



Title	持久的トレーニングが糖尿病モデルラットの骨格筋毛細血管網に及ぼす影響
Author(s)	鈴木, 淳一
Citation	冬季スポーツ研究, 7(1): 1-7
Issue Date	2004-10
URL	http://s-ir.sap.hokkyodai.ac.jp/dspace/handle/123456789/6776
Rights	

持久的トレーニングが糖尿病モデルラットの骨格筋毛細血管網に及ぼす影響

鈴木 淳一

北海道教育大学冬季スポーツ教育研究センター

Effects of endurance training on skeletal muscle capillarity in IDDM model rats

Research and Education Center for Winter Sports, Hokkaido University of Education, 5-3 Ainosato, Kita-ku, Sapporo, Hokkido 002-8502, Japan

Abstract

The effects of endurance exercise training on microvascular angioadaptation were studied in soleus muscle of streptozotocin-diabetic rats. The SD rats were randomly divided into sedentary control, training, diabetes and diabetes with training. Exercise training by running lasted for 5 weeks at 27 m/min for training group or 19.4 m/min for diabetes, 60 min/day, on a 10% gradient. Training alone significantly increased the capillary-to-fiber (C:F) ratio and the density of arteriolar capillaries, while it decreased significantly that of venular capillaries. The density of arteriolar capillaries increased and that of venular capillaries decrease in diabetic rats with and without training. The C:F ratio significantly decreased by 14% in diabetic rats, whereas, after training, it showed values similar to those of normal sedentary rats. Fiber cross-sectional area was significantly lower in both diabetic groups with and without training than in sedentary control. These results suggest that endurance training improves muscle capillarity, identified as an increase in the number of arteriolar capillaries, in streptozotocin-diabetic rats. These changes may contribute to effective oxygen supply and glucose uptake in muscle cells.

Key words: angioadaptation; capillary; diabetes; skeletal muscle; streptozotocin

緒言

糖尿病は生活習慣病の一つであり、我々の身近に存在している病態である。糖尿病は成因論的見地に基づき 2 種類に分類できる。膵臓 B 細胞の機能異常により、生命維持にインスリン治療が必須なものをインスリン依存型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus; IDDM) または 1 型糖尿病、肥満等の要因から糖代謝に異常が生じるが、治療上必ずしもインスリン投与を必要としないものをインスリン非依存性糖尿病 (non-insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM) または 2 型糖尿病と呼んでいる[18]。両者とも血糖値が常に正常範囲内にコントロールされていることが日常生活上重要である。そのためには糖尿病の三大治療といわれる食事療法、薬物療法、運動療法を適切に行う必要がある。中でも運動療法は運動能力と心肺機能を改

善させる他、糖尿病患者では基本的に血糖値の降下に作用し、NIDDM では、肥満と関連した動脈硬化症等の発症・進行を防止するとともに、その病因となるインスリン抵抗性を改善させ、減量を目的として食事療法と併用するとさらに効果的である[18]。IDDM 患者でも肥満者や NIDDM 患者と同様に有酸素運動の継続によりインスリン必要量の低下など、インスリン抵抗性が改善されることや血清脂質の低下などの効果が認められている[19,24]。

インスリン抵抗性の改善は、骨格筋毛細血管密度との間に強い相関関係があると報告されており[11]、さらにインスリン刺激による組織へのグルコース取り込み作用は毛細血管の血流量に依存していることが明らかになっている[11]。従って、持久的トレーニングによる骨格筋毛細血管密度の増加や運動時の血流量増加は、

インスリン抵抗性を改善させ、糖尿病の症状の改善に貢献している[19,20]。Lash ら[12]は、NIDDM モデルラットである肥満 Zucker ラット(OZR)に 60 分間の走運動を 6~12 週間負荷した。その結果、骨格筋毛細血管数が少ない傾向にある OZR において、トレーニング後に毛細血管の新生が促進され、骨格筋組織への酸素拡散能力が向上する可能性が示唆された。また、IDDM 患者に 45 分間の走運動を 8 週間行った研究では、トレーニング後、最大酸素摂取量や骨格筋酸化酵素活性は有意に増加したが、毛細血管網には変化がみられなかったと報告している[25]。

持久的トレーニングによって骨格筋毛細血管数が増加することはこれまで多く報告されている[5-7,17]。著者らの研究では[21,23]、持久的トレーニング後に細動脈側毛細血管が顕著に増加することを報告している。細動脈側毛細血管の増加は骨格筋への酸素供給にとって有利な適応と考えられる。このような適応性変化は、糖尿病患者においても骨格筋への酸素供給やグルコース供給の立場から、病態改善に貢献するものと思われる。しかし、そのような研究はこれまで報告されていない。

そこで本研究は、糖尿病の中で、毛細血管網に関する報告の少ない IDDM モデルラットを用い、持久的トレーニング後に骨格筋毛細血管網、特に細動脈側、細静脈側毛細血管の分布がどのように変化するかを明らかにすることを目的とした。

実験方法

1. 実験動物

実験には 4 週齢の Splague-Dawley (SD) ラットを用いた。2 週間飼育室の環境に慣らした後、6 週齢時に安静対照群(Cnt)、トレーニング群(Tr)、糖尿病群(DB)及び糖尿病トレーニング群(DBTr)の 4 グループに任意に分けた。DB 及び DBTr 群のラットには、6 週齢時にストレプトゾトシン(80 mg/Kg)を腹腔内に注射した。3 週間後に尿試験紙(ウリエース-Ga、テルモ)を用いて尿糖測定を行い、2000 mg/100mL 以上であることを確認した。全てのラットは室温 24±1°C、12 時間の明暗周期の環境下で飼育し、

1°C、12 時間の明暗周期の環境下で飼育し、飼料(CE-2、日本クレア)と水道水を自由摂取させた。

2. 持久的トレーニング

トレーニング群のラットには、ラット用トレッドミル(KN-73、夏目製作所)による持久的走運動を負荷した。トレーニングは 9 週齢から 13 週齢まで週 5 日の頻度で行った。第 1 週目は、Tr 群、DBTr 群共に 19.4m/min、30 分、勾配 0%の条件で開始し、1 週目の最終日まで時間を 60 分、勾配を 10%まで漸増した。第 2 週目からは Tr 群、DBTr 群で異なった運動負荷を用いた。Tr 群は 27m/min、60 分、勾配 10%、DBTr 群は 19.4m/min、60 分、勾配 10%とし、トレーニング最終日までこの条件を維持した。

3. 筋標本

最終トレーニングの 24 時間後にネブタール麻酔下(50 mg/Kg)のラットからヒラメ筋及び心筋を摘出し、湿重量を秤量した。ヒラメ筋は足関節と膝関節を最大に伸展した際の長さに固定した状態で、OCT コンパウンドで包埋後、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速冷凍した。組織化学的分析を行うまで-80°Cで冷凍保存した。本研究で用いた運動強度では、遅筋型筋線維である SO 線維(slow-twitch oxidative)と遅筋と速筋の中間型である FOG 線維(fast-twitch oxidative glycolytic)が主に利用されると考えられる[1]。よって本研究では、SO 線維が 87%、残り 13%が FOG 線維で構成されているヒラメ筋を分析の対象とした。

4. 毛細血管の二重染色

-20°Cに冷却したミクロトーム(Leica)を用いて、ヒラメ筋の筋腹部位から厚さ 10µm の横断切片を作成し、毛細血管の二重染色を行った[4,9,10,13]。切片をクロロフォルム・アセトン(1:1)で前固定後、DPPIV 染色、AP 染色の順で行い、4%(v/v)フォルマリンで後固定し、水溶性の封入剤(Crystal mount, Biomed)で封入した。DPPIV 染色は、1 mM glycyl-L-proline-4-methoxy-beta-naphthylamine、3 mM fast blue salt B、5% (v/v) N, N-dimethylformamide を含む 0.1M acetate buffer (pH 7.4)で 18 時間、4°Cで染色を行った。AP 染色は、2.5 mM naphthol AS-MX phosphate、7 mM variamine blue salt RT、5% (v/v)

variamine blue salt RT, 5% (v/v) N, N-dimethylformamide を含む 0.1M Tris-HCl buffer (pH 9.2)で 60 分間、38°Cで染色を行った。この二重染色で DPPIV を持つ細静脈側の血管内皮細胞は赤く染まり、AP を持つ細動脈側の血管内皮細胞は青く染まる。また、これらの移行部位は両者の酵素を合わせ持つことから中間の紫色に染色され、これを中間毛細血管と定義した。

5.毛細血管分布と筋線維断面積の形態測定

1 サンプル当たり 4 箇所の顕微鏡視野を任意に選択し、毛細血管の分布と筋線維断面積の測定を行った。光学顕微鏡(BX-50、Olympus)に接続した CCD カメラを介して顕微鏡画像をパーソナルコンピュータに取り込んだ。毛細血管は呈色に基づいて細動脈側(青)、細静脈側(赤)、及び中間(紫)に分類し、各毛細血管および全毛細血管の毛細血管密度(capillary density; CD)、毛細血管数/筋線維数(capillary-to-fiber ratio; C:F 比)を算出した。筋線維断面積は NIH image プログラムを用いて計測した。

6.統計処理

全てのデータは平均値±標準誤差で示した。

各群のデータはまず、Kormogorov-Smirnov 検定によって正規性の検定を行い、全て正規分布していることを確認した。有意差検定は二元配置分散分析を行い、有意差がみられた場合には一元配置分散分析及び Fisher の post-hoc テストを行い、4 群間の比較を行った。検定結果は危険率 5%未満を有意水準とした。

実験結果

トレーニング期間中の体重は Cnt, Tr, DBTr 群では漸増したが、DB 群では変化がみられなかった。実験終了時の体重は Cnt>Tr>DBTr>DB の順であった。ヒラメ筋の重量は Cnt 群よりも DB 群で約 60%、DBTr 群で約 35%有意に低い値を示した。

各グループの毛細血管密度を図 1 に示した。細動脈側毛細血管の密度は Cnt 群に対し、他の 3 群で有意に高い値を示した (P<0.05)。一方、細静脈側毛細血管の密度は Cnt 群に対し、他の 3 群で有意に低い値を示した (p<0.05)。しかし、全毛細血管密度及び中間毛細血管密度には有意な差がみられなかった。

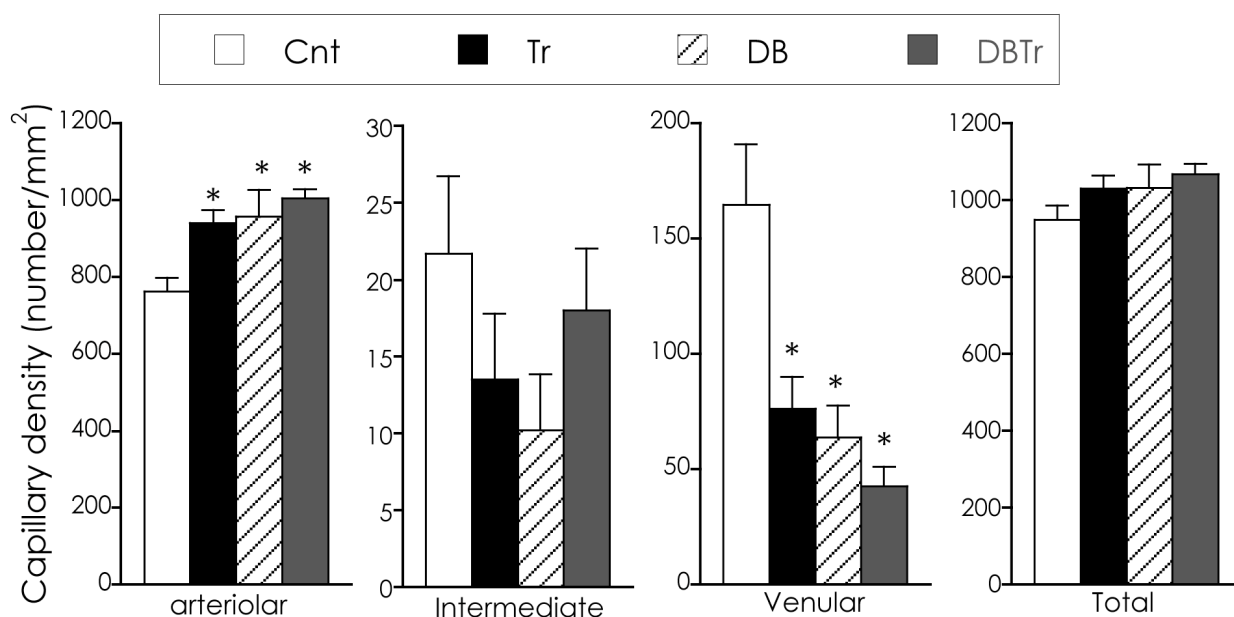


Figure 1 The density of arteriolar, intermediate, venular and total capillaries in the soleus muscle. *, significantly different from the Cnt group at p<0.05.

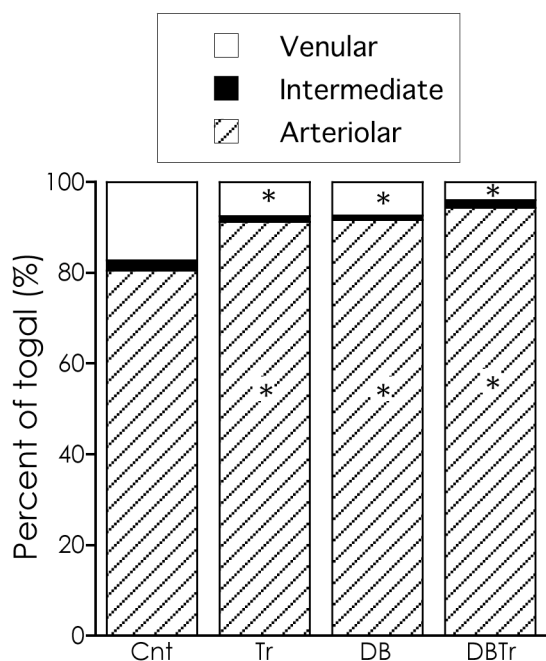


Figure 2 The proportion of arteriolar, intermediate and venular capillaries to the total capillaries in the soleus muscle. *, significantly different from the Cnt at $P < 0.05$.

全毛細血管数に占める各毛細血管数の割合を図2に示した。Tr、DB、DBTrの3群において細動脈側毛細血管の割合が Cnt よりも有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。逆に、細静脈側毛細血管の割合は、Cnt 群と比べ他の3群で有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。

図3に capillary-to-fiber ratio (C:F) の値を示した。Tr 群の C:F 比は Cnt 群よりも有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。DB 群の値は Cnt 群よりも有意に低いが、トレーニングによって約10%増加し、DBTr 群と Cnt 群との間に有意差は認められなかった。

筋線維断面積は、トレーニングによる変化はみられず、糖尿病によって有意に縮小した。Cnt 群と比較して DB 群で27%、DBTr 群で21%有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。

考察

本研究では、膵臓 B 細胞を破壊され自ら

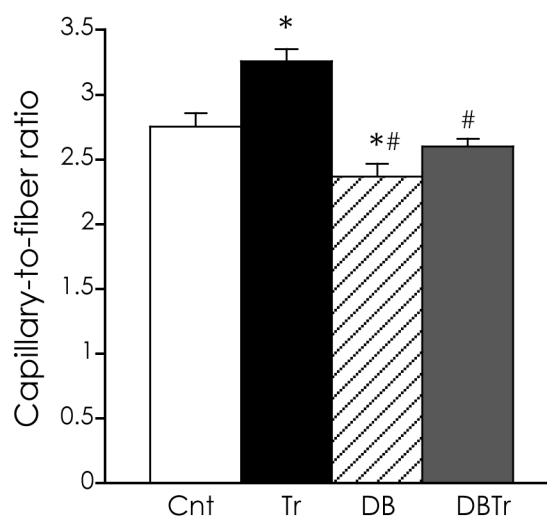


Figure 3 The capillary-to-fiber ratio in the soleus muscle. * and #, significantly different from the Cnt and Tr, respectively, at $p < 0.05$.

インスリンを生成できない IDDM モデルラットを対象とし、持久的トレーニングが骨格筋毛細血管網にどのような影響を与えるかを観察した。

主な結果に関して言及する前に、一般的な IDDM の病態やインスリン欠乏による骨格筋組織の変化について述べておく必要がある。IDDM の場合、血糖コントロール不良時やインスリン作用が欠如した状態では、運動が高血糖やケトosisを助長し、さらに血糖値コントロールを悪化させる。すなわち、運動により上昇したインスリン拮抗ホルモンの作用が増強され、脂肪組織から遊離脂肪酸の動員、肝臓でのグルコース放出を促し、さらには過剰の遊離脂肪酸による肝臓での β 酸化の亢進、クエン酸回路の抑制が生じ、ケトン体合成へと導かれる。このようにインスリン欠乏状態では、運動実施がかえって身体に悪影響を及ぼすという報告がある[24]。このため、ヒトの IDDM 患者に対して運動療法を実施する際には、その運動強度や種類に応じたインスリン投与や食事療法により、運動中や運動後の血糖コントロール不足が起こらないように注意することが必要となる。

糖尿病が骨格筋毛細血管網に及ぼす影響

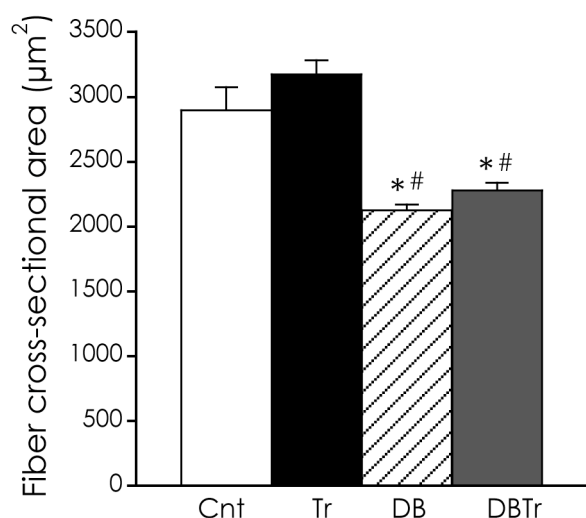


Figure 4 The mean fiber cross-sectional area in the soleus muscle. * and #, significantly different from the Cnt and Tr, respectively, at $p < 0.05$.

本研究では、IDDM ラットのヒラメ筋において、細動脈側毛細血管が有意に増加したが、細静脈側毛細血管が減少し（図 1）、C:F 比も有意に低下していた（図 3）。このことは、IDDM への病変によって骨格筋の毛細血管数は減少するが、既存毛細血管の細動脈化は促進されたことを示している。本研究の DB 群では筋重量及び筋線維断面積が有意に減少していることから（図 4）、骨格筋の萎縮に伴って毛細血管数も減少したと考えられる。このような変化は、血流阻害[8]や除神経[2,3]による筋萎縮モデルにおいても報告されている。これまで持久的トレーニング後[21,23]や寒冷順化後[22]に細動脈側毛細血管の増加が報告されている。このような適応性変化は、主に細静脈側から生じた新しい毛細血管が細動脈や細動脈側毛細血管と連結することによって起こり、またこの時、終末細動脈が既存の毛細血管に沿って延長する「毛細血管の細動脈化 (arterialization of capillary)」[15,16]が起こることによってその変化が助長されるものと考えられている。しかし、IDDM モデルにおいて毛細血管の細動脈化が促進されるメカニズムに関しては今後の研究が必要である。骨格筋が萎縮し、毛細血管が減少していく過程で、

細動脈側毛細血管が増加することは、骨格筋組織へ酸素やエネルギー基質の供給を維持するための適応性変化と考えることができる。

IDDM ラットの筋線維断面積が縮小したことは、おそらく骨格筋組織の主構成物質であるタンパク質が、インスリン作用不足による糖の取り込み減少同様、骨格筋組織に取り込まれることが困難になり、形態的な維持ができなくなったことが主因と考えられる。しかし、筋線維の縮小は結果的に毛細血管密度の増加を引き起こし、酸素拡散距離が短縮したことから、酸素供給には有益な変化であると考えられる。しかしながら、骨格筋の有酸素代謝能力の向上には酸素の供給だけではなく、筋組織での酸素利用能力、つまりミトコンドリアの酸化能の向上も必要である。今後は、骨格筋組織の酸素利用能の立場からも検討する必要があると考える。

持久的トレーニングが骨格筋毛細血管網に及ぼす影響

持久的トレーニングを行うと、活動筋の酸素需要増大に適応するため毛細血管網、特に細動脈側毛細血管が増加し、酸素供給を有利にすることが報告されている[21,23]。本研究においても、正常ラットに持久的トレーニングを负荷した結果、ヒラメ筋の毛細血管新生が促進され（図 3）、さらに細動脈側毛細血管が顕著に増加した（図 1、2）。毛細血管の細動脈側は酸素分圧が高いため、細動脈側毛細血管の増加は、筋組織への酸素需要増加に見合った変化と考えられる。前述のように、細動脈側毛細血管の増加は、血管拡張時に生じる壁張力の増加によって促進される[15,16]「毛細血管の細動脈化」によって引き起こされると考えられる。

一方、IDDM ラットにトレーニングを行った結果、毛細血管新生は促進されなかったが（図 3）、細動脈側毛細血管の増加と細静脈側毛細血管の減少が観察された（図 1、2）。また、DB 群と比較すると DBTr 群で C:F 比が約 10%増加しており、DB 群では Cnt 群に対して有意に低い値であったのに対し、DBTr 群は Cnt 群との間に有意な差がみられなかった（図 3）。このことは、糖尿病ラットにトレーニングを负荷し

ても骨格筋の萎縮状態が改善されていないにもかかわらず (図 4)、トレーニングによって毛細血管数が正常ラットと同等に維持され、さらに細静脈側毛細血管から細動脈側毛細血管への移行がより一層促進されたものと考えられる。このような変化は、運動中の酸素供給やグルコース取込みに有利な適応であると考えられる。

IDDM 患者に 45 分間の持久的走運動を 8 週間負荷した Wallberg-Henriksson ら [25] の研究では、トレーニング後最大酸素摂取量や骨格筋ミトコンドリアの酸化酵素活性は有意に増加したが、C:F 比には変化が見られなかったと報告している。本研究の結果は、これを支持するものであり、また、IDDM 患者においても持久的トレーニング後に、本研究で見られたような細動脈側毛細血管の増加が観察される可能性が示唆された。

本研究では、IDDM ラットにトレーニングを負荷しても正常ラットと比較すると、骨格筋は萎縮傾向にあった。しかしながら、安静糖尿病ラットと比較すると、体重、筋重量、筋線維断面積が有意ではないが増加する結果が得られた (図 4)。インスリン欠乏状態であるとタンパク質が筋組織へ取り込まれないこと、グルコースがエネルギー基質として利用できずに脂肪がエネルギー基質として消費されるため、一般的に体重は減少するといわれている。本研究の結果は、糖尿病ラットでも持久的トレーニングによってタンパク質取込みがある程度改善することを示唆するものである。

以上、本研究では IDDM ラットのヒラメ筋において正常ラットと比較して毛細血管数は減少するが、細動脈側毛細血管の増加が観察された。また、IDDM ラットに持久的トレーニングを負荷すると毛細血管数が正常ラットと同等まで改善され、さらに細動脈側毛細血管の顕著な増加が観察された。これらのことから、IDDM モデルラットにおいて、持久的トレーニングにより酸素供給能が改善され、これは筋細胞へのグルコースやタンパク質の取込み能向上にある程度寄与する可能性が示唆された。

参考文献

1. Baldwin KM, Cooke DA & Cheadle WG. 1977. Time course adaptations in cardiac and skeletal muscle to different running programs. *J Appl Physiol* 42, 267-272.
2. Goldspink DF. 1976. The effects of denervation on protein turnover of rat skeletal muscle. *Biochem J.* 156, 71-80.
3. Goldspink DF. 1978. The influence of passive stretch on the growth and protein turnover of the denervated extensor digitorum longus muscle. *Biochem J.* 174, 595-602.
4. Grim M & Carlson BM. 1990. Alkaline phosphatase and Dipeptidylpeptidase IV staining of tissue components of skeletal muscle: A comparative study. *J Histochem Cytochem* 38, 1907-1912.
5. Gute D, Laughlin H & Amann J. 1994. Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of interval-sprint and low-intensity, endurance-trained rats. *Microcirculation* 1, 183-193.
6. Gute D, Fraga C, Laughlin MH & Amann J.F. 1996. Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of high-intensity endurance-trained rats. *J Appl Physiol* 81, 619-626.
7. Hermansen L & Wachtlova M. 1971. Capillary density of skeletal muscle in well-trained and untrained men. *J Appl Physiol* 30, 860-863.
8. Hudlicka O & Price S. 1990. The role of blood flow and/or muscle hypoxia in capillary growth in chronically stimulated fast muscles. *Phlogers Arch* 417, 67-72.
9. Koyama T, Gao M, Uede T, Batra S, Itoh K, Ushiki T & Abe K. 1997. Different enzyme activities in coronary capillary endothelial cells. In: *Oxygen transport to tissue XVIII*, ed. Nemoto M, Prentice Press, New York/London, pp 359-364.
10. Koyama T, Xie Z, Gao M, Suzuki J & Batra S. 1988. Adaptive changes in the capillary network in the left ventricle of rat heart. *Jpn J Physiol* 48, 229-241.
11. 熊谷秋三、檜垣靖樹、中村友浩、諏訪雅貴、勝田茂. 1999. インスリン抵抗性と骨格筋の組織学的・生化学的特性との関連性. *日本運動生理学雑誌* 1, 1-16.
12. Lash JM, Sherman WM & Hamlin RL. 1989.

- Capillary basement membrane thickness and capillary density in sedentary and trained obese Zucker rats. *Diabetes* 38, 854-860.
13. Lojda Z. 1979. Studies on dipeptidyl (amino) peptidase IV (glycyl proline norphthylamidase). II. Blood vessels. *Histochemistry* 59: 153-16.
 14. Mrazkova O, Grim M & Carlson BM. 1986. Enzymatic heterogeneity of the capillary bed of rat skeletal muscles. *Am J Anat* 177: 141-148.
 15. Price RJ, Owens GK & Skalak TC. 1994. Immunohistochemical identification of arteriolar development using markers of smooth muscle differentiation-Evidence that capillary arterIALIZATION proceeds from terminal arterioles-. *Circ Res* 75: 520-527.
 16. Price RJ & Skalak TC. 1995. A circumferential stress-growth rule predicts arcade arteriole formation in a network model. *Microcirculation* 2: 41-51.
 17. Poole DC & Mathieu-Costello O. 1996. Relationship between fiber capillarization and mitochondrial volume density in control and trained rat soleus and plantaris muscles. *Microcirculation* 3, 175-186.
 18. 佐藤寿一、徳留信寛. 1998. 運動療法の易学. *臨床スポーツ医学* 15, 1085-1091.
 19. 沢登恵美、石原俊秀、雨宮伸. 1999. 糖尿病児とスポーツ. *臨床スポーツ医学* 16, 397-402.
 20. 曾根博仁、奥田諭吉、山下亀次郎、田中喜代次、浅野克己. 有酸素性トレーニングの生理と効用—糖尿病患者について—. *臨床スポーツ医学* 14, 170-173.
 21. Suzuki J, Gao M, Batra S & Koyama T. 1997. Effects of treadmill training on the arteriolar and venular portions of capillary in soleus muscle of young and middle-aged rats. *Acta Physiol Scand* 159, 113-121.
 22. Suzuki J, Gao M, Ohinata H, Kuroshima A & Koyama T. 1997. Chronic cold exposure stimulates microvascular remodeling preferentially in oxidative muscles in rats. *Jpn J Physiol* 47, 513-520.
 23. Suzuki J, Kobayashi T, Uruma T & Koyama T. 2001. Time-course changes in arteriolar and venular portions of capillary in young treadmill trained rats. *Acta Physiol Scand* 171, 77-86.
 24. 山之内国男. インスリン療法と運動. *臨床スポーツ医学* 15, 1081-1135.
 25. Wallberg-Henriksson H, Gunnarsson R, Henriksson J, Ostman J & Wahren J. 1984. Influence of physical training on formation of muscle capillaries in type I diabetes. *Diabetes* 33, 851-857.