ラット骨格筋の発育発達に関する基礎的研究
——筋内増殖細胞と総筋線維数の変化を中心として——

内 山 秀 一 玉 木 哲 朗 中 野 昭 一

CHANGES IN THE NUMBERS OF PROLIFERATING CELLS AND
MUSCLE FIBERS IN GROWING RAT SKELETAL MUSCLE

SHUICHI UCHIYAMA, TETSURO TAMAKI and SHOICHI NAKANO

Abstract

Changes in the numbers of muscle fibers and proliferating cells detected by immunohistochemistry were studied in correlation with various growth parameters including changes in body weight, lower hindlimb length, muscle length, muscle weight and age in Wistar-strain rats at various developmental stages. The total fiber number in plantaris (PLA) muscles increased gradually between 2 weeks and 10 weeks of age (about 300 g body weight), and then remained constant between 10,000 and 11,000 these after. In contrast, proliferating cells labeled by bromodeoxyuridine decreased gradually during the same period, and were hardly evident after 10 weeks. In the growth curves for the body weight, lower hindlimb length, muscle weight, and the length of the extensor digitorum longus (EDL) muscle, turning points were observed at 10 weeks (300 g body weight), respectively, suggesting that the turning point between growth in length and growth in width occurred at this point. Furthermore, the growth curves for the body weight and PLA muscle weight were correlated between 2 and 20 weeks, including the turning point. Therefore it is suggested that the development of muscle weight from 2 to 10 weeks depends mainly on the increment of fiber number (hyperplasia), whereas development after 10 weeks depends on the increment of individual fiber diameter (hypertrophy), in relation to the tendency for an increase in fiber number and a decrease in proliferating cells. These results indicate that maturation of skeletal muscle in male Wistar rats occurs at 10 weeks of age and a body weight of 300 g. Accordingly, these facts should be considered when investigating muscle hypertrophy or hyperplasia.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 1993, 42 : 130~137)

key words : skeletal muscle, growth, proliferating cell, hyperplasia, hypertrophy.

I. 緒 言

骨格筋が、運動をはじめとするいわゆる過負荷により肥大する事実は、これまでヒト及び様々なモデル動物を用い多くの研究者によって確認されている^{2,10,22,25}。この筋肥大に関しては、個々の筋線維がその横断面積を増すことによりもたらされ、筋線維は肥大はするが増殖（増加）はしないとされてきた。これに対し、近年、筋肥大に伴い筋線維の増加も起こるとする報告^{2,7,8,11}もなされるようになり、現在論争の的となっている。

一方、筋肥大は、発育・発達過程においても起こっており、成長にともない筋線維は肥大し、筋線維数も増加することが報告されている^{5,13}。

さらに、分化を完了した筋線維の肥大、増殖には、筋衛星細胞が関与しているとする報告^{3,11,12,16,17}もなされており、同様に、Allbrookら¹¹は³H-チミジンを用いたラジオオートグラフィによる検索で、生後発育にともない活性化した筋衛星細胞が減少することを示していることから、発育にともなう筋線維の肥大、増殖にも筋衛星細胞が関与している可能性が示唆される¹⁰。このことは、

筋の肥大あるいは増殖を考える上で常に考慮しなければならない事項である。すなわち、後天的な刺激あるいは過負荷による筋肥大、筋線維の増殖を検討する場合、発育による影響がどの時期まで継続するのかを明らかにし、しかも発育・発達に伴う因子を排除した上で検討する必要がある。しかし、生後発育にともなう筋線維の増殖と活性化した筋衛星細胞（増殖期細胞）との関係について検討した研究はほとんどみられない。

そこで本研究では、ラットの生後発育にともなう筋線維数の変化及び筋肉内の活性化した筋衛星細胞（増殖期細胞）の動向を、週齢、体重の推移、下腿長、筋長、及び筋の湿重量の変化等との関連から免疫組織化学的に検討した。

II. 実験方法

A. 実験動物及び実験手順

実験動物は生後2～10までの各週齢および15・20週齢のウィスター系雄性ラット各5匹、計55匹を用いた。飼育用ケージは30×35×18 cmで、餌（日本クレア；CE-2）及び水は自由摂取とした。尚、飼育室は12時間周期で昼夜逆転し、飼育期間中の平均室温及び湿度は $24.1 \pm 2.1^\circ\text{C}$ 、 $39.8 \pm 5.1\%$ であった。

各週齢のラットに対して体重を測定後、チミジンのアナログであり生体内の増殖期（DNA合成期）にある細胞核に特異的に取り込まれるBrdU（5-bromo-2-deoxyuridine、ペーリンガー・マンハイム社）100 mg/kg body weight（pH調整剤として11.6 mg/100 mg BrdUの水酸化ナトリウムを含む2 mlの生理食塩水に溶解）を、腹腔内投与し筋肉内増殖期細胞を標識した^{6,9,21)}。BrdU投与30分後ネプタール（Sodium-pentobarbital：40 mg/kg body weight i. p.）麻酔下にて屠殺し、骨の発育の指標として膝関節90度・足関節90度の状態で大腿骨遠位骨端上部から踵骨底部までを下腿長として、また同様の状態で、筋の発育の指標として脛骨に沿って付着し、今回測定した下腿長の変化に最も影響を受けると考えられるM. Extensor Digitorum Longus (EDL)を露出させ、EDL長として近位筋腱移行部から遠位筋腱移行部の長

さをキャリパーにて計測した。さらに、両下腿よりM. Plantarisを摘出し、湿重量を測定後、自然長にてドライアイス・アセトン内で冷却したイソペンタン（ -70°C ）中で瞬間凍結し、一方は組織化学的検索に、他方は筋線維数の算出に用いた。

B. 分析方法

1. 組織化学的検索

凍結した試料をクリオスタット内（ -20°C ）で、2週齢では2分割、3・4週齢では3分割、5～10週齢では4分割、15・20週齢では6分割し、各部位ごとに厚さ10 μm の連続切片を作成しほぼ筋全体の情報が得られるようにした。得られた切片に対してH. E.染色及び抗BrdUを用いた酵素抗体法（間接法）による免疫組織化学的染色を施した。

BrdU及び抗BrdU抗体を用いた酵素抗体法（間接法）による免疫組織化学的染色は以下の方法により行った^{6,9,21)}。

(1) 切片作成後70%エタノールにて15分固定した。

(2) 0.3% H_2O_2 を加えた100%メタノールに30分浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを阻止した。

(3) 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate Buffered Saline；PBS pH. 7.4）で洗浄した後、2規定塩酸で室温にて60分間処理しDNA変性を行った。

(4) 0.01 M PBSで洗浄後、正常ヒツジ血清（Normal Sheep Serum；NSS）にて30分間処理し、非特異的抗原抗体反応を阻止した。

(5) 0.01 M PBSで洗浄後、抗BrdU抗体（Becton Dickinson社製）を滴下し、Moist Chamber（室温）内で60分間反応させた。

(6) 0.01 M PBSで洗浄後、標識2次抗体（Horse radish peroxidase；HRP：標識抗マウス免疫グロブリン抗体）を滴下し、Moist Chamber（室温）内で60分間反応させた。

(7) 0.01 M PBSで洗浄後、0.02% DAB（3-3'-diaminobenzidine）を含む0.05 M トリス・リン酸緩衝液に0.005%の過酸化水素水を加えた溶液で発色し、水洗後、エタノール系列にて脱水、キシレンにて透徹、封入した。

さらに、光学顕微鏡下にて各部位より得られた連続切片6枚、計12~36枚の切片における総BrdU陽性細胞数をカウントし、1切片あたりの平均増殖期細胞数を算出した。

2. 筋線維数の算出

筋線維数の算出は、独自に改良した硝酸法¹⁸⁾により行った。すなわち、凍結した試料を蒸留水で溶解し、15%硝酸で1.5~3時間処理、水洗後4℃で1時間蒸留水に浸漬した後、4℃ 0.01 M PBSに移した。さらに、数百本の筋束に分割した試料をシリコンシャーレー上に移し、実態顕微鏡下で全筋線維を単離しカウントした。

また、統計処理には最小二乗法による回帰分析及びピアソンの相関係数を用い、各指標における発育発達の変曲点を求め、その傾向を回帰直線で示した。

III. 結 果

Fig. 1 に3週齢及び8週齢のBrdU陽性細胞を示した。細胞間質に細胞核に取り込まれた果粒状の反応産物が認められる。

Fig. 2 に、発育に伴う筋肉内増殖期(BrdU陽性)細胞数と総筋線維数の推移を示した。各週齢における切片あたりの増殖期細胞数は、2~10週齢にかけて直線的に減少し($Y = -30.4X + 293.1$, $r = -0.97$)、10週齢以降はほとんど観察されなかった。すなわち、2週齢では平均 224.99 ± 15.9 個観察された増殖期細胞は、5週齢では平均 110.08 ± 13.5 個と約半数となり、10週齢に至っては平均 6.37 ± 3.76 個となり、さらに20週齢では平均 0.85 ± 0.30 とほとんど認められなかった。これに対し、筋線維数は、増殖期細胞数とは逆に10週齢まで漸次増加する傾向を示した($Y = 330.0X + 7940.5$, $r = 0.97$)。すなわち、3週齢時には平均 $8,739 \pm 129.8$ 本であったものが、10週齢では平均 $11,087.6 \pm 612.3$ 本となり、それ以降は約11,000本前後で一定する傾向を示した。この2つのデータから、増殖期細胞数及び総筋線維数の週齢に伴う推移では、10週齢付近が変曲点となることが示された。

次に、週齢に伴う体重の推移をFig. 3 に示した。体重は週齢に伴い漸次増加する傾向を示した。

Fig. 1. The proliferating cells(anti-BrdU positive reactions) were distributed between fibers(a : 3 weeks x 270), and observed nearby muscle fiber. (b : 8 weeks x 770).

しかし、体重の推移にも変曲点が認められ生後2週齢、平均 27.4 ± 2.24 g から10週齢、平均 292 ± 14.7 g にかけては直線的に増加し($Y = 34.2X - 55.8$, $r = 0.98$)、それ以降はゆるやかに増加する傾向を示した($Y = 10.2X + 189.0$, $r = 0.99$)。すなわち、体重の推移では10週齢、体重300g付近を境に二本の直線で示されることが明かとなった。

Fig. 4 は週齢に伴うM. Plantarisの湿重量の推移を示したものである。M. Plantarisの湿重量の推移も、週齢にともない体重の推移と同様に、10週齢、平均 288.8 ± 3.9 mg を境に二本の直線で示されることが明かとなった。

Fig. 5 には、週齢に伴う下腿長及びEDL長の推移を示した。下腿長及びEDL長の推移も共に10週齢、体重300g付近まで漸次増加し、それ以降もわずかに増加する傾向を示した。すなわち、

Fig. 2. Changes in number of anti-BrdU positive reactions and muscle fibers of plantaris muscles (PLA). Both parameters gradually decreased (Anti-BrdU positive reactions) or increased (muscle fiber numbers) from 2 to 10 weeks of age, and then both parameters shows constant values after 10 weeks.

Fig. 3. Changes in body weight. In the growth curve of body weight, the turning point is observed at 10 weeks (300 g body weight).

Fig. 4. The growth curve of plantaris muscles (PLA). The muscle weight gradually increased following to the age, however the turning point is also observed at 10 weeks (300 g body weight).

Fig. 5. Changes in the length of lower hindlimbs and extensor digitorum longus muscles (EDL). The turning points were observed in both parameters at 10 weeks (300 g body weight), and few increments are observed after 10 weeks of age.

下腿長及び EDL 長の推移においても10週齢, 体重 300 g 付近に変曲点があることが示された. また, 10週齢までの下腿長及び EDL 長の推移を比較すると, EDL 長($Y=2.15X+10.9$, $r=0.97$)に対し下腿長($Y=3.51X+15.9$, $r=0.97$)で増加率が高い傾向を示した. しかし, 10週齢以降は下腿長($Y=0.38X+44.5$, $r=0.97$)及び EDL 長($Y=0.39X+27.5$, $r=0.97$)の増加率はほぼ等しくなる傾向が示された.

IV. 考 察

本研究ではウィスター系雄性ラットの発育・発達に伴う体重, 筋の湿重量, 下腿長, EDL 長, 総筋線維数の変化及びそれらに伴う筋肉内増殖期細胞の動向を免疫組織化学的に検討した.

総筋線維数は, 発育に伴って漸次増加し10週齢, 体重 300 g 付近を変曲点として 11,000本前後でほぼ一定する傾向を示したのに対し, 増殖期細胞数

は週齢を経るにしたがって漸次減少し、10週齢・体重約 300 g 付近を境にそれ以降ほとんど認められなくなった。Allbrook ら¹⁾は発育期にみられる増殖期細胞は主に活性化した筋衛星細胞であり、発育にともないそれらの細胞の割合が減少することを示している。本研究においても同様の傾向が示されたこと及び反応産物の局在 (Fig. 1) から、今回同定した増殖期細胞のほとんどが活性化した筋衛星細胞であると考えられた。さらに、総筋線維数の増加と増殖期細胞数の減少とが対称的な推移を示したこと (Fig. 2) から、筋線維数の増加と筋衛星細胞との関連性も示唆された。また、このことは筋衛星細胞が筋芽細胞であるとする Salleo ら¹⁵⁾の報告を支持するものである。

また、筋の湿重量の推移も 10週齢、体重 300 g 付近で変曲点が見られた。これは、総筋線維数の増加との関連から考えると 10週齢、体重 300 g 付近までの筋重量の増加は筋線維の増殖と肥大の両者によるものであり、それ以降の増加は主に筋線維の肥大によるものであると推察された。さらに、筋重量と体重の関係を検討したところ、 $Y=1.05X-0.02$, $r=0.98$ の相関関係が示され、ラットの発育発達過程において生後 2～20週齢では筋重量の増加は体重に依存しているものと考えられた。

また、生後発育の指標として体重、下腿長、さらに腱の付着部位から下腿長の影響を最も受けると考えられる EDL 長の推移を検討した結果、それぞれ 10週齢、体重 300 g 付近までは直線的に増加し、それ以降の増加はゆるやかとなる傾向を示し、下腿長と EDL 長の比率は 10週齢、体重約 300 g 以降で一定する傾向をした。すなわち、ウィスター系雄性ラットにおけるこれらの成長の変曲点、10週齢、体重 300 g 付近にあることが示された。またこのような骨長と筋長の関係はおそらく下腿の筋群全てに適応できるものと考えられ、前述の M. Plantaris における筋線維数と筋重量の推移との関係から、10週齢、体重約 300 g までの筋重量の増加は筋の長育と幅育の増加の両者によるものであり、それ以降の増加は主に筋の幅育の増加であると推察された。

一方、ラットにおける筋線維タイプの分化は、

生後約 4 週齢で完了する^{4,24)}とされている。しかし、本研究結果では、4 週齢の時点ではまだかなりの数の増殖期細胞が観察され、筋線維数も 9,000 本以下であったことから、増殖期を経た未成熟な筋線維の存在が考えられる。仮に、動物の発育発達過程において生体の諸器官が形態的・機能的に急速に変化する時期を成長期、その速さが低下し安定する時期を成熟期、さらに老化により形態的・機能的低下がみられる時期を老齢期とするならば²⁸⁾、ラットの場合、4 週齢では一個の骨格筋として成熟したとはいえず、成熟に至るのは筋内の増殖期細胞が消長し、筋線維数がほぼ一定となる生後 10週齢・体重約 300 g 以降であることが示唆された。

以上の成績は、ウィスター系雄性ラットの発育発達過程において、骨格筋が成熟に至るのは、体重、骨および筋の発育、さらに骨格筋内増殖期細胞の消長と筋線維数がほぼ一定となる時期、すなわち生後 10週齢・体重約 300 g 以降であることを示していた。これらのことは、筋肥大に関する研究でウィスター系雄性ラットを用いる場合、常に発育発達による影響を考慮すべきであり、さらに骨格筋の発育発達に関する基礎的研究の必要性を示唆するものであった。

V. 要 約

本研究ではウィスター系雄性ラットの M. Plantaris (PLA) における発育・発達にともなう総筋線維数の変化及び筋肉内増殖期細胞（活性化した筋衛星細胞と考えられる）の動向を、週齢、体重の推移、下腿長、筋の湿重量及び筋の付着部位から下腿長の変化に最も影響を受けると考えられる M. Extensor Digitorum Longus (EDL) の筋長の変化等の関連から免疫組織化学的に検討した。

(1) 発育発達にともない PLA の筋線維数は漸次増加し 10週齢、体重 300 g 付近で約 10,000～11,000 本の間ではほぼ安定する傾向を示した。

一方、PLA の増殖期細胞数の推移は筋線維数とは対称的に 10週齢、体重 300 g 付近まで漸次減少し、それ以降ほとんど認められなかったことから、発育・発達過程の筋線維数の増加にも筋衛星

細胞が関与している可能性が示唆された。

(2) 発育・発達にともなう体重, 下腿長, EDL の筋長, PLA の筋重量の推移においても, やはり10週齢, 体重 300 g 付近で成長の変曲点がみられ, それ以降の増加が緩やかとなる傾向を示したことから, この10週齢, 体重 300 g 付近が長育から幅育への一つの変曲点であると考えられた。

(3) 発育・発達にともなう PLA の筋重量及び体重の推移がほぼ等しい回帰式によって示されたことから, 今回用いた20週齢, 体重 400 g までのラットでは体重と筋重量の増加率がほぼ等しいことが示された。

(4) 発育・発達にともなう PLA の筋重量の推移及び総筋線維数の増加を示した回帰式から, 10週齢, 体重 300 g 付近までの筋重量の増加は, 筋線維の増殖と肥大の両者によるものであり, それ以降の増加は主に筋線維の肥大によるものであると考えられた。

(5) また, 下腿長と EDL の筋長の比率が10週齢, 体重約 300 g 以降で一定する傾向を示した。このような骨長と筋長の関係はおそらく下腿の筋群全てに適応できるものと考えられ, PLA における筋線維数と筋重量の推移とを考え合わせると, 10週齢, 体重約 300 g までの筋重量の増加は筋の長育と幅育の両者によるものであり, それ以降の増加は主に筋の幅育に依存するものであると推察された。

以上の結果から, ウィスター系雄性ラットの骨格筋の場合, 一個筋が筋全体として成熟したと考えられるのは10週齢, 体重約 300 g 以降であった。これらのことは筋の肥大や筋線維の増殖等の研究を行う場合, 発育発達の影響を除外するために, この点を考慮して行わなければならないことが考えられた。

(受付 平成4年5月18日)

References

- 1) Allbrook, D. B., Han, M. F. and Hellmuth, A. E. (1971) : Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity. *Pathology*, **3**, 233-243.
- 2) Alway, S. E., Gonyea, W. J. and Davis, M. E. (1990) : Muscle fiber formation and fiber hypertrophy during the onset of stretch-overload. *Am. J. Physiol.*, **259**, C92-C102.
- 3) Appell, H. J., Forsberg, S. and Hollmann, W. (1988) : Satellite cell activation in human skeletal muscle after training : Evidence for muscle fiber neof ormation. *Int. J. Sports Med.*, **9**, 297-299.
- 4) Baldwin, K. M. (1984) : Muscle development : neonatal to adult. *Exercise Sports Sciences Reviews*, **12**, 1-9.
- 5) Chiakulas, J. J. and Pauly, J. E. (1965) : A study of postnatal growth skeletal muscle in rat. *Anat. Rec.*, **152**, 55-62.
- 6) deFazio, A., Leary, J. A., Hedley, D. W. and Tattersall, M. N. T. (1987) : Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. *J. Histochem. Cytochem.*, **35**, 571-577.
- 7) Garner, R. P., Terracio, L., Borg, T. K. and Buggy, J. (1991) : Intra-cranical self stimulation motivates weight-lifting exercise in rat. *J. Appl. Physiol.*, **71**, 1627-1631.
- 8) Gonyea, J. W., Sale, D. G., Gonyea, F. B. and Mikesky, A. (1986) : Exercise induced increases in muscle fiber number. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **55**, 137-141.
- 9) Gratzner, H. G. (1982) : Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine : A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, **218**, 474-475.
- 10) Kelly, A. M. (1978) : Satellite cell and myofiber growth in the rat soleus and extensor digitorum longus muscle. *Develop. Biol.*, **65**, 1-10.
- 11) Kevin, C. D. and Edward, S. (1987) : Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, **63**, 1816-1821.
- 12) Kevin, C. D. and Schultz, E. (1989) : Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. *J. Appl. Physiol.*, **67**, 1827-1834.
- 13) Ontell, M. and Dunn, R. F. (1978) : Neonatal muscle growth : A quantitative study. *Am. J. Anat.*, **152**, 539-556.

- 14) Rayne, J. and Crawford, G. N. C. (1975) : Increase in fiber numbers of the rat pterygoid muscles during postnatal growth. *J. Anat.*, **119**, 347-357.
- 15) Salleo, A., Anastasi, G., La Spada, G., Falzea, G. and Denaro, M. G. (1980) : New muscle fiber production during compensatory hypertrophy. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **12**, 268-273.
- 16) Schlitz, E. (1989) : Satellite cell behavior during skeletal muscle growth and regeneration. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **21**, 181-186.
- 17) Snow, M. H. (1990) : Satellite cell response in rat soleus muscle undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergists. *Anat. Rec.*, **227**, 437-446.
- 18) Tamaki, T., Akatsuka, A., Itoh, J. and Nakano, S. (1989) : A newly modified isolation method of single muscle fibers-Especisly useful in histological and electron microscopic studies on branched fibers-. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, **17**, 211-218.
- 19) Tesch, P. A. (1988) : Skeletal muscle adaptations consequent to long-term heavy resistance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **20**, S132-S134.
- 20) Timiras, s. p. (寺沢 瑩・江上信雄監訳) (1972) : *Developmental Physiology and ageing. (ティラミス生理学. 発育と老化のしくみ), 序説・第I編発育の生理学.* 丸善株式会社, 東京, 3-14.
- 21) Timo, H. and Hannu, K. (1992) : Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **24**, 197-205.
- 22) Tomanek, R. J. and Woo, Y. K. (1970) : Compensatory hypertrophy of the plantaris muscle in relation to age. *J. Geront.*, **25**, 23-29.
- 23) Umnova, M. N. and Seene, T. P. (1991) : The effect of increased functional load on the activation of satellite cells in the skeletal muscle of adult rats. *Int. J. Sports Med.*, **12**, 501-504.
- 24) Vuokko, K. (1989) : Effects of ageing and physical training on rat skeletal muscle. *Act. Physiol. Scand.*, **135** (Suppl. 557), 6-56.
- 25) Yarasheski, K. E., Lemon, P. W. and Gilloteaux, J. (1990) : Effects of heavy-resistance exercise training on muscle fiber composition in young rats. *J. Appl. Physiol.*, **69**, 434-437.