

代償性に活動量増大を起こしたラット横隔膜の疲労耐性

宮田浩文*・Wen-ZHI ZHAN**・Y.S. PRAKASH**・Gary C. SIECK**

Fatigue Resistance of Compensatory Activated Diaphragm in the Rat

Hirofumi MIYATA*, Wen-Zhi ZHAN**, Y.S. PRAKASH** and Gary C. SIECK**

Summary

The purpose of this study was to evaluate the alterations in muscle contractility and neuromuscular transmission in the rat diaphragm under conditions of increased activity. We used a model of unilateral denervation in the rat diaphragm muscle to induce compensatory activation on the contralateral side. The activity of compensatory activated diaphragm was increased by ~40% following 2 weeks of contralateral denervation. Muscle fatigue induced by repetitive stimulation as well as the contribution of neuromuscular transmission failure (NF) to fatigue were measured in vitro. Fatigue resistance was measured as the relative drop in force production during isometric contractions induced by direct muscle stimulation at 40Hz (330ms trains every sec) over 2 min. Fatigue resistance was significantly increased in the compensatory activated diaphragm ($33.7 \pm 7.4\%$), compared to control ($26.1 \pm 5.1\%$). NF was measured by comparing decrement in muscle force during muscle vs. nerve stimulation at 40 or 75Hz. The contribution of NF to muscle fatigue was significantly decreased in the compensatory activated diaphragm ($61.3 \pm 7.5\%$ at 40Hz, $69.4 \pm 9.9\%$ at 75Hz) compared to control ($74.1 \pm 6.3\%$ at 40Hz, $80.0 \pm 3.9\%$ at 75Hz). We conclude that fatigue resistance is considerably improved in compensatory activated diaphragm due to both maintained muscle contractility as well as improved neuromuscular transmission.

Key words: rat diaphragm, compensatory activation, fatigue resistance, transmission failure

I. 緒言

横隔膜におけるトレーニング効果の組織化学・生化学的検討は、1970年代から精力的に行われたが^{16,21)}、その変化が下肢筋ほど顕著でないために、一致した結論が得られなかった。1990年代になって、Powersの研究グループは、運動時間を30~90分、運動強度を55~80% VO_2Max に設定した走トレーニ

ング実験、および85~90% VO_2Max の高強度インターバルトレーニング実験を系統的に行い、横隔膜にはトレーニング効果があることを結論づけた^{22,23,24)}。現在では、十分なトレーニング刺激は、横隔膜の酸化的筋線維数を~20%増加させること、酸化系酵素活性を~30%増大させることが、走運動以外の持久性トレーニングでも追認されている³⁰⁾。

* 山口大学農学部生物資源科学科神経筋生理学研究室 (〒753-8515 山口市吉田1677-1 Tel and Fax: 0839-33-5866)
Department of Biological science, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Japan

** メイヨクリニック麻酔科生理学研究室

Departments of Anesthesiology, Physiology and Biophysics, Mayo Clinic, USA

これらの研究結果は、一定の期間活動量が増大した横隔膜の疲労耐性は高まり、換気機能の向上に貢献することを予想させる。しかしながら、呼吸筋の収縮持続性が実際に向上したか否かはまだ明らかにされていない。

生理学的に骨格筋の疲労耐性を考えるとき、筋線維そのものの収縮持続機能を評価すると同時に、運動ニューロンから筋線維への刺激伝達過程も考慮すべきである。なぜなら、筋自体の疲労が起こる以前に、神経および筋の活動電位伝導、伝達機能に疲労が生じ、発揮張力の低下が生じる可能性があるからである³⁾。したがって、横隔膜の収縮持続性にトレーニング効果がなくても、神経筋接合部の伝達機能が改善されれば、呼吸機能の向上が起こりうると考えられる。

本研究は、代償性に活動量を増大させた横隔膜の疲労耐性に関する2つの要素、すなわち筋の収縮持続機能と神経筋接合部の伝達持続機能を *in Vitro* で評価し、横隔膜の機能的改善を検証しようとするものである。

II. 実験方法

A. 横隔膜の代償性活動量増大モデル

雄性的の Sprague-Dawley ラットを、対照群 (CTL; $n=8$, 平均体重285g) と、右横隔膜神経を頸部で切断し左横隔膜の活動量を代償性に増大させる群 (CAC; $n=16$, 平均体重274g) の2群に分けた。CAC 群のラットを Sodium pentobarbital (60mg/kg) の腹腔内注入により麻酔し、滅菌消毒した手術用具を用いて各処置を施した。各ラットの頸部腹側を約4 cm 切開し、表層筋を注意深く開いた後、右横隔膜神経軸索を露出した。軸索内に残る栄養物質の影響をなくすために、横隔神経軸索を1~2 cm 取り除いた。手術後、処置部に出血がないことを確認した上で筋と皮膚をそれぞれ縫合した。手術後2日間は、抗生物質 (ピクシリン0.1ml/日) を注入し、体重測定と行動観察により回復過程を監視した。CTL 群には、神経切断を除く同上の処置を施した。2週間後、再び麻酔下で、両側の横隔膜全体を取り出し、筋重量を測定した。その後、左横隔膜 Mid-costal 部を筋線維走行方向に沿って切り、幅5 mm (長さ2 cm, 厚さ2 mm) 程度の筋切片を2つ作成した。1つの筋切片には約1 cm の横隔神経線維を付けたまま取り出し、*in Vitro* での神経筋接合部に

おける伝達機能評価に用いた。他方は、疲労耐性を含む Isometric 収縮特性の評価に用いた。

筋を摘出する直前に、片側の横隔膜麻痺が呼吸機能に及ぼす影響をしらべるために、各群5匹のラットにおける血液ガスの pH, 酸素分圧, 二酸化炭素分圧を測定した。麻酔15分後に、左頸動脈にヘパリン処理したカテーテル (PE10, OD 0.61mm, ID 0.28mm) を挿入し、約80 μ l の動脈血サンプルを採取した。分析は微量血液ガス分析器 (Instrumentation Laboratory System Model, IL 1306) を用い、37℃の条件下で行った。

手術の効果は、他の6匹のラット (294 $\pm$ 20g) に施した上述の手術中および2週間後に左右の横隔膜筋電図をモニターすることによって確認した。筋電信号は右横隔膜に埋め込んだワイヤー電極 (直径0.1mm) により双極性に誘導し、生体アンプで増幅後、オシロスコープでモニターした。同時に神経切断後0~1分, 9~10分, 29~30分の信号をデジタルレコーダー (TEAC RD120TE) に保存し、後に、1呼吸当たりの筋電図出現の時間的割合 (Duty cycle) および放電量 (Root Mean Square: RMS) を算出し、それぞれ1分間の平均値を求めた。

本研究の手順は、「動物実験ガイドライン」に基づく山口大学農学部動物実験委員会により許可された。

B. Isometric 収縮特性評価

横隔神経線維を伴わない筋切片を、リンガー液 (137mM Na⁺, 5mM K⁺, 5.04mM Ca²⁺, 2mM Mg²⁺, 121mM Cl⁻, 20mM HCO₃⁻, 1.9mM HPO₄²⁻, 0.012mM d-tubocurarine) 中に垂直に固定した。リンガー液には95%O₂-5%CO₂を通入し、pH7.4, 25℃に保持した。横隔膜切片の片側を Force Transducer に連結固定し、マイクロマニピュレーターにより最大単収縮力が得られる筋長 (至適筋長) に設定した。筋を2 ms 幅の矩型波で直接刺激し、強度は最大単収縮張力が得られる強度の125%に設定した。単収縮張力, 単収縮時間 (張力のピークまでの時間) および1/2弛緩時間 (張力のピークからその1/2までの時間) の測定後、十分に間隔をおいて40Hz, 330ms 幅の単発刺激を数回行い、強縮張力が安定していることを確認した。その後、Burke ら⁶⁾の方法に従い、2分間の連続刺激 (40Hz, 330ms 幅) を行った。筋重量と至適筋長から筋横断面積を Mendez and Keys¹⁹⁾の式により求め、初期張力と最終張力

を単位横断面積あたりの値で表した。また、疲労耐性の指標は、初期張力に対する最終張力の比 (%) で表した。

C. 神経筋接合部の伝達機能評価

横隔神経線維を伴う筋切片を前述リンガー液から d-tubocurarine のみを除いた液中に収縮特性評価時と同様に固定した。さらに、横隔神経線維のみを電気刺激するために、吸引電極中に神経線維を引き込み固定した。神経線維に対する刺激は 0.2ms 幅の矩形波で直接刺激し、強度は前述と同様に設定した。刺激頻度は、40Hz または 75Hz の 2 種類を用いた。横隔神経線維に対する 2 分間の電気刺激の中、15 秒ごとに 2 回の筋に対する直接刺激を加えた。この筋刺激によって発生した張力と、直前の神経刺激によって発生した張力の差が、神経筋接合部における伝達欠落を表す。この伝達欠落の筋疲労に対する割合 (Contribution of Neuromuscular Transmission Failure to Muscle Fatigue: NF) を、Aldrich ら¹⁾によって提唱された式 $(NS-MS)/(1-MS) \times 100$ によって評価した。

ここで、NS は神経刺激による張力低下 (初期値に対する比)、MS は筋刺激による張力低下 (初期値に対する比) を意味する。

なお、筋刺激初期張力に対する神経刺激初期張力の値が 0.90 以下であった場合には、横隔神経線維に対するダメージがあったと判断し、データから除外した。CTL 群および 2 つの CAC 群 (40Hz 刺激または 75Hz 刺激) の各群 1 例ずつがこれに相当し、結果的に伝達機能評価は各群 $n = 7$ で行った。

D. 統計処理

得られた結果は 1 元配置あるいは 2 元配置 (伝達機能評価) の分散分析によって検定し、有意差の認められた項目については Turkey 法により post-hoc analysis を行った。有意水準は全ての場合において $p < 0.05$ とした。結果は平均 $\pm$ 標準偏差で表した。

III. 結果

A. 代償性活動量増大モデルの検証

ラットの平均体重は実験の最終段階において、両実験群間で差はなかった (CTL 群; 317 ± 17 g, CAC 群; 321 ± 22 g)。筋重量は、CTL 群の左横隔膜 (439 ± 54 mg)、CAC 群の活動量増大側である左横

隔膜 (443 ± 41 mg) および神経切断側である右横隔膜 (467 ± 46 mg) の間に有意な変化は認められなかった。

右横隔神経の切断前後に左右の横隔膜から導出した筋電図を Fig. 1 に示した。右横隔膜の筋電信号は切断直後に消失した。左横隔膜の Duty Cycle は切断前の $40.4 \pm 5.2\%$ に対し切断直後は $42.7 \pm 6.8\%$ であり、統計的に有意な変化は見られなかった。一方、RMS は切断前の 0.144 ± 0.04 mV に対し切断直後は 0.203 ± 0.05 mV であり、約 40% の有意な増大が認められた。この Duty Cycle と RMS は神経切断 10 分後および 30 分後もほぼ変わらなかった。2 週間後、右横隔膜の筋電信号は消失したままであり、左横隔膜の Duty Cycle は手術の直前および直後の値とほぼ同じであった。

2 週間の片側横隔膜麻痺による血液ガスの変化を Table 1 に示した。CAC 群の酸素分圧、二酸化炭素分圧および pH は、 96.8 ± 5.4 Torr, 51.8 ± 2.2 Torr および 7.32 ± 0.02 であり、それぞれ CTL 群の値との間に統計的有意差は認められなかった。

B. Isometric 収縮特性評価

単収縮時間および 1/2 弛緩時間の比較を Fig. 2 に示した。CAC 群の収縮時間および 1/2 弛緩時間は 49.3 ± 5.6 ms, 59.2 ± 9.5 ms であり、CTL 群の 46.2 ± 2.8 ms, 63.6 ± 11.6 ms との間に有意差は認められなかった (Fig. 2)。筋疲労テストの結果を Fig. 3 に示した。CAC 群の初期強縮張力は 17.5 ± 3.1 N/cm² であり、CTL 群の 17.6 ± 2.1 N/cm² とほぼ同じであった。CTL 群の最終張力は 4.6 ± 0.9 N/cm² であり、疲労指数は $26.1 \pm 5.1\%$ であった。一方、CAC 群の最終張力および疲労指数は 5.9 ± 1.3 N/cm² および $33.7 \pm 7.4\%$ であり、CTL 群に比べ有意に高い疲労耐性を示した。

C. 神経筋接合部伝達機能評価

CTL 群と CAC 群の、典型的な疲労曲線を Fig. 4 に示した。筋刺激によって発生した初期張力に対する、神経刺激により発生した初期張力の比は 0.94 ± 0.04 であった。この結果は、神経筋標本の作成に際して、神経線維に対する損傷はなかったことを示している。40Hz および 75Hz の刺激における CAC 群の筋疲労に対する伝達欠落の比は $61.3 \pm 7.5\%$ および $69.4 \pm 9.9\%$ であり、CTL 群の $74.1 \pm 6.3\%$ および 80.0

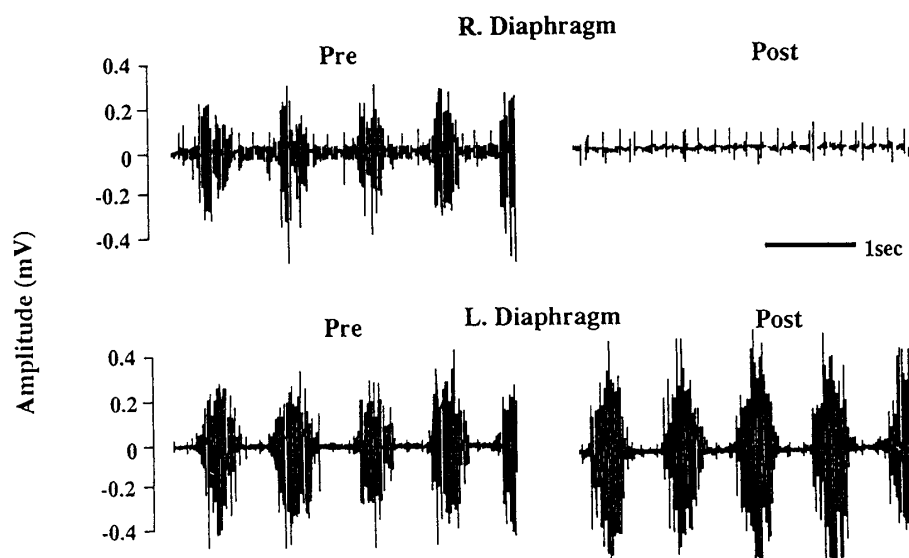


Fig. 1. Electromyographic (EMG) activity taken from the right (upper trace) and left (lower trace) hemidiaphragm muscles of rats subjected to a denervation (DNV) of right phrenic nerve. Left and right recordings in each trace were recorded before and 1min after the DNV surgery, respectively. The spontaneous inspiratory-related EMG activity disappeared and increased after the surgery in right and left hemidiaphragms, respectively.

Table 1. Comparison of blood gas data between control (CTL) and compensatory activated (CAC) diaphragm muscle groups.

Groups (n)	pO ₂ (Torr)	pCO ₂ (Torr)	pH
CTL (5)	99.9±3.3	51.5±1.5	7.34±0.02
CAC (5)	96.8±5.4	51.8±2.2	7.32±0.02

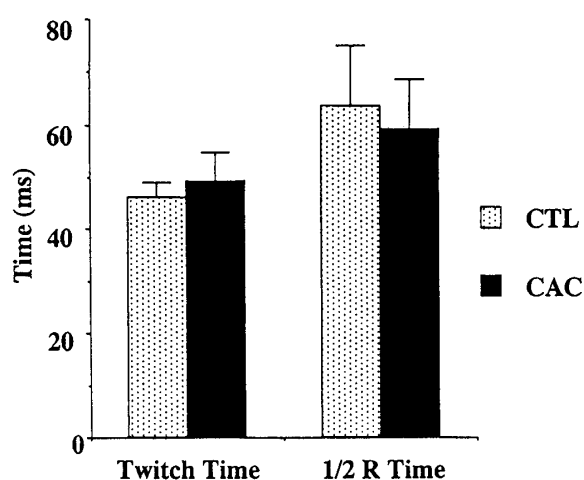


Fig. 2. Comparison of twitch time (time to peak force) and half relaxation time (time to 1/2 of peak force) between CTL and CAC diaphragm muscles.

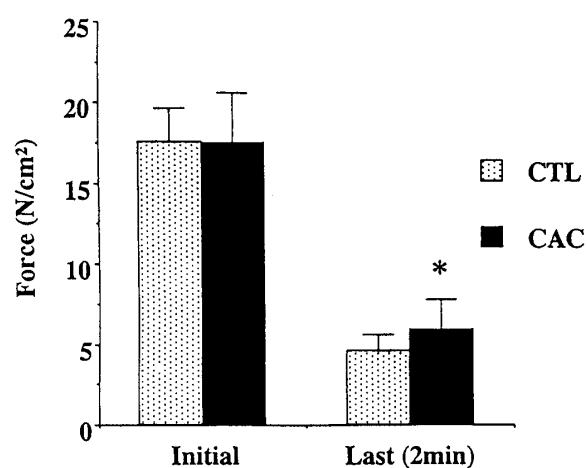


Fig. 3. Comparison of first and last tetanic forces during repetitive stimulation for 2 min between CTL and CAC diaphragm muscles. Note the significant increase in last force with CAC. * $p < 0.05$ (vs. CT value).

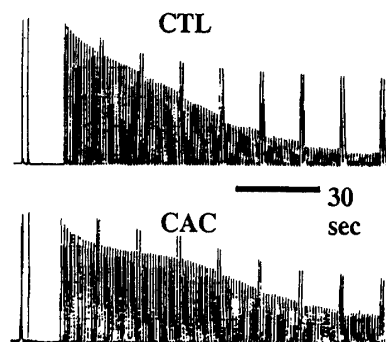


Fig. 4. Typical samples of tetanic forces generated by repetitive stimulation to phrenic nerve every sec over 2 min and superimposed stimulation to diaphragm muscle every 15 sec. The differences between forces generated by nerve and muscle stimulation indicate neuromuscular transmission failure (NF).

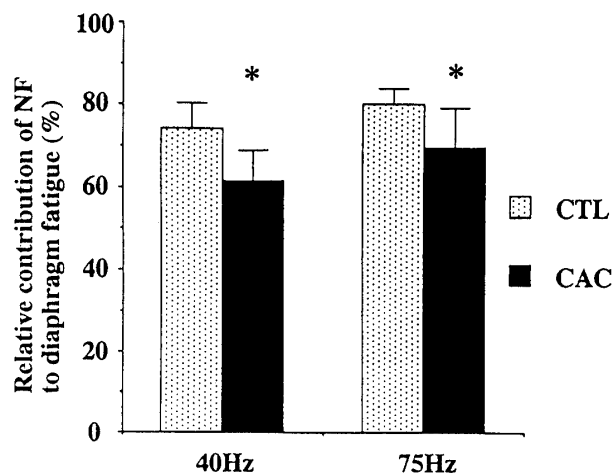


Fig. 5. Comparison of contribution of the NF to diaphragm muscle fatigue between CTL and CAC. Note the significant decreases in NF with CAC ($p < 0.05$).

±3.9%と比べ有意に低い値を示した (Fig. 5)。この結果は、CAC 群の方が、伝達欠落の少ない、疲労耐性のある神経筋接合部を有していることを示している。

IV. 考察

片側の横隔膜の神経切断は、数秒以内に反対側の intact な横隔膜の活動量増大をもたらした。これは、片側横隔膜の麻痺により生じた不十分な胸郭の拡張が、末梢神経の反射、特に group III, IV 線維を経由する反射をひき起し^{10, 18)}、十分な拡張を得るための代償活動がすばやく生じたためと解釈される。この代償作用は、intact な横隔膜のみならず、肋骨呼吸運動の主働筋である傍胸骨肋間筋と外肋間筋にも生じることが、Dimarco ら⁸⁾の筋電図観察により明らかにされている。しかし、彼らは、傍胸骨肋間筋と外肋間筋の長さ変化が、横隔膜のそれに比べると非常に狭い範囲に留まっていることも報告している。したがって、胸郭拡張に対する貢献度は、明らかに肋骨呼吸運動より横隔膜運動の方が大きく、本研究のモデルにおいても、反対側の横隔膜における代償性作用が最も重要な意味を持つと考えられる。

本研究は、上述のメカニズムにより活動量が増大した横隔膜において、その収縮持続機能のみならず神経筋接合部の伝達持続機能も改善されることを明らかにした。不活動あるいは活動量増大モデルを

使った実験では、被験筋の活動量を定量し、処置のインパクトを明らかにすることが望まれる。多くの実験で用いられる後肢筋の活動は多種多様であり、その活動量を定量することは容易でない。一方、呼吸活動の主働筋である横隔膜は²⁷⁾、終始周期的に活動しており、その活動量の定量が比較的容易である。本研究で用いた右横隔神経の切断は、左横隔膜筋の duty cycle には変化を起こさなかったが、その振幅には約40%の増大を生じさせた。2週間後の筋電図記録からその振幅が増大したままであるか否かは判断できないが、動脈血の酸素分圧、二酸化炭素分圧および pH の値が正常に保たれていたことから、左横隔膜は右横隔膜の麻痺を機能的に十分代償していたと考えられる。これらのことから、手術直後に右横隔膜に生じた代償性活動量増大は、その後2週間継続したものと推測される。

代償性に活動量が増大した筋の構造的な変化については、これまで主に下肢筋について検討がなされているが、屈筋、伸筋あるいは速筋、遅筋により結果が多少異なるようである^{9, 14, 28, 29)}。また、処置後の時間経過の違いも結果に影響を及ぼしているようである。Mackova と Hnik¹⁷⁾は、代償性負荷の与えられたラット下肢筋において、筋量の急激な増加が収縮力の増加を伴わない時期が1週間程度続き、その後は筋量の増加と収縮力の増加が平行して起こることを明らかにしている。本研究で用いた横隔膜の場合、下肢筋と単純に比較はできないが、14

日間の実験期間中に十分な筋の適応が生じたと推察している。

本研究で用いた横隔膜と比較的似た筋線維組成を有するラット足底筋では、極端な筋肥大が生じると共に遅筋線維占有率の増加が報告されている²⁹⁾。また、収縮特性に関しても、遅筋化に対応する変化、すなわち、単収縮時間および1/2弛緩時間の延長が報告されている²⁶⁾。以上の先行研究で用いられた下肢筋は、協働筋の除去により極端な過負荷あるいはストレッチが生じ、構造的・機能的遅筋化が起こる。一方、本研究で用いた右横隔膜麻痺による左横隔膜の活動量増加は、左横隔膜の量的変化を起こさず、むしろ、麻痺した右横隔膜の筋重量を微増させた。これは、Hopkinsら¹¹⁾および我々の以前の報告²⁰⁾に見られるように、intactな横隔膜の周期的収縮がもたらすストレッチにより、麻痺した横隔膜のType I (約35%) および Type IIa 線維 (約30%) の肥大と Type IIx (約25%) および Type IIb 線維 (約10%) の萎縮が同時に起こった結果であると考えられる。このように、本研究で被験筋として用いた左横隔膜は、ストレッチがあまりかからない状態で活動量が増大する。その結果、筋線維の肥大やタイプ変換は起こらず、収縮速度および弛緩速度にも変化が認められなかったのかもしれない。疲労耐性に関しては、Royら²⁶⁾および Frischknecht と Vrbova⁹⁾の報告がなされている。前者は、ラットの腓腹筋とヒラメ筋除去により代償性肥大を起こした足底筋において、収縮速度の低下等の機能的遅筋化を伴う疲労耐性の改善を報告している。また、後者は、ラットの前脛骨筋除去により代償性肥大を起こした長指伸筋において、機能的遅筋化を伴わない疲労耐性の改善を認めている。本研究でも、機能的遅筋化を伴わない、疲労耐性の改善が認められた。Frischknecht と Vrbova⁹⁾は、筋の酸化酵素活性の増加と毛細血管の発達を疲労耐性の改善の主な理由にあげている。また、Hubbardら¹²⁾は、気道抵抗を高めて活動量を増大させた横隔膜において、酸化酵素活性が有意に増加することを明らかにしている。一般的にはこれらの要因に加えて、筋小胞体におけるCa²⁺の取り込みあるいは放出機能の変化が疲労耐性の改善をもたらしている可能性がある。しかし、単収縮特性に変化が認められなかったことから、本実験の結果は、筋の酸化酵素活性の増加が主な要因であるかもしれない。

横隔膜は神経筋標本を容易に作成できることから、神経筋接合部の伝達欠落については多くの研究がなされてきた。Aldrichら¹⁾は、本研究でも用いた伝達欠落の筋疲労に対する貢献度の指標を提唱し、刺激頻度が高くなるにつれ、伝達欠落が頻繁に起こるようになることを示した。一方、Bellemare と Bigland-Ritchie⁵⁾は、人の横隔神経を経皮刺激し、横隔神経線維および横隔膜上での伝達欠落は生理的状态では起こらないことを報告した。しかし、Bellemare と Garzaniti⁴⁾は、人の母指内転筋で、筋疲労の主な原因は神経筋接合部を含む末梢部位で起こることを報告し、横隔膜に関する先の報告の方法論的欠点を指摘している。このように、生理的状态での伝達欠落の程度については未解決であるが、in Vitro 実験においては伝達欠落は疲労の主な要因であることが明らかにされている。本研究の条件では、CTL 群の筋疲労に対する伝達欠落の比は40Hz 刺激で74.1%, 75Hz 刺激で80.0%であった。一方、活動量が増大した横隔膜は40Hz 刺激で61.3%, 75Hz 刺激で69.4%の伝達欠落貢献度を示し、いずれの刺激頻度においても伝達機能の向上が示された。神経筋接合部の伝達機能向上に関しては、脊髄半切により2週間不活動になった横隔膜においてすでに報告されている²⁵⁾。さらに、この伝達機能の改善は、伝達物質の受け渡しをする神経線維末端と運動終板の拡張に起因していることも明らかにされている²⁵⁾。一方、活動量増大に伴う神経筋接合部の構造変化については、Deschenesら⁷⁾のラットひらめ筋に関する報告がある。彼らは、12週間の持久走トレーニングが神経線維末端と運動終板の両方に拡張をひき起こし、しかもそれが筋線維肥大とは無関係に起こっていることを示している。この他、Andonian と Fahim²⁾, Waerhaugら³¹⁾も、トレーニングにより神経終末の拡張が起こることを報告している。本研究で用いた代償性に活動量を増大させたモデルの神経筋接合部の構造変化については明らかでないが、先行研究同様に神経線維末端と運動終板の拡張が起こっていることが予想される。このように拡張した神経筋接合部に多くの伝達物質とそのレセプターがあり、連続刺激に対して優れた疲労耐性を示したのかもしれない。今後、代償性に活動量が増大した横隔膜について免疫組織化学的手法を用いた神経筋接合部形態の検討が期待される。

本研究の結果は、トレーニングが横隔膜の神経筋

接合部における伝達機能の改善をもたらす可能性を明らかにした。したがって、Bazzy と Donnelly³⁾が報告したように、シグナルの伝導伝達の機能が疲労の主な原因であるならば、横隔膜に対する持久性トレーニングの重要性が示唆される。横隔膜の運動単位動員様式は、安静時にはSタイプおよびFRタイプの一部が動員され、運動強度あるいは気道抵抗の増大に伴いFR, FI, FFと段階的に動員されることが推察されている²⁸⁾。したがって、本実験における活動量の増大は、Fタイプの運動単位の参画を意味していると考えられる。これまで、伝達欠落はFタイプ運動単位において大きく、Sタイプ運動単位では小さいことが明らかにされており¹³⁾、Fタイプ運動単位の伝達持続機能の向上は、筋全体の伝達疲労耐性の向上に大きく貢献するであろう。これらの結果を実際のトレーニングの場に応用するなら、Hubbardら¹²⁾が、ラットにおいて行ったように、気道抵抗を高めて呼吸筋の活動量を増大させながらトレーニングすることも効果的かも知れない。たとえば、マスク携帯により気道抵抗を少しでも高めることができれば、呼吸筋、特に横隔膜の活動量が増大し、Fタイプ運動単位における伝達機能の改善をひき起こすことが可能であろう。今後、これらの推察に対する検証および横隔膜の疲労耐性と全身持久力の関連について、さらに検討を加える必要がある。

V. 結論

本研究は、代償性に活動量を増加させた横隔膜の疲労耐性を、筋自体の収縮持続機能と神経筋接合部の伝達持続機能の評価により明らかにすることを目的とした。右横隔神経を頸部にて切断し、左横隔膜の活動量を2週間にわたり増大させたCAC群の筋および神経筋接合部の疲労耐性をin Vitroで評価し、CTL群のそれと比較した。右横隔神経切断直後、左横隔膜から記録された筋電図の出現周期は変化しなかったが、その平均振幅は約40%増大した。CAC群の単収縮および強収縮張力特性はCTL群と同じであったが、筋および神経筋接合部の疲労耐性は有意に向上した。これらの結果は、持久性トレーニングが横隔膜の収縮持続機能のみならず、神経筋接合部における伝達持続機能も向上させる可能性を示している。

謝辞

本研究は、文部省科学研究費（H8年度奨励研究（A）08780083）の補助を受けた。

参考文献

- 1) Aldrich T K, Shander A, Chaudhry I and Nagashima H (1986) Fatigue of isolated rat diaphragm: role of impaired neuromuscular transmission. *J Appl Physiol* 61: 1077-1083
- 2) Andonian M J and Fahim M A (1987) Effects of endurance exercise on the morphology of mouse neuromuscular junctions during ageing. *J Neurocytology* 16: 589-599
- 3) Bazzy A R and Donnelly D F (1993) Diaphragmatic failure during loaded breathing: role of neuromuscular transmission. *J Appl Physiol* 74 (4): 1679-1683
- 4) Bellemare F and Garzaniti N (1988) Failure of neuromuscular propagation during human maximal voluntary contraction. *J Appl Physiol* 64(3): 1084-1093
- 5) Bellemare F and Bigland-Ritchie B (1984) Assessment of human diaphragm strength and activation using phrenic nerve stimulation *Respir Physiol* 58: 263-277
- 6) Burke R E, Levine, D N, Tsairis P and Zajac F E (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* 234: 723-748
- 7) Deschenes M R, Maresh C M, Crivello J F, Armstrong L E, Kraemer W J and Covault J (1993) The effects of exercise training of different intensities on neuromuscular junction morphology. *J Neurocytology* 22: 603-615
- 8) DiMarco A F, Romaniuk J R and Supinski G S (1992) Parasternal and external intercostal responses to various respiratory maneuvers. *J Appl Physiol* 73(3): 979-986
- 9) Frischknecht R and Vrbova G (1991) Adaptation of rat extensor digitorum longus to overload and increased activity. *Pflügers Arch* 419(3-4): 319-326
- 10) Haouzi P, Huszczuk A, Gille JP, Chalon B, Marchal F, Crance JP and Whipp BJ (1995) Vascular distension in muscles contributes to respiratory control in sheep. *Respir Physiol* 99: 41-50
- 11) Hopkins D, Manchester K L and Gregory M

- (1983) Histochemical and biochemical characteristics of the transient hypertrophy of the denervated rat hemidiaphragm. *Exp Neurol* 81: 279-293
- 12) Hubbard R W, Ianuzzo C D, Mathew W T and Linduska J D (1975) Compensatory adaptations of skeletal muscle composition to a long-term functional overload. *Growth* 39(1): 85-93
 - 13) Johnson B D and Sieck G C (1990) Differential susceptibility of diaphragm muscle fibers to neuromuscular transmission failure. *J Appl Physiol* 68: 174-180
 - 14) Johnson T L and Klueber K M (1991) Skeletal muscle following tonic overload: functional and structural analysis. *Med Sci Sports & Exerc* 23(1): 49-55
 - 15) Keens T G, Chen V, Patel P, O'Brien P, Levison H and Ianuzzo C D (1978) Cellular adaptations of the ventilatory muscles to a chronic increased respiratory load. *J Appl Physiol* 44(6): 905-908
 - 16) Lieberman D, Maxwell L and Faulker J (1972) Adaptation of guinea pig muscle to aging and endurance training. *Am J Physiol* 222: 556-560
 - 17) Mackova E and Hnik P (1976) Some hormonal factors (hypophysectomy, castration and testosterone administration) modifying the course of "compensatory" muscle hypertrophy in the rat. *Physiol Bohemoslov* 25: 325-332
 - 18) McClosky D I and Mitchell J H: Reflex cardiovascular and respiratory responses originating in exercising muscle. *J Physiol* 224: 173-186 1972
 - 19) Mendez J and Keys A (1960) Density and composition of mammalian muscle. *Metabolism* 9: 184-188
 - 20) Miyata H, Zhan W Z, Prakash Y S and Sieck G C (1995) Myoneural interactions affect muscle adaptations to inactivity. *J Appl Physiol* 79(5): 1640-1649
 - 21) Moore R and Gollnick P (1982) Response of ventilatory muscles of the rat to endurance training. *Pflugers Arch* 392: 268-272
 - 22) Powers S K, Criswell D, Lawler J, Martin D, JILL, Herb R A and Dudley G (1994) Regional training-induced alterations in diaphragm oxidative and antioxidant enzymes. *Respir Physiol* 95: 227-237
 - 23) Powers S K, Criswell D, Lieu F, Dodd S and Silverman H (1992) Exercise-induced cellular alterations in the diaphragm. *Am J Physiol* 263: R1093-1098
 - 24) Powers S K, Lawler J, Criswell D, Dodd S, Grinton S, Bagby G and Silverman H (1990) Endurance training-induced cellular adaptations in respiratory muscles. *J Appl Physiol* 68: 2114-2118
 - 25) Prakash Y S, Miyata H, Zhan W Z and Sieck G C (1999) Inactivity-induced remodeling of neuromuscular junctions in rat diaphragm muscle. *Muscle & Nerve* 22(3): 307-319
 - 26) Roy R R, Meadows K, Baldwin K M and Edgerton VR (1982) Functional significance of compensatory overloaded rat fast muscle. *J Appl Physiol* 52(2): 473-478
 - 27) Sherrey J H and Megirian D (1990) After phrenicotomy the rat alters the output of the remaining respiratory muscles without changing its sleep-waking pattern. *Respir Physiol* 81(2): 213-225
 - 28) Sieck G C and Fournier M (1991) Developmental aspects of diaphragm muscle cells: structural and functional organization. In: *Developmental Neurobiology of Breathing*, G.G. Haddad and J.P. Farber (Eds), Lung Biology in Health and Disease Series. New York, Marcel Dekker, 375-428
 - 29) Sugiura T, Miyata H, Kawai Y, Matoba M and Murakami N (1993) Changes in myosin heavy chain isoform expression of overloaded rat skeletal muscle. *Int J Biochem* 25: 1609-1613
 - 30) Sugiura T, Morimoto A, Sakata Y, Watanabe T and Murakami N (1990) Myosin heavy chain isoform changes in rat diaphragm are induced by endurance training. *Jpn J Physiol* 40(5): 759-63
 - 31) Waerhaug O, Dahl H A and Kardel K (1992) Different effects of physical training on the morphology of motor nerve terminals in the rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *Anat Embryol* 186: 125-128
- (平成11年4月12日受付, 平成11年12月3日訂正, 平成11年12月24日受理)