

# メダカの筋肥大について

宮城県仙台第三高等学校

魚類は人間などの哺乳類と同様に筋肥大することがわかっている。魚類の筋肥大はどのような条件で行われるのだろうか。一見人間とは構造が違っているように思われる魚類の筋肉も、種類によっては人間と非常によく似ている種類がある。本研究ではそんな魚類（本研究ではメダカを用いた）の筋肥大がどのような条件で起こるのかについて調べた。メダカの筋肉は主に血合筋、普通筋という部分で構成されており、人間で言う遅筋、速筋と役割が非常に似ている。血合筋は主に遊泳などの持続的な運動に使われ、普通筋は敵から逃げる際などの瞬発的な動作を行う際に用いられる。本研究では4つの条件に分けた各メダカの断面積に占める血合筋の割合を測定し、メダカの筋肥大に有効な条件の解明を行った。

## 1 背景

私たちは日々筋力トレーニングを行うにあたり、他の生物における筋力トレーニング及び筋肥大にも興味を抱いた。そんな中、本校の先行研究から魚類であるメダカにおいても我々と同様に筋肉に負荷を与えれば、筋肥大が起きる可能性があること知り、研究を行うことにした。先行研究からは水流の有無によってメダカの筋肥大率に差が生じる事がわかっており、また同時に、与える水流が強すぎると、メダカの大量死が起り、生存率が大幅に下がることも分かっている。それらを踏まえ、私達はメダカを餌のタンパク質含有量と負荷を与えるための水流の有無によって以下のような4つのグループに分け1ヶ月間飼育した。その後、それぞれのグループの個体の血合筋の筋肥大率の平均の差を求める。

一般にメダカは普通筋と血合筋によって筋肉が構成されていることが知られている（図1）が、本研究では、主に長い時間泳ぐ時に用いられる血合筋の筋肥大率を対象とする。

また、比較的飼育が行いやすいことからメダカを対象とした。

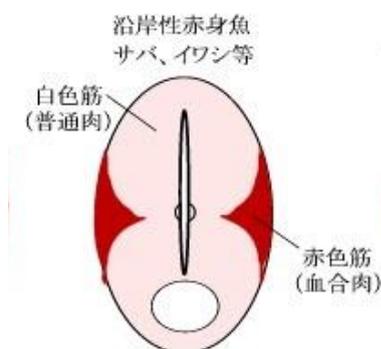


図1 魚類の筋肉構造

以上より、本研究の目的はメダカにおける効率の良い筋肥大の条件を調べるための以下の二点とする。

(1) 水流の有無、餌におけるタンパク質含有量の差による筋肥大率の差を求める。

(2) 結果からどの条件が効果的に筋肥大に影響したのかを調べる。

## 2 材料と方法

### (1) 材料

- ・メダカ (180匹) ・水流ポンプ (2個)
- ・餌 (タンパク質45%、タンパク質55%)
- ・水槽 (4つ) ・マイクローム・スライドガラス
- ・カバーガラス・エタノール (50%、70%、80%、90%、95%、99.5%、Abs)
- ・キシレン・レモゾール・ビオライト
- ・エオシン・ブアン液・ヘマトキシリン
- ・パラフィン (58°C、70°C、77°C)

### (2) メダカの飼育について

メダカを以下のような4つのグループに分け、各水槽25匹ずつ1ヶ月間飼育する。

1. 水流あり タンパク質55%	3. 水流なし タンパク質55%
2. 水流あり タンパク質45%	4. 水流なし タンパク質45%

- ・餌は毎日メダカ1匹あたり0.05gずつ与える
- ・水流を与えるグループでは毎日9時から17時の間3時間毎に15分ずつ水流を流す（図2）

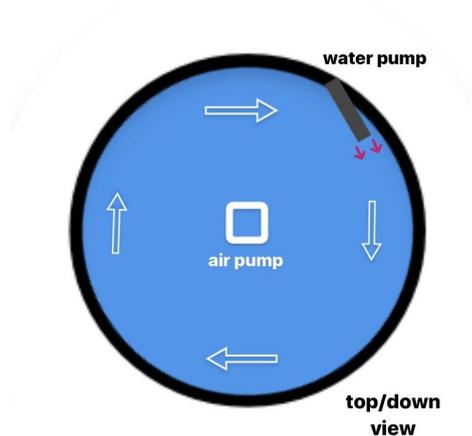


図. 2 水流あり水槽

### (3) パラフィン切片制作と染色工程

#### ・パラフィン切片制作工程

私達は面積測定の際にメダカのパラフィン切片を用いる。メダカの体内には水分が含まれており、パラフィンが水に溶けにくいいため、そのままでは水をパラフィンに置換できない。そこで円滑に水からパラフィンへの置換を行うためにそれぞれと相性の良いエタノールとキシレンに段階的に浸けるという作業を行う。ここではその工程を以下に示す。

1. メダカを氷水につけ麻痺させブアン液へ浸ける(約1時間)
2. 流水につける(数時間)
3. エタノール(70%) (約1時間)
4. エタノール(80%) (約1時間)
5. エタノール(90%) (約1時間)
6. エタノール(95%) (約1時間)
7. エタノール(99.5%) (約1時間)
8. Asb. エタノール (約1時間)
9. キシレン1 (約1時間)
10. キシレン2 (約2時間)
11. パラフィン1 (58°Cで約1時間)
12. パラフィン2 (70°Cで約1時間)
13. パラフィン3 (77°Cで約1時間)
14. 減圧処理 (約30分)
15. パラフィンブロックの作成
16. パラフィンブロックを成形し台木へつける(図3)
17. ミクロトーム(図. 4)により1枚あたり10 $\mu$ mlにスライスし(図. 5)パラフィン切片とする。

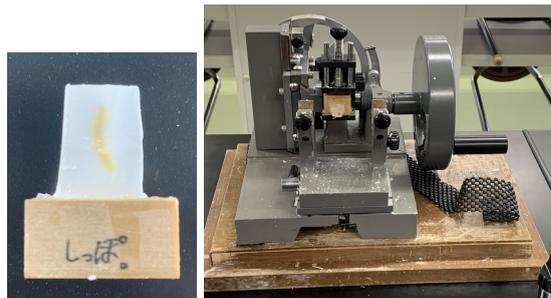


図. 3 ブロック 図. 4 ミクロトーム



図. 5 パラフィンシート

#### ・パラフィン切片染色工程

パラフィン切片の染色にはヘマトキシリンとエオシンを使う。ヘマトキシリンは核を青色に、エオシンは細胞質、細胞膜などを赤色に染める役割を持つ。今回実際に染色するのはこの2つの染色液であるが、パラフィン切片を染色するまでに浸す工程が多いため以下に示す。

1. キシレン2 (約10分)
2. キシレン1 (約10分)
3. Abs. エタノール (約5分)
4. エタノール(95%) (2~3分)
5. エタノール(90%) (2~3分)
6. エタノール(80%) (2~3分)
7. エタノール(70%) (2~3分)
8. エタノール(50%) (2~3分)
9. 水 (2~3分)
10. ヘマトキシリン (約15分)
11. 水洗 (10~20分)
12. エオシン (30秒~1分)
13. 水 (数回上下し浸す)

#### (4) 面積測定工程

染色したシートはImageJ(図. 6)という科学研究における画像解析に広く利用される画像ソフトウェアを用いて計測する。また、全断面積における、遅筋の面積の比率を個体ごとに計測する。

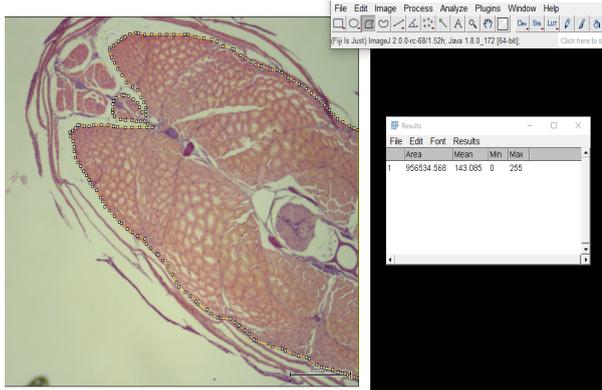


図.6 ImageJによる面積測定

(5) 筋肥大の評価方法について

今回実験で得る割合の平均値に本当に差があるのかを統計的に調べるためにT検定を行った。T検定とは帰無仮説(※1)が正しいと仮定した場合に、その帰無仮説を棄却する判断基準となる確率である「有意水準(※2)」を設定し比較するデータに意味のある差があるかどうかを示す値を算出しそこから得られるp

値(※3)を有意水準と比較する。ここでp値が有意水準よりも小さければ帰無仮説が棄却され示したい結果を示せたこととなる。

(※1)統計学上の仮説で、ある変数が他の一つの変数、もしくは一群の変数と関係がないとする仮説、あるいは二つ以上の母集団の間に差があることをないとする仮説。

(※2)統計的仮説検定において、過誤を犯す確率であり、p値の小ささの基準。

(※3)統計的仮説検定において、帰無仮説のもとでもとの検定統計量がその値となる確率のことで、p値が小さいほど検定統計量がその値となることはあまり起こり得ないことを意味する値。

3 結果と考察

実験.1

・結果(生存数 20匹中)

1. 水流あり タンパク質55% 4匹生存	3. 水流なし タンパク質55% すべて死亡
2. 水流あり タンパク質45% すべて死亡	4. 水流なし タンパク質45% 5匹生存

多くの個体が死亡してしまい、次の工程に進むことが困難だと考え、実験を中断した。考察としては、水質の悪化により、生存数が極端に減ったことから、餌の与えすぎや日光の当たり具合が関

係していると考えた。また、水流を流す時間が長すぎたことも生存数の減少に関係していると考えた。改善点は

- ・餌を与える頻度を毎日→二日に一度に変更
  - ・日光による影響を考え1週間に一度水槽の位置を入れ替える
  - ・水流を流す時間を3時間あたり15分→5分に変更
  - ・週に一回水質改善の薬品投与
  - ・一つの水槽あたり20匹→25匹に変更
- 日光の当たり具合に関して、水槽ごとに差があり、水槽内の水草などの生え方に違いがあったため水質が水槽によって変わってしまったと考えられる。

実験2

・結果(生存数 25匹中)

1. 水流あり タンパク質55% 22匹	3. 水流なし タンパク質55% 7匹
2. 水流あり タンパク質45% 4匹	4. 水流なし タンパク質45% 17匹

※多くのメダカが死んでしまった水槽もあったが実験1に比べ大きな改善が見られたため次の段階に移ることにした。

・T検定による有意差

結果の出た2つの水槽についてT検定を行った。今回のT検定では、帰無仮説を「この2つの水槽のメダカの筋肥大に差はない」とし、また有意水準を慣例的にp=0.05としてT検定を行った。結果は以下のとおりである。

実験2

・結果(全体の筋肉における遅筋面積割合)

1. 水流あり タンパク質55% 8.7094%	3. 水流なし タンパク質55% 未測定
2. 水流あり タンパク質45% 未測定	4. 水流なし タンパク質45% 7.6830%

※多くのメダカが死んでしまった水槽もあったが実験1に比べ大きな改善が見られたため次の段階に移ることにした。

・T検定による有意差

結果の出た2つの水槽についてT検定を行った。

今回のT検定では、帰無仮説を「この2つの水槽のメダカの筋肥大に差はない」とし、また有意水準を慣例的に $p=0.05$ としてT検定を行った。結果は以下のとおりである。

・ T検定による結果

	1. 水流あり タンパク質55%	4. 水流なし タンパク質45%
測った数	13匹	10匹
平均値	8.67213	7.65447
標準誤差	0.368161	0.218567
標準偏差	1.27535	0.655700

危険率（有意水準）	0.393017
結果（p値）	$0.01 < p < 0.05$

T検定を行ったところp値が0.05未満であったため、帰無仮説が棄却され測定した2つの水槽の筋面積の平均に有意差が認められた。

・ 考察（実験2）

今回の実験では生存数が大幅に改善した。しかし、水槽2と水槽3では多くのメダカが死んでしまった。これについてこの2つの水槽のメダカは飼育し始めに多く死亡し、またこの2つの水槽はどちらもはじめは日当たりがかったことが共通していることから、日当たりの悪さがメダカの生存数を減少させていると考える。また、全体的に生存数が増加していることから実験1から実験2にかけて改善した点はメダカの生存数に影響を与えたと考える。また今回作成したパラフィン切片を染色imageJを用いて面積を測定し得られた2つのデータに関してT検定を行ったところ有意差が認められたことから、水流による運動負荷、もしくはタンパク質の含有量の差によって筋肥大率が増加したと考えられる。

4 展望

今回測定が行えなかった2つの水槽においても今後同様の測定を行い、餌のタンパク質含有量と水流の有無による筋肥大への影響を調べる。また、実験に今回よりも多くの個体用いることで、より正確な遅筋の筋肥大におけるデータを求め、何が最も筋肥大に影響しているのかを調べるとともに

他の分野での応用にもつなげていきたい。

5 参考文献

1) 魚類筋肉タンパク質機能の多様性と分子機構渡部柊五, 日本水産学会誌, (2006)  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan/72/3/72\\_3\\_357/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan/72/3/72_3_357/_article/-char/ja/)

2) 仙台第三48回生先行研究