Actomyosin ATPase 活性への影響

1) 固定による影響

表9に示したように、足底筋において実験開始時と固定およびトレーニング終了時の対照群はほぼ同じ actomyosin ATPase 活性値を示した。

4週間の固定により、I-ST 群より I-SH

群の活性値の低下が著しく、対照群の約54%まで低下した。

一方、ヒラメ筋については固定を行なってもI-ST, I-SH群と対照群との間のactomyosin ATPase活性値に差はみられなかった。

従って、4週間の固定によりヒラメ筋のactomyosin ATPase活性は伸展位および短縮位群とも変化しなかったが、足底筋では両固定群とも低下した。特に、短縮位固定群の低下が著しかった。

2) トレーニングによる影響

表9に示すようにヒラメ筋についてはI-T-ST, I-T-SH群ともトレーニングによりactomyosin ATPase活性は増加したが、I-T-ST群の活性値の回復の方が良かった。

また、ヒラメ筋は両固定群ともトレーニングによりactomyosin ATPase活性は変化しなかった。

従って、固定と同期間のトレーニングによりヒラメ筋のactomyosin ATPase活性は伸展位、短

縮位固定群とも変化しなかった。一方、足底筋は伸長位固定群の方が回復が良かった。

考察

Bárány, M. ら³⁾, Sreter, F.A. ら⁴⁹⁾ および Guth, L. ら¹⁹⁾ の研究により myosin ATPase 活性と筋収縮スピードとの関係が明らかになった。彼らの研究により、筋の収縮スピードは myosin ATPase 活性と比例することがわかってきた。特に、actin および Ca^{++} により活性化される myosin ATPase 活性が筋の収縮スピードと関連があり、その myosin ATPase の活性の高い線維は筋の収縮スピードが速く、一方活性の低い線維は収縮スピードがおそいことが明らかになった。

また、Barnard, R.J. ら⁴⁾ は、組織化学的に myosin ATPase 染色で暗く染まる筋線維を多くもっている筋では生化学的に actomyosin ATPase 活性が高く、一方明るく染まる筋線維が多い筋では活性が低いことを示した。

これらの研究により、組織化学的染色で分類された筋線維の生化学的あるいは収縮特性の検討がなされるようになった。筋のエネルギー源である ATP の再合成は無気的条件下では

解糖に、有氣的条件では酸化によるので解糖系酵素および酸化酵素の組織化学的染色により、筋線維の収縮特性あるいは酸化能力を推定することが出来る。

(1) 固定による影響

1) 筋線維構成および筋線維面積

本実験の実験対象は、9週齢から17週齢までのラットであり成熟期に達していったものがあった。

対照群の足底筋は、FG、FOGおよびSO線維から成っていた。FG線維は約36~42%であり、FOG線維は約53~58%であった。従って足底筋はほとんどFT線維によって構成されていた。

一方、ヒラメ筋はほとんどSO線維およびFOG線維から構成されておりFG線維は約0.2~0.9%しか存在しなかった。従って、ヒラメ筋は酸化能力のすぐれた筋であった。これは、Ariano, M.A.ら¹⁾のラットの骨格筋の線維構成とほぼ一致する値であった。

4週間の固定により足底筋の筋線維構成は短縮位群においてFG線維の占める割合が低下し、FOG線維の占める割合が多くなる傾向であったが、統計的に有意な差は認められなかった。従って、伸長位および短縮位固定により足底筋の筋線維構成に変化は認められなかった。一方、ヒラメ筋においても両固定群とも筋線維構成に変化は認められなかった。これは、Boyes, GとI. Johnston⁶⁾のラットの間脚筋を用いた固定実験によりmyosin ATPase活性の高い筋線維の割合が伸長位、短縮位とも増加したという報告と異なるものであった。その原因のひとつとして固定の期間あるいは用いた筋が異なることが考えられる。

固定による筋線維の萎縮について、筋の横断面積で見ると、足底筋は伸長位群において対照群にくらべFG, FOGおよびSO線維とも約50%の萎縮を生じた。一方、短縮位群は伸長位群より萎縮の程度が大きく、どの筋線維とも約60%ほどの萎縮であった。また、相

対的な筋線維面積の占める割合と合わせて考えると本実験の結果から単一の筋線維だけが著しく萎縮を生ずるといふことはなかつた。従つて、どの筋線維ともほぼ同じ程度萎縮が生じた。これはヒラメ筋についても同様の傾向であつた。これらの結果は、Karpati, G と W. K. Engel²⁶⁾の結果と一致しており筋線維間に萎縮の程度に差が生じなかつた。これはひとつには4週間という固定期間が長かつたためであると考えられる。

また、伸長位固定より短縮位固定の方が足底筋、ヒラメ筋とも筋線維の萎縮は大きかつた。これは本実験と同期間固定実験を行なつた Tarbay, J. C. (51)の結果と一致してゐた。伸長位より短縮位の方が萎縮の程度が大きかつた原因のひとつとして、筋節の長さあるには1本の筋線維にそつて存在する筋節の数が短縮位固定において著しく減少するためであると考えられる。

また、ヒラメ筋においては伸長位および短

縮位固定群の間で萎縮の程度に差が生じなかった。その原因のひとつとして、Cooper, R.R.⁹⁾が述べているようにST線維の多い筋の方がFT線維の多い筋より早期に萎縮が生ずることが考えられる。また、Tomanek, R.J.⁵³⁾が述べているように固定によりヒラメ筋の収縮フィラメントの崩壊ならびに構造上Z線が変化し腓腹筋などのFT線維の多い筋よりヒラメ筋のようなST線維の多い筋の方が早期にかっ著しく萎縮が生ずることから本研究のヒラメ筋において伸長位群と短縮位との間に萎縮の程度に差が生じなかったことは伸長位固定に対して足底筋よりヒラメ筋の応答が早かったためであると考えられる。

2) Actomyosin ATPase活性への影響

4週間の固定によりactomyosin ATPase活性値は対照群と比較して伸長位群で33%、短縮位群で46%低下し、短縮位の足底筋の活性値の低下が著しかった。短縮位固定でのactomyosin ATPase活性の低下が著しかった原因のひとつは、Gold-

Spink, D. F.¹⁷⁾が述べているように伸長位より短縮位固定の方が萎縮した組織でのたんぱく合成の低下とたんぱく分解の増加が大きいことによると考えられる。また, Maier, A.ら³⁵⁾が述べているようにヒラメ筋のようなST線維の多い筋より腓腹筋のようなFT線維の多い筋の方が固定による筋原線維たんぱくの減少が著しいことも原因のひとつであると考えられる。さらに, actomyosin ATPase 活性の低下する原因として, 筋が白筋型から赤筋型に変化すること, あるいは myosin 自体に変化が生じたために低下することが考えられる。組織化学的分析によつて筋線維構成に変化がないことから固定によつて筋線維の myosin に変化が生じたために actomyosin ATPase 活性が低下したものと考えられる。

一方, ヒラメ筋の actomyosin ATPase 活性は両固定群と対照群との間に差はみられなかった。これは, ヒラメ筋自体の actomyosin ATPase 活性が足底筋に比べて本来低いためであると考えら

れる。

組織化学的および生化学的結果から、足底筋の actomyosin ATPase 活性が固定により低下したにもかかわらず組織化学的に分類した筋線維構成に変化はみられなかった。その原因のひとつとして、同一浸漬条件で固定した筋を myosin ATPase 染色した場合、染まり方がうすい線維が生じていたことから足底筋の actomyosin ATPase は低下したがヒラメ筋の活性値に至るまで低下しなかったために、組織化学的に筋線維を分類した場合、線維構成に変化がなかったものと思われれる。

(2) トレーニングによる回復

4週間の固定後、同期間の持久的トレーニングを行なわせた結果、固定した群と固定解除後のトレーニング群との間で足底筋、ヒラメ筋とも筋線維構成に有意な変化はみとめられなかった。これは、固定を行なわずに持久的運動のみを行なわせた Edgerton, V. R. ら¹³⁾の実験結果と異なるものであった。彼らは、持久

的トレーニングにより足底筋の FOG 線維が増加すると述べている。本実験において筋線維構成が変化しなかったことの原因のひとつとして、固定によりどの筋線維とも萎縮あるいは actomyosin ATPase 活性が低下し、それらの低いレベルからのトレーニングであったこと、および固定と同期間のトレーニングでは総運動量が低いため筋線維タイプに移行が生じなかったものと思われる。

また、トレーニングにより足底筋の筋重量、筋線維面積とも回復したが、ヒラメ筋の短縮位固定群の回復が他の群にくらべ悪かった。これは、MacDougall, J. D. ³³⁾ および Grimby, G. ¹⁸⁾ の人間を用いた回復トレーニングにおいて ST 線維の方が筋線維面積の回復がおそかったという報告と合わせて考えると ST 線維の多いヒラメ筋の方が回復が悪かったと考えられる。しかし、伸長位群のヒラメ筋の回復は早かったのび短縮位固定のヒラメ筋の回復が悪かったことは Józsa, L. ²⁵⁾ が述べているように固

定によって毛細血管数が減少したということが短縮位固定時に生じていたためであると考えることもできる。

固定期間と同期間のトレーニングにより actomyosin ATPase 活性が固定前の活性値まで回復しなかったことは, Houston, M. E. ら²³⁾ のトレーニングを中止した場合に低下した筋の酵素活性値は同期間再トレーニングを行ってもトレーニング中止前の活性値にもどらなかったという知見と一致している。

今後、固定により萎縮した筋、あるいは低下した酵素活性が固定前の値まで回復するものなのか、あるいは回復するとすればどの程度の期間が必要であるのか検討してゆかねばならないと思われる。

結論

SD系ラットを用いて、伸長位および短縮位で4週間固定を行なった場合、足底筋、ヒラメ筋とも短縮位固定の方が筋線維面積の萎縮は大きい。また、足底筋の actomyosin ATPase 活性に低下がみられる。

固定解除後の4週間の持続的トレーニングにより、足底筋、ヒラメ筋とも伸長位固定群の方が筋線維面積の回復は早い。また、足底筋の actomyosin ATPase 活性も同様な傾向である。

しかし、固定と同期間の持続的トレーニングでは筋線維面積、酵素活性とも固定前の値まで回復しない。

要約

- 1) 固定と固定解除後の持続的トレーニングが足底筋およびヒラメ筋の筋線維面積, 筋線維構成および actomyosin ATPase 活性値に及ぼす影響を検討した。
- 2) 実験対象として, SD系ラット(9週齢)を用い, 右後肢を伸展位および短縮位で4週間固定を行ない, その後4週間のトレッドミル持久走を行なわせた。
- 3) 足底筋およびヒラメ筋の連続凍結切片を myosin ATPase および SDH 染色を行ない, 筋線維を Fast-twitch-glycolytic (FG), fast-twitch-oxidative-glycolytic (FOG) および slow-twitch-oxidative (SO) 線維に分類し, 各線維の相対的割合, 横断面積および相対的面积比を求めた。また, 両筋をそれぞれホモジゲナイズして actomyosin ATPase 活性を求めた。
- 4) 足底筋の線維面積は対照群に対して, 短縮固定の方が萎縮が大きかった(伸展位: 53.7, 49.9, 51.8%, 短縮位: 61.9, 58.8, 60.9%, FG, FOG および SO 線維)。また, ヒラメ筋

も同様な傾向がみられた(伸長位: 43.5, 41.0, 46.4, 短縮位: 49.9, 45.3, 47.6%, FG, FOG およびSO線維)。Actomyosin ATPase 活性値は、足底筋の短縮位固定での低下が著しく、伸長位、短縮位それぞれ対照群の35および46%の低下であった。ヒラメ筋の活性値に差はなかった。また、両筋とも筋線維構成および相対的線維面積の割合に変化はみられなかった。

5) 固定解除後の持続的トレーニングに伴ない、足底筋は各筋線とも伸長位の方が短縮位よりも筋線維面積の回復は良かった。これはヒラメ筋についても同様であった。また、actomyosin ATPase 活性も足底筋においては伸長位の回復が良かったが、ヒラメ筋では差はなかった。固定後と同様、両筋とも筋線維構成および相対的筋線維面積の割合は変化しなかった。

6) 従って、伸長位、短縮位で固定を行なった場合、足底筋では短縮位固定での筋線維面積の萎縮が著しく、actomyosin ATPase 活性値の

低下も大きかった。また、ヒラメ筋についても同様な傾向がみられた。

固定解除後の持続的トレーニングにより、足底筋、ヒラメ筋とも伸長位固定群の方が筋線維面積、actomyosin ATPase 活性値の回復は早かったが、固定と同期間の4週間のトレーニングでは固定前の値まで回復しなかった。

謝辞

本研究の実験に際し、多大の便宜を与えて下さった順天堂大学共同病理研究室の福田芳郎教授および終始、御懇篤な御指導をして下さいました村田弥恵子室長補佐、ならびに体育学部生化学研究室の鈴木勝彦先生に対してここに慎んで感謝いたします。

文献

- 1) Ariana, M.A., R.B. Armstrong and V.R. Edgerton : Hindlimb muscle fiber population of five mammals. J. Histochem. Cytochem., 21 51-55 (1973)
- 2) Bagby, G.J., W.L. Sembrowich and P.D. Gollnick : Myosin ATPase and fiber composition from trained and untrained rat skeletal muscle. Am. J. Physiol., 223 1415-1417 (1972)
- 3) Bárány, M. : ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. J. Gen. Physiol., 50 197-216 (1967)
- 4) Barnard, R.J., V.R. Edgerton, T. Furukawa and J.B. Peter : Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. Am. J. Physiol., 220 410-414 (1971)
- 5) Booth, F.W. and J.R. Kelso : Effect of hindlimb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. Pflugers Arch., 342 231-238 (1973)
- 6) Boyes, G. and I. Johnston : Muscle fibre composition of rat vastus intermedius following immobilisation at different muscle length. Pflugers Arch., 381 195-200 (1979)
- 7) Brooke, M.H. and K. Kaiser : Three "myosin adenosine triphosphate" system : the nature of their pH ability and sulfhydryl dependence. J. Histochem. Cytochem., 18 670-672 (1970)
- 8) Bullard, H.H. : Histological as related to physiological and chemical differences in certain muscle of the cat. Johns Hosp. Rep., 18 323-328 (1919)
- 9) Cooper, R.R. : Alterations during immobilization and regeneration of skeletal muscle in cats. J. Bone Jt. Surg., 54-A 919-953 (1972)
- 10) Denny-Brown, D. : The histochemical feature of striped muscle in relation to its functional activity. Proc. Roy. Soc. B. 104 371-411 (1929)
- 11) Edgerton, V.R. : Mammalian muscle fiber types and their adaptation. Amer. Zool., 18 113-125 (1978)
- 12) Edgerton, V.R., J. Barnard, J.B. Peter, A. Maier and D.R. Simpson : Properties of immobilized muscle of the Galago senegalensis. Exp. Neurol., 46 115-131 (1975)
- 13) Edgerton, V.R., L. Gerchman and R. Carrow : Histochemical changes in rat skeletal muscle after exercise. Exp. Neurol., 24 110-123 (1969)

- 14) Faulkner, J.A., L.C. Maxwell and D.A. Lieberman : Histochemical characteristics of muscle fibers from trained and detrained guinea pigs. Am.J.Physiol., 222 836-840 (1972)
- 15) Fischbach, G.D. and N. Robbins : Changes in contractile properties of disused soleus muscle. J.Physiol., 201 305-320 (1969)
- 16) Fiske, C.H. and Y. Subbarow : The calorimetric determination of phosphorus. J.Biol.Chem., 66 375-400 (1925)
- 17) Goldspink, D.K. : The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. J.Physiol., 264 267-282 (1977)
- 18) Grimby, G., E. Gustafsson, L. Peterson and P. Renström : Quadriceps function and training after knee ligament surgery. Med.Sci. Sports Exercise, 12 70-75 (1980)
- 19) Guth, L., and F.J. Samaha : Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. Exp.Neurol., 25 138-152 (1969)
- 20) Guth, L., and H. Yellin : The dynamic nature of the so-called fiber types of mammalian skeletal muscle. Exp.Neurol., 31 277-300 (1971)
- 21) Hickson, R.C., W.W. Heusner and W.D.V. Huss : Skeletal muscle enzyme alterations after sprint and endurance training. J.Appl.Physiol., 40 868-872 (1976)
- 22) Holloszy, J.O. : Biochemical adaptation in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. J.Biol.Chem., 242 2278-2282 (1967)
- 23) Houston, M.E., H. Bentzen and H. Larsen : Interrelationships between skeletal muscle adaptation and performance as studied by detraining and retraining. Acta Physiol.scand., 105 163-170 (1979)
- 24) Joblecki, C. and S. Kaufman : Myosin adenosine triphosphatase activity during work-induced growth of slow and fast skeletal muscle in normal rat. J.Biol.Chem., 248 1056-1062 (1973)
- 25) Józsa, L., M. Järvinen, M. Kvist, M. Lehto and A. Mikola : Capillary density of tenotomized skeletal muscles. I. Experimental study in the rat. Eur.J.Appl.Physiol., 44 175-181 (1980)

- 26) Karpati, G. and W.K. Engel : Correlative histochemical study of skeletal muscle after suprasedgmental denervation, peripheral nerve section and skeletal fixation. Neurol., 18 681-692 (1968)
- 27) Khan, M.A., J.M. Papadimitriou, P.G. Holt and B.A. Kakulas : A calcium-citro-phosphate technique for the histochemical localization of myosin ATPase. Stain Technol., 47 277-281 (1972)
- 28) Khan, M.A., J.M. Papadimitriou, P.G. Holt and B.A. Kakulas : A histochemical analysis of mammalian oxidative skeletal muscle fibers using the enzymes of energetic metabolism. Histochemi., 33 301-312 (1973)
- 29) Kowalski, K., E.E. Gordon, A. Martinez and J. Adamek : Changes in enzyme activities of various muscle fiber type in rat induced by different exercise. J.Histochem.Cytochem., 17 601-607 (1968)
- 30) Krieger, D.A., C.A. Tate, J.M. Wood and F.W. Booth : Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. J.Appl.Physiol.:Respirat.Environ.Exercise Physiol., 48 23-28 (1980)
- 31) Kuffer, S.W. and E.M.V. Williams : Properties of the slow skeletal muscle fibers of the frog. J.Physiol., 121 318-340 (1953)
- 32) Mabuchi, K. and K.A. Sréter : Actomyosin ATPase. II. Fiber typing by histochemical ATPase reaction. Muscle Nerve, 33 233-239 (1980)
- 33) MacDougall, J.D., G.C.B. Elder, D.G. Sale, J.R. Moroz and J.R. Sutton : Effects of strength training and immobilization on human muscle fibres. Eur.J.Appl.Physiol., 43 25-34 (1980)
- 34) MacDougall, J.D., G.R. Ward, D.G. Sale and J.R. Sutton : Biochemical adaptation of human skeletal muscle to heavy resistance training and immobilization. J.Appl.Physiol.:Respirat.Environ.exercise physiol., 43 700-703 (1977)
- 35) Maier, A., E. Eldred and V.R. Edgerton : The effects on spindles of muscle atrophy and hypertrophy. Exp.Neurol., 37 100-123 (1972)

- 36) Maier, A., J.L. Crockett, D.R. Simpson, C.W. Saubert and V.R. Edgerton : Properties of immobilized guinea pig hindlimb muscle. Am. J. Physiol., 231 1520-1526 (1976)
- 37) Mann, W.S. and B. Salafsky : Enzymic and physiological studies on normal and disused developing fast and slow cat muscle. J. Physiol., 208 33-47 (1970)
- 38) Nachlas, M.M., K.-C. Tsou, E.D. Souza, C.-S. Cheng and A.M. Seligman : Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J. Histochem. Cytochem., 5 420-436 (1957)
- 39) Nishiyama, A. : Histochemical studies on the red, white and intermediate muscle fibers of some skeletal muscle. I. Succinic dehydrogenase activity and physiological function of intercostal muscle fibers. Acta Med. Okayama, 19 177-189 (1965)
- 40) Padykula, H.A. : The localization of succinic dehydrogenase in tissue section of the rat. Am. J. Anat., 91 107-132 (1952)
- 41) Padykula, H.A. and E. Herman : The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphate. J. Histochem. Cytochem., 3 170-195 (1955)
- 42) Patel, A.N., Z.A. Razzak and D.K. Dastur : Disuse atrophy of human skeletal muscle. Arch Neurol., 20 413-421 (1969)
- 43) Peter, J.B., R.J. Barnard, V.R. Edgerton, C.A. Gillespie and K.E. Stempel : Metabolic profiles of three types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. Biochemistry, 11 2627-2633 (1972)
- 44) Ranvier, P.L. : De quelques faits relatifs a l'histologie et a la physiologie des muscles striés. Arch Physiol. norm. Path., 1 5-15 (1874)
- 45) Ranvier, P.L. : Note sur les vaisseaux sanguins et la circulation dans les muscles rouges. Arch physiol. norm. Path., 1 446-450 (1874)
- 46) Rifkenberick, D.H., J.G. Camble and S.R. Max : Response of mitochondrial enzymes to decreased muscle activity. Am. J. Physiol. 225 1295-1299 (1973)
- 47) Sargeant, A.J., C.T.M. Davies, R.H.T. Edwards, C. Maunder and A. Young : Functional and structural changes after disuse of human muscle. Cli. Sci. Mol. Med., 52 337-342 (1977)

- 48) Seligman, A.M. and A.M. Rutenburg : The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. Science., 113 317-320 (1951)
- 49) Sreter, F.A., J.C. Seidel and J. Gregely : Studies on myosin from red and white skeletal muscle of the rabbit. I. Adenosine triphosphatase activity. J. Biol. Chem., 241 5772-5776 (1966)
- 50) Stein, J.M. and H.A. Padykula : Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. Am. J. Anat., 110 103-123 (1962)
- 51) Tabary, J.C., C. Tabary, C. Tardieu, G. Tardieu and G. Goldspink : Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different length by plaster casts. J. Physiol., 224 231-244 (1972)
- 52) 田嶋嘉雄 : 実験動物学 各論 第2版 417-441 朝倉書店 : 東京 (1972)
- 53) Tomanek, R.J. and R.R. Cooper : Ultrastructural changes in tenotomized fast and slow-twitch muscle fibres. J. Anat., 113 409-424 (1972)
- 54) 植木 厚 : 生化学実験講座. 筋肉 第1版 245 東京化学同人社 : 東京 (1975)
- 55) 植木 厚 : 生化学実験講座. タンパク質の化学 I 一分離精製 — 第1版 48-49 東京化学同人社 : 東京 (1975)
- 56) Wohlfart, G. : Über das vorkommen verschiedener Arten von Muskelfasern in der Skelettmuskulatur des Menschen und einiger Säugetiere. Acta Psychiatria et Neurolog., Suppl. 12 1-110 (1937)

The effects of the immobilization and endurance training after the immobilization on the skeletal muscle fibers of rat.

Noboru HOTTA

1. The purpose of the present study was to clarify the effects of the immobilization and the endurance training after the immobilization on the muscle fiber composition, muscle fiber areas and actomyosin ATPase activities of m.plantaris and m.soleus.
2. One hind limb of male Spragu Dawley strain rat was forced to fully stretched or shortened immobilization with plaster cast for 4 weeks from the age of 9-week-old. After immobilization, they were forced to endurance running training on a treadmill 5 days per week for 4 weeks.
3. The muscle fibers were classified into fast-twitch-glycolytic(FG), fast-twitch-oxidative-glycolytic(FOG) and slow-twitch-oxidative(SO) types by myosin ATPase and SDH stain methods. The actomyosin ATPase activities of the homogenized muscles were measured by Fiske-SubbaRow method.
4. After stretched and shortened immobilization, fiber areas of all types in m.plantaris were smaller than that of the control : in case of the stretched immobilization, the areas were 53.7, 49.9 and 51.8% smaller, in FG, FOG and SO fibers, respectively ; in case of the shortened immobilization, the decrease of the areas was 61.8, 58.8 and 60.9%, respectively. Therefore, the atrophy was greater in shortened than in stretched immobilization.
The atrophy of m.soleus showed the same tendency as of m.plantaris (I-ST:43.5, 41.0 and 46.4, I-SH:49.9, 45.3 and 47.6%, for FG, FOG and SO fibers, respectively). Also, the actomyosin ATPase activities of m.plantaris were decreased in stretched and in shortened immobilization more than in the control, by 33% and 46%, respectively.
5. No significant difference was detected in any fiber types and relative fiber areas of m.plantaris and m.soleus among control group, immobilization groups and training groups. After endurance training, the hypertrophy of m.plantaris and m.soleus in stretched position is greater than in shortened.

6. In conclusion, m.plantaris in shortened immobilization was atrophied more than in stretched immobilization. Also, actomyosin ATPase activities of m.plantaris in shortened were decreased more than in stretched immobilization. While, the atrophy of m.soleus was almost the same tendency as of m.plantaris.

After training, the hypertrophy of m.plantaris and m.soleus in stretched immobilization occurred faster than in shortened immobilization. However, the fiber area and actomyosin ATPase activity did not recover to the values obtained before immobilization.

Table 1. Number of rats in this study.

Group	Number
Cont.	6
Cont.	6
I-ST	9
I-SH	9
Cont.	6
I-T-ST	7
I-T-SH	8

Cont. : Control group.
I-ST : Stretched immobilization group.
I-SH : Shortened immobilization group.
I-T-ST : Stretched immobilization and training group.
I-T-SH : Shortened immobilization and training group.

Table 2. Training program.

Week	Speed m/min	Duration min/day	Frequency days/week
1	12.0	5-10	2
	15.0	5-10	2
	18.0	10-15	2
2	22.0	15-20	5
3	25.0	20-25	5
4	25.0	25-30	5

Table 3. Histochemical enzyme profile used to classify muscle fibers.

myosin ATPase (pH 9.4)	SDH	Fiber type
Dark	Light	Fast-twitch-glycolytic (FG)
Light	Intermediate	Slow-twitch-oxidative (SO)
Dark	Dark	Fast-twitch-oxidative-glycolytic (FOG)

Table 4. Weight of m.plantaris and m.soleus in control group and immobilization group after 4-week fixation.

Muscle Weight (mg)		
	M.Plantaris	M.Soleus
Cont.	307	138
	304	98
	277	101
	292	96
	308	104
	266	98
	\bar{X}	296.3
SD	15.94	14.81
I-ST	164	57
	164	52
	198	61
	208	53
	207	62
	158	52
	207	50
	166	43
	173	51
	\bar{X}	182.8***
SD	20.38	5.52
I-SH	188	44
	196	48
	205	47
	186	59
	142	56
	195	55
	175	44
	180	41
	194	39
	\bar{X}	184.6***
SD	17.27	6.60

*** $P < 0.001$ Cont.vs.I-ST,I-SH

The abbreviations are the same in Table 1.

Table 5. Weight of m.plantaris and m.soleus in control group and training group after 4-week endurance training.

Muscle Weight (mg)		
	M.Plantaris	M.Soleus
Cont.	377	140
	283	133
	315	131
	371	183
	343	147
	347	123
	\bar{X}	339.3
SD	32.29	19.45
I-T-ST	279	128
	269	88
	347	145
	268	78
	347	132
	318	137
	286	113
\bar{X}	302.0 ^{ns}	117.3 ^{ns}
SD	32.37	23.63
I-T-SH	324	128
	288	98
	225	100
	248	90
	318	130
	314	135
	312	110
301	113	
\bar{X}	291.3*	113.0*
SD	33.73	15.53

* $p < 0.05$ Cont. vs. I-T-SH
 ns not significant Cont. vs. I-T-ST

The abbreviations are the same Table 1.

Table 6. Muscle fiber composition of m.plantaris and m. soleus in all groups.

	M.Plantaris (%)			M.Soleus (%)			
	FG	FOG	SO	FG	FOG	SO	
Cont.	\bar{X}	41.7	53.0	5.3	0.2	28.7	71.1
	SD	3.76	5.28	1.73	0.29	4.19	4.25
Cont.	\bar{X}	37.4	58.1	4.5	0.5	38.5	61.0
	SD	3.40	2.20	1.38	0.30	3.24	3.46
I-ST	\bar{X}	36.6	58.5	4.9	0.8	38.5	60.7
	SD	2.44	2.61	0.73	0.31	1.62	2.11
I-SH	\bar{X}	33.9	60.1	6.0	0.6	41.8	57.6
	SD	3.50	2.75	2.35	0.41	5.73	5.83
Cont.	\bar{X}	35.4	59.7	4.9	0.9	35.0	64.1
	SD	4.36	3.91	2.12	0.46	4.00	4.00
I-T-ST	\bar{X}	34.6	60.4	4.8	1.0	36.2	62.8
	SD	4.40	4.79	3.70	0.40	2.12	3.91
I-T-SH	\bar{X}	34.2	61.2	4.6	0.9	34.1	66.3
	SD	4.71	4.36	2.88	0.47	4.44	4.96

The abbreviations are the same in table 1.

Table 7. Muscle fiber area of m.plantaris and m.soleus in all groups.

	M.Plantaris (μm^2)			M.Soleus (μm^2)			
	FG	FOG	SO	FG	FOG	SO	
Cont.	\bar{X}	1097.9	1100.6	1458.7	1439.4	1347.5	1980.8
	SD	128.03	206.74	130.88	169.80	110.40	147.45
Cont.	\bar{X}	1627.0	1693.9	2032.1	1633.8	1729.0	2149.8
	SD	157.73	157.49	340.05	135.63	131.15	272.62
I-ST	\bar{X}	752.6***	848.6***	979.4***	923.8***	1019.8***	1152.2***
	SD	136.29	146.38	118.62	265.23	209.55	210.08
I-SH	\bar{X}	619.5***	679.4***	795.0***	817.9***	945.4***	1126.9***
	SD	109.14 #	106.50 #	141.58 #	133.35 ns	108.59 ns	119.41 ns
Cont.	\bar{X}	1681.9	1794.6	1991.2	2048.2	2111.6	2395.4
	SD	176.42	230.84	286.32	206.37	207.76	279.35
I-T-ST	\bar{X}	1391.1**	1466.6*	1580.2*	1827.0 ns	1938.9 ns	2256.3 ns
	SD	102.61	173.61	172.22	187.96	250.50	237.18
I-T-SH	\bar{X}	1254.3***	1330.9***	1430.5***	1263.2***	1369.3***	1487.4***
	SD	103.42 #	92.14 ns	68.01 ns	171.79 ###	200.27 ###	189.73 ###

* p<0.05 Cont.vs.I-T-ST
 *** p<0.001 Cont.vs.I-ST,I-SH,I-T-SH
 # p<0.05 I-ST vs.I-SH
 ### p<0.001 I-T-ST vs.I-T-SH
 ns not significant

The abbreviations are the same in Table 1.

Table 8. Relative muscle fiber area of m.plantaris and m.soleus in all groups.

	M.Plantaris (%)			M.Soleus (%)			
	FG	FOG	SO	FG	FOG	SO	
Cont.	\bar{X}	30.1	29.9	40.0	30.1	28.3	41.6
	SD	0.79	1.79	1.40	1.82	0.94	1.89
Cont.	\bar{X}	30.5	31.8	37.7	29.7	31.4	38.9
	SD	1.09	1.28	2.26	1.56	1.09	2.15
I-ST	\bar{X}	29.0	32.8	38.2	29.4	33.1	37.5
	SD	1.66	1.55	1.99	3.54	1.89	2.02
I-SH	\bar{X}	29.6	32.5	37.9	28.2	32.7	39.1
	SD	2.17	1.33	2.45	2.19	0.97	1.79
Cont.	\bar{X}	30.9	32.8	36.3	31.3	32.2	36.5
	SD	0.99	0.36	1.07	0.44	0.79	1.03
I-T-ST	\bar{X}	31.9	33.0	35.1	30.3	32.2	37.5
	SD	1.75	0.69	1.31	0.82	1.12	0.66
I-T-SH	\bar{X}	31.2	33.1	35.7	30.6	33.2	36.2
	SD	0.86	0.38	1.20	0.89	0.47	1.15

The abbreviations are the same in Table 1.

Table 9. Actomyosin ATPase activities of m.plantaris and m.soleus in allgroups.

	M.Plantaris	M.Soleus
	4 pi μmol/protein mg·min	
Cont.	1.61 (3)	0.61 (2)
Cont.	1.65 (3)	0.50 (2)
I-ST	1.10 (2)	0.57 (1)
I-SH	0.89 (2)	0.48 (1)
Cont.	1.61 (3)	0.39 (2)
I-T-ST	1.24 (3)	0.38 (2)
I-T-SH	1.08 (3)	0.38 (2)

(n) is the number of samples.

The abbreviations are the same in Table 1.

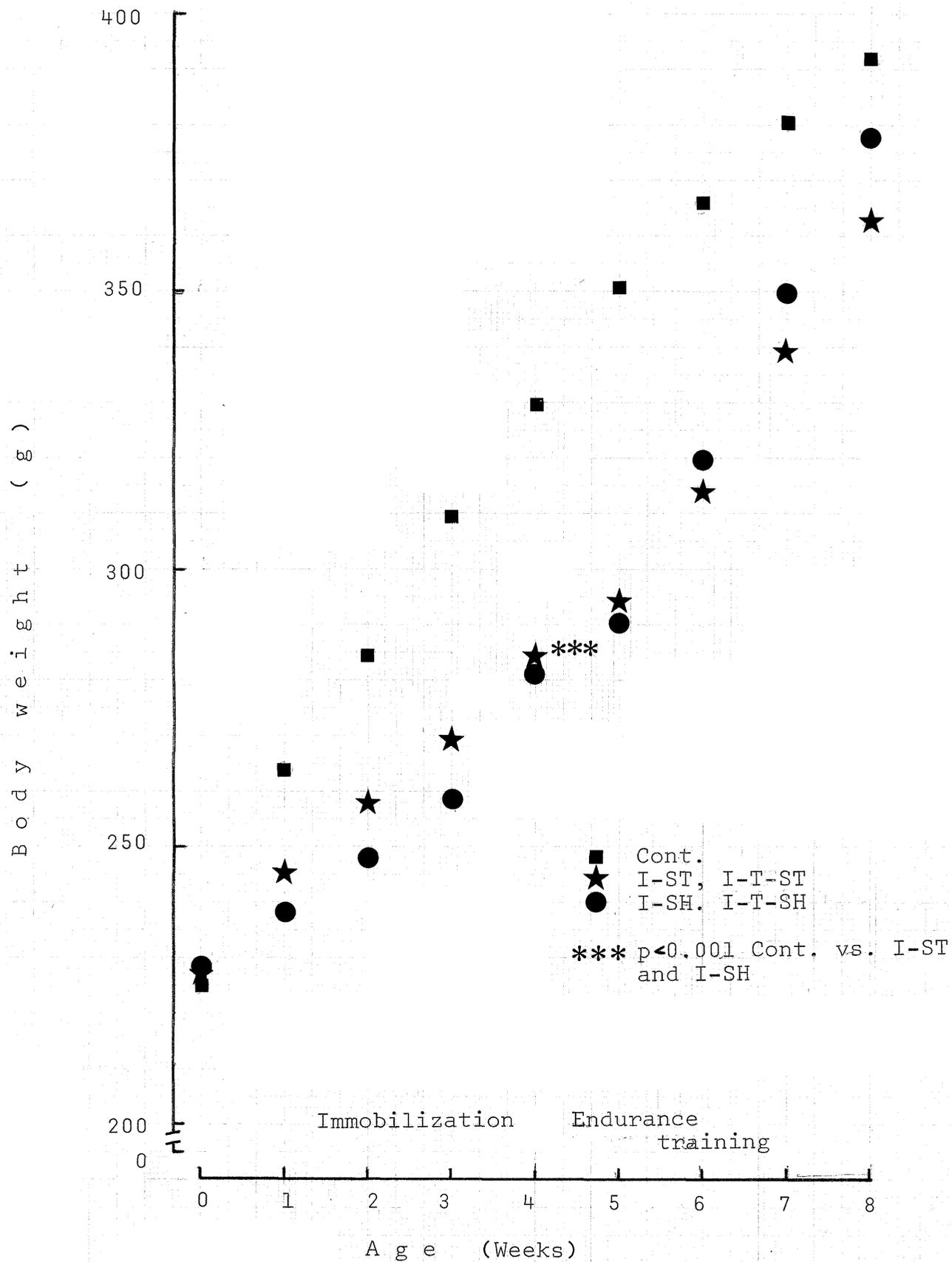


Fig 1. Change of body weight during experimental week.

The abbreviations are the same in Table 1.

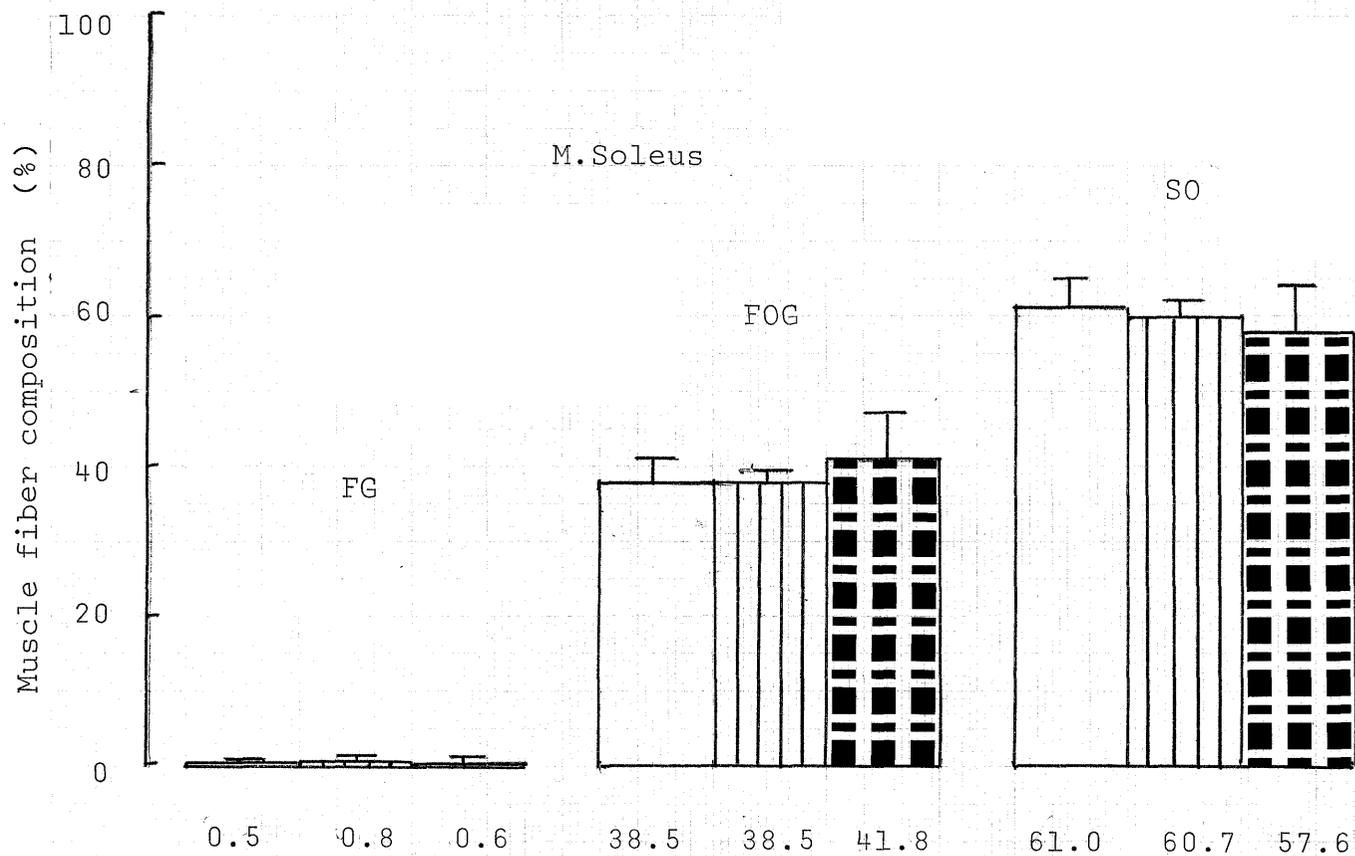
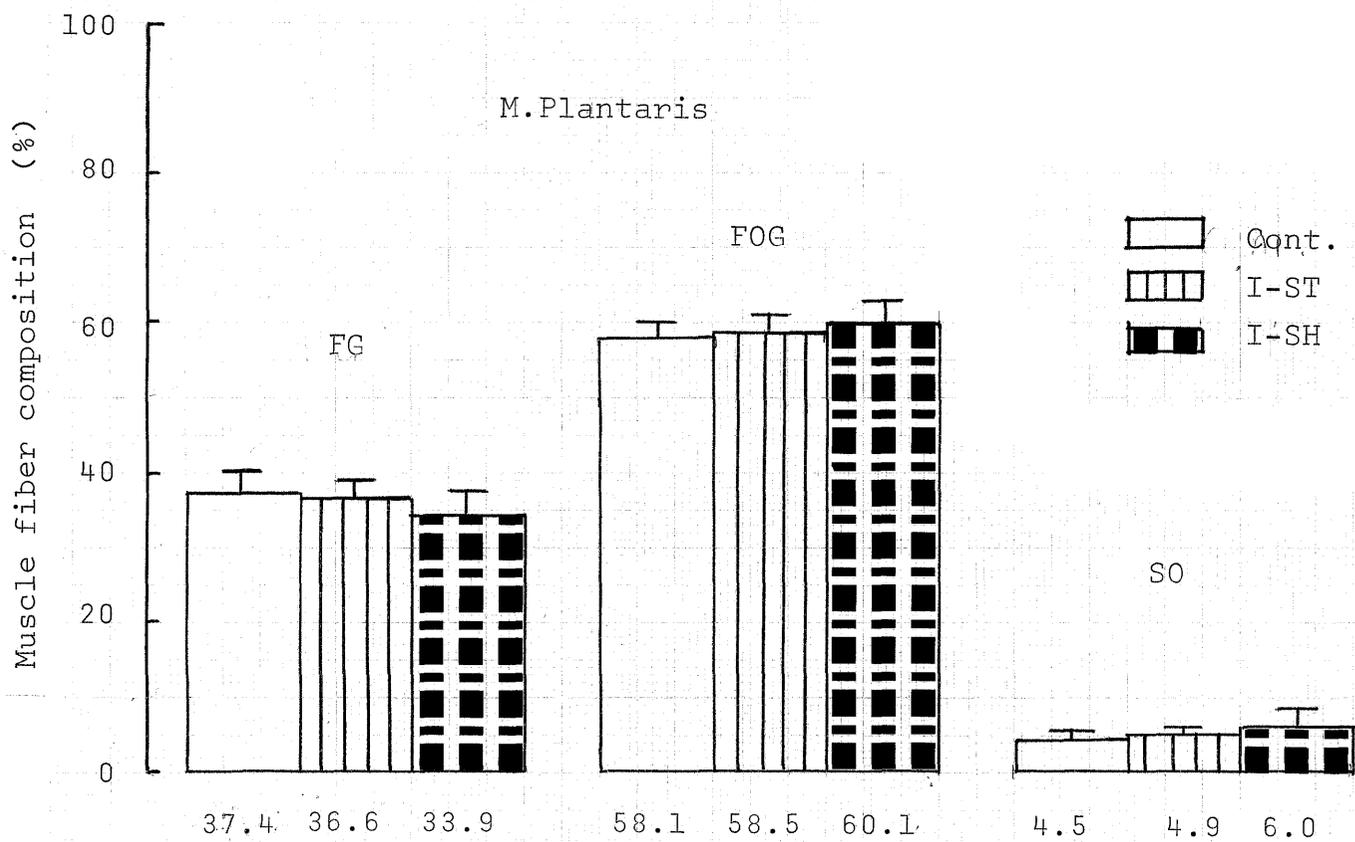


Fig 2. Muscle fiber composition of m.plantaris and m.soleus in control and immobilization groups. The abbreviations are the same in Table 1.

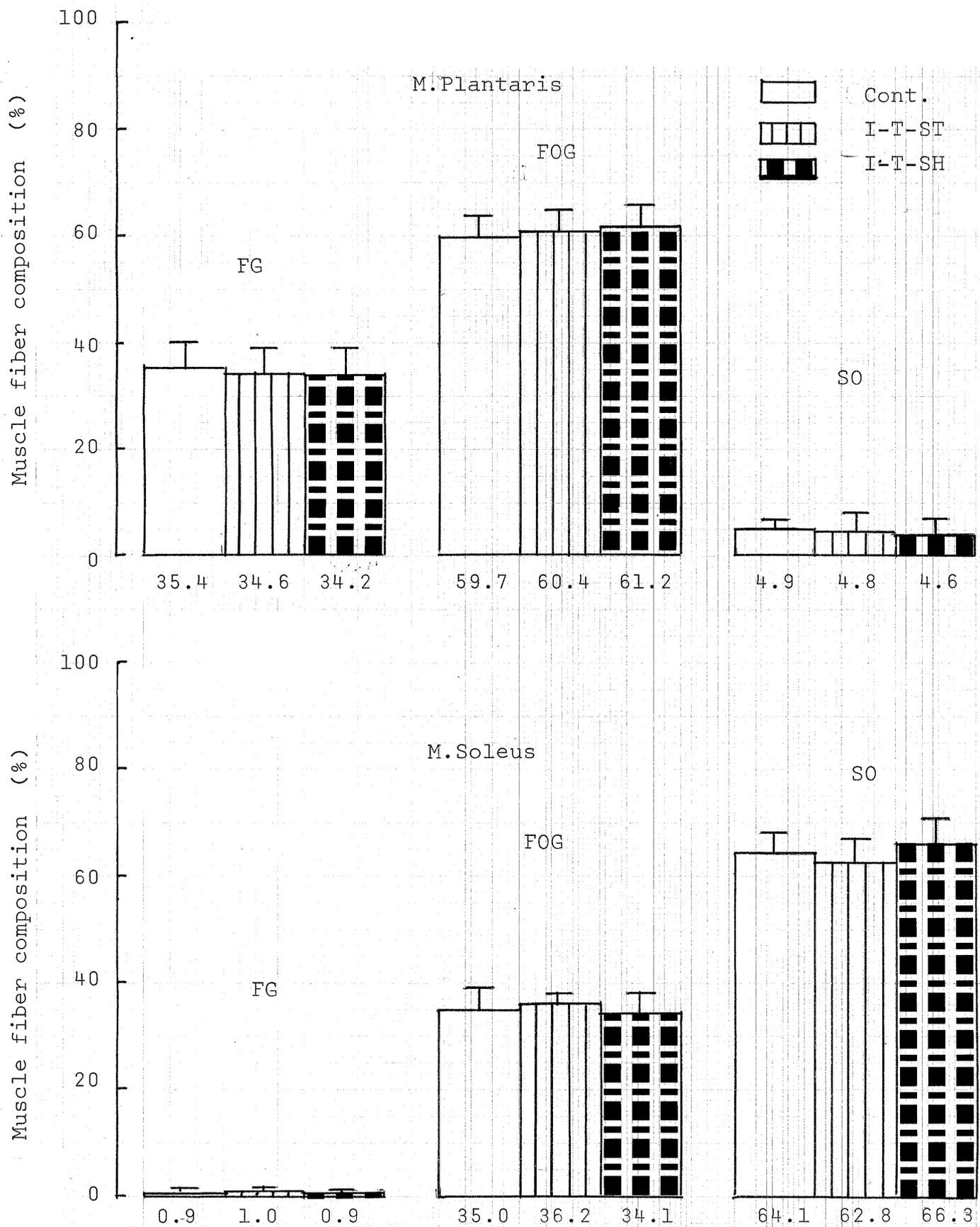


Fig 3. Muscle fiber composition of m.plantaris and m.soleus in control and training groups and after 4-week fixation. The abbreviations are the same in Table 1.

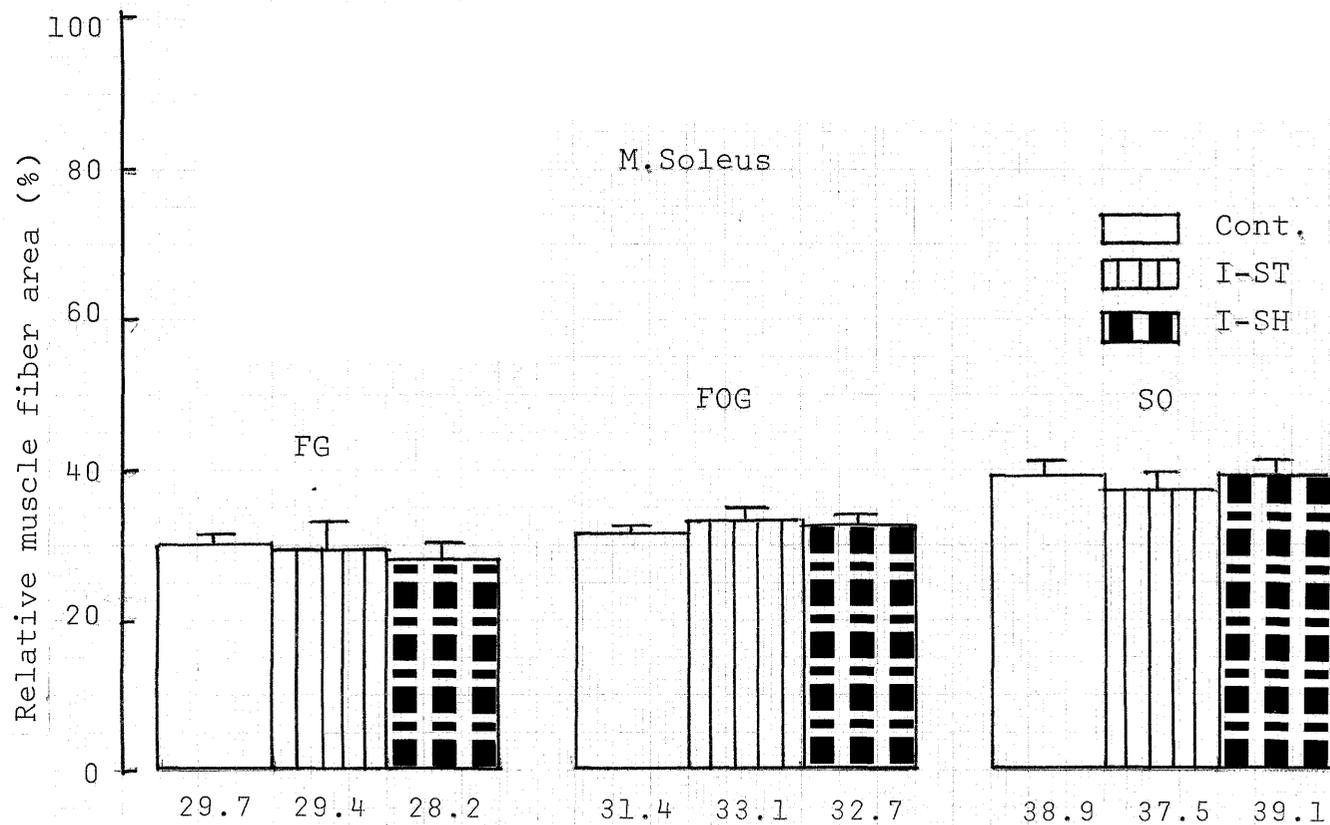
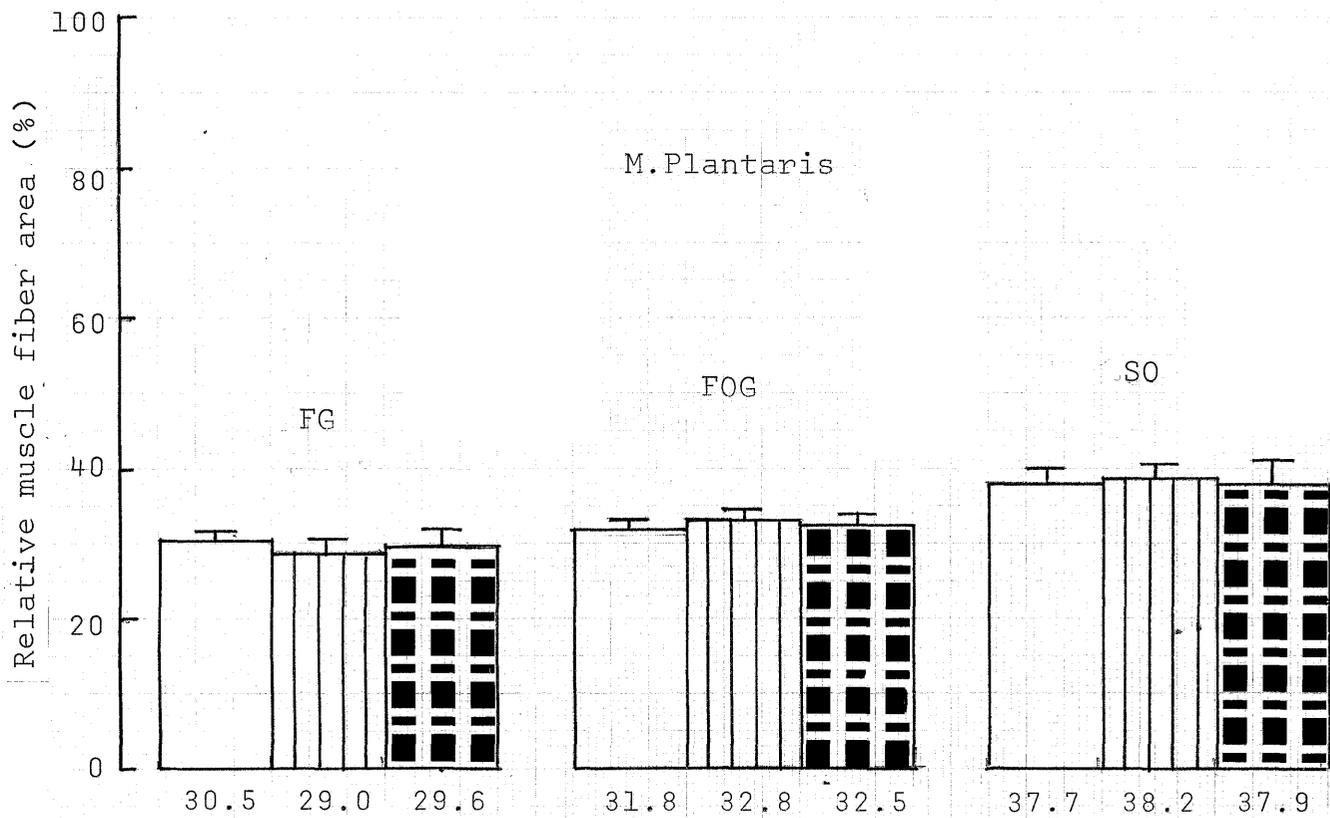


Fig 4. Relative muscle fiber area of m.plantaris and m.soleus in control and immobilization groups. The abbreviations are the same in Table 1.

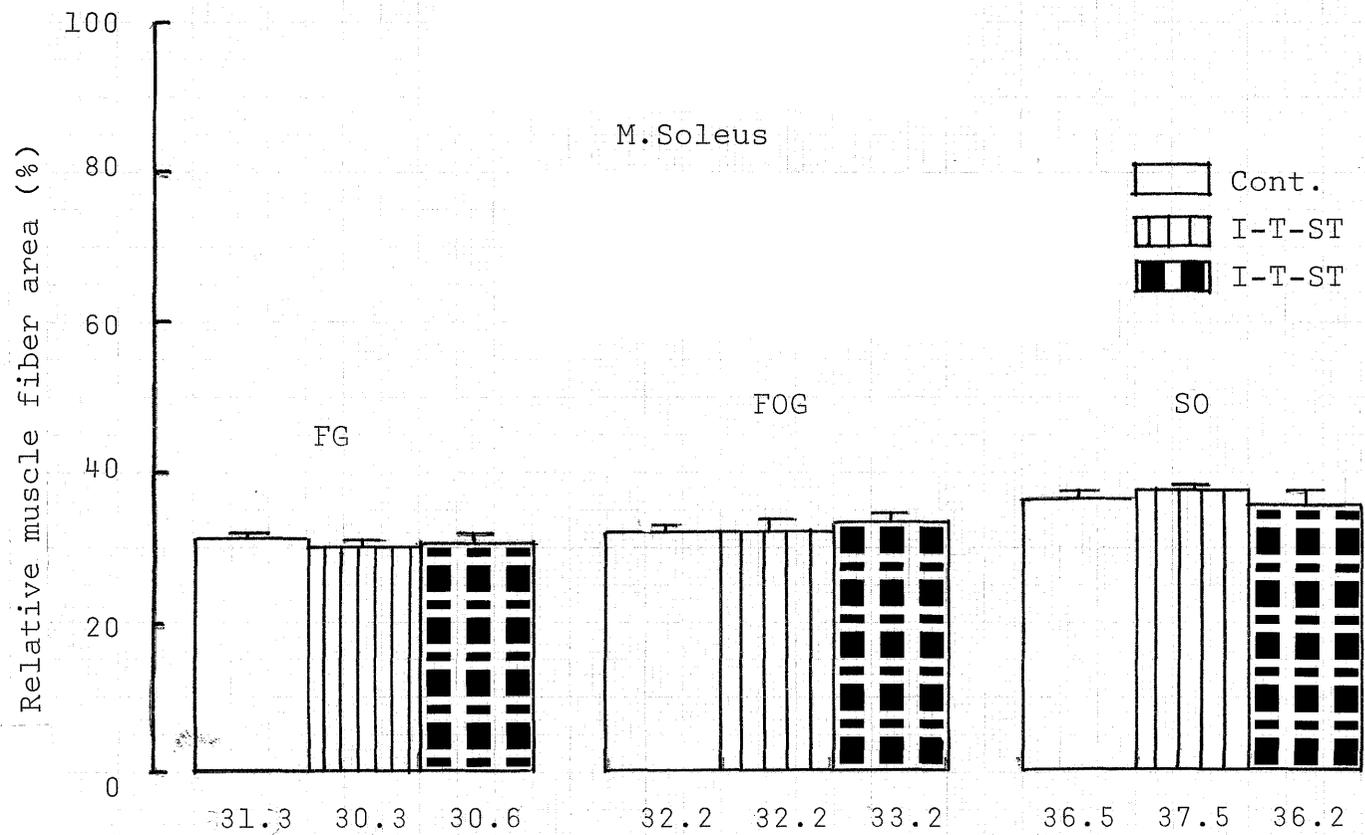
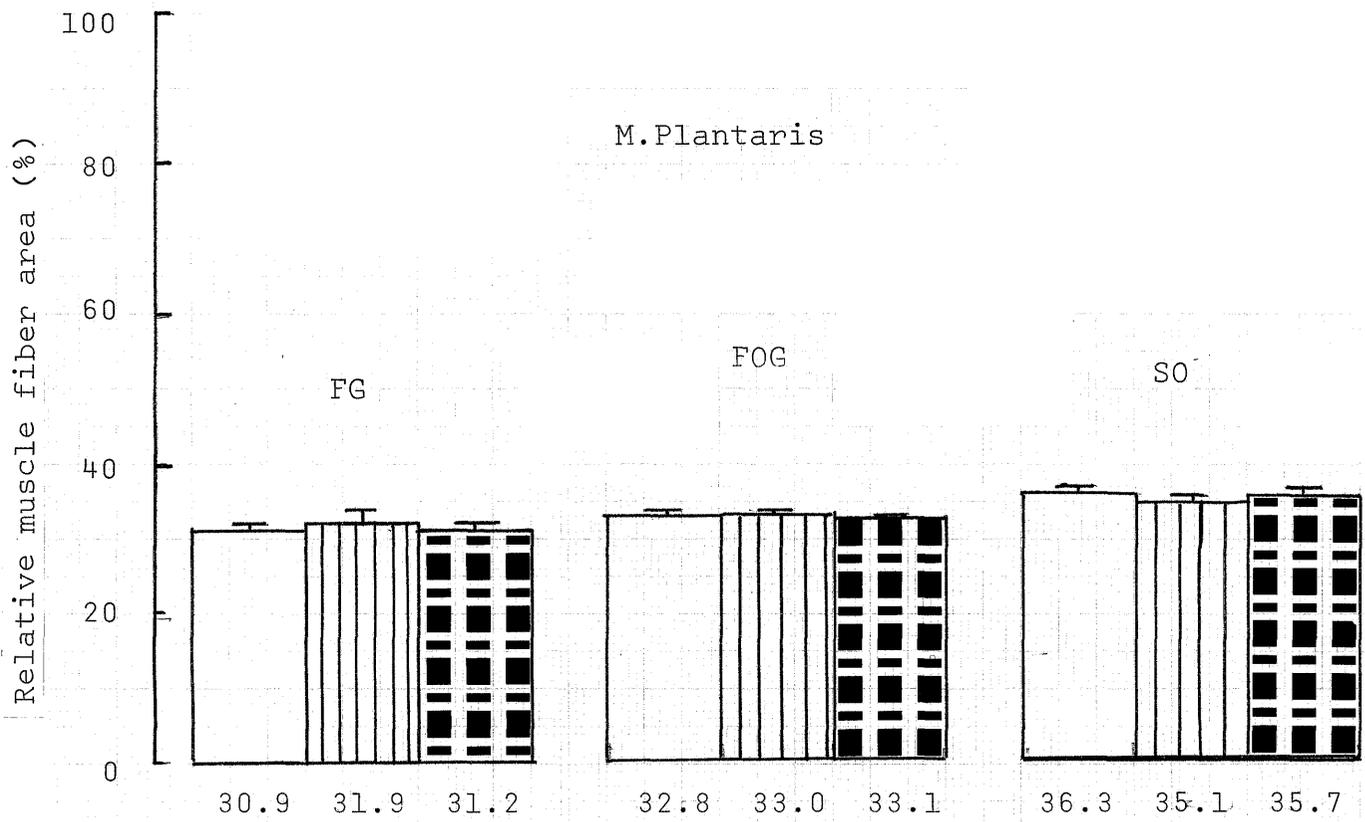


Fig 5. Relative muscle fiber area of m.plantaris and m.soleus in control and training groups after 4-week fixation. The abbreviations are the same in Table 1.

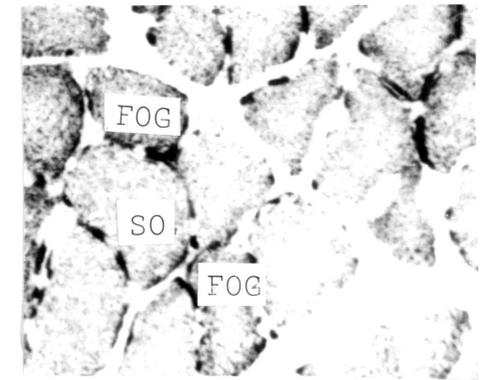
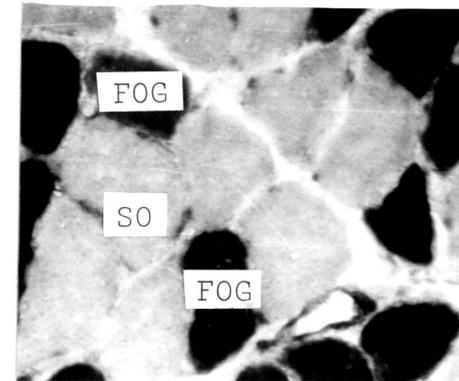
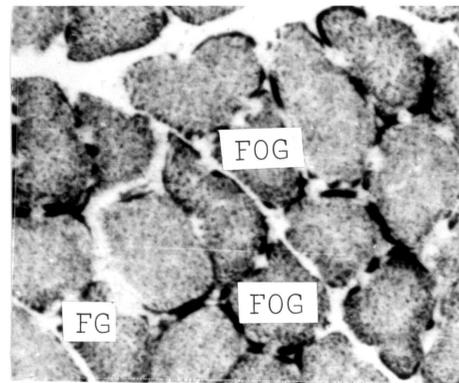
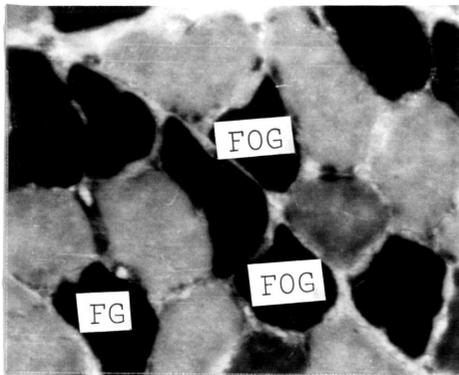
Stained for

Myosin ATPase

SDH

Myosin ATPase

SDH



M. Plantaris

M. Soleus

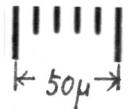


Fig 6. Photomicrographs of serial sections of muscle sample from 9-week-old control rat plantaris muscle and soleus muscle stained for myosin ATPase and SDH activities. Fast-twitch-glycolytic(FG),fast-twitch-oxidative-glycolytic(FOG) and slow-twitch-oxidative(SO) are shown. Magnification is x280.

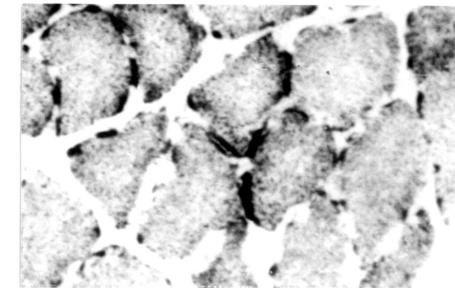
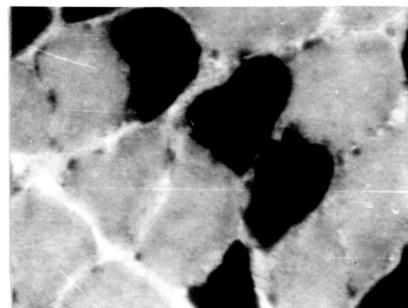
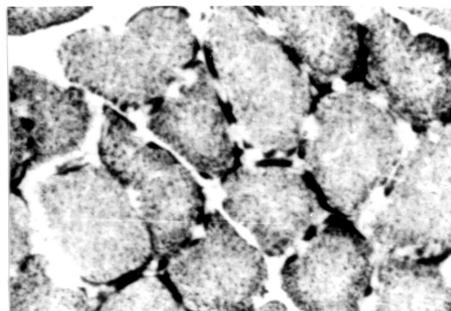
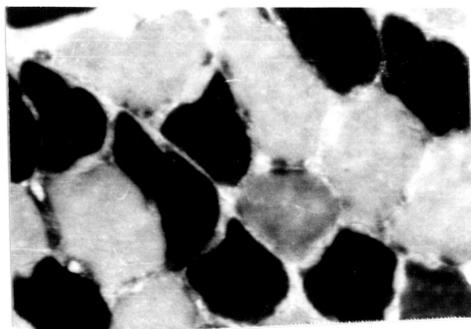
Myosin ATPase

SDH

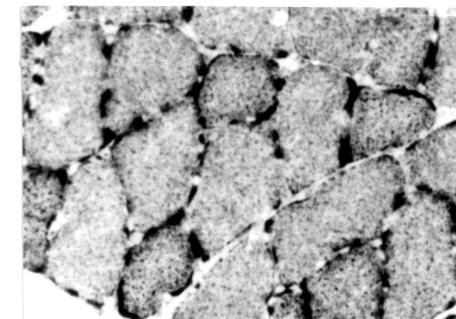
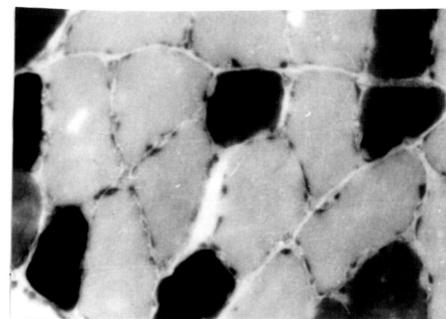
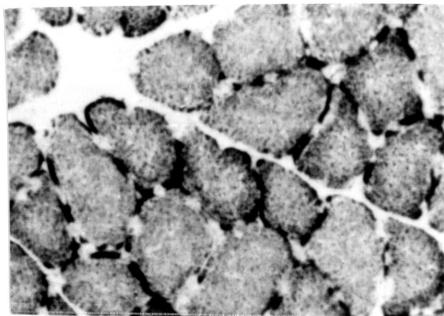
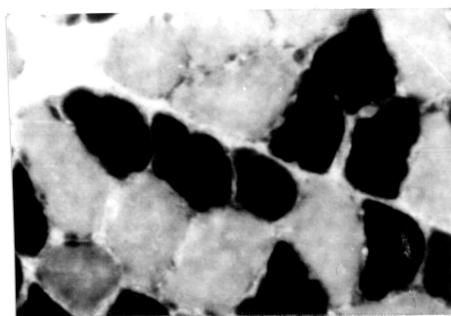
Myosin ATPase

SDH

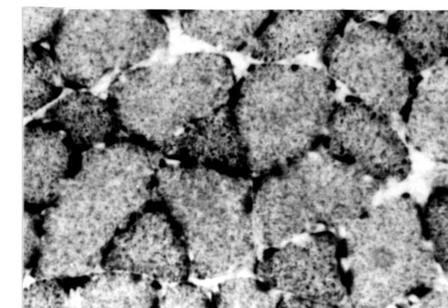
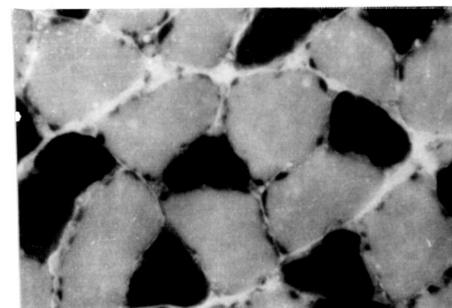
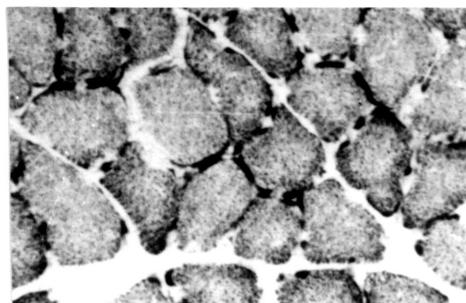
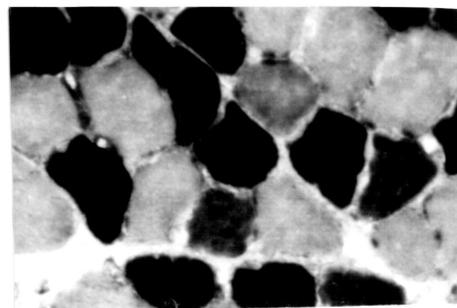
Cont.



I-ST



I-SH



M. Plantaris

M. Soleus

Fig 7. Photomicrographs of m. plantaris and m. soleus in control group and immobilization groups after 4-week fixation. The abbreviations are the same in Table 1. Magnification is x280.



Stained for

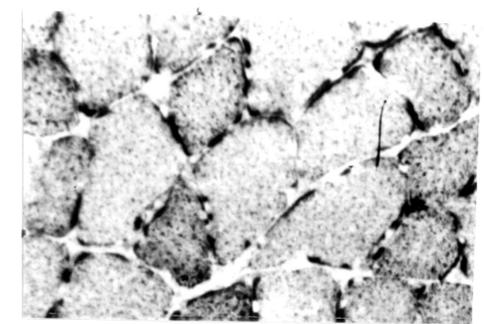
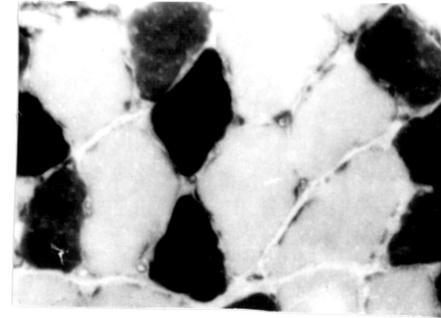
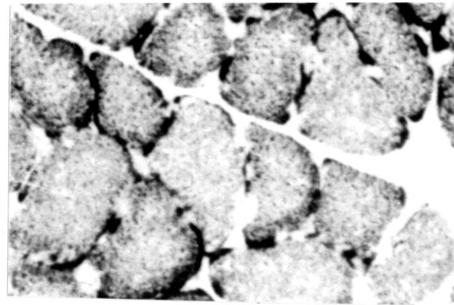
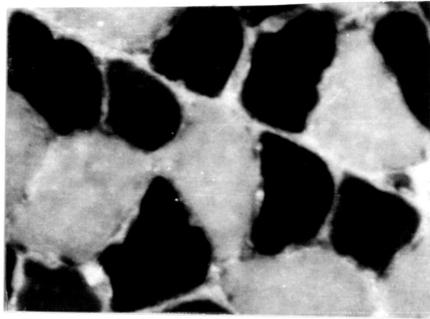
Myosin ATPase

SDH

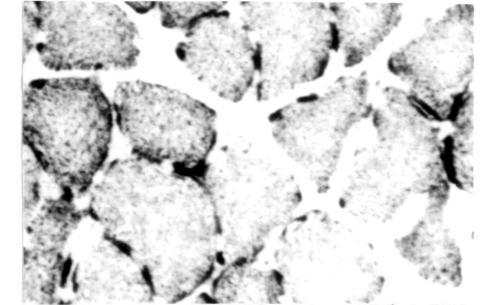
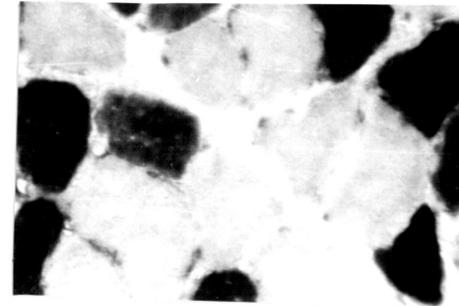
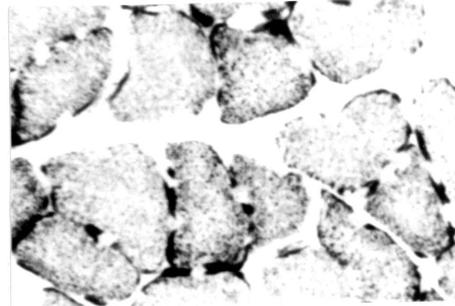
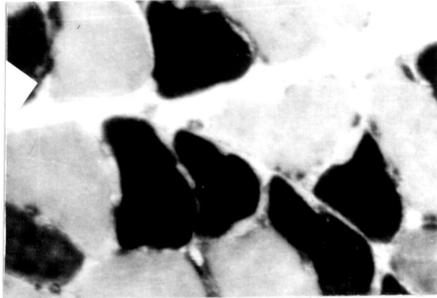
Myosin ATPase

SDH

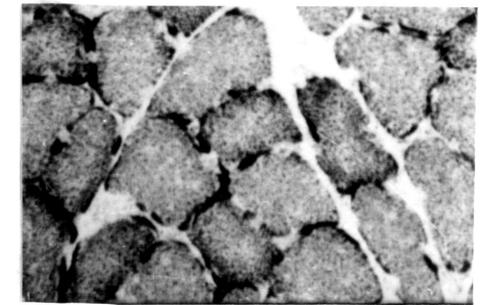
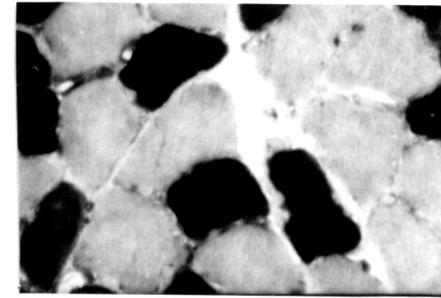
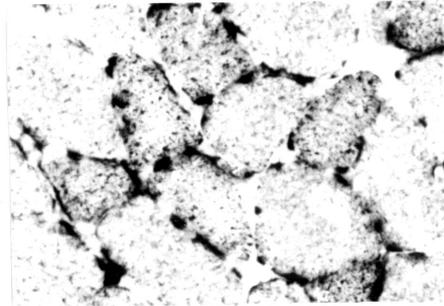
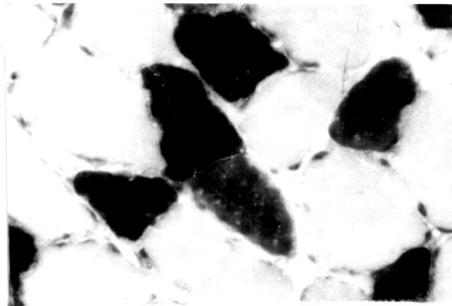
Cont.



I-T-ST



I-T-SH



M. Plantaris

M. Soleus

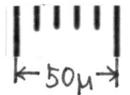


Fig 8. Photomicrographs of m.plantaris and m.soleus in control group and training groups after 4-week endurance training. The abbreviations are the same in Table 1. Magnification is x280.