

In Vivo ^{31}P MRS によるウサギ骨格筋の疲労の研究

古賀けい子 (大塚製薬, 徳島研) 三浦 巖 (大塚製薬, 徳島研)

キーワード

in vivo ^{31}P MRS, rabbit skeletal muscle, fast-twitch fiber, fatigue, ATP depletion

序

家兎 (rabbit) と野兎 (hare) の両脚の筋肉の違いとその生活様式との関連, すなわち家兎の筋肉の色は白く短距離走には優れるが疲れやすく, 一方 野兎の筋肉の色は赤く長距離走に優れ疲れにくいことは, 古くから知られていた. 筋線維は, 速筋線維と遅筋線維とに分類される. 前者には FG 線維 (fast glycolytic) と FOG 線維 (fast oxidative glycolytic) とが含まれ 後者には SO 線維 (slow oxidative) が含まれる. これら各々の筋線維の性質, 特に 運動時, 疲労回復時における特徴は, 疲労やトレーニングを考える上で, 重要なことがらであり, これまでにも生理学的観測あるいはバイオプシーによって研究されてきた¹⁾²⁾.

近年, NMR が in vivo の研究手段として広く応用されるようになり³⁾, 久野等⁴⁾は筋線維組成と ^1H 緩和時間の相関について報告した. ^{31}P NMR は生体中のエネルギー代謝を観測する良い手段であるため筋肉に関しても多くの研究がなされてきた. しかし筋線維のタイプを明確に認識した上での ^{31}P NMR による研究はそれほど多くはない⁵⁾⁶⁾.

本論文では, 家兎の骨格筋を電気刺激により運動させ, 運動中および疲労回復時における ^{31}P NMR スペクトルの測定から得られた速筋線維特有のエネルギー代謝について述べる.

方 法

実験には家兎 (Rabbit, NZW-SLC, オス, 3-3.5 kg) を用い, 無麻酔下で実験を行なった. 大腿部の血流を妨げないように注意して家兎の全身を固定筒に固定した. 表皮を露出したのみで切開することなく, 大腿二頭筋近辺に電気刺激用の白金製電極針を約 2.5 cm 離して刺し, その間に直径 1.8 cm のサーフェスコイルをおいた.

^{31}P NMR スペクトルは, Otsuka Electronics (U.S.A.) Inc., 製 BEM250/80 を用いて, 32.7 MHz にて得た. パルス幅は 15 μs , パルスの繰り返し時間は 3 秒であった.

実験の標準プロトコールは次の通りである. コントロールスペクトルを得た後, 0.5 Hz 周期の電気刺激を 3 分間行ない, 次の 12 分間, 周期のみを 4 Hz に上げて電気刺激を続行した. その後, 電気刺激を停止した. 電気刺激中, および停止後の回復過程における ^{31}P NMR スペクトルを観測した. 電気刺激の持続時間は 20 ms, 電圧

は 17 V であった。電気刺激の周期を変えた測定の場合、最初の 0.5 Hz 周期における 3 分間の電気刺激は標準プロトコールと同様に 4 Hz での 12 分間の電気刺激のかわりに 1 Hz あるいは 2 Hz にて電気刺激した。一度電気刺激すると充分待った後でも二度目の電気刺激により得られた結果は一度目の結果とは異なった。従って再現性のある結果を得るために測定は一週間以上の間隔をおいて行なった。信号強度の基準として hexamethyltriamide phosphate を含むキャピラリーをコイル上に置いた。信号強度は面積強度を用いた。

結 果

標準プロトコール実験より得られた³¹P NMR スペクトルの例を図 1 に示す。図 1 の a はコントロールスペクトルである。無機リン酸とクレアチンリン酸との強度比は緩和時間⁷⁾の補正後 0.03±0.01 (SE) であった。図 1 の b はウォーミングアップとしておこなった 0.5 Hz 周期での 3 分間の電気刺激中のスペクトルを示す。図 1 の c, d, e, f は、4 Hz 周期での 12 分間の電気刺激中のスペクトルを 3 分ごとに時間の経過順に示している。図 1 の g から k までは、電気刺激停止後の回復過程を時間の経過順に示している。これらのスペクトルから以下の特徴が挙げられる。

① 最初の 0.5 Hz 周期による 3 分間の電気刺激中の無機リン酸とクレアチンリン酸の強度比は 0.19±0.04 (SE) であった。無機リン酸の化学シフト値から得られる細胞内 pH⁸⁾の値はコントロール時の pH の値と比べてわずかしこ低下しなかった。

② 4 Hz 周期による電気刺激開始 3 分後に

はクレアチンリン酸がほとんど消失するのみならず、ATP が大きく減少した。

③ 細胞内 pH は 4 Hz 周期による電気刺激

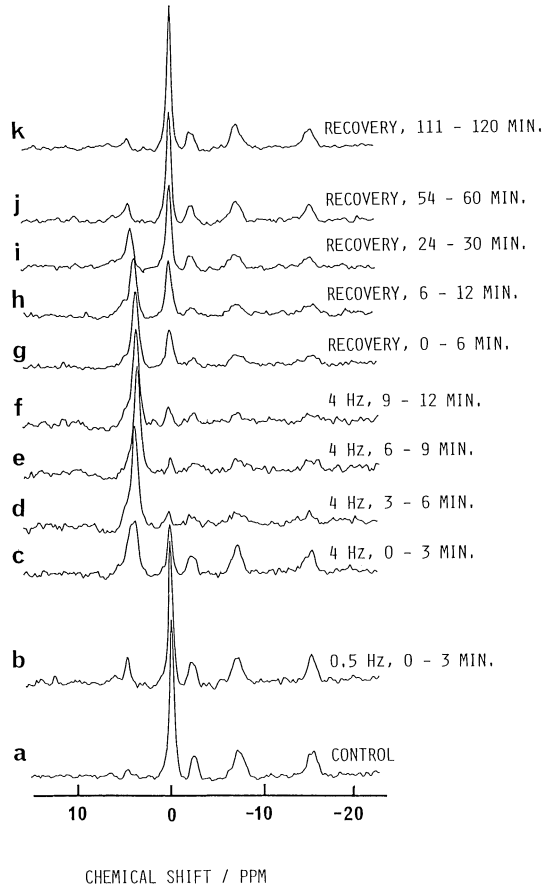


Fig. 1 ³¹P NMR spectra of rabbit skeletal muscle of standard protocol experiment.

(a): control, (b): 0-3 min. at 0.5 Hz electric stimulation, (c), (d), (e) and (f): 0-3 min., 3-6 min., 6-9 min. and 9-12 min. at 4 Hz electric stimulation, respectively. (g), (h), (i), (j) and (k): 0-6 min., 6-12 min., 24-30 min., 54-60 min. and 111-120 min. at recovery process, respectively.

の開始後急速に低下し数分後には 5.9 まで下がった。

④ 回復がきわめて遅かった。電気刺激停止後 30 分を経過しても、ATP の信号強度はあまり回復しておらず、クレアチンリン酸、無機リン酸の信号強度、および細胞内 pH もまだコントロールの状態には戻らなかった。

⑤ 電気刺激の周期を 0.5 Hz から 4 Hz に変化させた直後に、2 種類の無機リン酸のピークが現われ、低い pH に対応する無機リン酸成分が次の 3 分間に急速に増加した。この挙動は、同一プロトコルで行なった実験 5 例 (図 2) に明瞭に示されている。

図 3 において標準プロトコルで得られたクレアチンリン酸と ATP の信号強度の経時変化を示す。縦軸で示している信号強度は各々の時刻での全信号量に対するピークの相対強度であり、

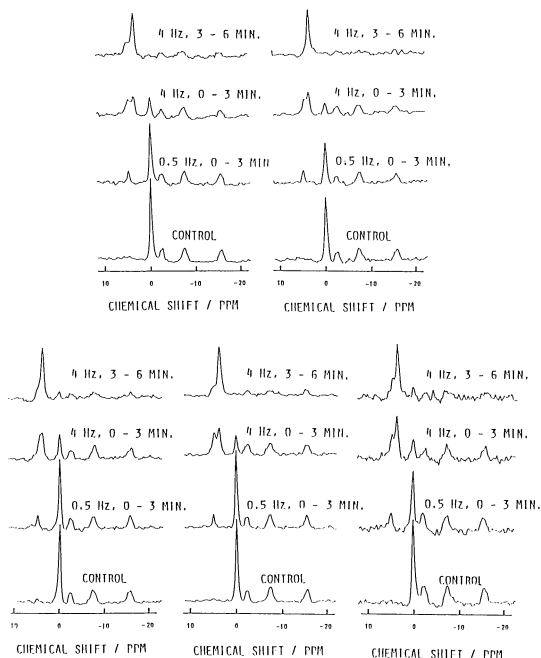


Fig. 2 ^{31}P NMR spectra of 5 runs at early stages of standard protocol experiments.

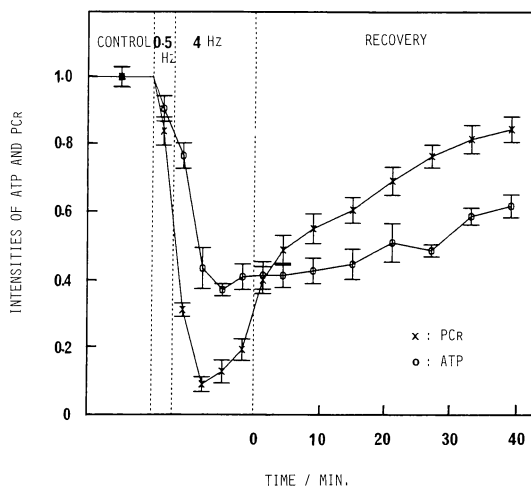


Fig. 3 Time dependence of the intensities of phosphocreatine and ATP of standard protocol experiments.

The intensities are the relative values to the total intensities at each spectrum, and normalized by those of the control values. Error bars show standard error. $n=5$

さらにコントロール時の値を 1 としたものである。破線で区切った領域は左からそれぞれコントロール、0.5 Hz 周期での 3 分間の電気刺激、4 Hz 周期での 12 分間の電気刺激の期間、および回復過程を示す。横軸の時間は電気刺激を停止した時刻を 0 として、回復過程の時間を示している。この結果をみると 4 Hz の電気刺激開始後クレアチンリン酸も ATP も速やかにかつ大きく減少している。たとえば約 5 分後クレアチンリン酸の全信号強度に対する割合はコントロール時の値の 10% 以下に ATP においては 40% 程度になった。更にここで注目すべき現象は、一定電圧、一定周期での電気刺激中に、クレアチンリン酸の回復が見られたことである。この実験とは独立して行なったストレインゲージによる収縮力の測定結果では、この時の収縮力は、徐々に低下していた。すなわちエネルギー代謝

と収縮力とは必ずしも正の相関を示さないことが観測された。電気刺激停止後、クレアチニンリン酸の信号強度の回復は、初期は速やかであり、その後緩やかになった。ATP の回復過程には、クレアチニンリン酸の場合のような速やかな初期回復は見られずその回復は遅かった。無機リン酸と糖リン酸の信号強度の和の経時変化を図 4 に示す。これは各々の時刻の全信号強度に対するそれらの信号強度の相対強度として示している。4 Hz 周期での電気刺激中はこれらの信号強度が全信号強度の 70 %程度に達することが観測された。また回復は大変遅かった。図 5 は細胞内 pH の経時変化を示す。0.5 Hz、3 分間の電気刺激では、コントロールにおける pH とほとんど変わらなかったが 4 Hz 周期での電気刺激の開始とともに pH は急速に下がった。4 Hz の電気刺激における、時刻 1.5 分での 2 点は、図 2 のスペクトルに示した 2 本の無機リン酸のピークに対応している。図 3 において、一定電圧、一

定周期で電気刺激を継続している間にクレアチニンリン酸の回復が見られたが、細胞内 pH も同様な傾向を示した。電気刺激停止後における細胞内 pH の回復も遅く、40 分後でもコントロール値に戻っていない。図 3、4、5 の結果は実験例 5 例の平均である。図 6 は電気刺激終了後 190 分まで回復過程を観測した結果 (40 分以降は 2 例であり図中のエラーバーはただ目安として示しているにすぎない) である。クレアチニンリン酸はほぼ 60 分程度で元のレベルまで回復するが、ATP の回復は大変遅く、190 分後でも完全には回復しなかった。

次に、電気刺激の周期を変えた実験の結果を図 7 に示す。図中の c は標準プロトコールの結果であり、a および b は、標準プロトコールと同様に 0.5 Hz、3 分間の電気刺激を行なった後、それぞれ 1 Hz および 2 Hz 周期の電気刺激を行なった際の 6-9 分後のスペクトルである。すなわち、運動の程度が a、b、c の順に強くなっている。いずれの場合にも、2 本の無機リン酸の

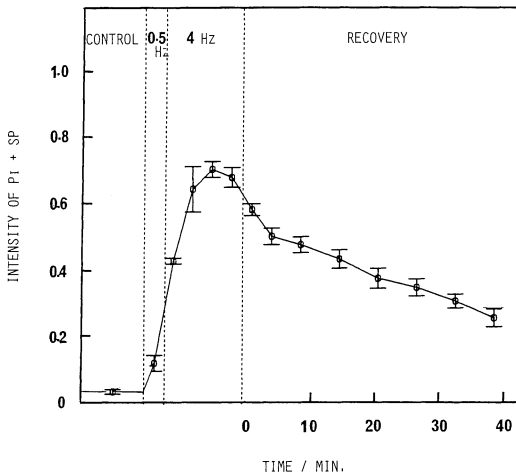


Fig. 4 Time dependence of the sum of the intensities of inorganic phosphate and sugar phosphate of standard protocol experiments. The intensities are the relative values to the total intensities at each spectrum. Error bars show standard error. n=5.

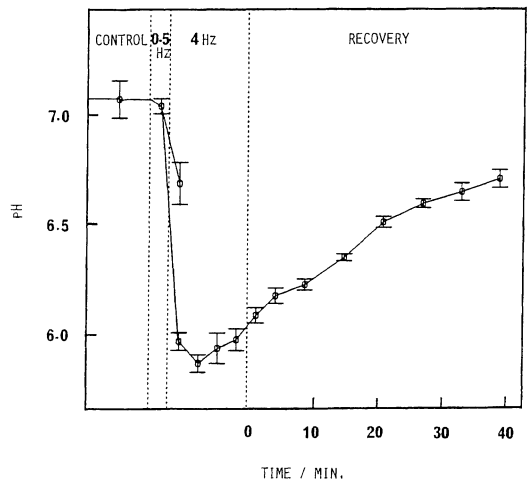


Fig. 5 Time dependence of intracellular pH of standard protocol experiments. Error bars show standard error. n=5

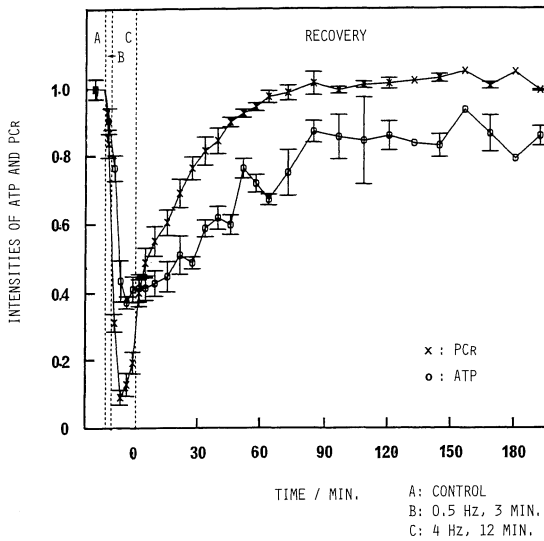


Fig. 6 Time dependence of the intensities of phosphocreatine and ATP of standard protocol experiments observed until 190 minutes of recovery.

Error bars show standard error, which have less physical meaning after 40 min. because of $n=2$.

信号の存在が認められた。しかも、高い pH に対応する無機リン酸の信号と低い pH に対応する無機リン酸の信号の強度の割合は運動の強さによって異なっていた。強い運動時には低い pH を示す無機リン酸の割合が大きく、逆に弱い運動時には高い pH を示す無機リン酸の割合が大きかった。

考 察

負荷をかけていない時の無機リン酸とクレアチンリン酸の強度比は速筋と遅筋とでは異なっており、前者においてより小さい値を示すことがネコの筋肉を用いた灌流実験の結果から報告されている⁹⁾。また Challiss 等⁹⁾は localization 法を用いてラット後肢の筋肉を *in vivo* において表層から深部へとスライスして ³¹P NMR スペクトルを測定し、FG 線維の比率の多い表層部におい

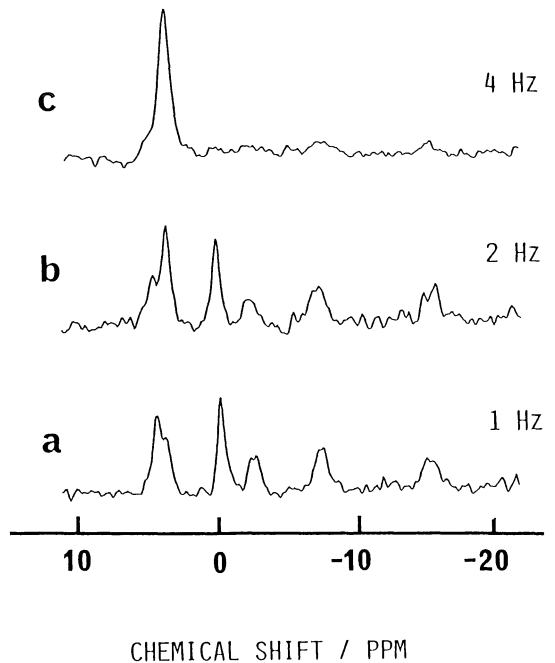


Fig. 7 ³¹P NMR spectra of rabbit skeletal muscle under electric stimulation at different frequency.

(a) : 1 Hz. (b) : 2 Hz. (c) : 4 Hz.

All these spectra were acquired during 6-9 minutes of electric stimulation at each frequency after 3 minutes of electric stimulation at 0.5 Hz.

て無機リン酸とクレアチンリン酸の比が 0.05 (彼等のデータより換算) であり FOG 線維と SO 線維の多い深層部において 0.14 であることを示した。本実験のコントロールスペクトルの無機リン酸とクレアチンリン酸の強度比が 0.03 であったことは我々が観測している部位は速筋線維の含量が高いことを示していると考えて良い。

in vivo ³¹P NMR を用いた筋肉の運動、疲労に関する研究では、運動中にはクレアチンリン酸の信号強度が減少し無機リン酸の信号強度が上昇するが、細胞内 pH の低下はそれ程小さくなく、また ATP はほとんど変化しないという結果

が多かった。また、強い運動を行うことによってヒト浅肢屈筋におけるクレアチンリン酸の信号強度の大きな減少、細胞内 pH の大きな低下を観測した Arnold 等¹⁰⁾の実験においても、クレアチンリン酸の信号強度が半分回復するのはわずか 2.1 分後であり pH は 6.23 まで低下したものが約 10 分で 6.8 以上に戻っている。本研究で得られた結果はそれらと異なり ①クレアチンリン酸が 10% 以下に減少するのみならず ATP も 40% に減少し、②細胞内 pH が大きく低下し、③運動停止後の回復が非常に遅かった。最近強い運動を行なった場合のヒトの浅指屈筋の³¹P NMR を測定した Taylor 等¹¹⁾は、筋線維を明確には区別していないが、ATP が約半分に減少し、40 分後にも回復しないグループのあることを報告している。Park 等⁵⁾はヒトの前腕筋群の³¹P NMR を測定し、ATP 量が運動によって約半分に減少すること、また、2 種類の無機リン酸のピークが観測されることを報告し、消失した ATP と低い pH 値を示す無機リン酸の信号は速筋由来であると結論づけている。

また NMR 以外の手法による研究としては Meyer 等¹²⁾が生化学的な定量法を用いて ラットの筋肉を運動させた時、速筋では ATP が 50% の減少を示したが遅筋では 10% しか減少しないことを報告している。Dobson 等¹³⁾も、生化学的な定量法を用いてサケの速筋における強い運動時のクレアチンリン酸と ATP の枯渇を報告した。我々の実験結果は速筋に対して報告されているこれらの研究結果とよく対応しており、運動時および疲労回復時における速筋線維特有のエネルギー代謝を in vivo において示したものと見える。

疲労は、細胞中の代謝物の蓄積あるいは減少により説明されるという考えが一般的であったが(たとえば Dawson 等¹⁴⁾)、本実験において電気刺激の続行により収縮力は下がるが、その時 NMR スペクトルから観測されるエネルギー代謝

はむしろ回復する傾向を示し必ずしも両者は相関していない例が示された。これは疲労が NMR によって観測されるエネルギー代謝以外の因子によっても支配されていることを示唆する。すなわち収縮できなくなったために、エネルギー消費量が減少し、スペクトルは一見回復したようなパターンを示したと考えることができる。高田等¹⁵⁾はラット骨格筋の強縮時においてもこの不一致が認められることを確認した。

運動の強さが異なる時動員される筋線維の割合が異なることは運動後バイオプシーを行ない各線維中のグリコーゲンの減少量を測定した研究から示されている²⁾。図 7 の結果は、運動の程度が弱いときには高い pH の無機リン酸信号を与える筋肉、すなわち遅筋が比較的多く使われ、強い運動を行なうときには、低い pH の無機リン酸信号を与える筋肉、すなわち速筋が多く動員されるということを示しており、筋線維の動員の違いを動物の in vivo 測定において示すことができた。

結 語

速筋線維を多く含む家兎骨格筋の運動時および疲労回復時における³¹P NMR スペクトルを観測した。その結果、運動時において ATP、クレアチンリン酸の速やかなかつ大きな減少、細胞内 pH の大きな低下が起こり、またこの状態からの回復は大変遅かった。これらは速筋線維の特徴を in vivo においてエネルギー代謝の面から捉えたものである。

収縮中の収縮力は必ずしも NMR で観測されるエネルギー代謝と正に相関しているとは限らないことが示唆された。

運動の強さに応じて速筋線維と遅筋線維との動員される割合が異なるという現象を in vivo ³¹P NMR において観測することができた。

謝 辞

有益な討論をして頂きましたペンシルベニア大学, ブリトン チャンス博士に感謝の意を表します。

本文の要旨は第12回日本磁気共鳴医学会大会において発表した。

文 献

- 1) P.D. Gollnick, R.B. Armstrong, C.W. Saubert IV, et al.: Glycogen depletion patterns in human skeletal muscle fibers during prolonged work, *Pflugers Arch.*, 344 : 1-12, 1973.
- 2) P.D. Gollnick, K. Piehl and B. Saltin : Selective glycogen depletion pattern in human muscle fibers after exercise of varying intensity and at varying pedalling rates, *J. Physiol.*, 241 : 48-57, 1974.
- 3) S.M. Cohen (Ed.) : Physiological NMR spectroscopy : From isolated cells to man, *Ann. NY. Acad. Sci.* 508 : 1-533, 1987.
- 4) S. Kuno, S. Katsuta, T. Inouye, et al. : Relationship between relaxation time determined by MRI and muscle fiber composition, *Radiology*, 169 : 567-568, 1988.
- 5) J.H. Park, R.L. Brown, C.R. Park, et al. : Functional pools of oxidative and glycolytic fibers in human muscle observed by ^{31}P magnetic resonance spectroscopy during exercise, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 8976-8980, 1987.
- 6) R.A.J. Challiss, M.J. Blackledge and G.K. Radda : Spatial heterogeneity of metabolism in skeletal muscle in vivo studied by ^{31}P -NMR spectroscopy, *Am. J. Physiol.*, 254 : C417-C422, 1988.
- 7) C. Thomsen, K.E. Jensen and O. Henriksen : In vivo determination of T1 relaxation times of ^{31}P metabolites in human skeletal muscle, Abstracts for 7th annual meeting of Society of

Magnetic Resonance in Medicine : 368, 1988.

- 8) D.G. Gadian, G.K. Radda, M.J. Dawson and D. R. Wilkie : pH measurements of cardiac and skeletal muscle using ^{31}P -NMR, in "Intracellular pH : Its measurement, regulation and utilization in cellular functions" (R. Nuccitelli and D.W. Deamer, Eds.) , Alan R. Liss, Inc., New York, 1982, p. 61-77.
- 9) R.A. Meyer, T.R. Brown and M.J. Kushmerick : Phosphorus nuclear magnetic resonance of fast- and slow-twitch muscle, *Am. J. Physiol.*, 248 : C279-C287, 1985.
- 10) D.L. Arnold, P.M. Matthews and G.K. Radda : Metabolic recovery after exercise and the assessment of mitochondrial function in vivo in human skeletal muscle by means of ^{31}P NMR, *Magn. Reson. Med.*, 1 : 307-315, 1984.
- 11) D.J. Taylor, P. Styles, P.M. Matthews, et al. : Energetics of human muscle : Exercise-induced ATP depletion, *Magn. Reson. Med.* 3 : 44-54, 1986.
- 12) R.A. Meyer and R.L. Terjung : Differences in ammonia and adenylate metabolism in contracting fast and slow muscle, *Am. J. Physiol.*, 237 : C111-C118, 1979.
- 13) G.P. Dobson, W.S. Parkhouse and P.W. Hochachka : Regulation of anaerobic ATP-generating pathways in trout fast-twitch skeletal muscle, *Am. J. Physiol.*, 253 : R186-R194, 1987.
- 14) M.J. Dawson, D.G. Gadian and D.R. Wilkie : Muscular fatigue investigated by phosphorus nuclear magnetic resonance, *Nature*, 274 : 861-866, 1978.
- 15) S. Takata, H. Takai, T. Ikata, et al. : Observation of fatigue unrelated to gross energy reserve of skeletal muscle during tetanic contraction-An application of ^{31}P -MRS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 157 : 225-231, 1988.

A Study of Fatigue in Rabbit Skeletal Muscle by In Vivo ^{31}P MRS

Keiko Koga

(Tokushima Res. Inst., Otsuka Pharmaceutical
Co., Ltd.)

Iwao Miura

(Tokushima Res. Inst., Otsuka Pharmaceutical
Co., Ltd.)

Energy metabolism during exercise and recovery process of rabbit skeletal muscle was observed by in vivo ^{31}P MRS. The small value of the ratio of the intensities between inorganic phosphate and phosphocreatine at rest indicated that the observed moiety of muscle had high fast-twitch fiber content. More than half of ATP and almost all of phosphocreatine were depleted by electric stimulation at 4Hz. The extreme intraellular pH was 5.9. The recovery from this metabolic state was very slow, and only a small amount of ATP was resynthesized after 40 minutes of recovery. These phenomena show the characteristic features of the energy metabolism in the fatigue of fast-twitch muscle.

The metabolic state as indicated by the intensity of phosphocreatine and intracellular pH during exercise was not always parallel to contraction power measured by strain-gauge.

Two inorganic phosphate peaks were observed, which are regarded as the signals from fast-twitch fiber and slow-twitch fiber from their pH values. The ratios of these two peaks were different between 1Hz, 2Hz and 4Hz electric stimulation. We conclude that we are observing the different recruitment of fiber types at different exercise level in vivo.