原 著

粉末飼料飼育によるウサギ咬筋筋線維直径と筋線維タイプ構成比率の変化

伊 藤 関 門* 平 場 勝 成* 根 来 武 史** 水 谷 誠***
森 田 匠** 藤 原 琢 也* 後 藤 滋 巳** 大 野 紀 和***

*愛知学院大学歯学部生理学講座（主任：故 佐藤豊彦教授）

**愛知学院大学歯学部歯科矯正学講座（主任：後藤滋巳教授）

***愛知学院大学歯学部解剖学第一講座（主任：大野紀和教授）

〔受付：平成 13 年 2 月 5 日，受理：平成 13 年 10 月 23 日〕

Changes in Muscle Fiber Size and Fiber Type Composition of the Masseter Muscle Induced by Long-term Feeding of a Fine-grained Diet to Rabbits

Kanmon Ito*, Katunari Hiraba*, Takefumi Negoro**, Makoto Mizutani***,
Takumi Morita**, Takuya Fujiwara*, Shigemi Goto** and Norikazu Ohno***

**Department of Physiology, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University*
(Chief : The Late Prof. Toyohiko Satoh)

***Department of Orthodontics, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University*
(Chief : Prof. Shigemi Goto)

****Department of Anatomy, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University*
(Chief : Prof. Norikazu Ohno)

****1-100 Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan

**2-11 Suemori-dori, Chikusa-ku, Nagoya 464-8651, Japan

[Received on February 5, 2001 ; Accepted on October 23, 2001]

Key words : muscle fiber size / muscle fiber type composition / the rabbit masseter muscle / fine-grained diet

Abstract : The purpose of this study was to investigate the effects on the morphologic properties of masseter muscle fibers of rabbits fed a fine-grained diet. Six male domestic rabbits were raised on a fine-grained diet from 5 (after weaning) to 18 wks of age. The masseter muscles were examined by myosin adenosine triphosphatase (ATPase) and SDH histological stainings. Muscle fiber diameter decreased significantly in the Type I and IIA fibers ($35.3\ \mu\text{m}$ and $n=1,462$ for Type I, and $50.1\ \mu\text{m}$ and $n=1,410$ for Type IIA) as compared with the control group raised on a pellet diet ($43.9\ \mu\text{m}$ and $n=1,809$ for Type I, and $55.0\ \mu\text{m}$ and $n=722$ for Type IIA), while there was no change in diameter in the Type IIB fibers. In addition, fiber type composition markedly changed. Percentages of the Type I, IIA and IIB fibers were 29.3%, 30.5% and 24.2%, respectively, in the experimental group, while those of the control group were 40.7%, 17.6% and 19.5%, respectively. The percentages of the Type I and IIA fibers were significantly decreased and increased, respectively, in the experimental group as compared with the control group. A

number of previous studies on skeletal muscle of the hindlimbs demonstrated that not only atrophy of both Type I and IIA fibers, but also dynamic and wide changes in phenotype of the myosin heavy chain (MyHC), $I \rightarrow IIa \rightarrow IIb/x \rightarrow IIb$, take place depending on functional demands placed on the muscle itself. It may be concluded that a decrease in functional loads on the masseter muscle produced by a long-term fine grained diet led to marked disuse of the S and FR motor units which consist of Type I and IIA fibers, respectively, and resulted in atrophy of the Type I and IIA fibers. In addition, the probable transformation of MyHC isoform expression from Type I to IIa in the masseter muscle might reflect the decrease of Type I fiber composition and the increase of Type IIA fiber composition.

抄録: ウサギにおいて粉末飼料飼育(離乳直後5週齢から成獣時18週齢まで)が咬筋筋線維に及ぼす影響をタイプI, IIA, IIBの3種類についてミオシンATPaseならびにSDH染色法にて検討した。その結果, 実験群の筋線維の直径は対照群(固形飼料飼育)と比べて, タイプI線維は43.9(対照群, $n=1,809$)から35.3 μm (実験群, $n=1,462$)に, IIA線維は55.0(対照群, $n=722$)から50.1 μm (実験群, $n=1,410$)に有意に減少したが, IIB線維では有意な変化はみられなかった。計測した全筋線維数に占める各タイプの筋線維数の割合(構成比率)は, タイプI線維は対照群と比較して統計的に有意に減少した(対照群: 40.7%, 実験群: 29.3%)。一方, IIA線維は有意な増加を示した(対照群: 17.6%, 実験群: 30.5%)。過去の筋に対する負荷を低下させた四肢筋での研究では, 負荷の低下はSとFRタイプの運動単位に属するタイプIとIIA線維の萎縮を引き起こすだけでなく, ミオシン重鎖の出現型を $I \rightarrow IIa \rightarrow IIb/x \rightarrow IIb$ と変化させることが明らかにされている。したがって, 粉末飼料飼育による負荷の低下は, SならびにFRタイプの運動単位の活動量を低下させ, その結果, タイプIとIIA線維に萎縮が生じたと思われる。また, タイプI線維の構成比率の減少と, タイプIIA線維の構成比率の増加の背景には, おそらくミオシン重鎖のI型からIIa型への変換が存在すると思われた。

緒 言

近年食物の軟化が進み, 咀嚼筋ならびに顎骨形態に対する影響が懸念されている。四肢の骨格筋に対する負荷の低下は, 筋の萎縮を引き起こすことが広く知られており, 筋線維の横断面積(直径)の減少だけでなく, 異なる種類の筋線維の数の割合(構成比率)の変化も引き起こすことが報告されている¹⁻¹⁰⁾。筋線維は組織学的にはそのミオシンATPase活性から大別して, タイプI, IIA, IIB線維の3種類に分類されるが, 動物の種類や, 発育段階などにより各種の亜タイプの報告も多い¹¹⁻¹⁹⁾。そして, タイプI線維が全線維の70%前後を占めるヒラメ筋を代表とする遅筋と, タイプI線維が数%しかなく残りがIIA, IIB線維で構成されている長指伸筋を代表とする速筋とでは, 宇宙飛行や神経切断などによる骨格筋に対する負荷の低下の影響が異なることが報告されている^{1,3,4,9)}。

食物の性状の変化が咀嚼筋に及ぼす影響は, 主としてラットやマウスを用いて行われている^{11,20-25)}。これらの動物の咬筋は, タイプI線維が非常に少なくタイプIIA, IIB線維を主体とするもので速筋的性格が強い^{11,26-28)}。一方, ヒトの咬筋はタイプI線維が22-78%(41%²⁹⁾, 46.8-71.0%³⁰⁾, 22-78%³¹⁾の割合で含まれており,

ラットやマウスとはかなり異なる筋線維の構成比率である。

そこで本研究では, 咬筋筋線維の構成比率がラットやマウスと比べると比較的ヒトに近いウサギ¹²⁾を用いて, ミオシンATPase(以下ATPase)活性ならびにコハク酸脱水素酵素(以下SDH)活性から判別した各筋線維タイプの直径と構成比率を計測し, 粉末飼料飼育が咬筋に及ぼす影響を検討した。

方 法

1. 実験動物

日本白色家ウサギ12羽(雄)を用い, その内訳は実験群(粉末飼料飼育)6羽, 対照群(固形飼料飼育)6羽とした。飼育期間は, 実験群と対照群ともに, 離乳直後(5週齢, 体重約0.5 kg)から成獣時(18週齢, 体重2.5-3.5 kg, 平均体重3.2 kg)までとした。飼育飼料は, 実験群では粉末状CR-3(日本クレア)を, 対照群ではペレット状CR-3(日本クレア)を用いた。飼料および水は, 飼育期間中自由に与えた。実験は愛知学院大学歯学部動物実験指針に従って行った。

2. 咬筋の組織学的解析

ウサギを深麻酔にて屠殺し, ただちに左右咬筋を摘出

Fig. 1 Position of cross-section and compartments measured.

した。摘出した咬筋は、横断切片を得るために表層筋線維の走行に垂直に中央部で分割し (Fig. 1, 左), 各ブロックを Tissue-Tek (Sakura Finetechnical) で埋没した後, すみやかに液体窒素で冷却したイソペンタン (関東化学) 中で凍結固定した。その後, -15°C に設定したクリオスタット内で咬筋中央部横断面の厚さ $10\text{ }\mu\text{m}$ の連続切片を作成した。

咬筋切片の染色については, Brooke ら³²⁾の方法に準じて ATPase 染色法を用いた。また, 加えてわれわれは SDH 染色法も同時に行い, この 2 種類の染色法を用いて以下の咬筋の組織学的解析を行った。なお, 予備実験として, 同一個体の左右咬筋を染色し, 各筋線維タイプの直径と総本数に占める割合に左右差がないことを確認したので, 以後の解析ではすべて右側の咬筋を用いた。

筋線維タイプの判別は, ATPase 染色の判別基準に従い, アルカリ側の前処理で酵素活性を失うものをタイプ I, 活性があり黒く染まるものをタイプ II とした。さらに, 酸性側の前処理で pH 4.6 で失活するものをタイプ IIA, pH 4.3–4.2 で失活するものをタイプ IIB とした。SDH 法では筋線維内にミトコンドリアの多い赤筋 (タイプ I) は濃染し, ミトコンドリアが少ない白筋 (タイプ II) は薄く染まることから, ATPase 染色法と併せて筋線維タイプの判別に用いた。なお, このような判別基準で分類されない筋線維が存在したが, それらはすべてその他としてまとめ, 解析した。Fig. 2 に, 判別基準をもとに各筋線維タイプを分類した咬筋組織像を示す。

ウサギ咬筋は, ラットやマウスの咬筋と比べて, 容積が大きだけでなく, 層構造が複雑で層による機能的^{33,34)}, 組織学的違い¹²⁾が報告されている。したがって, 咬筋全体の総合的変化をとらえるためには, 1 カ所の限られた代表的部位からの標本計測では不十分である。そこで, 本研究では Bredman ら¹²⁾の報告に従い, 咬筋の広い範囲に分布する 10 カ所の計測部位 (Fig. 1, 右) を設定した。各計測部位について倍率 100 倍で画像解析装置

ARGUS-20 (浜松ホトニクス) からコンピュータに取り込み, コンピュータ画面上で 1 視野内に約 70 本の筋線維を, 画像計測ソフト (NIHImage ver. 1.62) を用いて計測した。その結果, 1 個体より平均でタイプ I 線維は 272 本, IIA 線維は 177 本, IIB 線維は 165 本, その他の線維は 144 本, 計 758 本の直径を計測した。1 個体においてタイプごとに直径の平均値を求めた。さらに, その平均値の平均と標準偏差 (SD) を各群 6 羽から求め, 粉末飼料飼育の影響を咬筋全体で総合的に検討した。なお, 薄切時の斜断による影響を除外するため最短直径 (以下, 直径) を計測し, 測定部位 10 カ所以外の横断面最深部は, 摘出時の損傷を考慮して今回計測から除外した。

3. 統計処理

統計処理は, 統計ソフト (StatView ver. 5.0 for Mac) を用いて, 以下の項目について行った。体重は, 全個体について 18 週齢の体重を測定し, 実験群 ($n=6$) と対照群 ($n=6$) の間で Mann-Whitney の U 検定を行った。筋線維の直径は, 筋線維タイプごとに実験群 ($n=6$) と対照群 ($n=6$) との間で Mann-Whitney の U 検定を行った。構成比率は, 計測した筋線維の総数に占める各タイプの筋線維数の割合を個体ごとに求め, 実験群 ($n=6$) と対照群 ($n=6$) との間で Mann-Whitney の U 検定を行った。相関は実験群 6 羽における 1) 筋線維直径の相互間, 2) 構成比率の相互間, 3) 直径と構成比率との間, の Pearson の相関係数を求めた。

各検定と相関の有意レベルはすべて 5% で行った。

結 果

実験終了時の 18 週齢での体重は実験群 (2.5–3.5 kg, 平均 3.1 kg) と対照群 (3.1–3.5 kg, 平均 3.3 kg) の間で有意な差は認められなかった (Mann-Whitney の U 検定, $p>0.05$)。

Fig. 2 Serial transverse sections of the masseter.

A : Alkali-stable ATPase (pH 10.9 pre-incubation).

B : Acid-stable ATPase (pH 4.6 pre-incubation).

C : Acid-stable ATPase (pH 4.2 pre-incubation).

D : SDH.

Calibration is 50 μ m.

1. 筋線維直径の変化

Fig. 3 に、対照群と実験群それぞれの典型的な咬筋組織像 (ATPase 染色, pH 10.9) を示す。アルカリ前処理により ATPase 活性を失ったタイプ I 線維が染色されずに白く残る。実験群では、対照群に比べてタイプ I 線維の直径の明らかな減少がみられた。対照群 6 羽からは総数 4,346 本、実験群 6 羽からは総数 4,775 本の筋線維の計測を行った。各タイプの筋線維の数は、Table 1 に示すごとくであった。タイプ I, IIA, IIB 線維の直径の度数分布を Fig. 4 に示す。タイプ I 線維の直径の分布は、実験群が対照群に比べて明らかに細い領域に偏っていることがわかる。IIA 線維では、I 線維ほど顕著ではないが同様の傾向がみられた。しかし IIB とその他の線維では、対照群と実験群とで直径の分布に顕著な違いは

認められなかった。1 個体当たり、対照群では 724 ± 153 (平均 $\pm$ SD) 本、実験群では 795 ± 220 本の筋線維の直径を計測したが、各個体ごとに直径の平均値を求め、さらにその平均値の平均と SD を各群でタイプごとに算出した。実験群では対照群に比べて、タイプ I 線維は $43.9 \pm 1.7 \mu\text{m}$ ($n=6$) から $35.3 \pm 2.0 \mu\text{m}$ ($n=6$) に、IIA 線維は $55.0 \pm 1.7 \mu\text{m}$ ($n=6$) から $50.1 \pm 3.8 \mu\text{m}$ ($n=6$) に、IIB 線維は $70.7 \pm 8.4 \mu\text{m}$ ($n=6$) から $65.3 \pm 7.1 \mu\text{m}$ ($n=6$) に直径が減少した。その他の線維は $56.3 \pm 6.3 \mu\text{m}$ ($n=6$) から $56.8 \pm 5.9 \mu\text{m}$ ($n=6$) に直径が増加した。これらの筋線維のうちタイプ I, IIA 線維は統計的に有意な減少であった (Mann-Whitney の U 検定, $p < 0.05$) (Fig. 5)。

実験群 6 羽の各個体での直径の変化を、詳細に検討し

Fig. 3 Serial transverse sections of the masseter.

A : Control group. Alkali-stable ATPase (pH 10.9 pre-incubation) of a rabbit fed a pellet diet.

B : Experimental group. Alkali-stable ATPase (pH 10.9 pre-incubation) of a rabbit fed a fine-grained diet.

Calibration is 50 μ m.

Table 1 Sample number of muscle fibers

	Control group	Experimental group
Type I	1,809	1,462
Type IIA	722	1,410
Type IIB	852	1,132
Others	963	771
Total	4,346	4,775

た。タイプ I 線維は 6 羽すべてにおいて顕著な直径の減少を示したが、IIA、IIB 線維では顕著な直径の減少がみられず、対照群の SD の範囲内に収まる変化しかみられなかった個体も存在した。特に IIB 線維では、各個体の値は対照群の SD の範囲内にほぼ収まる範囲で大きく変動していた (Fig. 6)。Fig. 6 においては後述する筋線維の構成比率の値をも考慮して、タイプ IIB 線維の直径がおおむね細い個体から太い個体の順に、グラフ左側から順に配列して示す。IIA 線維の直径が減少すると、IIB 線維の直径も減少する傾向が推測された。そこで、実験群 6 羽の各個体の値をもとに両者の相関を求めた (Fig. 7)。IIA 線維と IIB 線維の直径との間には有意な正の相関 (0.90, $p < 0.05$) が認められたが、ほかの組合せ (I $\Leftrightarrow$ IIA: 相関係数 0.68, I $\Leftrightarrow$ IIB: 相関係数 0.33) では統計的に有意な相関はみられなかった。また、対照群では各タイプの直径との間に有意な相関はみられなかった。

2. 筋線維の構成比率の変化

対照群 6 羽の筋線維の構成比率は、タイプ I 線維では $40.7 \pm 6.4\%$ (平均値と SD)、IIA 線維では $17.6 \pm 6.9\%$ 、IIB 線維では $19.5 \pm 6.2\%$ 、その他の線維が $22.2 \pm 10.3\%$ であった。一方、実験群 6 羽の筋線維の構成比率は、タイプ I 線維では $29.3 \pm 7.8\%$ 、IIA 線維では $30.5 \pm 5.2\%$ 、IIB 線維では $24.2 \pm 4.0\%$ 、その他の線維が $16.0 \pm 3.3\%$ であった。I 線維は対照群と比較して統計的に有意な減少であった (Mann-Whitney の U 検定, $p < 0.05$)。一方、IIA 線維は有意な増加であった (Mann-Whitney の U 検定, $p < 0.05$)。IIB 線維やその他の線維では有意な変化ではなかった (Mann-Whitney の U 検定, $p > 0.05$) (Fig. 8)。

実験群 6 羽の各個体での構成比率の変化を詳細に検討した。Fig. 9 には、Fig. 6 で示した同じ順序で各個体をグラフ左側から順に配列して示す。グラフ左側から右側につれてタイプ I 線維の構成比率が徐々に減少するのに対して、IIA、IIB 線維では増加する傾向がみられた。

そこで、これらの相関を検討した。I 線維と IIB 線維の構成比率との間には、有意な負の相関 (-0.95 , $p < 0.05$) が認められた (Fig. 10)。また、統計的には有意ではないが、I 線維と IIA 線維の構成比率との相関係数は -0.64 で比較的高い値を示した。IIA 線維と IIB 線維の構成比率との相関係数は $+0.45$ で、3 つの比較のなかで最も低い値であり、統計的な有意性もみられなかった。また、対照群では各タイプの構成比率との間に有意

Fig. 4 Histograms of diameter of each fiber-type.

■ : The experimental group rabbits.
□ : The control group rabbits.

Fig. 5 Diameter of each fiber type from the control (○ : Nor) and the experimental group rabbits (● : Paw). Values are means $\pm$ SD. *, statistically significant from control (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$). $n = 6$ in each group.

な相関はみられなかった。

3. 直径の変化と構成比率の変化との相関

Fig. 6 に示した直径の変化と, Fig. 9 に示した構成比率の変化をみると, 両者はまったく個別に独立した変化ではなく, お互いに関連をもって変化していることが推測された。そこで, 両者の相関を解析した。その結果, タイプ IIA 線維の構成比率は IIA 線維の直径ならびに IIB 線維の直径と有意な正の相関(いずれも, 0.88 , $p < 0.05$)を示した。ほかの組合せでは統計的に有意な相関はみられなかった (Table 2)。また, 「IIA 線維の構成比率 $\Leftrightarrow$ IIA 線維の直径」, 「IIA 線維の構成比率 $\Leftrightarrow$ IIB 線維の直径」の相関がいずれも 0.88 と等しかったのは, “直

Fig. 6 Variant fiber diameter among the experimental group rabbits. There is a tendency that diameter increase of type IIA fibers is associated with increase of type IIB fibers among the experimental group rabbits. Values are means for the experimental group and means $\pm$ SD for the control group (n=6). The signs of SEP 2 (00), SEP 1 (00), NON 0 (99), SEP 3 (00), SEP 10 (99) and SEP 3 (99) are experimental rabbit's names, respectively.

Fig. 7 Correlation between diameters of type IIA and IIB fibers. Values are means of the experimental group rabbits. r , Pearson's correlation coefficient. This correlation was statistically significant ($p < 0.05$).

径の変化”のところで述べたように、IIA線維の直径とIIB線維の直径の間に0.90という高い相関が存在したことが原因と思われた。一方、対照群ではタイプI線維の構成比率とタイプIIB線維の直径との間に有意な負の相関(-0.95 , $p < 0.05$)が存在したが、それ以外の組合せでは有意な相関はみられなかった。

考 察

従来より、負荷の低下が筋組織に与える影響は、遅筋

Fig. 8 Fiber type composition in the control group (open bar : Nor) and the experimental group rabbits (filled bar : Paw). Values are means $\pm$ SD. *, statistically significant from control (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$). n=6 in each group.

Fig. 9 Variant fiber type composition among the experimental group rabbits. There is a tendency that percentages of type IIA and IIB fibers inversely correlated with those of the type I fibers. Values are means for the experimental group and means $\pm$ SD for the control group. The signs of SEP 2 (00), SEP 1 (00), NON 0 (99), SEP 3 (00), SEP 10 (99) and SEP 3 (99) are experimental rabbit's names, respectively.

Fig. 10 Correlation between percentages of type I and IIB fibers. Values are means of the experimental group rabbits. r , Pearson's correlation coefficient. This correlation was statistically significant ($p < 0.05$).

と速筋とで異なることが四肢筋で報告されてきた^{1,3,4,9}). Martin ら¹⁾は、7日間の宇宙飛行による無重力下での影響をタイプ I 線維の占める割合の高い遅筋型のヒラメ筋や長内転筋、タイプ II 型線維の占める割合の高い速筋型の長指伸筋、内側腓腹筋や足底筋で検討した。その結果、筋線維の断面積は、タイプ I、II 型線維ともに遅筋と速筋の区別なく有意に減少するのに対して、筋線維の構成比率はタイプ I の減少と II 型線維の増加が遅筋で起こるが、速筋では、構成比率の変化がみられなかった。また、Booth ら⁹⁾は後肢を 4 週間石膏で固定して不動化の影響をラットヒラメ筋と速筋型の大腿直筋で比較した。その結果、筋線維の構成比率はタイプ I の減少と II 型線維の増加がヒラメ筋で起こるのに対して、大腿直筋では認められず、また、機械的な筋の収縮特性もヒラメ筋では変化がみられたのに対して、大腿直筋ではみられなかったと報告している。一方、咀嚼筋においては、Maeda ら²⁰⁾は、タイプ I 線維が非常に少なくタイプ IIA、IIB 線維を主体とするマウスにおいて粉末飼料飼育による咬筋筋線維の直径の変化を検索した。その結果、筋タイプの種別を問わない平均的な直径の減少が飼育期間の全期間において起こっており、SDH 活性に基づいて分類した中間タイプを除く特に赤筋と速筋の両方で直径の減少が起こっていたと報告している。Maeda らの報告した SDH 活性に基づく赤筋、中間タイプ、速筋は、今回のわれわれのタイプ I、IIA、IIB 線維と同等である可能性が高い。したがって、タイプ I、IIA 線維で直径の有意な減少が認められ、IIB 線維では有意な変

Table 2 Correlation between diameter and percentage from the experimental group rabbits

		Percentage		
		Diameter		
Diameter	Percentage	-0.95*		
		-0.64 0.45		
		Type I	Type IIA	Type IIB
		Type I	Type IIA	Type IIB
0.33	0.68	0.19	0.46	-0.33
	0.90*	-0.33	0.88*	0.12
		-0.60	0.88*	0.39

To summarize, correlation coefficients of diameter and percentages among three fiber types are shown, simultaneously. Values are Pearson's correlation coefficients.

*: statistically significant ($p < 0.05$).

化がみられなかった本研究結果と、Maeda らのマウスでの報告は、必ずしも一致しない。斉藤ら²¹⁾はやはり IIA、IIB 線維を主体とするラット咬筋において液状飼料飼育の影響を、ミオシン重鎖アイソフォームの mRNA 量を指標に解析し、咬筋筋線維の組成は IIB 優位になることを報告している。斉藤らが用いた生化学的定量法は、各タイプの線維が占める総面積の影響を強く反映するであろうということを考えあわせると、今回のわれわれの結果と結びつくところがある。すなわちわれわれの研究においては、粉末飼料飼育によりウサギ咬筋のタイプ I 線維の構成比率が 40.7% から 29.3% に有意に減少する一方、IIB 線維が 19.5% から 24.2% に増加する傾向を見いだした。また、IIA 線維も 17.6% から 30.5% に有意に増加した。この筋線維数の変化と直径の変化から総面積的な変化を考えると、直径と本数がともに減少したタイプ I 線維の占める総面積は著しく減少したと推測されるが、IIA、IIB 線維ではその傾向は弱い、あるいは逆に総面積は増加した可能性も考えられるからである。以上のように、過去のラットやマウスでの咬筋における結果と、タイプ I 線維の割合が約 40% も存在するウサギ咬筋を用いたわれわれの結果と類似点と相違点がともに認められた。相違点が四肢筋でいわれている筋タイプの構成比率に起因するものか、あるいは動物種などのほかの要因によるものかは今後検討すべき課題であろう。

Maxwell ら³⁵⁾は、全歯を抜歯し 4.5 年の長期間飼育を行ったサル咬筋についてそのタイプ別に筋線維の面積、構成比率の変化を報告した。この研究によれば、S タイプと彼らが称する（本研究でのタイプ I 線維に相当する）筋線維の面積の著しく有意な減少と、構成比率の有意な減少が認められている。しかし FR、FF タイプと彼らが

称する（本研究でのタイプIIA, IIB線維に相当する）筋線維では面積の変化は認められず、FFタイプのみで構成比率の増加が認められている。また、彼らはホモジネートした咬筋のSDH活性を調べ、抜歯によって咬筋全体のSDH活性が低下していることを報告している。これらの結果から、抜歯によって引き起こされた咬筋への負荷の低下は、有酸素的エネルギー産生系酵素活性の高いSタイプの退行変性をまず第一に引き起こすと考えている。そして、Sタイプの一部の線維は、速筋への転換を引き起こすと考察している。本研究結果も含めたこのような咀嚼筋での変化は、主としてヒラメ筋を対象とした四肢筋での宇宙飛行、ギプス固定、後肢懸垂、脊髄損傷による筋麻痺などで行われた一連の研究結果^{1-3,5-10)}と一致するところも多い。結果の概要は、1)横断面積の変化はタイプI, IIA線維の両方で減少し¹⁰⁾、その程度はタイプI線維のほうがタイプIIA線維よりも顕著な減少をきたす^{1-3,6,8)}（ラットのヒラメ筋においては、タイプIIB線維は対照群では認められない）、2)筋線維タイプの構成比率は、タイプI線維の減少と、タイプIIA線維の増加を起こす^{1-3,7-10)}、3)MyHCのisoformの出現型とその比率の変化は、I型MyHCの減少、IIa型やIId/x型MyHCの増加が起こる^{3,8)}、4)エネルギー代謝にかかわる解糖系酵素活性や酸化系酵素活性の変化が起こる^{1,2,6,7,10)}、である。これらの所見から、筋に対する負荷の低下は筋組織の構成を、難疲労性の遅筋タイプから易疲労性の速筋タイプへと変化させると考えられてきた³⁶⁾。

筋に対する負荷の変化が筋タイプの構成の変化を引き起こすということは、筋の支配神経に電気刺激を与えて強制的な収縮を継続的に長期間起こさせると、筋の機械的収縮特性ならびに組織学的変化が起こること³⁷⁻⁴⁰⁾からも確かめられている。この種の実験では刺激を定量的に調節することが可能なため、筋に与えた負荷（収縮回数）と起こった変化との定量的な検討が可能である。ネコの内側腓腹筋の支配神経を埋め込み電極で20 Hzで慢性的に刺激し、負荷を増大させた研究では⁴⁰⁾、対照群では22%と46%存在したタイプIIA, IIB線維が、60日以上以上の刺激で完全に消失し、すべてがタイプI線維に変化したと報告されている。すなわち、負荷を減少させた結果とは逆の現象が引き起こされ、その結果、筋組織の構成は易疲労性の速筋タイプから難疲労性の遅筋タイプへと変化した。そして、筋組織の構成の変化を起こすのに重要な要因は、刺激頻度ではなく、1日当たりの総刺激回数（総活動回数）であることが示された。

本研究で認めた粉末飼料咀嚼による咬筋への機能的負荷の低下の影響は、タイプI, IIA線維の直径の減少と、

構成比率についてはタイプI線維の減少と、タイプIIA線維の増加であった。本実験結果と、四肢筋での結果を考え合わせると、粉末飼料咀嚼による咬筋への機能的負荷の低下は、タイプIならびにII線維を構成要素とするS, FRタイプ運動単位の活動回数の減少を引き起こしたと推測する。その結果、Sタイプに属するタイプI線維とFRタイプに属するタイプII線維でタンパク代謝ならびにエネルギー代謝系酵素活性の変化を招来し、顕著な直径の減少と、一部のタイプI線維のMyHCのタイプI→IIaへの移行を引き起こし、最終的にはタイプI, IIA線維の構成比率の変化を引き起こしたと考察する。

実験群における筋線維の直径ならびに構成比率の結果には、各個体間で大きなバラツキが生じた。本研究では、実験群の筋に対する負荷の低下を起こすための手段として、飼料を固形飼料から粉末飼料にした。咀嚼筋の活動は咀嚼以外では対照群と同じで特に咀嚼筋活動を制限する要因はない。したがって、四肢筋での宇宙飛行、脊髄切断、除神経、後肢懸垂などといった実験条件よりはるかに筋に対する負荷の低下の程度は弱いと想像される。また、本実験の期間は約13週であり、宇宙飛行や後肢懸垂など2週間から長くて4週間の実験期間と比べて比較的長い。すなわち本実験は、弱い負荷の低下が長い期間加わった場合の変化を検索したものである。したがって、各個体における負荷の低下に対する筋組織の感受性（閾値）の違いや、粉末飼料を咀嚼する下顎運動パターンや咀嚼回数、咀嚼筋活動などの違いによって筋組織に現れる影響は、個体間で大きく異なる可能性が高いと思われる。ウサギにおいては、無拘束自由摂食時の下顎運動や筋電図記録法がすでに確立されており⁴¹⁾、今後、筋組織の変化と、下顎運動パターンや咀嚼回数、咀嚼筋活動などの変化との対応を解析し、実験群での各個体間変動の原因を検討する必要がある。

構成比率については、タイプI線維の減少と、タイプIIA線維の増加が、実験群6羽と対照群6羽の比較を行った場合の結果であったが、実験群の6羽の個体間変動のなかではタイプI線維とIIB線維の構成比率との間の高い負の相関（ -0.95 ）が存在し、タイプI線維の数が減少するとIIB線維の数が増加するという傾向が存在した。また、構成比率だけでなく、直径相互間ならびに直径と構成比率との間のいくつかの組合せでは、有意な高い相関が実験群の6羽の個体間変動のなかで認められた。一方、対照群では有意な高い相関が認められた組合せは1つのみで、しかも実験群では有意ではなかった組合せであった。このことは、実験群における個体間変動は無秩序な個体のバラツキではなく、筋線維の直径なら

びに構成比率の間に存在する何らかの密接な関連を反映した現象であることを示唆するとともに、その関連は対照群とは異なるものであることを示していると思われる。四肢筋での一連の研究結果から強く示唆されているように、筋に対する負荷の低下は、MyHCの isoform の出現型をタイプ I $\rightarrow$ IIa $\rightarrow$ II d/x $\rightarrow$ IIb へと移行させ、その結果としてタイプ I 線維の構成比率が減少する一方で、タイプ II B 線維の構成比率は増加すると考えられる。この移行過程の中間に位置するタイプ II A 線維の構成比率は、タイプ I からタイプ II A に移行してきた数とタイプ II A から II B へ移行した数のバランスにより増加あるいは減少すると考えられる。したがって、タイプ I 線維の構成比率の変化が、タイプ II A よりもむしろ II B 線維の構成比率と高い相関を示したのは、このような MyHC の isoform の出現型の変化とそれに対応した筋線維タイプの構成比率の変化を反映した現象である可能性が高いと考える。

本研究の実験群では、タイプ I 線維の直径は、実験群 6 例すべてにおいてほぼ同様に顕著な減少を示したのに対して、II 群線維の II A, II B 線維では個体間変動が大きかった。筋線維の直径は、筋線維に含まれる筋原線維の数、すなわち、それを構成する、ミオシンタンパクやアクチンタンパクの量とその代謝を調節する遺伝子レベルの変化とより直接的な関係があると推測される。1 本の筋線維には複数の核が含まれる多核の細胞であることから、含まれる核の数と直径との関係が注目されている^{5,42)}。Allen ら⁵⁾は、14 日間の宇宙飛行による無重力下の影響を、ラットヒラメ筋で Single-fiber gel electrophoresis 法を用いて、筋線維 1 本 1 本に含まれる MyHC の isoform の出現型と筋線維 1 本当たりの核数を測定した。それによれば、対照群では 1 本の筋線維に 2 種以上の MyHC isoform が出現することは非常にまれであったのが、IIb 型や neonatal 型 MyHC といった対照群では存在しなかった MyHC isoform が同一の筋線維に I 型あるいは II x 型や II a 型 MyHC と共存出現した。その結果、MyHC isoform の出現型は対照群の 4 種類から 10 種類に増加した。そして、I 型 MyHC が残存出現した筋線維では、直径の短縮と核数の減少が平行して顕著に起こるのに対して、II 型 MyHC の各種 isoform が共存出現した筋線維では、直径と核数の変化に MyHC の出現型が複雑に関連し、筋組織に与えられた影響の強弱の程度を単純に反映する現象ではないことを示唆している。特に、neonatal 型 MyHC が新たに出現した筋線維の直径と核数は対照群と差がないことが報告されている。このように、直径の変化は、I 型 MyHC が出現する筋線維

と、II 型 MyHC が出現する筋線維とでは、異なるようである。このことは、直径の減少の程度はタイプ I 線維のほうがタイプ II A 線維よりも顕著な減少をきたす^{1-3,6,8)}という過去の四肢筋での報告とも一致する。また、本研究で II 群線維の II A, II B 線維では個体間変動が大きかったことの背景に、II 型 MyHC isoform の出現型の違いが存在した可能性も考慮すべきかもしれない。

咀嚼筋の筋線維の直径と MyHC の isoform の出現型との関係に関して、Kwa ら¹³⁾はウサギ咬筋筋線維について報告している。それによると、横断面積は MyHC の isoform の出現型の II a < II a + II d/x < II d の順に大きい。また、Tonndorf ら²⁶⁾はウサギ顎二腹筋の横断面積は MyHC の I + II a < II d/x < II b の順に大きいと報告している。したがって、咀嚼筋筋線維の直径と MyHC の isoform の出現型との間に間接的な関連があることは推測されるが、本実験で認めた実験群での II A 線維と II B 線維の直径との間の高い正の相関 (0.90) を明確に説明しうる根拠は現在のところ見当たらない。

これまで考察したように、構成比率ならびに直径の変化には、直接あるいは間接的に MyHC の isoform の出現型との関係がある。したがって、本研究で認めた実験群における個体間変動のなかでのタイプ II A 線維の構成比率と II A 線維の直径ならびに II B 線維の直径との有意な正の相関 (いずれも 0.88) には、このような MyHC の isoform の出現型を介した複雑な関係が背景にあると想像される。このような MyHC の isoform の出現型と直径ならびに構成比率の変化に関しては、今後検討すべき課題であろう。

結 論

ウサギにおいて粉末飼料飼育が咬筋筋線維に及ぼす影響を、タイプ I, II A, II B 線維の筋線維直径と、計測総数に対する各タイプ筋線維数の占める割合 (構成比率) から検討した。その結果、以下の結論を得た。

1. 咬筋筋線維の直径は、タイプ I 線維では 43.9 (対照群) から 35.3 μ m (実験群) に、II A 線維では 55.0 (対照群) から 50.1 μ m (実験群) に有意に減少したが、II B 線維では有意な変化はみられなかった。

2. 構成比率は、タイプ I 線維は対照群と比較して統計的に有意に減少した (対照群: 40.7%, 実験群: 29.3%)。一方、II A 線維は有意な増加を示した (対照群: 17.6%, 実験群: 30.5%)。

3. 実験群の直径ならびに構成比率は個体間で大きく変動したが、このような変動のなかで、II A の直径と

II B の直径との相関 (0.9), I の構成比率と II B の構成比率との相関 (0.95), II A の構成比率と II A の直径との相関 (0.95), II A の構成比率と II B の直径との相関 (0.95) などが統計的に有意であった。このことから筋線維の直径ならびに構成比率の変化の間に密接な関連があることが示唆された。

4. 粉末飼料咀嚼による咬筋への機能的負荷の低下は、タイプ I ならびに II 線維を構成要素とする S, FR タイプ運動単位の活動回数の減少を引き起こしたと推測する。その結果タイプ I, II 線維でタンパク代謝の変化を招来し、顕著な直径の減少をきたしたと考察する。一方、一部のタイプ I 線維の MyHC のタイプ I → IIa への移行を引き起こし、最終的にはタイプ I 線維の構成比率の減少と、II A 線維の構成比率の増加をも引き起こしたと推測する。

文 献

- 1) Martin, T. P., Edgerton, V. R. and Grindeland, R. E. : Influence of spaceflight on rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **65** : 2318—2325, 1988.
- 2) Desplanches, D., Mayet, M. H., Ilyina-kakueva, E. I., Sempore, B. and Flandrois, R. : Skeletal muscle adaptation in rats flown on cosmos 1667. *J. Appl. Physiol.* **68** : 48—52, 1990.
- 3) Dupont-Versteegden, E. E., Houle, J. D., Gurley, C. M. and Peterson, C. A. : Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise. *Am. J. Physiol.* **275** : C 1124—C 1133, 1998.
- 4) Bacou, F., Rouanet, P., Barjot, C., Janmot, C., Vigneron, P. and Albis, A. : Expression of myosin isoforms in denervated, cross-reinnervated, and electrically stimulated rabbit muscles. *Eur. J. Biochem.* **236** : 539—547, 1996.
- 5) Allen, D. L., Yasui, W., Tanaka, T., Ohira, Y., Nagaoka, S., Sekiguchi, C., Hinds, W. E., Roy, R. R. and Edgerton, V. R. : Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single fibers after spaceflight. *J. Appl. Physiol.* **81** : 145—151, 1996.
- 6) Riley, D. A., Slocum, G. R., Bain, J. L. W., Sedlak, F. R., Sowa, T. E. and Mellender, J. W. : Rat hindlimb unloading : soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J. Appl. Physiol.* **69** : 58—66, 1990.
- 7) Martin, T. P., Stein, R. B., Hoepfner, P. H. and Reid, D. C. : Influence of electrical stimulation on the morphological and metabolic properties of paralyzed muscle. *J. Appl. Physiol.* **72** : 1401—1406, 1992.
- 8) Templeton, G. H., Sweeney, H. L., Timson, B. F., Padalino, M. and Dudenhoefter, G. A. : Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hind-limb suspension. *J. Appl. Physiol.* **65** : 1191—1195, 1988.
- 9) Booth, F. W. and Kelso, J. R. : Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. *Pflügers Arch.* **342** : 231—238, 1973.
- 10) Edgerton, V. R., Zhou, M. Y., Ohira, Y., Klitgaard, H., Jiang, B., Bell, G., Harris, B., Saltin, B., Gollnick, P. D., Roy, R. R., Day, M. K. and Greenisen, M. : Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J. Appl. Physiol.* **78** : 1733—1739, 1995.
- 11) 三枝木泰丈 : 顎筋の特性. *神経進歩* **37** : 845—851, 1993.
- 12) Bredman, J. J., Weijs, W. A., Moorman, A. F. M. and Brugman, P. : Histochemical and functional fiber typing of the rabbit masseter muscle. *J. Anat.* **168** : 31—47, 1990.
- 13) Kwa, S. H. S., Korfage, J. A. M. and Weijs, W. A. : Function-dependent anatomical parameters of rabbit masseter motor units. *J. Dent. Res.* **74** : 1649—1657, 1995.
- 14) Umezu, Y., Hachisuka, K., Ueda, H., Yoshizuka, M., Ogata, H. and Fujimoto, S. : Histochemical and immunological analysis of differentiating skeletal muscle fibers of the postnatal rat. *Acta Anat.* **143** : 1—6, 1992.
- 15) Eriksson, P. O., Eriksson, A. and Ringqvist, M. : Special histochemical muscle-fiber characteristics of the human lateral pterygoid muscle. *Arch. Oral Biol.* **26** : 495—507, 1981.
- 16) Eriksson, P. O., Eriksson, A., Ringqvist, M. and Thornell, L. E. : Histochemical-fiber composition of the human digastric muscle. *Arch. Oral Biol.* **27** : 207—215, 1982.
- 17) Rokx, J. T. M., Van Willigen, J. D. and Jansen, H. W. B. : Muscle fiber types and muscle spindles in the jaw musculature of the rat. *Arch. Oral Biol.* **29** : 25—31, 1984.
- 18) Staron, R. S. and Pette, D. : Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. *Histochemistry* **86** : 19—23, 1986.

- 19) Ringqvist, M., Ringqvist, I., Eriksson, P. O. and Thornell, L. E. : Histochemical fiber-type profile in the human masseter muscle. *J. Neurol. Sci.* **53** : 273—282, 1982.
- 20) Maeda, N., Kawasaki, T., Osawa, K., Yamamoto, Y., Sumida, H., Masuda, T. and Kumegawa, M. : Effects of long-term intake of a fine-grained diet on the mouse masseter muscle. *Acta Anat.* **128** : 326—333, 1987.
- 21) 斉藤 高, 大貫芳樹, 三枝木泰丈, 山根 明, 柳沢慧二, 石橋克禮 : ラット咬筋におけるミオシン重鎖 mRNA の生後変化に対する食環境の影響. *歯基礎誌* **42** : 63, 2000.
- 22) Maeda, N., Sato, M., Osawa, K., Kawasaki, T., Masuda, T. and Kumegawa, M. : Postnatal development of the mouse temporal muscle and effects of a fine-grained diet on the muscle spindle. *Anat. Anz.* **165** : 177—192, 1988.
- 23) 伊藤久嗣, 町野 守 : 発育途次マウスにおける食性の変化が咬筋筋線維に及ぼす影響. *明海学誌* **23** : 172—182, 1994.
- 24) 山田 元 : 粉末飼料飼育が発育途上ラット咬筋並びに下顎骨形態に与える影響. *岐歯学誌* **19** : 284—301, 1992.
- 25) 吉田礼子 : 液状飼料飼育マウスの咀嚼筋筋線維の分化と発達に関する研究. *日矯歯誌* **54** : 52—63, 1995.
- 26) Tonndorf, M. L., Timmis, D. P., Widmer, C. and English, A. W. : A comparison of ATPase histochemistry and myosin heavy chain isoform content in a rat masticatory muscle. In : *Brain and oral functions.* (edited by Morimoto, T., Matsuya, T. and Takada, K.), pp. 449—455, Elsevier, Amsterdam, 1995.
- 27) Suzuki, A. : A comparative histochemical study of the masseter muscle of the cattle, sheep, swine, dog, guinea pig and rat. *Histochemistry* **51** : 121—131, 1977.
- 28) Mizutani, M., Saruwatari, L. and Ohno, N. : Analysis of postnatal differentiation of histochemical fiber types in the superficial portion masseter muscle of rat. *Aichi-Gakuin Dent. Sci.* **12** : 19—31, 1999.
- 29) Vignon, C., Pellissier, J. F. and Serratrice, G. : Further histochemical studies on masticatory muscles. *J. Neurol. Sci.* **45** : 157—176, 1980.
- 30) Eriksson, P. O. and Thornell, L. E. : Histochemical and morphological muscle-fiber characteristics of the human masseter, the medial pterygoid and the temporal muscles. *Arch. Oral Biol.* **28** : 781—795, 1983.
- 31) Sciote, J. J., Rowleron, A. M., Hopper, C. and Hunt, N. P. : Fiber type classification of human masseter muscle. In : *Brain and oral functions.* (edited by Morimoto, T., Matsuya, T. and Takada, K.), pp. 439—447, Elsevier, Amsterdam, 1995.
- 32) Brooke, M. H. and Kaiser, K. K. : Muscle fiber types : how many and what kind? *Arch. Neurol.* **23** : 369—379, 1970.
- 33) Weijs, W. A., Brugman, P. and Grimbergen, C. A. : Jaw movements and muscle activity during mastication in growing rabbits. *Anat. Rec.* **224** : 407—416, 1989.
- 34) Weijs, W. A. and Kwa, S. H. S. : The rabbit masseter : organisation and function of a heterogeneous muscle. In : *Brain and oral functions.* (edited by Morimoto, T., Matsuya, T. and Takada, K.), pp. 11—18, Elsevier, Amsterdam, 1995.
- 35) Maxwell, L. C., McNamara, J. A., Jr., Carlson, D. S. and Faulkner, J. A. : Histochemistry of fibers of masseter and temporalis muscles of edentulous monkeys *Macaca mulatta*. *Arch. Oral Biol.* **25** : 87—93, 1980.
- 36) Pette, D. and Staron, R. S. : Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytol.* **170** : 143—223, 1997.
- 37) Ausoni, S., Gorza, L., Schiaffino, S., Gundersen, K. and Lömo, T. : Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J. Neurosci.* **10** : 153—160, 1990.
- 38) Salmons, S. and Sreter, F. A. : Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type. *Nature* **263** : 30—34, 1976.
- 39) Salmons, S. and Vrbova, G. : The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J. Physiol.* **201** : 535—549, 1969.
- 40) Gordon, T., Tyreman, N., Rafuse, V. F. and Munson, J. B. : Fast-to-slow conversion following chronic low-frequency activation of medial gastrocnemius muscle in cats. I, Muscle and motor unit properties. *J. Neurophysiol.* **77** : 2585—2604, 1997.
- 41) Yamada, Y., Haraguti, N., Oi, K. and Sasaki, M. : Two-dimensional jaw tracking and EMG recording system impacted in the freely moving rabbit. *J. Neurosci. Methods* **23** : 257—261, 1988.
- 42) Hughes, S. M. and Schiaffino, S. : Control of muscle fiber size : a crucial factor in ageing. *Acta Physiol. Scand.* **167** : 307—312, 1999.