

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19700500

研究課題名(和文) サラブレッドの前肢および体幹における筋線維構造特性と  
トレーナビリティ研究課題名(英文) Characteristic of muscle fiber structure and trainability in forelimb  
and trunk muscle of Thoroughbred horses.

研究代表者

山野 聖子 (YAMANO SEIKO)

山口大学・総合科学実験センター・技術職員

研究者番号：00448276

研究成果の概要(和文)：本研究は、上腕頭筋(前駆)、最長筋(体幹)、中殿筋(後駆)の各部位の筋の運動に対する貢献の違いに着目し、各部位の筋のトレーニングおよび脱トレーニングの影響を、組織・生化学的手法を用いて筋線維レベルで詳細に調査することを目的として行った。各部位の筋の筋線維組成および酵素活性の特性が明らかになった。また、筋(部位)によって、トレーニングおよび脱トレーニングに対する感受性の違いがあるらしいことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate effects of training and detraining in each muscle (Triceps brachii, Longissimus, gluteus medius and Semitendinosus) using by histochemical, immunohistochemical and biochemical analysis. Muscle fiber composition of each muscle and the characteristic of enzyme activity were analyzed. It was suggested that the adaptability to training and detraining were different in each muscle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：サラブレッド、トレーニング、骨格筋線維、体幹筋

## 1. 研究開始当初の背景

ウマの骨格筋のトレーニング効果については、形態学的、組織・生化学的手法を用いて様々に評価されてきた。ウマの全身を前駆(頭部から前肢まで)、体幹、後駆(臀部を含めた後肢)の3つの部位に分けて考えた際、

走行運動中に果たす役割は、それぞれの部位で異なっている。これらの中で、後駆は「蹴り出し」の動作によって、走行時の推進力を生み出す役割を担っていることが知られている。それゆえ、後駆の筋とパフォーマンス能力には密接な関係があるとの観点から、多

くの研究者が後駆に注目して研究を行ってきた。特に Lindholm と Piehl (Acta Vet Scand 15: 287-309, 1974) が中殿筋のバイオプシー法を提唱して以来、トレーニングや発育に関する研究のほとんどが中殿筋を対象としたものになった。これまでの研究でも、発育やトレーニング、または脱トレーニングによって、中殿筋線維の面積やタイプ組成、酸化・解糖系酵素活性に変化が生じることが報告されていた (Yamano et al. Am J Vet Res 66: 401-405, 2005. McGowan et al. Equine Vet J Suppl 34: 257-263, 2002)。しかし、中殿筋以外の筋に関しては、深殿筋や外側広筋を用いた研究が数例報告されている程度で、十分には行われていなかった (Gingboom et al. Equine Vet J 34: 177-183, 2002)。走行運動の後駆の力強い蹴り出しに、中殿筋が大きく関与しているのは間違いないが、その他に大腿四頭筋や半腱様筋なども大きな役割を果たしていると推察された。これらの筋の十分な発達が、蹴り出し動作の向上や理想的な走行フォームの獲得に貢献する可能性も考えられるため、運動への関与やトレーニング効果に関する検討が必要であると考えられた。

後駆の蹴り出しに対して、走行中の前駆は、1) 走行の方向を定める「舵」の役割を果たすこと、2) 「掻き込み」の動作によって棒高跳びの棒のように体を持ち上げ、前上方に移動させる働きを持つことなどが知られている。また、全力疾走時の手前肢（最後に離地する前肢）には、約 5700N の垂直方向の力がかかるとも言われ (Kai et al. Am J Vet Res 61: 979-985, 2000)、運動中の骨折や腱損傷の発症は前肢に集中している。そのため、前肢に関する研究は、フォースプレートを用いて骨や蹄にかかる負重を測定する運動力学的研究、走行中の前肢のスイングや関節角度を分析する動作解析学的研究を中心に行われてきた。一方で、前肢の筋に着目した研究は、ほとんど行われてこなかった。蹄や骨にかかる大きな負重を支え、迅速な掻き込み動作を行うためには、浅胸筋、上腕三頭筋、橈側手根伸筋などの発達は不可欠である。運動中の負傷を減らし、理想的な走行フォームを獲得するためにも、安全かつ効果的に前駆の筋を鍛える方法を見いだすことは重要であると考えられた。

また、体幹筋は運動中の四肢あるいは頭部の動きを円滑させるために、体幹を固定する役割を担っている。特に、人間を背に乗せて走行運動を行うウマにおいて、背筋群の十分な発達は、安定した運動動作を行う上で重要である。ウマでは、運動に伴って背痛を発症するケースが多く、体幹筋の研究は、背痛の診断と経過観察に主眼を置いた筋電図記録が主に行われてきた。ウマの脊柱は柔軟性に

乏しく、ネコ科の動物のように柔軟に背を湾曲させて走行することは不可能である。それゆえ、走行中も前駆や後駆のようなダイナミックな動きは見られない。それゆえ、前駆や後駆の筋とは異なり、体幹筋ではトレーニング効果が現れにくい可能性もあると思われた。しかし、安定した走行運動を行うためには、僧帽筋や最長筋などの背部の筋、腹直筋などの腹部の筋を十分に発達させることが重要である。さらに、これらの筋の発達が、運動中の背痛の予防につながる可能性もあるため、今後の研究でデータを蓄積していく必要があると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、各部位の筋の運動に対する貢献の違いに着目し、各部位の筋トレーニング、脱トレーニングの影響を、組織・生化学的手法を用いて筋線維レベルで詳細に調査することを目的とした。これは、競走馬の効果的なトレーニング法を考え、十分なトレーニング効果を得るためには必要不可欠であると考えた。本研究で得られたデータは、負傷や故障によってトレーニングの中断を余儀なくされたウマが再起を図る際のトレーニング・プログラムに、重要な示唆を与えることができると考えた。

骨格筋には、体の部位による働きの違いや筋線維組成の違いによって、トレーニングや脱トレーニングに対する感受性の違いが存在すると推察される。体の各部位におけるトレーニング効果の違いを明らかにすることで、競走馬の最適なトレーニング方法や期間に新たな示唆を与えることが可能になると考えられた。また、負傷や故障によってトレーニングの中断を余儀なくされるウマが多く存在するにもかかわらず、脱トレーニングと再トレーニングの影響の調査はほとんど行われていない。本研究によって、最初のトレーニングから再トレーニングまでの、長期間の筋の組織・生化学的特性を初めて明らかにすることを目的とした。

また、本研究で全身の様々な筋のトレーニング性を明らかにすることにより、競走馬の最適なトレーニング方法およびトレーニング期間を見いだすことが可能になると考えられた。走行運動に重要な役割を果たしているにも関わらずトレーニング効果を得にくい筋の存在が明らかになった場合には、その筋を重点的に鍛える新しいトレーニング法を見いだすための新たな研究にもつながると考えられた。これらの研究で得られた結果は、先天的に特定の筋に弱点を持つウマや、運動器障害を発症したウマに対する特別なトレーニング（リハビリ）を考える際の基礎データともなりうる。また、トレーニングを中断したウマの休養中の管理やその後のト

レーニングに新しい考察を与えることができると考えられた。

### 3. 研究の方法

研究に使用した被験馬および実験方法は、以下に示す通りであった。

#### (1) 被験動物と被験筋

被験動物には、これまでに恒常的な走行トレーニングを行ったことのない1年齢のサラブレッド8頭、2~3年齢のサラブレッドを10頭用いた。ウマの全身を前駆（頭部から前肢まで）、体幹、後駆（臀部を含めた後肢）の3部位に分け、各部位から被験筋を選択した。前駆の筋として上腕三頭筋、体幹筋として最長筋、後駆の筋として中殿筋・半腱様筋を用いた。

#### (2) 運動トレーニング

被験馬のトレーニングおよび走行試験は、走行運動には高速トレッドミル (Mustang 2200) を用いて行った。まず、週に5日の割合で16週間の運動トレーニングを課した。トレーニング内容は、初めの4週間は600m/minの速度で1600~3200mの走行、次の4週間は600~800m/minの速度で1600~3200mの走行、その後は600~1000m/minの速度で1600~3200mの走行であった。

#### (3) 漸増負荷運動試験

トレーニング開始時と、その後約4週ごとに、トレーニングに対する全身の適応状態と、トレーニングの進行に伴う運動後の筋の回復速度の変化を調べるために、10%の傾斜を付けた高速トレッドミルを用いた漸増負荷運動試験を以下のプロトコルで行った。2分間の常歩 (1.8 m/s) と5分間の速歩 (3.6 m/s) でのウォームアップ後、走行速度を6 m/sで1分、8 m/sで1分、その後も1分ごとに1 m/sずつ増加し、疲労困憊に至って走行が不可能となった時点で試験終了とした。全身の適応状態の指標として、最大酸素摂取量と各速度段階における血中乳酸濃度を測定した。最大酸素摂取量の測定はオープンフローシステムを用いて行った。各走行速度の最後15秒間の平均酸素摂取量が、その走行速度における酸素摂取量として記録され、最大酸素摂取量は回帰直線分析により決定された。さらに、血中乳酸分析装置 (1500 SPORT) を用いて、走行中の血中乳酸濃度の変化を経時的に測定した。

#### (4) 筋サンプルの採取

筋サンプルは、ニードルバイオプシー法を用いて、前述の4つの被験筋から採取した。筋の採取時期は、トレーニング開始前と、各漸増負荷運動試験時であった。それぞれのサンプルは、運動開始前、運動終了直後、20分後、60分後、24時間後の5回にわたって採取した。

#### (5) 組織化学的分析

各運動試験前に採取されたサンプルを、トレーニングに対する長期的な適応を評価するために用いた。-20°Cのクリオスタット

(Leica, CM510) を用いて、厚さ8 $\mu$ mの連続横断切片を作成し、免疫組織化学染色、コハク酸脱水素酵素 (Succinate dehydrogenase; SDH) 染色を施した。免疫組織化学染色には、ミオシン重鎖 (Myosin heavy chain; MHC) -I (BA-D5)、-IIa (SC-71)、-IIx (BF-35) をそれぞれ識別する3種類の一次抗体

(anti-mouse IgG) を用いた。西洋ワサビの過酸化酵素 (horseradish peroxidase; HRP) ラベルの二次抗体中での処理後、Diaminobenzidine (DAB) 反応による発色を行った。染色画像は、画像処理システム

(Leica DC 100) を用いてコンピュータに取り込み、得られた染色像をもとに、筋線維をtype I, I/IIA, IIA, IIA/IIIX, IIIX線維の5種類に分類した。さらに、Zhanら (J Appl Physiol 82: 1145-1153, 1997) の手法に基づいてSDH染色を行う。顕微鏡画像の取り込み後、画像処理ソフト (NIH image) を用いて、およそ500本の筋線維のタイプ分類を行い、各筋線維タイプの本数比を計算した。また、各筋線維タイプの少なくとも50本の外形を囲み、面積 ( $\mu$ m<sup>2</sup>) とSDH活性レベル (Optical density = OD) を測定した。

#### (6) 生化学的分析

各運動試験前に採取されたサンプルを用いて、生化学的分析を行った。筋の有酸素能力の指標として、TCAサイクル中の律速酵素であるSDHの活性を、Coopersteinら (J Biol Chem 186: 129-139, 1950) の手法を基に測定した。また、筋の無酸素能力の指標として、解糖系に存在するPFK

(Phosphofructokinase) の活性を、Shonk & Boxer (Cancer Res 24: 709-724, 1964) の手法を基に測定した。

#### (7) 筋中グリコーゲン濃度の測定

各筋線維タイプの運動への動員、トレーニングの進行に伴うグリコーゲンの貯蔵量、使用割合および回復速度の変化を調べるために、各運動試験前とその後24時間以内に採取された5つの筋サンプルを用いて、運動に伴う筋中グリコーゲン濃度の変化を測定した。-20°Cのクリオスタットを用いて厚さ8 $\mu$ mの凍結連続切片を作成し、Vollestadら (Acta Physiol Scand 122: 433-441, 1984) の手法を修正して過ヨウ素酸 Schiff

(Periodic acid-Schiff; PAS) 染色を行った。染色画像は上述の画像処理システムと画像処理ソフトを用いて分析し、筋線維中のグリコーゲン含有量を、OD-PASで表現した。

#### (8) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて、筋線維中の収縮タンパクであるミオシン重鎖 (MHC) の分離同定を行った。

#### 4. 研究成果

本研究は、各部位の筋の運動に対する貢献の違いに着目し、各部位の筋トレーニング、脱トレーニングの影響を、組織・生化学的手法を用いて筋線維レベルで詳細に調査することを目的として、三年間の計画で実施した。

一年目は、各部位の筋の特性に関する基礎データを得るため、6頭のサラブレッドのオートプシーサンプルを用いて、全身の48か所の筋を組織・生化学的に分析した。その結果、前軀にはtype IおよびIIA線維が優位な筋が比較的多く見られ、後軀ではtype IIAおよびIIX線維が優位な筋が多いことが明らかになった。これらの結果は、常に全身の6割程度の体重を支持している前軀と、走行時の推進力を生み出す後軀の機能的な違いに起因していると推察された。全身の筋のトレーニングや脱トレーニングを調査していく上での、コントロールデータとして非常に重要な意味を持つと考えている。

二年目と三年目は、上腕頭筋（前軀）、最長筋（体幹）、中殿筋（後軀）の4つの筋について、それぞれの筋のトレーニング効果および脱トレーニングの影響について調査を行った。その結果、サンプルとして用いた各部位の筋の筋線維組成および酵素活性の特性が明らかになった。また、筋（部位）によって、トレーニングおよび脱トレーニングに対する感受性の違いがあることが示唆された。特筆すべきは、体幹の最長筋である。他の部位の筋が、走行運動によってグリコーゲンの含有量が大きく減少するのに対し、特にtype II線維群でのグリコーゲンの含有量がほとんど変化しなかった。また、他の筋がトレーニングや脱トレーニングによって、組織・生化学的特性が変化するのに対し、最長筋では、これらの変化がほとんど見られなかった。これらの結果は、運動中に動的な動きを見せる前軀や後軀の筋とは対照的に、体幹筋が姿勢維持という静的な動きのみにとどまっているためだと考えられる。

本研究では、全身のごく一部の筋に関してしか調査を行うことができなかったが、今後、さらに多くの筋について、また、さらに多くのトレーニングパターンについて、同様の検証をしていくことが望ましいと思われる。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等           なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山野 聖子 (YAMANO SEIKO)

山口大学・総合科学実験センター・技術

職員

研究者番号：00448276

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし