

飼料性状の違いがラット咬筋の筋内代謝物質含有量に及ぼす影響について

—¹H-MRS による咬筋内代謝物質の定量および評価—

益田 勉

岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座

(主任：三浦 廣行 教授)

(受付：1999年10月25日)

(受理：1999年11月16日)

Abstract : The purpose of this study was to investigate the effects of the physical consistency of the diet on the metabolites of the masseter muscle on rats fed a pelleted or a powdered diet. The effects were evaluated with ¹H-NMR (nuclear magnetic resonance) spectroscopy (¹H-MRS) and biochemistry. The other purpose was to examine the relationship between the each type of muscle fiber through identification by ATPase staining and of the metabolites also between the masseter muscle.

Male Wistar rats were divided into two groups, those fed a pelleted diet and those fed a powdered diet, at 3 weeks of age. Rats were fed ad libitum until 9 or 12 weeks. The contents of the metabolites in the masseter muscle were observed by ¹H-MRS. The ratio of different fiber types was determined by ATPase staining.

The following results were obtained.

1. The weight of the masseter muscle of the pelleted diet group was significantly greater than that of the powdered diet group at both 9 and 12 weeks.
2. The share of the cross-sectional area of type 2 A fibers in the pelleted diet group was significantly greater than that of the powdered diet group.
3. The contents of creatine and taurine in the pellet diet group were significantly greater than in those in the powdered diet group at 9 weeks of age. The contents of creatine, taurine, anserine, and anserine + carnosine at 12 weeks of age were significantly greater than in those at 9 weeks of age in the pelleted diet group.
4. From the results of a discriminant factor analysis employing the contents of creatine, taurine, anserine and carnosine, there was 100% accuracy in predicting between the pelleted and the powdered diet group at 9 weeks. At 12 weeks there were 91.7% and 83.3% accuracy.

Consequently, it was suggested that the physical consistency of the diet might influence the contents of metabolites and the share area of the fiber type in the masseter muscle.

Key word : masseter muscle, nuclear magnetic resonance, myosin ATPase, powdered diet

The effects of the physical consistency of diet on the metabolites in the masseter muscle of the rat

—¹H-MRS spectroscopic analysis of the metabolites in masseter muscle—

Tsutomu MASUDA

(Department of Orthodontics, School of Dentistry, Iwate medical University, 1-3-27 Chuodori, Morioka, Iwate 020-8505 Japan)

緒 言

成長期の個体における咀嚼筋では、その活動の頻度や強度が咬筋の重量のみならず筋線維の構成にまで影響を及ぼすことが知られている¹⁻⁶⁾。実験的に粉末飼料や液状飼料で飼育したラットやマウスの咬筋では固形飼料群に比べ筋線維の直径は細くなり、咬筋や側頭筋の重量が低下すること、さらにこのような粉末飼料や液状飼料の飼育により、閉口筋の発達や筋線維の分化の程度が遅延し、筋の生理学的性質の違いが生じるばかりではなく、顎骨の形態にも影響をもたらすことが報告されている^{5,6)}。

筋線維のタイプ別比率は遺伝的影響を強く受けているが、後天的な要因によってもその比率は変化すると考えられ、さらにタイプごとに収縮特性や酸化的・解糖的エネルギー産生能が異なることから、筋線維タイプ別比率の違いは各種代謝系とも関連していると推察される。

従来よりこれらの咀嚼筋の機能や組織学的形態を評価する手段として、免疫・酵素組織化学的手法が用いられてきたが、近年、咀嚼筋の生理学的特性を非侵襲的に直接評価する試みが³¹P-NMR (nuclear magnetic resonance) スペクトロスコーピー (以下 MRS と略す) を用いて行われ始めた。³¹P-MRS では高エネルギーリン化合物や無機リンが対象であり、エネルギー代謝に関わる情報が主である。¹H-MRS ではエネルギー代謝に関わる物質のみならず各種アミノ酸や膜代謝に関係する物質などの各種代謝系に関係した情報を得ることが可能である。

本研究では、より情報量の多い¹H-MRS を用い、固形飼料と粉末飼料で飼育した成長期ラット咬筋の各種代謝物質を定量し、飼料性状の違いによる咀嚼筋活動量の差が咬筋代謝物質に及ぼす影響について検討を行うとともに、各代謝物質相互の関係および筋線維の組成との関連性について検討した。

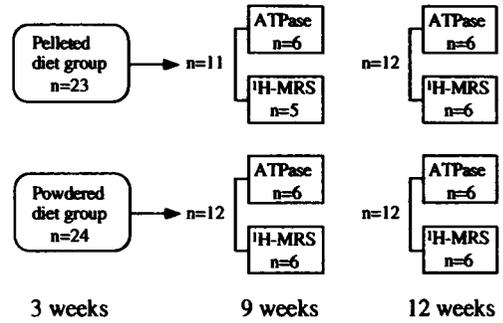


Fig. 1. Experimental protocol

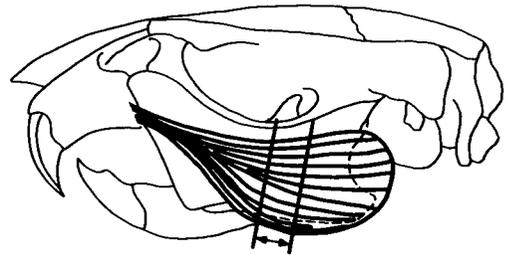


Fig. 2. Masseter muscle portion used for dissection

材料および方法

1. 実験動物

実験動物として Wistar 系雄性ラットを予備実験を含め72匹を用い、そのうち Fig. 1 に示すように47匹を本実験に用いた。

生後3週齢より固形飼料 MF (オリエンタル酵母工業) で飼育した固形群 (23匹) と同成分の粉末飼料 MF で飼育した粉末群 (24匹) の2群に分けた後、生後9週齢もしくは12週齢まで一定の環境下 (室温23℃±1℃, 湿度55%±5%) で飼育を行い実験に供した。

なお、実験期間中は飼料と水を自由に摂取させた。

2. 体重および頭尾長、咬筋湿重量

飼料の性状の違いが全身の発育に及ぼす影響を検討するために体重と頭尾長の測定を行った後、エーテル麻酔下で脱臼屠殺し、左側咬筋浅層を未固定の状態で見出し (Fig. 2)。摘出した咬筋は直ちにその筋湿重量を電子上皿天秤

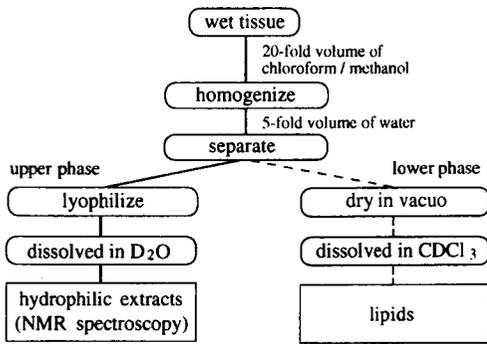


Fig. 3. Flow chart demonstrating sample processing in preparation for ^1H -MRS.

で測定した。

3. 筋線維のタイプ別観察

1) 凍結切片の製作

摘出した咬筋は、Fig. 2 に示すように筋腹中央部で筋線維の走行と直行するように切断し、ティッシュテックに包埋後、液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結固定を行った。その後、クリオスタットを用いて厚さ $8\ \mu\text{m}$ の連続横断切片を作製した。

2) ATPase 染色について

筋線維を組織化学的にタイプ別に分類するためにBrookeらの方法⁷⁾に従い routine ATPase, ATPase (pH4.5, pH4.3) 染色を行った。今回、ATPase 染色における前処理溶液の pH は routine ATPase では pH10.3~10.5まで0.1きざみで行い、酸性側では pH4.2~4.6まで0.1きざみで行った。各 pH の溶液で前処理後、ATPase 基質溶液中でインキュベートを行い、黄色硫化アンモニウムで発色させ、脱水後封入した。また ATPase 染色の至適 pH を決定するために、コントロールとして同ラットのヒラメ筋 (タイプ 1 線維優位) と長指伸筋 (タイプ 2 線維優位) を用いた。

個々の筋線維は Brookeらの分類⁷⁾に従い pH10.4付近で酵素活性を失う筋線維をタイプ 1 線維 (遅筋線維) と酵素活性を失わないタイプ 2 線維 (速筋線維) に分類した。さらにタイプ 2 線維は pH4.5付近の前処理で酵素活性を失うタイプ 2 A 線維と pH4.3付近の前処理で酵素

活性を失うタイプ 2 B 線維に分類した。また前処理液の pH の程度に関係なく酵素活性が保持される筋線維を未分化なタイプ 2 C 線維とした。

3) 筋線維タイプ別面積の占有率の計測

ATPase 染色を行った各週齢・各群の凍結切片標本の筋表層部、中央部、内側部の領域について任意に選択した10ヶ所を光学顕微鏡に接続したデジタルカメラ (Polaroid Digital Microscope Camera; Polaroid 社) を用いて撮影し、パーソナルコンピューターにデジタル画像として取り込みを行った。筋線維のタイプ別面積については対物レンズ倍率40倍で1視野内に200本以上の筋線維を含むように撮影を行い、筋線維をタイプ別に分類後、筋線維のタイプごとの面積を画像解析ソフト NIH Image ver. 1.61 (Wayne Rasband; U. S. National Institutes of Health) を用いて測定し、百分率で示した。

4. 筋内代謝物質の測定

1) 試料の処理

摘出した咬筋は筋腹中央部で筋線維の走行と直行するように切断後、Folch 法⁸⁾を参考にして Fig. 3 に示す手順で抽出処理を行った。試料として切断された咬筋は湿重量の20倍量のクロロホルム・メタノール (2:1) 混合液にてホモジナイズ後、濾過し、濾過量の1/4倍量の水を加えて混和した。これを4°Cで20時間静置し、メタノール/水層とクロロホルム層の2層に分離させ、各種代謝物質の測定のために上層のみを用いた。上層の水溶性抽出物は48時間の凍結乾燥後、0.3mlの重水 (D_2O ; Merck 社) に再溶解し、これを NMR 測定用 5 mm 試料管に移して測定を行った。なお、凍結乾燥前に各物質の含量を求めるための基準として既知量の DSS (dimethylsilapentane sodium sulfonate; Merck 社) を添加した。

2) 核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance) 装置による測定

測定は1.88T の NMR 装置 (WP-80SY-WG; Bruker 社) により、5 mm 試料管プローブを用

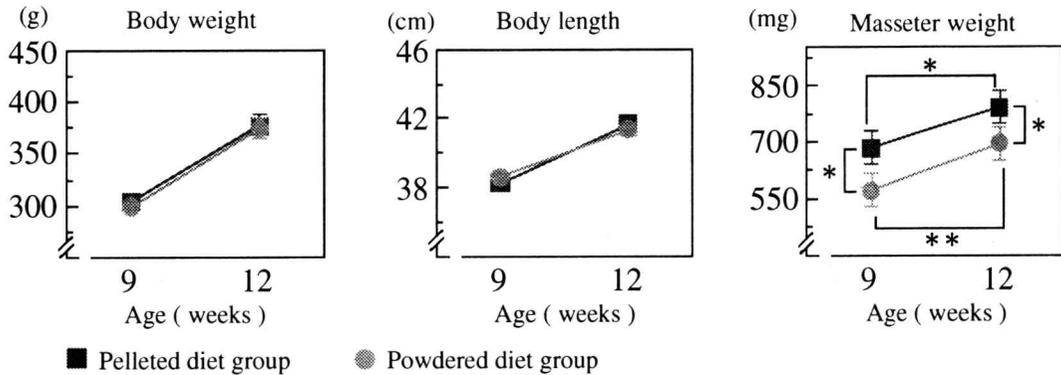


Fig. 4. Student's t-test test was used for comparison tests of body weight, body length, and masseter weight, between the pelleted diet group and powdered diet group. Results are shown as mean ± S.D.. Bracket indicates a significant difference. *: p < 0.05, **: p < 0.01

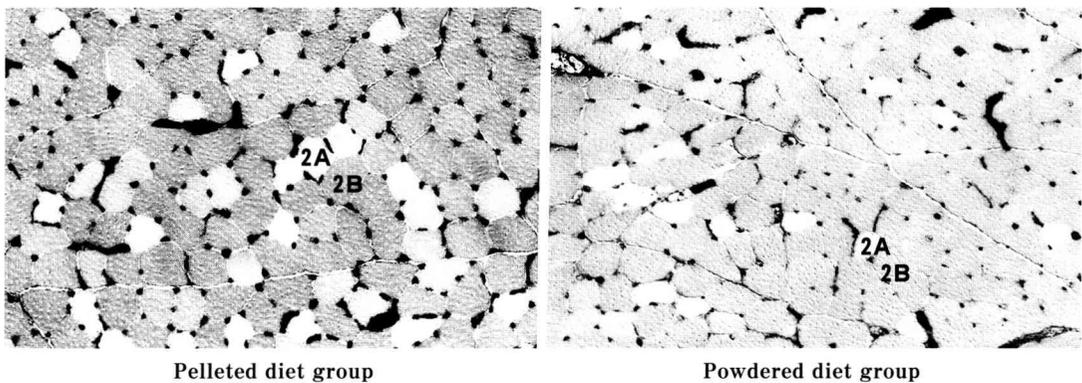


Fig. 5. ATPase staining in rat masseter muscle cross sections at 9 weeks after preincubation at pH4.5.

いて、観測周波数80.13MHz, パルス幅 3 μs (90 パルス), 繰り返し時間14.1s, 積算回数256回の条件で行った。測定により得られたスペクトルは、波形分離ソフト (GRAMS386 ; Galactic社) を用いてフィッティング処理を行い、骨格筋における収縮と密接に関わる物質であるクレアチン (crn), タウリン (tau), アンセリン (ans), カルノシン (car), および解糖系における中間代謝産物である乳酸 (lac) についてピークの面積を求めた。さらに既知量添加の DSS のピーク面積を基準として各物質の含量を求めた。なお、各ピークの帰属は、過去の文献⁹⁻¹¹⁾を参考にするとともに、純物質を試料に添加することで確認した。

5. 固形群および粉末群における各代謝物質の関係

体重および頭尾長, 咬筋湿重量, ATPase 染色による筋線維タイプ別の面積, ¹H-MRS で得られた各代謝物質の含量については, Shapiro-Wilks 検定を用いて正規性の確認を行った後, 群間および週齢間について平均値の差の検定 (t-検定) を行った。また固形群と粉末群で代謝物質に差が生じているか否かを検討するために各代謝物質を変数として相関分析を行った後に多変量解析の判別分析を行った。

結 果

1. 体重および頭尾長と咬筋湿重量

Fig. 4 に示すように全身成長の指標となる

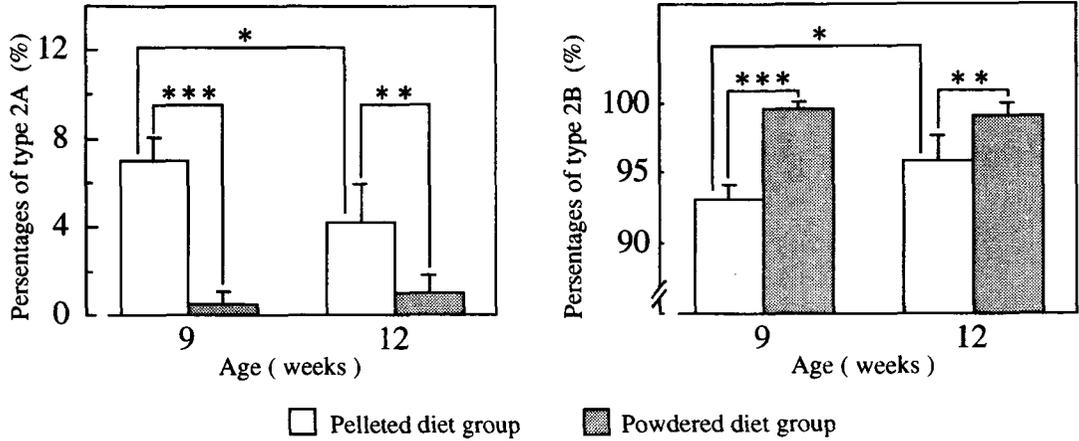


Fig. 6. Distribution ratio of ATPase in stained masseter muscle fibers. The ratio of 2A fiber in the pelleted diet group was significantly greater than in the powdered diet group. At 12 weeks of age, the ratio of 2A fiber in the pelleted diet group was significantly reduced in comparison to that at 9 weeks. Student's t-test was used to compare the results. Results are shown as mean \pm S.D. Bracket indicates a significant difference. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

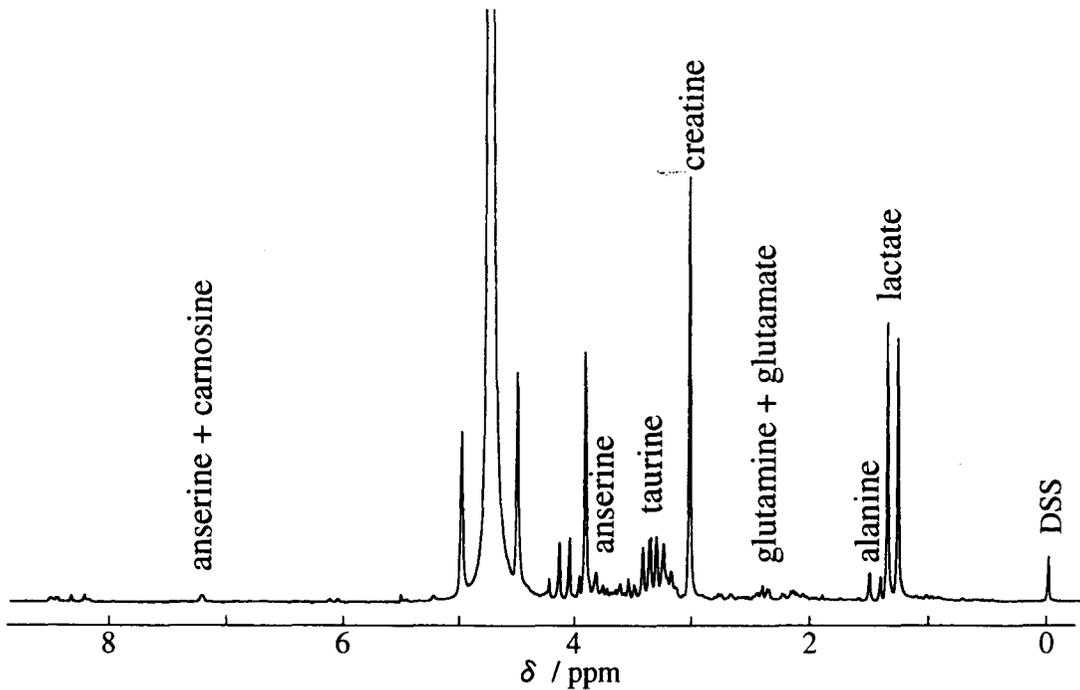


Fig. 7. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the masseter muscle hydrophilic extracts.

体重および頭尾長はいずれの週齢においても固型群、粉末群の間に有意な差は認められなかった。一方、咬筋湿重量は週齢の変化にともない固形群も粉末群も有意な増加を示したが、固形

群の咬筋湿重量は粉末群のそれに比べていずれの週齢においても有意に大きかった。

2. 筋線維タイプ別面積の占有率

今回検討を行った咬筋浅層では、未分化なタ

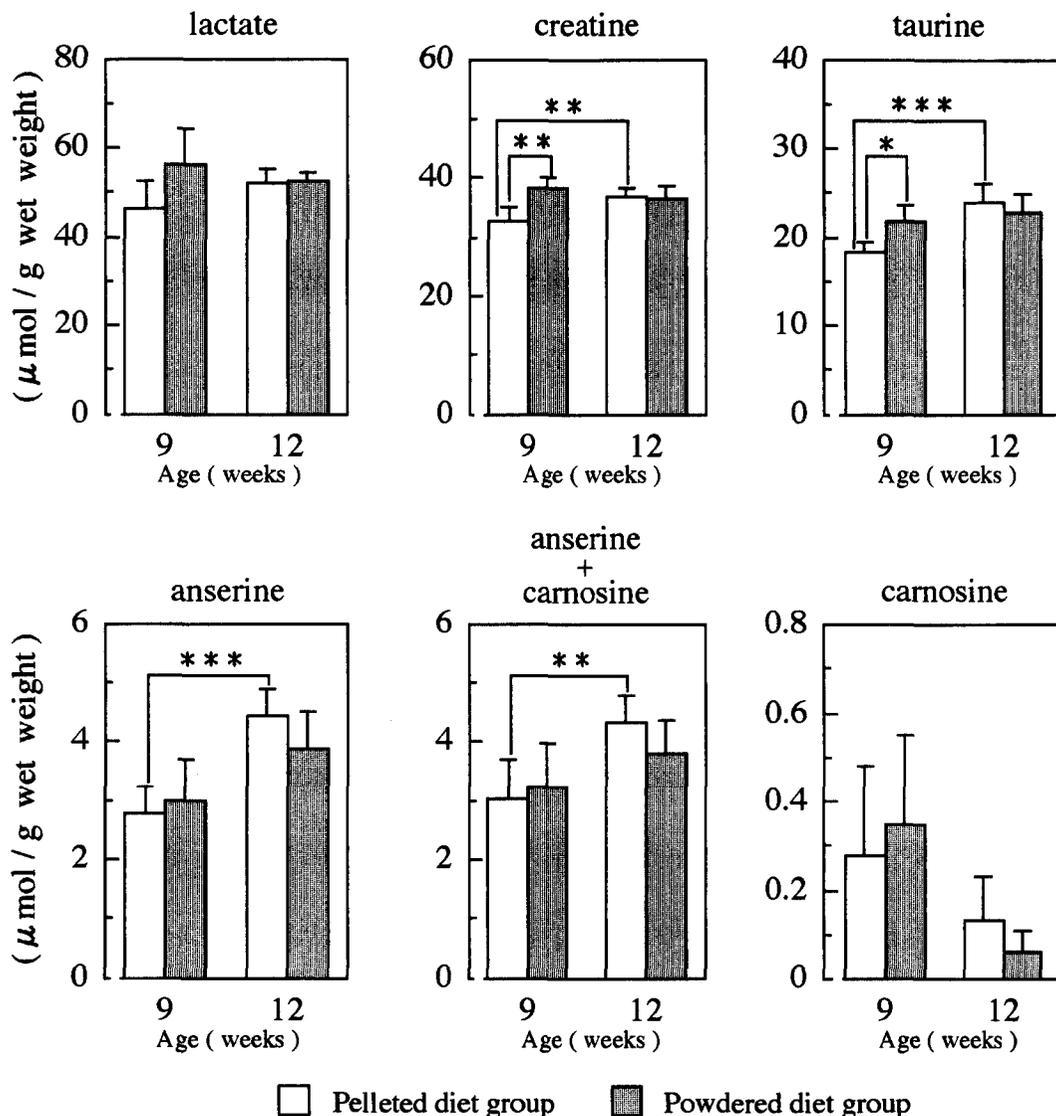


Fig. 8. A comparison of metabolite contents observed by ¹H-MRS in rat masseter muscle specimens between the pelleted diet group and powdered diet group at 9 and 12 weeks of age. There were significant differences for both creatine and taurine at 9 weeks between the two groups. There were also significant differences in the pelleted diet group for creatine, taurine, anserine, and anserine+carnosine when measured at 9 and 12 weeks. Student's t-test was used to compare the results. Result are shown as mean ± S.D.

Bracket indicates a significant difference. * : p<0.05, ** : P<0.01, *** : p<0.001

タイプ 2C 線維, 遅筋線維のタイプ 1 線維は認めず, タイプ 2A 線維および 2B 線維の速筋線維のみで構成されていた (Fig. 5)。2A 線維と 2B 線維の分布は部位的特異性が認められ, 咬筋浅層断面の上下的に中央部では大部分が 2B 線維であり, 2A 線維は下方部で下顎骨下縁に

近い内側部で多く認められた。

タイプ 2A 線維の占有率は, 9 週齢の固形群で 7.0% であるのに対し粉末群では 0.5%, 12 週齢では固形群 4.2%, 粉末群 1.0% で, 粉末群に比べ固形群で有意に高かった (Fig. 6)。

また固形群では週齢の変化にとまないタイプ

Table 1. Correlation matrix of the metabolite parameters.

9 weeks	lac	crn	tau	ans	ans+car	car
lac	1.000					
crn	-0.662	1.000				
tau	0.888***	0.673*	1.000			
ans	0.075	0.423	0.090	1.000		
ans+car	-0.420	0.456	-0.263	0.683*	1.000	
car	-0.607*	0.239	-0.375	-0.140	0.600*	1.000

12 weeks	lac	crn	tau	ans	ans+car	car
lac	1.000					
crn	0.540	1.000				
tau	0.510	0.744**	1.000			
ans	0.174	0.505	0.429	1.000		
ans+car	0.347	0.723**	0.723**	0.860***	1.000	
car	-0.105	0.189	0.303	-0.272	0.164	1.000

Statistically significant *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

lac : lactate, crn : creatine, tau : taurine, ans : anserine, car : carnosine

2 A 線維の占有率が減少し、2 B 線維の有意な増加が認められたが、粉末群では変化を認めなかった (Fig. 6)。

3. 各代謝物質の含量

測定により得られた咬筋浅層の代表的な $^1\text{H-MRS}$ のスペクトルを Fig. 7 に示した。検出されたピークのうち主なものは乳酸 (lac)、アラニン (ala)、グルタミン (glu)、クレアチン (crn)、タウリン (tau)、アンセリン (ans)、カルノシン (car) である。このうち筋の収縮と密接に関わる物質である lac, crn, tau, ans, car について検討を行った。

9 週齢では crn と tau の含量が粉末群と比べて固形群で有意に低値であったが、その他の代謝物質については有意な差は認められなかった。さらに12週齢ではいずれの代謝物質についても群間で有意な差は認められなかった (Fig. 8)。

週齢による変化では固形群においてのみ crn, tau, ans, ans+car が有意な増加を示した (Fig. 8)。

4. 固形群および粉末群における各代謝物質の関係

固形群および粉末群を問わず同じ週齢内で各種代謝物質の相関を求めたところ、9 週齢の

tau と lac との間に非常に強い有意な正の相関が認められた。また tau と crn は9週齢および12週齢とともに有意な正の相関が認められた (Table 1)。これらの筋内代謝物質が固形群と粉末群で差を生じているか否かを検討するために、多変量解析の判別分析を行い、各物質の組み合わせによる関連性の高さを調べた。lac, crn, tau, ans, car それぞれ単独の変数で評価した場合は固形群と粉末群との判別力は低いものの、crn, ans+car の組み合わせ、および crn, tau, ans, ans+car の組み合わせといった複数の変数で見た場合、9 週齢では固形群と粉末群に全例が正しく判別された (Fig. 9 a, b)。すなわち、的中率は100%であった。12週齢においては crn, ans+car の組み合わせは的中率91.7% (1例が誤判別された)、crn, tau, ans, ans+car の組み合わせは的中率83.3% (2例が誤判別された) であった (Fig. 9 c, d)。

考 察

本研究で用いた MRS は、ヒトにおいて非侵襲的に生体の代謝物質を測定できるという特徴がある。MRS の中で $^{31}\text{P-MRS}$ は骨格筋のエネルギー代謝に関する測定が可能であることから、近年スポーツ医学の分野で四肢骨格筋の機

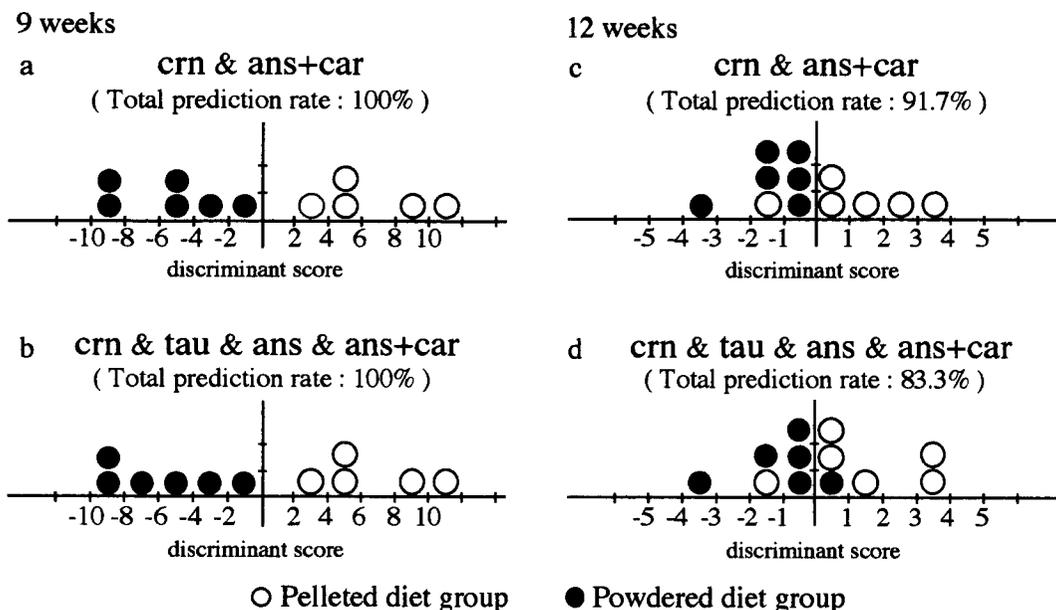


Fig. 9. From the results of discriminant factor analyses employing the contents of creatine, taurine, anserine, and carnosine, there was 100% accuracy in predicting the differences between the pelleted and powdered diet groups at 9 weeks, while At 12 weeks the prediction accuracy was 91.7% and 83.3%, respectively.

能評価に用いられている^{12,13)}。今回の測定に用いた¹H-MRSはエネルギー代謝に関わる物質のみならず、タンパク合成に関係するアミノ酸類、膜代謝に関係するコリンなどを同時に測定することが可能な手法であり、これらの各種代謝物質から新たな情報を提供できる可能性がある。しかしながら、¹H-MRSを用いた骨格筋に関する報告は少なく、咬筋に関しての報告はない。そこで本研究では飼料性状の違いによる咀嚼筋運動量の差が咬筋に及ぼす影響について、従来から多く用いられているATPase染色を用いた筋線維タイプ別占有率による評価に加え、新たに¹H-MRSを用いた代謝物質からみた評価について検討を行った。

1. 実験方法について

1) 固形飼料群と粉末飼料群の設定

従来より咀嚼筋活動を実験的に変える方法として支配神経切除や咬合挙上などを行った報告がある^{14,15,16)}。これらの方法では外科的侵襲や、人為的に構築された咬合によるストレスの影響が大きいと考えられる。そこで本研究ではこの

ような急激な環境変化を避け、できる限り自然な状態での影響を観察することが望ましいと考え、固形飼料と粉末飼料による飼育を行った。

2) 観察部位

ラットの咬筋浅層は下顎の前後運動に関与し、飼料をかじり取る際に重要な働きをすることから¹⁷⁾、飼料性状の違いが反映され易い部位と考えられる。固形飼料を摂取する際には咬筋浅層に対して持続的な負荷が加わるが、粉末飼料摂取時には前歯でのかじり取りが無いために咬筋浅層に対する負荷は減弱する。咬筋浅層を対象として軟食飼料摂取時の影響を調べた報告は多く、粉末飼料や液状飼料で飼育したラットやマウスの咬筋では固形飼料群に比べ咬筋湿重量の低下^{1,2)}や酸化酵素活性の低下^{1,5)}、タイプ2A線維の構成率や面積率の減少^{2,4)}、伸張反射時の活動電位の低下の報告などがあり⁴⁾、いずれも咬筋の発育が遅延することを示唆している^{1~6)}。このような理由から本研究においては咬筋浅層を観察部位とした。

3) 実験開始時期および実験期間の設定

実験開始時期を生後3週齢としたのは、この時期が離乳期で吸啜運動から咀嚼運動へ移行する時期であり、離乳直後の摂取する飼料性状の違いが咀嚼運動に大きく影響すること、および筋線維が完全に分化する¹⁸⁾直前から差を設けることを目的としたからである。またラットを用いて粉末飼料飼育した実験において、太田ら¹⁾は生後4週齢から粉末飼料を摂取させ、ほぼ1週間で固形群に比べ咬筋湿重量の減少、筋線維直径の低下が起こることを明らかにしている。さらに山田⁴⁾は実験開始30日目の生後およそ8週齢で下顎枝長が固形群に比べ小さくなり骨形態に差が生じ始めることを報告していることから、本研究での観察期間を咬筋および顎骨形態に差が生じ始めていると考えられる生後9週齢および12週齢とした。

2. 体重および頭尾長、咬筋湿重量

本研究において、体重および頭尾長はいずれの週齢においても固形群と粉末群の間に有意差は認められなかった。飼料については固形および粉末飼料ともに成分とカロリーは同一で、異なるのは飼料の性状であり、ラットは粉末飼料からでも固型飼料と同様に十分な栄養を摂取でき、飼料性状の違いが全身の成長発育に及ぼす影響は無かったものと考えられた。

咬筋の湿重量は固形群が粉末群より有意に大きかった。これまでの研究から軟食飼料で飼育したラットの咬筋^{1, 2)}、側頭筋^{2, 3)}重量は固形飼料群に比べて小さいことが知られており、本研究でも同様の結果が得られた。

骨格筋の重量は成長や活動量によって増加することが知られている¹⁹⁾。咀嚼運動は等尺性収縮と等張性収縮の組み合わせで行われている。固形飼料摂取時には前歯でのかじり取りが咬筋浅層の活動によって行われるが、固形群では粉末群に比べ持続的かつ長期的に負荷が加わるため、咬筋の総活動量は粉末飼料摂取時に比べ多くなる。筋肥大の程度は負荷の強さにより変化することから²⁰⁾、咬筋重量が粉末群に比べ固形群で有意に大きくなったものと考えられた。

3. 筋線維タイプ別面積の占有率

筋の生理学的特性は、構成する筋線維のタイプと関連することが知られている²¹⁾。本研究では、従来より筋線維を組織化学的に分類するときに最も多く用いられてきたATPase染色法に基づくBrookeら⁷⁾の分類を用いて筋線維のタイプ分けを行った。ATPase染色では遅筋(slow twitch: ST)線維であるタイプ1線維と速筋(fast twitch: FT)線維であるタイプ2線維に大別できる。さらに前処理液のpHを変えることでタイプ2線維はサブタイプの2Aと2B線維に分類され、前処理液のpHの程度に関係なく酵素活性が保持される未分化な2C線維として識別できる。タイプ1線維は収縮速度が遅く持続的で、酸化酵素活性が高くATPを有酸素的に合成する酸化系能力に優れる。一方、2A、2B線維は解糖系酵素活性が高く、無酸素状態でのATP合成に優れているといわれている。その中でも2A線維は2B線維に比べ酸化酵素活性が高く、疲労抵抗性もあり持久性に優れている²²⁾。これに対して2B線維は2A線維に比べて酸化酵素活性が低く、易疲労性といわれている²²⁾。

本研究の結果では9週齢、12週齢ともにタイプ1線維は認められず、タイプ2線維の2A、2B線維のみから構成されており、固形群における2Aの占有率は粉末群に比べ有意に大きかった。

筋の活動量の多少により遅筋線維と速筋線維の比率は変化しないが、速筋線維内では活動量の増大によって2B線維の占める割合が減少して2A線維の割合が増大することが知られている²³⁾。粉末飼料と比べて固形飼料の摂取では咬筋浅層の総活動量を増大させることから、このような差が生じたものと考えられる。

また週齢に伴う変化では固形群において2A線維の占有率の減少と2B線維の増加が有意な差をもって認められたが、粉末群では変化は認められなかった。酒井⁶⁾は経時的な観察から本実験で設定した時期には2A線維の減少がみられ、2B線維の占める割合が増加する時期であると考察している。したがって本研究におけ

る9週から12週での固形群のタイプ2A線維の占有率の減少と2B線維の増加は、酒井⁶⁾の報告によるところの成長変化にともなうものとも考えられる。しかしながら、この時期に成長発育による筋線維の構成に変化が生じていたとしても、9週齢および12週齢ともに固形群と粉末群の間には筋線維の占有率に有意な差が認められることから、飼料性状の違いによる咬筋の活動量の影響が生じていたものと考えられる。

4. 筋内代謝物質の含量

1) クレアチン

本研究の結果においてクレアチン (crn) 含量はタイプ2B線維の占有率の大きい粉末群で固形群より高値であった。本研究で観察された crn およびその中に含まれるクレアチンリン酸 (PCr) は、ともに筋収縮のエネルギー源である ATP の産生に関わる代謝物質である。crn はクレアチンキナーゼの平衡反応によってクレアチンリン酸 (PCr) に転換され、crn が増加すると PCr も増加する。

筋線維との関連において Sahlin ら²⁴⁾は生化学的に単一筋線維中の PCr 含量を測定し、遅筋線維より速筋線維でその含量が高いと報告している。同様に Edström ら²⁵⁾も Cr と PCr が速筋で多いことを報告している。本研究の結果では固形群および粉末群の筋線維組成はともに2Aと2B線維の速筋線維のみで構成されていたが、9週齢では粉末群に比較して2A線維の占有率が大きい固形群で crn が有意に低値であった。このことは速筋内でもその筋線維組成の違いにより crn 含量が異なることを示している。9週齢の固形群における crn 含量の低値は2B線維の割合が粉末群に比べ少なかったことが要因の一つとして考えられる。また12週齢の群間において crn 含量に差が認められなくなったのは、12週齢では固形群と粉末群で筋線維のタイプ別占有率の差が9週齢に比べ少なくなったためと考えられる。

代謝経路についてみた場合、解糖系では乳酸を生じ、その蓄積による pH の低下で解糖系自体も停止する。細胞内 pH の低下は乳酸の蓄積

に伴う [H⁺] の増加によるが、PCr は代謝過程において [H⁺] の取り込みを担い、嫌氣的解糖による細胞内 pH の緩衝作用がある²⁶⁾。したがって PCr 含量が多い程、解糖系によるエネルギー供給能力は高くなる。通常の咀嚼運動で嫌氣的解糖に至ることはないと思われるが、乳酸は有酸素状態でも産生される²⁷⁾。

本研究の結果においても、粉末群では crn が高値であり、また咬筋の構成がほとんど2B線維のみから構成されていることから、解糖系によるエネルギー供給の割合が高いことを示していると考えられる。しかしながら解糖系による ATP 合成のためには多量のグルコースが必要な上に、合成された ATP と同じ数の乳酸を産生する。また、この乳酸が疲労物質として働くという欠点もあり、解糖系では ATP の合成量は少なくエネルギー産生の効率が悪い。したがって粉末群の咬筋では固形群に比べ疲労抵抗性のある2A線維の占有率が少ないことから、運動に対する持久力は固形群に比べ劣ることが推察される。

2) アンセリンとカルノシン

アンセリン (ans: 1-メチルヒスチジン+β-アラニン) とカルノシン (car: ヒスチジン+β-アラニン) はヒスチジンを含むジペプチドで、主に脊椎動物の骨格筋に多く分布する²⁸⁾。ラットでは主に ans が多く、ヒトでは ans が認められずほとんどが car である。本研究の結果からもラット咬筋の car 含量は 0.4 μmol/g wet tissue 以下で非常に少なく ans 含量のおよそ 1/10 以下であった。ans と car は嫌氣的解糖に伴う細胞内 pH に対する緩衝作用をもち²⁹⁻³²⁾、crn、PCr と同様に遅筋より速筋に多い^{33, 34)}。ans 含量は9週齢、12週齢ともに固形群と粉末群の間に有意な差は認められなかった。Tanaka³⁵⁾はラットの四肢骨格筋において持久的トレーニングを行った場合、成長期ラットのヒラメ筋(遅筋)、長肢伸筋(速筋)の ans 増加率が抑制され、速筋である長肢伸筋よりも遅筋のヒラメ筋でその低下は顕著であったと報告している。このことから酸化系のエネルギー供給

に頼るような持久的トレーニングでは速筋内での ans 含量の差は捉えにくいことが考えられる。

しかしながら、ヒト骨格筋において速筋の多い短距離競技者で car 含量は多く、解糖系のエネルギー供給に頼るようなスプリント・トレーニングにより car が増加することが知られている³¹⁾。また乳酸の蓄積にともなう pH の低下により筋収縮機構における Ca^{2+} によるミオン ATPase の活性が抑制されるが、ans と car にはそのミオン ATPase を活性化する³⁶⁻³⁸⁾ことや筋小胞体の Ca^{2+} の放出を促進すること³⁹⁾などの作用があることも分かっており、嫌氣的解糖に伴う細胞内 pH に対する緩衝作用をもつことから ans と car は速筋内で解糖系のエネルギー供給を維持するための促進因子であると考えられている³¹⁾。すなわち、解糖系の代謝が優位に行われる速筋では、解糖系に依存するような運動で、その運動量が異なる場合に ans や car 含量は変化することが考えられる。

9 週齢から 12 週齢の変化において ans 含量は固形群、粉末群ともに増加傾向を示したが、とくに固形群で有意な増加を示した。この増加は固形群での解糖系の代謝を行うタイプ 2 B 線維占有率の増加によることが考えられる。また ans はラットのヒラメ筋(遅筋)、長肢伸筋(速筋)では成長に伴い増加することが知られており³⁴⁾、咬筋においても成長期の筋の発達にともなって増加傾向を示すと考えられる。成長にともなう変化についてはさらに観察の必要があるものと思われた。

3) タウリン

タウリン (tau) は骨格筋に多く存在し、とくにタイプ 1 線維に多く含まれることが知られている⁴⁰⁾。しかしながら速筋内においては 2 A と 2 B 線維でどちらにタウリンが多く含まれるかははっきりと分かっていない。Dunnett らは、ラクダの中臀筋では tau 含量はタイプ 1 線維に最も多く 2 A と 2 B 線維の間には差を認めず⁴¹⁾、さらにウマの中臀筋においてはタイプ 1 線維との間に正の相関 ($r=0.94$, $p<0.001$) を

認め 2 B 線維内には全く存在しなかったと報告している⁴²⁾。本研究の結果ではラット咬筋浅層にはタイプ 1 線維は認められず、タイプ 2 線維の 2 A と 2 B 線維のみから構成されていたが tau の存在が認められ、このような速筋線維内での tau 含量は 9 週齢では 2 A 線維の占有率が大きい固形群で有意に低値であった。tau はタイプ 1 線維と関連することを考えると、収縮特性がタイプ 1 線維に近い 2 A 線維の占有率が大きい固形群で高値を示すと思われたが、実際には 2 B 線維の占有率が高い粉末群で高値であった。この原因については明らかではないが、tau には抗酸化作用があり⁴³⁾、タイプ 1 線維に多く存在することから筋の酸化能力と関係するとも考えられる。しかしながら本研究において、tau は lac との間に有意な正の相関 ($p<0.001$) を認め、また crn との間にも有意な正の相関 ($p<0.05$) を認めたことから解糖系に關与している可能性が考えられる。

5. 固形群および粉末群における各代謝物質の関係

固形群と粉末群で代謝物質に差が生じているか否かを検討するために、多変量解析の判別分析を行い、各物質の組み合わせによる関連性の高さを調べた。

判別分析は 2 つ以上の群が存在するとき、何らかの測定値により群を区別したり、所属が未知の対象から得られた測定値をもとに、その対象をある群に割り当てるための分析法である。分析の結果、crn, ans+car の組み合わせ、および crn, tau, ans, ans+car の組み合わせにより高い確率で固形群と粉末群とを分けることが可能であった。このことを言い換えれば、飼料性状の違いによって生じる咬筋の運動量の違いは、咬筋の筋線維のタイプに影響を及ぼすと同時に多数の代謝物質、そして代謝経路全体に影響を及ぼしている可能性がある。crn, ans, car はタイプ 2 線維に多く解糖系に関わる物質であることから、各代謝物質の含量を測定し組み合わせることによって、筋線維の組成の違い、あるいは酸化・解糖系能力の違いをこれら

代謝物質が反映している可能性が示唆された。

結 論

1. 粉末試料を摂取したラットの咬筋においては固形群の咬筋に比較して、その湿重量の低下と速筋線維の中では疲労抵抗性のある2A線維の占有率の減少が認められた。これらのことから、咀嚼筋活動量の差が咬筋の成長発育に影響することが示唆された。
2. 固形群での週齢変化にともなう解糖系の代謝を行う2B線維の有意な増加と解糖系に関わるcrn, ans, ans+car含量の有意な増加から、これら代謝物質が筋線維組成あるいは筋の成長発育に関連がある可能性が考えられた。
3. 筋内代謝物質の違いとしては、crn, ans+carの組み合わせ、またはcrn, tau, ans, ans+carの組み合わせで固形群と粉末群を80~100%で高く判別できたことから、咀嚼筋活動量の差が多数の代謝物質、代謝経路全体に影響している可能性が示唆された。

以上のことから、多数の代謝物質を測定し、それらを組み合わせることによって、筋機能あるいは筋の病態などを把握できる可能性が考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座三浦廣行教授、ならびに終始ご指導とご助言をいただきました本学口腔解剖学第二講座名和橙黄雄教授、歯科放射線学講座坂巻公男教授、口腔生理学講座北田泰之教授に深甚なる謝意を表します。さらにMRSの測定にあたり常に御指導・御協力頂きました岩手医科大学医学部第二生理学講座久保川学教授、ならびに吉岡芳親講師に深謝致します。最後に歯科矯正学講座の諸先生方ならびに口腔解剖学第二講座の諸先生方に深謝致します。

本論文の要旨の一部は、第41回歯科基礎医学会学術大会(平成11年9月)において発表した。

本研究は日本私立学校振興・共済事業団の特別補助を受けたものである。

文 献

- 1) 太田 勲, 石井久淑, 山根美子, 猪俣孝四郎, 山口明彦: 幼若ラットの咬筋に対する粉末飼料の影響, 東日本歯誌, 17: 183-190, 1998.
- 2) 吉田礼子: 液状飼料飼育マウスの咀嚼筋線維の分化と発達に関する研究, 日矯歯誌, 54: 52-63, 1995.
- 3) 金 俊熙: 液状飼料がマウスの顎下腺の発達と老化に及ぼす影響, 日矯歯誌, 49: 73-86, 1990.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 酒井秀彰: 成長期ラットにおける各種硬度の飼料摂取による咀嚼筋の組織学的変化および下顎骨の形態計測学的変化, 日矯歯誌, 51: 126-141, 1992.
- 7) Brooke, M. H., and Kaiser, K. K.: Muscle fiber types: How many and what kind?. *Arch. Neurol.* 23: 369-379, 1970.
- 8) Folch, J., Lees, M., and Stanley, G. H. S.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509, 1957.
- 9) 吉田雄樹, 吉岡芳親: 脳腫瘍組織診断におけるProton Magnetic Resonance Spectroscopyの有用性に関する研究, 脳神経外科, 19: 421-427, 1991.
- 10) 吉岡芳親, 及川 浩, 柳澤 融, 小川 彰, 安田直毅: NMR(核磁気共鳴)スペクトロスコピーによる腫瘍組織の診断, 病態生理, 13: 797-805, 1994.
- 11) Ernest, B.C.: Clinical magnetic resonance spectroscopy. Plenum press, New York and London, pp 1-45, 1990.
- 12) 花岡秀人, 佐藤克彦, 林 光俊, 是永建雄, 向井隆文, 蜂屋順一: ³¹P-MRSを用いたバレーボール選手の骨格筋エネルギー代謝の評価に関する研究, 日磁医誌, 15: 283-289, 1995.
- 13) 桑森真介: 持久的および瞬発的に鍛錬されたヒト骨格筋の運動時エネルギー代謝-リン31磁気共鳴分光法(³¹P-MRS)による評価一, 東医大誌, 54: 370-379, 1996.
- 14) 荒木元英: 顔面神経切除がラット咬筋に与える影響, 岐歯学誌, 17: 203-222, 1990.
- 15) 盧 俊雄: ラットの下顎神経切断による顎顔面発育に及ぼす影響について, 歯科学報, 79: 2305-2365, 1979.

- 16) 峰田雅章：咬筋神経切除並びに咬合挙上が発育途上ラット咬筋に与える影響，*岐歯学誌*，17：32-73，1990.
- 17) Hiimeae, K. : The structure and function of the jaw muscles in the rat (*Rattus norvegicus* L.). *Zool. F. Linn. Soc.* 50 : 111-132, 1971.
- 18) 岡田理美，埜中征哉，石浦章一，杉田秀夫：ラット筋線維の発育・分化に関する組織化学的研究，*神経内科*，15：363-370，1981.
- 19) 山田 茂：森谷敏夫，根本 勇編集：スポーツ生理学，第6版，朝倉書店，東京，72-85ページ，1997.
- 20) Sale, D. G. : Neural adaptation to resistance training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 20 : S135, 1988.
- 21) Burke, R. E., Levine, D. N., and Zajac, F. E. : Mammalian motor units : Physiological-histochemical correlation in three types in cat *gastrocnemius*. *Science* 174:709-712,1971.
- 22) 勝田 茂，伊藤一生，的場秀樹，北浦 孝，春日規克，石原昭彦：骨格筋線維タイプの特性とそれに影響を及ぼす因子，そのI. 骨格筋の分類，*体力科学*，37：345-357，1988.
- 23) Staron, S. R., Leonardi, J. M., Karapondo, L. D., Malicky, S. E., Falkel, E. J., Hagerman, C. F., and Hikida, S. R. : Strength and skeletal muscle adaptations in heavy-resistance-trained women after detraining and retraining. *Am. J. Physiol.* 70 : 631-640, 1991.
- 24) Sahlin, K., Söderlund, K., Tonkonogi, M., and Hirakoba, K. : Phosphocreatine content in single fibers of human muscle after sustained submaximal exercise. *Am. J. Physiol.* 273 (Cell physiol 42) : C172-178, 1997.
- 25) Edström, L., Hultman, E., Sahlin, K., and Sjöholm, H. : The contents of high-energy phosphates in different fiber types in skeletal muscles from rat, guinea-pig and man. *J. physiol.* 332 : 47-58, 1982.
- 26) 岩岡研典：骨格筋，血液の緩衝能力と運動の持続，*体育の科学*，40：547-554，1990.
- 27) 八田秀雄：乳酸の産生と除去のLTとの関係，*臨床スポーツ医学*，9：745-750，1992.
- 28) Tamaki, N., Nakamura, M., Harada, M., Kimura, K., Kawano, H., and Hama, T. : Anserine and carnosine contents in muscular tissue of rat and rabbit. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 23 : 319-329, 1977.
- 29) Davey, C. L. : The effects of carnosine and anserine on glycolytic reactions in skeletal muscle. *Arch Biochem. Biophys.* 89 : 296-302, 1960.
- 30) Davey, C. L. : The significance of carnosine and anserine in strained skeletal muscle. *Arch Biochem. Biophys.* 89: 303-308, 1960.
- 31) Parkhouse, S. W., McKenzie, C. D., Hochachka, W. P., and Ovalle, K. W. : Buffering capacity of deproteinized human vastus lateralis muscle. *J. Appl. Physiol.* 58: 14-17, 1985.
- 32) Harris, C. R., Marlin, J. D., Dunnett, M., Snow, H. D., and Hultman, E. : Muscle buffering capacity and dipeptide content in the thoroughbred horse, greyhound dog and man. *Comp. Biochem. Physiol.* 97A: 249-251, 1990.
- 33) Turinsky, J., and Long, L. C. : Free amino acids in muscle : effect of muscle fiber population and denervation. *Am. J. Physiol.* 258 : E485-491, 1990.
- 34) Tanaka, M. : Effect of a training session of endurance running on anserine and carnosine contents in fast and slow muscles of young rats. *Jpn. J. Physiol.* 45 : 659-666, 1995.
- 35) Tanaka, M. : Changes in anserine and carnosine contents in slow-and fast-twitch muscles of rats during growth and effects of endurance training. *St. Marianna Med. J.* 23: 249-260, 1995.
- 36) Matsumura, Y., Mimura, T., and Sumita, S. : Physiological significance of carnosine, anserine and related compounds in muscle-contraction. *Wakayama Med. Reports.* 10: 83-92, 1965.
- 37) Avena, M. R., and Bowen, J. W. : Effects of carnosine and anserine on muscle adenosine triphosphatases. *J. Biol. Chem.* 244: 1600-1604, 1969.
- 38) Johnson, P., and Aldstadt, J. : Effects of carnosine anserine on muscle and non-muscle phosphorylases. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B : 331-333, 1984.
- 39) Batrukova, A. M., and Rubtsov, M. A. : Histidine-containing dipeptides as endogenous regulators of the activity of sarcoplasmic reticulum Ca-release channels. *Biochem. Biophys. Acta* 1324 : 142-150, 1997.
- 40) Airaksinen, E. M., Paljärvi, L., Partanen, J., Collan, Y., Laakso, R. and Pentikäinen, T. : Taurine in normal and diseased human skeletal muscle. *Acta Neurol. Scand.* 81 : 1-7, 1990.
- 41) Dunnett, M., and Harris, C. R. : Carnosine, anserine and taurine contents in individual fibers from the middle gluteal muscle of the camel. *Res. in Veterinary Sci.*, 62 : 213-216, 1997.
- 42) Dunnett, M., Harris, C. R. and Sewell A. D. : Taurine content and distribution in equine skeletal muscle. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 52 : 725-730, 1992.
- 43) Charles, E. W., Harris, H. T., and Yong, Y. L. : Taurine : biological update. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 427-453, 1986.