

2002年度助成研究論文

廃用性筋萎縮の予防としての温熱負荷の影響に関する研究*

沖田 実¹⁾ 中居和代²⁾ 片岡英樹³⁾ 豊田紀香²⁾
 中野治郎⁴⁾ 折口智樹¹⁾ 吉村俊朗¹⁾

要旨

本研究の目的は、温熱負荷ならびに温熱負荷と持続的筋伸張運動を併用した場合の廃用性筋萎縮の進行抑制効果を明らかにすることである。実験動物は、7週齢のWistar系雄ラットで、1週間の後肢懸垂によってヒラメ筋に廃用性筋萎縮を惹起させるとともに、その過程で約42℃の温熱ならびに持続的筋伸張運動、両者を併用した方法を負荷し、筋湿重量とタイプI・II線維の筋線維直径の変化、Heat shock protein 70 (Hsp 70) の発現状況を検索した。温熱負荷によってHsp 70の発現が増加し、タイプI・II線維とも廃用性筋萎縮の進行抑制効果を認めた。そして、これはHsp 70の作用によってタンパク質の合成低下と分解亢進が抑制されたことが影響していると考えられた。一方、持続的筋伸張運動でも廃用性筋萎縮の進行抑制効果を認めたが、温熱負荷と併用した方法がより効果的であり、これはHsp 70の作用と機械的伸張刺激の作用の相乗効果によるものと推察された。

キーワード 廃用性筋萎縮, 温熱負荷, Heat shock protein 70

はじめに

温熱療法は、古くから疼痛緩和や筋スパズムの軽減、末梢循環の改善などを目的に行われてきた理学療法の一手段である¹⁾²⁾。しかし、後藤らの報告³⁾では、予め筋細胞を暖めてからトレーニングした方が筋肥大効果が著しいとされており、新たな温熱療法の効果が注目されている。そして、このメカニズムには熱刺激によって誘導される筋細胞内のHeat shock protein 70 (以下、Hsp 70) が関与していると考えられている³⁾。

Hsp 70とは、熱などの様々なストレスによって誘導されるタンパク質で、新生ポリペプチド鎖の伸張と正しい折り畳みを介助する分子シャペロンとしての機能があり、タンパク質の合成に関与しているといわれている。また、ストレスによるタンパク質の凝集を抑えたり、損

傷したタンパク質の修復にも作用することからタンパク質の分解抑制にも関与していると考えられている⁴⁾⁵⁾。

一方、日常の臨床においては、安静・臥床やギプス・装具などによる関節固定などによって廃用性筋萎縮が発生するが、廃用性筋萎縮の発生メカニズムにもHsp 70が関与していることが近年報告されている。Thomasonら⁶⁾は、廃用性筋萎縮は初期の段階ではタンパク質の合成が低下し、その後、分解が亢進することによって起こると報告しているが、Kuら⁷⁾は、このタンパク質の合成低下は、Hsp 70の減少とそれに伴うポリペプチド鎖の伸張がうまく機能しないことが主な要因であると報告している。また、Naitoら⁸⁾はラットの全身に1時間、約41℃の温熱暴露を行い、その後8日間の後肢懸垂を行った群は、ヒラメ筋内のHsp 70の発現が増加し、筋湿重量も後肢懸垂のみを行った群より有意に高値であったと報告している。そして、この結果を基にHsp 70の分子シャペロンとしての働きや酸化ストレスに対する防御・修復機能に着目すると、プレコンディショニングによるHsp 70の誘導がタンパク質の合成低下と分解亢進を抑え、廃用性筋萎縮の発生を軽減する可能性がある⁴⁾と述べている⁴⁾。

しかし、先行研究⁸⁾においては、廃用性筋萎縮の進行過程における温熱負荷の影響や筋線維タイプの違いによる温熱負荷の影響は明らかにされていない。そこで、本研究では温熱負荷によるラットヒラメ筋の廃用性筋萎

* Effects of Heat Stress on Prevention of Disuse Muscle Atrophy in Rat Soleus Muscle

1) 長崎大学医学部保健学科

(〒852-8520 長崎県長崎市坂本1-7-1)

Minoru Okita, RPT, Tomoki Origuchi, MD, Toshiro Yoshimura, MD: Nagasaki University, School of Health Sciences

2) 長崎北病院総合リハビリテーション部

Kazuyo Nakai, RPT, Norika Toyoda, RPT: Department of Rehabilitation, Nagasaki KITA Hospital

3) 長崎記念病院リハビリテーション部

Hideki Kataoka, RPT: Department of Rehabilitation, Nagasaki Memorial Hospital

4) 井上病院リハビリテーション科

Jiro Nakano, RPT: Department of Rehabilitation, Inoue Hospital

a: 温熱負荷



b: 持続的筋伸張運動

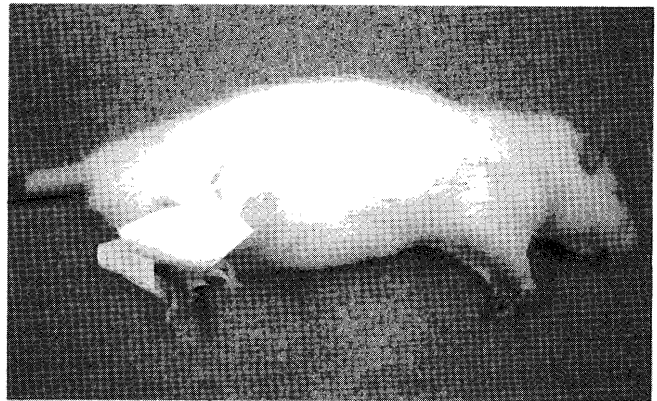


図1 温熱負荷と持続的筋伸張運動の方法

縮の進行抑制効果を筋線維タイプ別に検討した。加えて、臨床においては、温熱療法と運動療法を併用することが多いが、これらを単独で行った場合と併用した場合で効果に差があるかどうかは明らかにされていない。そこで、先行研究⁹⁻¹¹⁾において廃用性筋萎縮の進行抑制効果が認められている持続的筋伸張運動について、これを単独で行った場合と温熱負荷を併用した場合のラットヒラメ筋の廃用性筋萎縮の進行抑制効果を同様に検討した。

材料と方法

1. 実験動物

実験動物は7週齢のWistar系雄ラット30匹で、これらを対照群(Control; 以下, C群)5匹と実験群25匹に振り分けた。そして、実験群の内5匹は温熱負荷のみを行い(以下, Heat群), 残り20匹はヒラメ筋に廃用性筋萎縮を惹起させる目的で後肢懸垂法(Hindlimb suspension; 以下, HS)を行うとともに、1) HSのみの群(以下, HS群; n=5), 2) HSの過程で温熱を負荷する群(以下, HS&Heat群; n=6), 3) HSの過程で持続的筋伸張運動を負荷する群(以下, HS&Stretch群; n=5), 4) HSの過程で温熱と持続的筋伸張運動を負荷する群(以下, HS&Heat&Stretch群; n=4)に振り分けた。

なお、今回の実験は、長崎大学動物実験委員会に実験計画書を提出し、認可を受け、同委員会が定める動物実験指針に準じ、長崎大学医学部附属動物実験施設で実施した。

2. 後肢懸垂法(Hindlimb suspension, HS)

HSは、Morey¹²⁾や藤野ら¹³⁾の報告を参考に以下の方法で実施した。すなわち、独自に作製した皮製のジャケットをラットに着用させ、ジャケットの背側骨盤部にサルカンを付け、これをケージ上部に張った針金に取り付けた。そして、この実験処置により後肢を懸垂、無荷

重状態とし、この状態のまま1週間飼育した。なお、実験期間中もラットは前肢にてケージ内を移動でき、水と餌は自由に摂取させた。

3. 温熱負荷ならびに持続的筋伸張運動の方法

温熱負荷を行う各ラットには、腹腔内にペントバルビタールナトリウム(40 mg/kg)を投与し、麻酔を行った後、約42℃の温水に毎日1時間、下腹部から後肢全体を浸漬し、ヒラメ筋に温熱負荷を行った(図1-a)。また、持続的筋伸張運動を行う各ラットには、同様の方法で麻酔を行った後、毎日30分間、非伸縮性のテープで足関節を最大背屈位に保持し、ヒラメ筋を持続的に伸張した(図1-b)。なお、HS&Heat&Stretch群においては温熱負荷を行った直後に持続的筋伸張運動を実施し、麻酔による成長不良などの影響を排除するため、C群、HS群にも他の群と同様に麻酔のみを行った。

4. 検索内容

1週間の実験期間終了後は、各ラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム(40 mg/kg)を投与し、麻酔を行った後、両側ヒラメ筋を摘出した。そして、筋湿重量を測定し、右側ヒラメ筋は組織化学的分析に、左側ヒラメ筋は生化学的分析に供した。

5. 組織化学的分析

右側ヒラメ筋を筋のほぼ中央部で二分割し、トラガントガムに包埋した。包埋した試料は、液体窒素で冷却したイソペンタン液内で急速凍結し、クリオスタットを用いて6μm厚に薄切した。そして、ルーチンATPase染色(pH 10.5)を施し、筋線維をタイプI・II線維に分別した。

定量解析として、ルーチンATPase染色像を顕微鏡用デジタルカメラ(FUJI FILM HC-300Z)で撮影し、パソコン(Apple Power Machintosh 8500/180)に取り込

んだ。そして、画像解析ソフト (NIH Image Ver 1.62) を用い、一試料当たりタイプ I・II 線維の筋線維直径を各々 200 本以上計測した。

6. 生化学的分析

生化学的分析としては、Enzyme-linked immunosorbent assay (以下、ELISA) 法と Western blot 法を用いてヒラメ筋内の Hsp 70 の検出を行った。

1) ELISA 法

左側ヒラメ筋の一部を切り出した後に、その試料の筋湿重量の 50 倍容量のトリス緩衝液 (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.6) を加え、ホモジェネートした。ホモジェネート後は、4℃に設定した冷却遠心分離器を用い、遠心加速度 12,000 g の条件で 15 分間遠心分離を行い、回収した上清液を ELISA 法の試料とした⁸⁾。そして、Bradford 法にて試料中のタンパク質濃度を測定するとともに、Hsp 70 ELISA キット (Stressgen 社) を用いて、試料中の Hsp 70 含有量を測定した。具体的には、Hsp 70 抗体が固相化されたマイクロプレートに試料を 100 μ l 添加し、室温で 2 時間反応させた後に、キット付属の洗滌液で 6 回洗滌した。その後は、ビオチン標識 Hsp 70 抗体を 100 μ l 添加し、室温で 1 時間反応させ、洗滌後にペルオキシターゼ標識アビジン溶液を 100 μ l 添加し、室温で 1 時間反応させた。そして、洗滌の後にテトラメチルベンチジン溶液を 100 μ l 添加し、室温で 10 分間反応させ、発色の後にキット付属の停止液で発色を停止させ、プレートリーダー (マルチスキャン JX, Lab system 社) を用い、450 nm の波長で吸光度を測定した。また、キット付属の Hsp 70 標準液を希釈し、Hsp 70 含有量が 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 ng/ml となるように調整した後に、上記と同様の方法で吸光度を測定し、標準曲線を求めた。そして、この標準曲線を基に試料中の Hsp 70 含有量を算出し、タンパク量当りに換算した。

2) Western blot 法

切り出した左側ヒラメ筋の一部を細切りし、300 μ l の Tris 緩衝液 (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 15 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.6) を加えホモジェネートした。ホモジェネート後は、4℃に設定した冷却遠心分離器を用い、遠心加速度 12,000 g の条件で 15 分間遠心分離を行い、回収した上清液を Western blot 法の試料とした⁸⁾¹⁴⁾。Western blot 法は以下の手順で行った。すなわち、Bradford 法にて試料中のタンパク質濃度を測定し、各試料のタンパク質濃度を上記の緩衝液にて 2 μ g/ μ l に調整した。その後は、95℃で 5 分間、熱処理を行い、12.5% SDS-PAGE の各レーンに 20 μ l の試料および分子量マーカーをロードし、200 V の定電圧で 1 時間、電気泳動を行った。電気泳動後は、ニトロセ

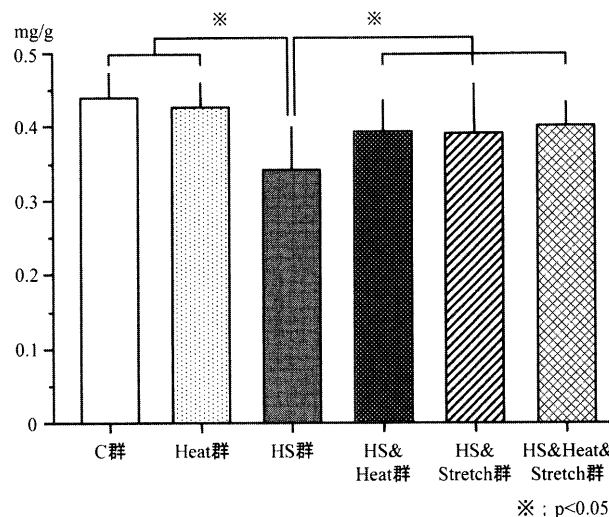


図2 相対重量比の比較

ルロース膜へ 40 V の定電圧で 70 分間、転写を行い、転写後のニトロセルロース膜は 5% スキムミルクによる非特異反応のブロッキングを室温で 1 時間行った。そして、一次抗体に抗マウス Hsp 70 モノクローナル抗体 (Stressgen 社) を用い、4℃の冷蔵庫内で一晩反応させ、洗滌後は二次抗体にペルオキシターゼ標識抗マウス IgG を用い、室温で 2 時間反応させ、洗滌した。その後は、ECL system (Amersham Bioscience 社) を用い、化学発光させ、X 線フィルムに感光、現像し、Hsp 70 のバンドを検出した。

7. 統計処理

体重あたりのヒラメ筋の筋湿重量を示す相対重量比、タイプ I・II 線維の筋線維直径、ならびに ELISA 法によって測定された Hsp 70 含有量を各群で比較するために、一元配置分散分析 (以下、ANOVA) を適用し、有意差を判定した。また、ANOVA にて有意差を認めただけの場合には、多重比較検定に Fisher の PLSD 法を適用し、2 群間の有意差を判定した。なお、すべての統計手法とも有意水準は 5% 未満とした。

結 果

1. 相対重量比の変化 (図 2)

各群の相対重量比の平均値は、C 群が 0.44 ± 0.03 、Heat 群が 0.43 ± 0.03 、HS 群が 0.34 ± 0.06 、HS&Heat 群が 0.39 ± 0.05 、HS&Stretch 群が 0.39 ± 0.07 、HS&Heat&Stretch 群が 0.40 ± 0.04 であり、ANOVA で有意差が認められた ($F_{(5, 54)} = 5.19, p < 0.01$)。そして、各群を比較すると HS 群に比べ他の 5 群は有意に大きかったが、HS&Heat 群、HS&Stretch 群、HS&Heat&Stretch 群の 3 群間には有意差は認められなかった。

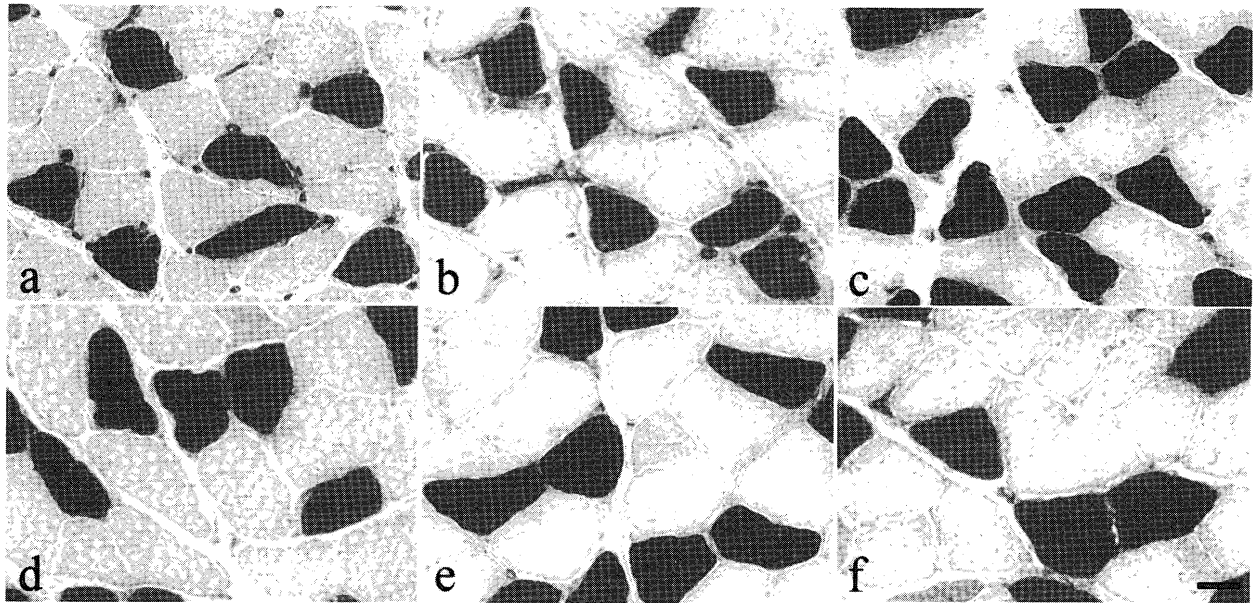
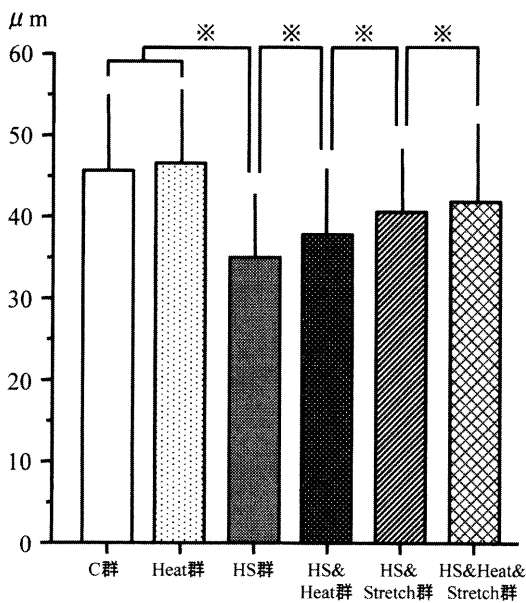


図3 ATPase 染色像
淡染した筋線維はタイプ I 線維, 濃染した筋線維はタイプ II 線維で, スケールは 50 μm を示す.
a : HS 群, b : HS&Heat 群, c : HS&Stretch 群, d : HS&Heat&Stretch 群, e : C 群, f : Heat 群

a: タイプ I 線維



b: タイプ II 線維

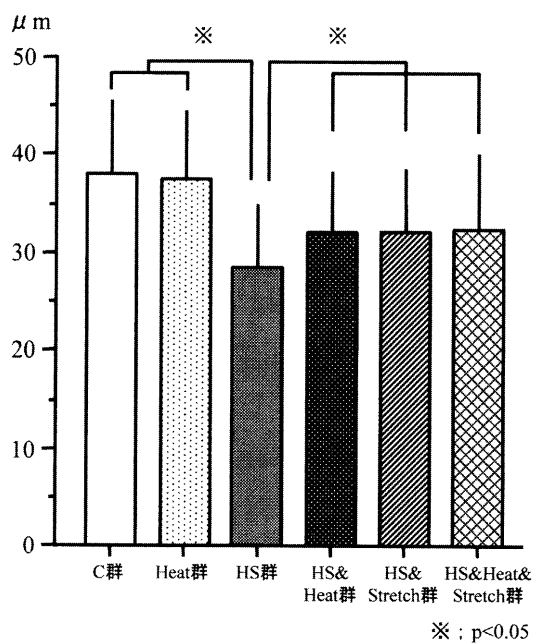


図4 平均筋線維直径の比較

2. 筋線維直径の変化 (図3, 4)

タイプ I 線維の平均筋線維直径は, C群が $45.5 \pm 9.4 \mu\text{m}$, Heat群が $46.6 \pm 9.0 \mu\text{m}$, HS群が $34.9 \pm 7.8 \mu\text{m}$, HS&Heat群が $37.7 \pm 8.1 \mu\text{m}$, HS&Stretch群が $40.7 \pm 7.8 \mu\text{m}$, HS&Heat&Stretch群が $41.8 \pm 9.9 \mu\text{m}$ であり, ANOVAで有意差が認められた ($F_{(5, 8849)} = 362.36, p < 0.01$)。そして, 各群を比較すると HS群に比べ他の5群は有意に大きく, HS&Heat群, HS&Stretch群, HS&Heat&Stretch群の3群では HS&Heat&Stretch群

が最も大きく, 次いで HS&Stretch群, HS&Heat群の順で各々の群間に有意差が認められた (図3, 4-a)。

次に, タイプ II 線維の平均筋線維直径は, C群が $38.0 \pm 7.7 \mu\text{m}$, Heat群が $37.6 \pm 7.0 \mu\text{m}$, HS群が $28.3 \pm 6.6 \mu\text{m}$, HS&Heat群が $32.0 \pm 6.2 \mu\text{m}$, HS&Stretch群が $32.0 \pm 6.5 \mu\text{m}$, HS&Heat&Stretch群が $32.4 \pm 7.7 \mu\text{m}$ であり, ANOVAで有意差が認められた ($F_{(5, 6622)} = 317.54, p < 0.01$)。そして, 各群を比較すると HS群に比べ他の5群は有意に大きかったが, HS&Heat群,

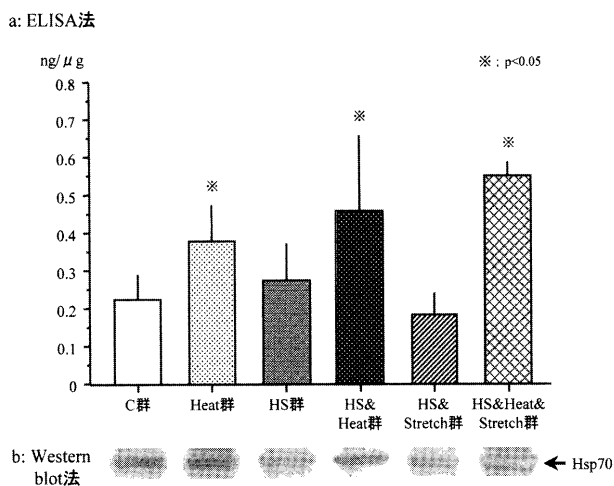


図5 Hsp 70の発現状況

HS&Stretch群, HS&Heat&Stretch群の3群間には有意差は認められなかった(図3, 4-b)。

3. Hsp 70の発現状況(図5)

ELISA法によって測定されたHsp 70含有量の平均値は, C群が 0.23 ± 0.07 ng/ μ g, Heat群が 0.38 ± 0.09 ng/ μ g, HS群が 0.27 ± 0.09 ng/ μ g, HS&Heat群が 0.46 ± 0.19 ng/ μ g, HS&Stretch群が 0.18 ± 0.06 ng/ μ g, HS&Heat&Stretch群が 0.55 ± 0.04 ng/ μ gであり, ANOVAで有意差が認められた ($F_{(5, 24)} = 7.44$, $p < 0.01$)。そして, 温熱負荷を行ったHeat群, HS&Heat群, HS&Heat&Stretch群のHsp 70含有量は, C群, HS群, HS&Stretch群のそれよりも有意に多かった(図5-a)。さらに, Western blot法で検出されたHsp 70のバンドを比較すると, Heat群, HS&Heat群, HS&Heat&Stretch群は他の3群より濃染していた(図5-b)。

考 察

日常の臨床では, 安静・臥床やギプス・装具などによる関節固定によって起こる廃用性筋萎縮をいかにして予防するかが重要である。そのため, これまでも走行運動¹⁵⁾¹⁶⁾や持続的筋伸張運動⁹⁻¹¹⁾, 荷重刺激¹⁷⁻¹⁹⁾などによる廃用性筋萎縮の進行抑制効果が実験動物モデルを用いた検索で明らかにされている。しかし, 疾病の急性期や意識混濁状態などで随意的な筋収縮が促せない時期や, 骨折後などで関節運動や荷重が許可されない時期においては, 上記のような手段を講じて廃用性筋萎縮の進行を予防することは困難な場合が多く, 他の手段を考案することが必要と思われる。

近年の先行研究では, あらかじめ筋細胞内にHsp 70を増大させておけば, その後に骨格筋損傷や廃用性筋萎縮を惹起させても, その程度は軽度であると報告されて

いる⁸⁾²⁰⁾。すなわち, Hsp 70の作用に着目すると, 理学療法の一手段である温熱療法でも廃用性筋萎縮の進行を予防できる可能性があり, このことを明らかにすることは, 新たな廃用性筋萎縮の予防手段の開発につながるものと思われる。

今回の結果から, 相対重量比ならびにタイプI・II線維の平均筋線維直径すべて, HS&Heat群はHS群に比べ有意に大きく, HS&Heat群にはHsp 70の発現が増加していた。すなわち, HS&Heat群のヒラメ筋においては, 温熱負荷によってHsp 70が誘導され, その機能である新生ポリペプチド鎖の伸張や正しい折り畳み, 損傷したタンパク質の修復などの作用⁴⁾⁵⁾が亢進していると推察される。そして, この作用によって廃用性筋萎縮の進行過程で認められるタンパク質の合成低下と分解亢進⁶⁾が抑制され, 結果的にタイプI・II線維とも廃用性筋萎縮の進行が抑制されたのではないかと考えられる。

一方, 非ストレス状態におけるラット骨格筋のHsp 70は, タイプI線維の組成に比例して発現することが明らかにされており, Hsp 70は高い酸化能力を有するタイプI線維において何らかの生理学的役割を果たしていると考えられている²¹⁾。また, 持久的運動によるラット骨格筋のHsp 70の発現は, タイプI線維を主としたヒラメ筋よりもタイプII線維を主とした長趾伸筋において顕著であることが報告されている¹⁴⁾。そのため, 温熱負荷の影響も筋線維タイプの違いによって異なるのではないかと考えられたが, 今回の結果では, タイプI・II線維ともに廃用性筋萎縮の進行抑制効果が認められた。したがって, ヒラメ筋のタイプI・II線維はともに温熱負荷によってHsp 70が発現し, タンパク質の合成・分解能に影響をおよぼしていると推測される。ただ, 今回行ったELISA法やWestern blot法では, 筋線維個々のHsp 70の発現状況は明らかではなく, 今後は免疫組織化学染色などによる検索も必要と思われる。また, 筋線維タイプ構成が異なる骨格筋に対する温熱負荷の影響も明らかではないことから, 今後はこの点についての検討も必要と考える。

次に, 温熱負荷と持続的筋伸張運動の影響を比較すると, タイプI線維の平均筋線維直径はHS&Heat&Stretch群が最も大きく, 次いでHS&Stretch群, HS&Heat群の順で, 各々の群間に有意差が認められた。したがって, タイプI線維の廃用性筋萎縮の進行抑制効果は, 温熱負荷よりも持続的筋伸張運動が著しく, 両者を併用した方がより著しいと推測される。

持続的筋伸張運動が廃用性筋萎縮の進行抑制に効果的であることは, すでに諸家により報告されている⁹⁻¹¹⁾。そして, このメカニズムとしては, 機械的伸張刺激によってもたらされる張力が遺伝子発現とリボゾームにおけ

る翻訳を促し、加えて、筋細胞の成長因子であるインシュリン様成長因子1や線維芽細胞成長因子などの発現も促すため、タンパク質合成が促進されると考えられている²²⁻²⁴⁾。したがって、タイプI線維の廃用性筋萎縮の進行抑制には、Hsp 70の作用よりも機械的伸張刺激の作用が有効であると考えられる。また、今回の結果から、温熱負荷と持続的筋伸張運動を併用した方法は、Hsp 70の作用と機械的伸張刺激の作用の相乗効果が期待できるため、これらを単独で行った場合より効果的であると推察される。

一方、タイプII線維の平均筋線維直径は、HS&Heat群、HS&Stretch群、HS&Heat&Stretch群の3群間に有意差は認められず、この結果が反映し、相対重量比にも有意差が認められなかったと思われる。したがって、タイプII線維に対しては、温熱負荷や持続的筋伸張運動を単独で行っても、両者を併用しても廃用性筋萎縮の進行抑制効果には大差はないと考えられる。このように、今回の結果では、タイプI線維とタイプII線維では持続的筋伸張運動、ならびに温熱負荷と持続的筋伸張運動を併用した場合の効果は異なっていた。そして、この要因としては、筋線維タイプの違いによって機械的伸張刺激に対する反応性が異なることが影響しているのではないかと考えられるが、詳細については不明であり、今後の検討課題である。

以上のことから、温熱負荷は廃用性筋萎縮の進行抑制に効果的であることが示唆された。そして、これは随意的な筋収縮が促せない時期や、関節運動や荷重が許可されない時期においても実施可能な手技であり、今後は臨床応用についても検討していきたい。

文 献

- 1) 岩倉博光, 吉田清和: 温熱・寒冷療法の現況. 理学療法 1: 163-167, 1984.
- 2) 神沢信行, 岩田由明: 温熱療法. 理学療法ハンドブック第2版, 細田多穂, 柳澤 健(編), 協同医書, 1995, pp1085-1105.
- 3) 後藤勝正, 吉岡利忠: 筋増量のメカニズム. PTジャーナル 35: 385-394, 2001.
- 4) 内藤久士: 身体活動とストレス蛋白質. 日本臨床 58 (2000年増刊号): 97-101, 2000.
- 5) Locke M: The cellular stress response to exercise: role of stress proteins. Exerc Sport Sci Rev 25: 105-136, 1997.
- 6) Thomason DB, Biggs RB, *et al.*: Protein metabolism and β -myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 257: R300-R305, 1989.
- 7) Ku Z, Thomason DB: Soleus muscle nascent polypeptide chain elongation slow protein synthesis rate during non-weight-bearing activity. Am J Physiol Cell Physiol 267: C115-C126, 1994.
- 8) Naito H, Powers SK, *et al.*: Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. J Appl Physiol 88: 359-363, 2000.
- 9) 山崎俊明, 立野勝彦・他: 麻酔下における短時間伸張位保持がラットの廃用性筋萎縮予防に及ぼす影響. PTジャーナル 29: 135-138, 1995.
- 10) Yamazaki T, Tachino K, *et al.*: Effect of short duration stretching for prevention of disuse muscle atrophy in mature rats. 理学療法学 23: 349-354, 1996.
- 11) 佐伯 彩, 沖田 実・他: 弛緩位ならびに伸張位での固定がラットヒラメ筋におよぼす影響. 理学療法学 27: 63-68, 2000.
- 12) Morey ER: Spaceflight and bone turnover; correlation with a new model of weightlessness. Bioscience 29: 168-172, 1979.
- 13) 藤野英己, 武田 功・他: 関節運動に伴うラットヒラメ筋メカノレセプターの活動と筋萎縮による活動変化. 理学療法学 27: 139-144, 2000.
- 14) 内藤久士, 小林裕幸・他: 持久的トレーニングが若齢および老齢ラット骨格筋の熱ショックタンパク質の発現に及ぼす影響. 順天堂医学 46: 203-210, 2000.
- 15) Herbert ME, Roy RR, *et al.*: Influence of one-week hindlimb suspension and intermittent high load exercise on rat muscles. Exp Neurol 102: 190-198, 1989.
- 16) 灰田信英: マウスヒラメ筋の廃用性萎縮の病態ならびに運動負荷効果に関する研究. 十全医会誌 99: 1050-1067, 1990.
- 17) Brown M, Hasser EM: Weight-bearing effects on skeletal muscle during and after simulated bed rest. Arch Phys Med Rehabil 76: 541-546, 1995.
- 18) 山崎俊明: ラットの廃用性筋萎縮に対する荷重刺激の効果. 理学療法学 23: 417-420, 1996.
- 19) Alley KA, Thompson LV: Influence of simulated bed rest and intermittent weight bearing on single skeletal muscle fiber function in aged rats. Arch Phys Med Rehabil 78: 19-25, 1997.
- 20) Garramone RR Jr, Winters RM, *et al.*: Reduction of skeletal muscle injury through stress conditioning using the heat-shock response. Plast Reconstr Surg 93: 1242-1247, 1994.
- 21) Locke M, Noble EG, *et al.*: Inducible isoform of HSP 70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. Am J Physiol 261: C774-C779, 1991.
- 22) Locke M, Atinson BG, *et al.*: Shifts in type I fiber proportion in rat hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP 72 content. Am J Physiol 266: C1240-C1246, 1994.
- 23) Goldspink DF: The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. J Physiol 264: 267-282, 1977.
- 24) Perrone CE, Fenwick-Smith D, *et al.*: Collagen and stretch modulate autocrine secretion of insulin-like growth factor-I and insulin growth factor binding protein from differentiated skeletal muscle cell. J Biol Chem 270: 2099-2106, 1995.
- 25) Yang S, Aluaqeb M, *et al.*: Change in muscle fiber type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. J Anat 190: 613-622, 1997.
- 26) 山崎俊明, 立野勝彦・他: ラットヒラメ筋の廃用性萎縮に及ぼす筋伸張位保持時間の影響. PTジャーナル 33: 834-835, 1999.

〈Abstract〉

Effects of Heat Stress on Prevention of Disuse Muscle Atrophy in Rat Soleus Muscle

Minoru OKITA, RPT, Tomoki ORIGUCHI, MD, Toshiro YOSHIMURA, MD
Nagasaki University, School of Health Sciences

Kazuyo NAKAI, RPT, Norika TOYODA, RPT
Department of Rehabilitation, Nagasaki KITA Hospital

Hideki KATAOKA, RPT
Department of Rehabilitation, Nagasaki Memorial Hospital

Jiro NAKANO, RPT
Department of Rehabilitation, Inoue Hospital

It is known that heat stress induces expression of heat shock protein 70 (Hsp 70) in myocytes. Hsp 70 plays an important role in chaperoning nascent peptides during translation, and it has been assumed that the elevation of cellular Hsp 70 levels can serve as a countermeasure to attenuate the disuse-induced reduction in protein synthesis. We therefore investigated the effects of heat stress, prolonged stretching, and heat stress combined with prolonged stretching on prevention of disuse muscle atrophy in rat soleus (SOL) muscle. Thirty Wistar rats were divided randomly into the control (Con, n=5), heat stress (Heat, n=5), hindlimb suspension (HS, n=5), HS and heat stress (HS&Heat, n=6), HS and prolonged stretching (HS&Stretch, n=5), and HS and heat stress combined with prolonged stretching (HS&Heat&Stretch, n=4) groups. Disuse muscle atrophy was induced by hindlimb unweighting for 7 days. Each rat in the Heat, HS&Heat, and HS&Heat&Stretch groups was anesthetized, and bilateral hindlimbs were immersed daily in hot water (42 °C) for 60 min during HS. In HS&Stretch and HS&Heat&Stretch groups, both soleus muscles underwent prolonged stretching daily for 30 min during HS. At the end of the experimental period, the SOL muscles were extracted and weighed. Frozen sections were stained with myofibrillar adenosin triphosphatase (pH 10.5), and muscle fiber diameters of each fiber type were measured. To determine the levels of Hsp 70 in muscular tissue, we performed an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blotting methods. The weight of the SOL muscles relative to body weight for the HS&Heat, HS&Stretch, and HS&Heat&Stretch groups increased significantly compared with the HS group. The mean muscle fiber diameter of type I and II for the HS&Heat, HS&Stretch, and HS&Heat&Stretch groups increased significantly compared with the HS group. HSP 70 levels were significantly greater in the Heat, HS&Heat, and HS&Heat&Stretch groups compared with the Con, HS, and HS&Stretch groups. Our results suggest that the progression of disuse muscle atrophy can be attenuated by heat or stretch, and this mechanism is related to the expression of Hsp 70 or mechanical stretch in myocytes.

〈コメント〉

従来より筋伸張は廃用性筋萎縮の進行に抑制効果があることは認められているが、本研究では温熱負荷が廃用性筋萎縮に対し予防効果があることを見いだすと共にその効果の要因である Heat shock protein 70 (Hsp 70) を実験的に同定することが出来たことは温熱の新たな臨床適用が増したことになり極めて意義深い。

今後は温熱負荷の廃用性筋萎縮抑制効果を臨床的に確

認することや温熱媒体や適用時間、適用温度による効果の比較、著者も述べているように筋線維タイプの相違による温熱や筋伸張刺激による影響の違いの原因などをさらに究めていただきたい。またEBM・EBPが叫ばれる今日このような治療効果のメカニズムに寄与する基礎的研究がさらに切望される。

(研究開発部)