

## 異なる濃度の常圧低酸素暴露がラットの腹腔内脂肪量の変化と 骨格筋線維タイプ特性に及ぼす影響

蘇 青青 藤井 久雄

キーワード: 低酸素暴露 ラット 腹腔内脂肪 筋線維タイプ

Effects of normobaric hypoxia exposure of different concentrations on change of intra-abdominal fat mass and characteristic of skeletal muscle fiber type in rats.

Qingqing Su Hisao Fujii

### Abstract

Purpose: With the occurrence of obesity, the incidence of many associated diseases is gradually increased such as diabetes, hypertension and cardiac disease. From the trend of many researches which are about the correlation between hypoxia environment and obesity, we can see that hypoxia environment is good to the prevention and amelioration of obesity in general population. Therefore, targeting rats' skeletal muscle fiber types, we mainly study the following change of rats' skeletal muscle fiber type and that of the amount of intra-abdominal fat studies under exposure of hypoxic environment with different oxygen concentration but a constant pressure.

Method: 9 weeks old Wister rats are divided into 3 groups: 0m, 2200m, 2200+3500m (n=10), which were anesthetized and dissected after 6 weeks. Each group takes out rats' musculi soleus and flexor digitorum longus, and identifies skeletal muscle fiber type via ATPase stain.

Result: After exposure to constant pressure environment with different degrees of low oxygen concentration in 6 weeks, compared with normal oxygen concentration group, in 2200+3500m group the ratio of FOG fiber of rats' flexor digitorum longus has a growing trend, and their weight loss significantly with a downward tendency of the amount of fat in abdominal cavity.

Conclusion: In order to adapt to different hypoxic environment, the increase of the ratio of FOG fiber -the oxidation type of rats' flexor digitorum longus muscle fiber -may exert a positive influence on organism's fat metabolism and lipolysis. However, under hypoxic environment, the change of skeletal muscle fiber type is closely related to oxygen concentration, exposure duration, as well as food intake.

Key words : normobaric hypoxia exposure, intra-abdominal fat mass, skeletal muscle fiber type, rat

## I. 緒言

### 1. 肥満

肥満は社会問題となっている。肥満に伴う合併症としては糖尿病をはじめ、高血圧、心臓病などは肥満者に有意に合併率が高いことが指摘されている<sup>1)</sup>。

### 2. 骨格筋線維タイプの特性

骨格筋は収縮特性によって3種類に分けられる。解糖系酵素活性が高いFG線維および酸化系代謝活性が高いSO線維、FOG線維3種類に分類される<sup>2)</sup>。実際では、肥満症患者の筋では酸化的代謝能の低下と解糖的代謝能の上昇が認められているが、同時に遅筋線維の割合低下も生じている。それ故、筋線維タイプ組成の差が肥満の傾向度に影響している可能性も考えられている<sup>2)</sup>。また、筋線維の組成、毛細密度インスリン感受性則定因子と肥満との関連が指摘されている<sup>3)</sup>。それで、骨格筋特性は肥満の発症や進展に影響を及ぼすことが考えられる。

### 3. 低酸素環境と骨格筋組成

Taguchiらは、高度4000mに相当する低圧低酸素環境と水泳運動を組み合わせた、5週間実施した後に、ラットのヒラメ筋においてSO線維の減少とFOG線維の増加、および長指伸筋と足底筋にFG線維の減少とFOG線維の増加を認め、低圧環境への暴露が筋線維に特異的なタイプ移行を引き起こす可能性を示唆した<sup>4)</sup>。また、Terblancheらは高度1750m相当の低圧環境にラットを2週間暴露した後に、腓腹筋の酸化系酵素活性に有意な増加を認めている<sup>5)</sup>。SillauとBanchemoらは、標高5000mに相当する酸素濃度で45日間飼育したラットのヒラメ筋には変化なく、腓腹筋と前脛骨筋のFG線維の増加とFOG線維の増加を報告している<sup>6)</sup>。

### 4. 低酸素環境と肥満

低酸素環境下の暴露により、生体は様々

な適応を引き起こす。特に低酸素環境においては、少ない酸素を内臓、骨格筋等、末梢組織に供給する血液の酸素運搬能力、供給された酸素の末梢組織での効率的な利用が重要になる。低酸素環境下においては、高脂血症や心疾患の患者が少なく長寿が多いことが知られており、低酸素環境が健康に及ぼす効果の研究がなされている<sup>7)8)9)</sup>。特に近年、低酸素環境が肥満の予防改善に貢献する可能性が指摘されている。Florianらはヒトに高度530mに1ヶ月、2650mに1週間計42日滞在させた実験で体重が有意に減少したことを報告している<sup>10)</sup>。石原らは5週齢ラットを5週間高度4000mに相当する酸素濃度で飼育し、長指伸筋のFOG線維の割合が有意に増加し、低酸素暴露により脂質酸化能力の高い筋線維が増加したことを報告している<sup>11)</sup>。

## II. 目的

近年、低酸素環境が肥満の予防改善に貢献する可能性も指摘されてきていることで、低酸素環境による肥満の予防・改善は一般人の健康増進に有効であると考えられる。そこで、本研究では低酸素環境暴露が肥満の予防・改善にどのような影響を及ぼすかあきらかにする為に、異なる濃度別のラット腹腔内脂肪量を測定した。また、骨格筋筋線維タイプ組成率を測定し検討した。

## III. 方法

### 1. 実験動物および飼育環境

本実験では9週齢のWistar系雄性ラット(体重 $269.38 \pm 6.24$ g: n=30)を、0m群、2200m群(酸素濃度16.02%相当)、2200m+3500m群(16.02%3週間+13.59%3週間)の3群に分けた。低酸素室(Fuji動物環境制御低酸素システム)で6週間飼育した。実験期間を通じて、室温23℃、湿度50%12時間の明暗サイクル(暗期AM9:00~PM9:00、明期

PM9:00～AM9:00)で飼育した。餌摂取量では、各群とも餌摂取量と同じ食事摂取量を給餌させ、水は自由飲水とした。

## 2. 摘出筋および測定項目

ラットは6週間の飼育後、体重を測定し、麻酔下で解剖した。その後、ラット下肢ヒラメ筋(SOL)と長指伸筋(EDL)を左右共に摘出し、湿重量を測った。直ちに液体窒素素下で瞬間凍結し、後日の組織学分析まで-80℃冷凍庫に凍結保存した。また、それぞれ精巣周囲脂肪、腎周囲脂肪、腸管周囲脂肪腹腔内脂肪を摘出し、重量を測定した。

## 3. 組織学的分析

### (1) 筋切片の作成

凍結したヒラメ筋、長指伸筋は、カミソリを使い筋幅部5mm-7mm程度を切り落とした。切り出した筋幅部を試料ブロックに固定した後、直ちに液体窒素素内にブロック入れ、固定した。その後、ブロックを-20℃の冷却式マイクロームに移し、厚さ10μmの連続切片を作成した。

### (2) ATPase 染色

ATPase 染色は速筋線維と遅筋線維、あるいは速筋線維のサブグループでATPaseのPHに対する安定性が異なることを利用して筋線維を分類する染色法であった。

### (3) 筋線維組成分析

顕微鏡(Observer.D1)で撮影した画像は、画像解析ソフト(AxioVision4.8)に取り込み、SO線維、FG線維、FOG線維の筋線維数をカウントし、その筋線維数から筋線維組成割合を求めた。

## 4. 統計処理

測定値は全て平均値±標準偏差で示した。統計処理は統計解析ソフトウェアSPSS ver. 17.0 for Windowsおよび一元配置分散分析を用いて分析した。なお有意水準は5%未満とした。

## IV. 結果

### 1. 体重

図1、図2に体重を示した。各群とも実験開始時の体重に有意な差はみられなかったが、飼育終了時の体重は0m群と比較して2200m+3500m群が有意に低値を示した。

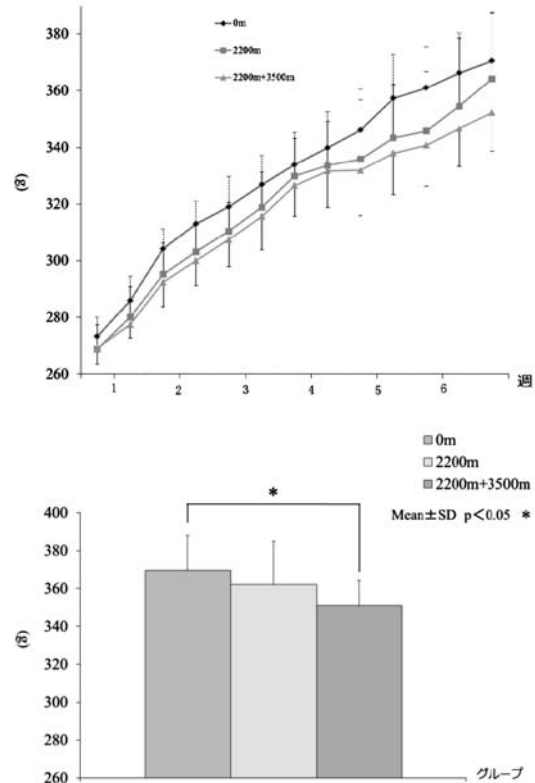


図1、図2 体重の推移および飼育終了時体重

### 2. 餌食量

図3に実験中ラットの餌食量を示した。ペアフィーディングにより有意な変化が認めなかった。

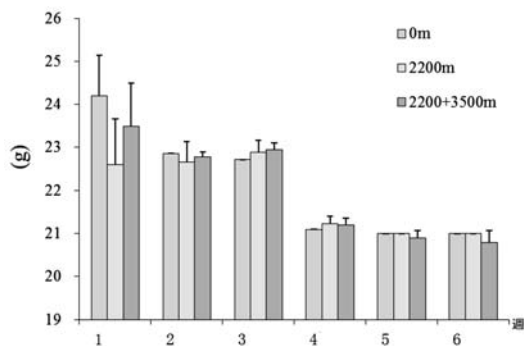


図3 実験中ラットの餌食量

### 3. 腹腔内脂肪重量

図4、図5に体重あたりの腹腔内脂肪量を示した。0m群と比較して2200m+3500m群が低値を示す傾向がみられた ( $p=0.082$ )。また、腎周囲脂肪量も低値を示す傾向がみられた ( $p=0.092$ )。

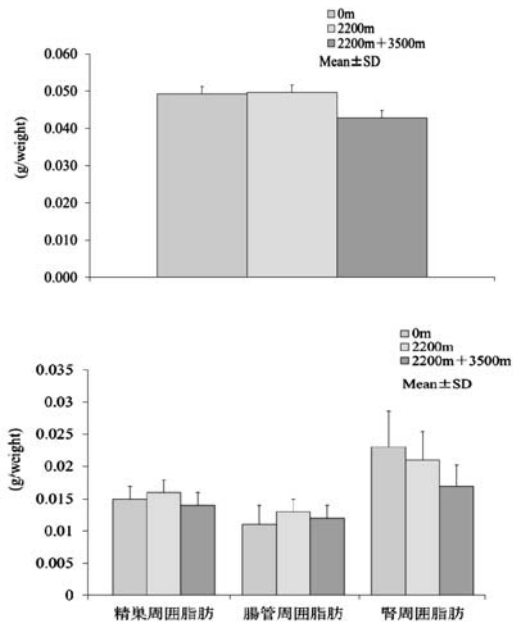


図4、図5 飼育終了時腹腔内脂肪量および飼育終了時各内臓脂肪量

### 4. 筋重量

図6にヒラメ筋、長指伸筋の筋重量、表1、表2に体重1gあたりの筋重量を示し、有意な変化はみられなかった。

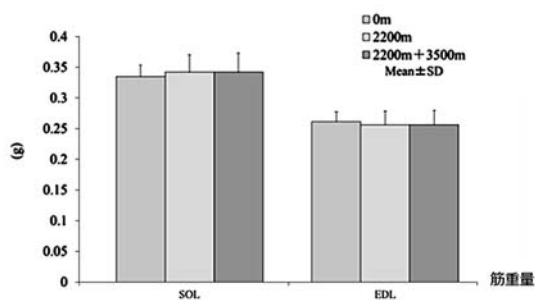


図6 飼育終了時筋重量

表1 ヒラメ筋の体重当たり筋重量

Altitude(m)	BW(g)	SOL	
		MW(g)	MW/BW(g) * 100
0	369.7±18.24	0.1377±0.01	0.0373±0.00
2200	362.3±22.72	0.1422±0.01	0.0393±0.00
2200+3500	351±14.02	0.1358±0.01	0.0386±0.00

表2 長指伸筋の体重当たり筋重量

Altitude(m)	BW(g)	EDL	
		MW(g)	MW/BW(g) * 100
0	369.7±18.24	0.2639±0.39	0.0713±0.10
2200	362.3±22.72	0.1404±0.01	0.0388±0.00
2200+3500	351±14.02	0.1363±0.01	0.0386±0.00

### 5. 筋線維組成

図7、図8、図9にヒラメ筋と長指伸筋の筋線維組成割合を示した。ヒラメ筋の筋線維組成比は有意な差はみられなかった。長指伸筋筋線維組成比に有意な差はみられなかったが、FOG線維に増加傾向がみられた ( $p=0.114$ )。

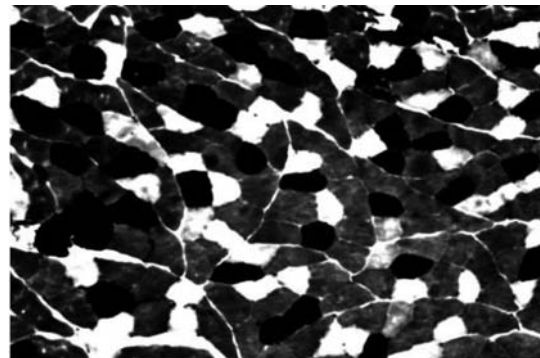


図7 2200+3500m群ラットの長指伸筋線維タイプ図

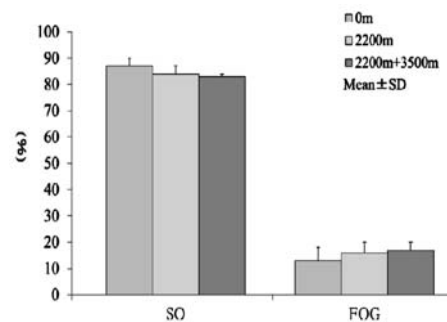


図8 ヒラメ筋筋線維組成比(%)

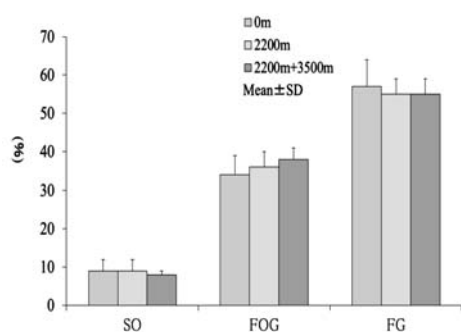


図9 長指伸筋筋線維組成比(%)

## V. 考察

### 1. 常圧低酸素暴露と体重および腹腔内脂肪量

本研究において、0mと比較して2200m + 3500m群において体重の有意な減少がみられた。また、腹腔内脂肪量が低値を示す傾向がみられた ( $p=0.082$ )、腎周囲脂肪量も低値を示す傾向がみられた ( $p=0.092$ )。ラットを用いた先行研究では、それぞれ標高2500mおよび3700mに相当する低酸素環境下に50日間暴露し、0m群と比較して低酸素暴露群の体重がそれぞれ6%および7%有意に低値を示したと報告している<sup>12)</sup>。またBigardらは標高5500mに相当する低圧低酸素環境下において4週間暴露した結果、体重が23%低値を示したことを報告している<sup>13)</sup>。本研究では、2200m群は体重の減少がみられなかった。標高が高くなるにつれて体重減少の影響が強くなることわかる。Daneshradらは標高5500mの低圧低酸素環境へ8週間暴露した実験で、餌摂取量が通常大気環境下の約65%だったと報告している<sup>14)</sup>。本実験においては、各群とも摂取量を同一にする目的でペアフィーディングを行い、餌食量は3500m群が摂取した餌食量を2200m、0m群に与えた。餌食量に有意な差がみられなかったことから、2200+3500m群において体重減少、腎周囲脂肪の減少がみられた要因として、低酸素による影響が考えられる<sup>14)</sup>。先行研究では、高所は平地に比べ安静時エネルギー消費量

が増加する結果、体脂肪分解および体重減少が促進されることを報告している<sup>15)</sup>。また、高所環境では酸素分圧の低下によるエネルギー消費量の増加により体重が減少することが報告されている<sup>6)</sup>。

### 2. 常圧低酸素暴露と骨格筋線維組成

本研究においてラット長指伸筋のFOG線維割合が高値を示す傾向がみられた。石原らは5週間の低酸素暴露で長指伸筋におけるFOG線維割合の増加を報告しており<sup>16,17)</sup>、本研究は同様の結果となった。低酸素環境では、酸素不足に対応する為、生体に様々な適応反応がみられる。血液では、低酸素環境における適応により、同様に骨格筋においても骨格筋での酸素利用を高めるため、ラットの筋肉(長指伸筋)では、酸化系代謝能力の高い筋線維であるFOG線維割合が増加した可能性が考えられる。Ishiharaたち<sup>6)</sup>は、低圧低酸素へ暴露することにより、筋線維の酸化系酵素活性の増加と酸化能力の高い筋線維の割合の増加を報告している。Tagutiらは、低圧低酸素暴露により、酸化能力の高い筋線維割合の増加とともに酸化系酵素活性の増大を報告している<sup>17)</sup>。また、標高2000、3000m、4000mに相当する低圧環境下で1日30分の水泳トレーニングを5週間実施し、2000m群でヒラメ筋のSDH活性の有意な増加を報告している<sup>18)</sup>。本研究では酸化系酵素活性を測定していないが、2200m + 3500m群の体重、腹腔内脂肪量の減少の要因として、酸化能力の高いFOG線維の増加による、脂質代謝の亢進が一要因である可能性が考えられる。また、FOG線維はFG線維と比較してインスリン感受性が高いことが報告されておる<sup>3,19)</sup>。伊藤らは5週齢の若齢ラットを低酸素環境(高度4000m相当)に7週間暴露させた実験で成長に伴う、ヒラメ筋のFOG線維からSO線維への移行が抑制されることを報告している<sup>20,21)</sup>。

### 3. 常圧低酸素暴露と筋重量

骨格筋重量はタンパク質の合成と分解のバランスによって制御されている。本研究で用いた常圧低酸素濃度では、筋重量および体重当たりの筋重量に有意な差はみられなかったことから、低酸素環境では、筋重量の減少が生じる<sup>19)</sup>。2200m+3500m群では、2200mに3週間暴露させることで、生体が低酸素環境に適応し、3500mに移行した後の低酸素の負担を軽減し、筋重量の減少を抑制する可能性がある。急に3500mの様な低酸素環境に暴露されるよりも徐々に酸素濃度を下げることで高所障害を防ぐ効果があると考えられる。

### VI. 結論

本研究では筋肉に着目して、6週間の異なる常圧低酸素暴露により2200m+3500m群で筋組織の低酸素環境下の適応現象である長指伸筋のFOG繊維が増加する傾向を示した。また、体重、内臓脂肪が減少傾向も示したことは異なる酸素濃度の要因による酸化系代謝能力の高い筋線維割合が増加で体脂肪が分解されたと推測されている。さらに、異なる低酸素濃度、滞在期間、餌食量など要因により常圧低酸素暴露の影響が異なることが分かった。

### VII. 参考文献

- 1) 日本肥満学会(1997)肥満症 診断・治療・指導の手引. 医歯薬出版, pp.10.
- 2) 山田 茂, 福永哲(2001)運動による機能と形態の変化(第3版). ナップ, pp.70.
- 3) Krotkiewski M (1994) Role of muscle morphology in the development of insulin resistance and metabolic syndrome. *PresseMed*, 23, pp.1393-1399.
- 4) Taguti, s. Hata, Y. and Itoh, K (1985) Enzymatic responses and adaptation to swimming training and hypobaric hypoxia in postnatalrats. *jpn. j. physiol*, 35, pp.1023-1032.
- 5) Terblance, S. E, Groenewald, j. etal (1984) A comparative study on the effect of training at altitude and at sea level on endurance and certain biochemical variables. *Comp. Biochem. Physiol*, 78, pp.21-26.
- 6) Sillau, A. H. and Banchemo, N (1977) Effects of hypoxia on capillary density and fiber composition in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*, 370, pp.227-232.
- 7) 寺尾 保, 木村季由, 湯浅康弘ほか(1997) 低圧環境下における持久的トレーニングがスポーツ選手の形態, 身体組成および脂質代謝に及ぼす効果. *体力科学*, 46(6), 916.
- 8) 寺尾 保, 木村季由, 湯浅康弘ほか(1999) 肥満者およびスポーツ選手の減量に対する低圧環境下における歩行運動の有効性 (1999) *東海大学スポーツ医科学雑誌*, 11, pp.22-29.
- 9) 寺尾 保, 桑原一郎, 宮川千秋ほか(2003) 肥満者の減量に対する低圧環境下および常圧環境下における歩行運動の有効性 *東海大学スポーツ医科学雑誌*, 15, pp.32-38.
- 10) Florian j Lippl, Sonja Neubauer, Susanne Schipfer (2010) Hypobaric hypoxia causes body weight reduction in obese subjects. *Obesity*, 18(4), pp.675-681.
- 11) Akihiko Ishiha, Kazuo Itoh, et al (2000) Effect of hypoxia on ratsoleus muscle fibers and their Innervatingmotoneurons. *Japanese journal of physiology*, 50, pp.561-568.
- 12) Perhonen, M., T. E. Takala, and V. Kovanen (1996) Effects of prolonged exposure to and physical training in hypobaric conditions on skeletal muscle morphology and etabolic enzymes in

- rats. *Physiological Reports*, 432, pp.50-58.
- 13) Bigard, A. X., H. Sanchez., O. Birot, and B. Serrurier (2000) Myosin heavy chain composition of skeletal muscles in young rats growing under hypobaric hypoxia conditions *J. Appl. Physiol.* 88, pp.479-486.
- 14) Daneshmandi, Z., V. Novel-Chatae., O. Birot., B. Serrurier., H. Sanchez., A. X. Bigard. and A. Rossi (2001) Diet restriction plays an important role in the alterations of heart mitochondrial function following exposure of young rats to chronic hypoxia *Arch. Physiol. Biochem.* 442, pp.12-18.
- 15) 高桜英補ほか (1997) : 高所環境における肥満治療の研究 - 安静時エネルギー消費量の増大を利用して - 登山医学 17 ; 97-102.
- 16) Itou M, Itoh K, and Ishihara (1992) Effect of hypobaric hypoxia on fiber type composition of the soleus muscle in the developing rat. *Aviat Space Environ Med* 63, pp.583-587.
- 17) Taguchi, S., Hata, Y, and Itoh, K (1985) Enzymatic responses and adaptations to swimming training and hypobaric hypoxia in postnatal rats. *Jpn. J. Physiol.*, 35, pp.1023-1032.
- 18) Taguchi, S., Hata, Y, and Itoh, K (1988) Biochemical adaptation and trainability in swimming in rats at various high altitude levels. *High-Altitude Medical Science*, pp.214-220.
- 19) 大澤拓也 (2012) 低酸素環境下の運動と筋内脂質代謝) 体育の科学 VOL.62 NO. 11.
- 20) Itou M, Itoh K, Taguchi S et al (1992) Effect of hypobaric hypoxia on fiber type composition of the soleus muscle in the developing rat. *Aviat Space Environ Med* 63, pp.583-587.
- 21) Ward, M. P., J. S. Milledge, and J. B. West.: *Hematology: High altitude medicine and physiology* 3rd edition. Arnold publisher. London. (2000) 97-106.

