

理学療法基礎系専門領域研究部会

筋萎縮に対する熱刺激を利用した新たなトレーニング方法の提案 —動物実験より*

片岡英樹¹⁾²⁾ 中野治郎²⁾
坂本淳哉¹⁾ 沖田 実³⁾

はじめに

高齢者では、健常な者でも筋肉量の減少や筋力低下、筋持久力低下による筋機能の低下が起こり、近年、このような高齢者の状態はサルコペニア（骨格筋減少症）として概念が整理されている¹⁾²⁾。小蘭³⁾によれば、サルコペニアの発生機序は、末梢神経支配の減退、筋タンパク合成能の低下、生体全体のホルモンの影響、アミノ酸などの筋タンパク合成基質の供給減少、呼吸循環系の衰え、の5つに大別できるとしている。また、Kamelの報告⁴⁾にある多変量解析の結果では、サルコペニアに関連する因子として、活動性の低下、低栄養、炎症性サイトカインの増加、酸化ストレス、成長ホルモンと性ホルモンの5つが抽出されている。そして、この5因子の中で、活動性の低下はわれわれ理学療法士が臨床の場で治療対象とすることの多い高齢障害者にしばしば認められる現象である。すなわち、高齢者が疾病や外傷などにより安静臥床や不活動状態を強いられ、筋活動が低下した状態になると廃用性筋萎縮が発生し、これはサルコペニアの進展を加速する因子と考えられている。また、高齢障害者はサルコペニアに廃用性筋萎縮が加味された筋機能の低下を招いていると推測され、単なる廃用性筋萎縮よりも筋肉量の減少や筋力低下は著しいものになっていると予想される。われわれ理学療法士はこのような高齢障害者を治療対象とする機会が非常に多いが、臨床的な経験では若壯年の障害者よりも筋力の改善などに多くの時間を費やすことも少なくない。つまり、このこともサルコペニアが影響していると考えられ、従来のトレーニング法のみでは対応できていない可能性がある。ただ、高齢障害者においても、生じている廃用性筋萎

縮は回復可能な可逆的変化であり²⁾、これをいかに予防し、できるだけ早期に回復させ得るかが高齢障害者の筋機能の改善策として重要であり、サルコペニアの進展を抑える意味でも大切と思われる。

これまで、廃用性筋萎縮に対しては、レジスタンストレーニング⁵⁾⁶⁾や、トレッドミル走行⁷⁾⁸⁾といった運動負荷、あるいは荷重刺激⁹⁾¹⁰⁾などが有効であることが動物実験と臨床研究の両方で報告されている。しかし、われわれが臨床で遭遇する高齢障害者に対して、これらの運動負荷方法を早期から適用することは困難な場合が多く、廃用性筋萎縮の治療方法としては運動負荷以外の方法の開発も求められている。

熱刺激を利用した新たな廃用性筋萎縮の予防方法

運動負荷以外の方法で近年、廃用性筋萎縮の予防に効果が見いだされたものとしては熱刺激を用いた方法があり、このメカニズムには、熱刺激によって筋細胞内に発現するHeat Shock Protein（以下、HSP）72と呼ばれるタンパク質の働きが関与しているとされている。すなわち、HSP72とは、熱などの様々なストレスによって細胞内に発現するストレスタンパク質の一種で、タンパク質の合成促進や変性したタンパク質の修復といった分子シャペロン機能を備えるものである。そして、この分子シャペロン機能に着目すると廃用性筋萎縮の発生を軽減する可能性があり¹¹⁾¹²⁾、この点についていち早く検討したNaitoら¹¹⁾の報告によれば、ラットの全身に60分間、約42度の熱刺激を負荷し、その後8日間の後肢懸垂法（Hindlimb Suspension：以下、HS）を実施した群は、HSのみを実施した群よりもヒラメ筋内のHSP72含有量が増加し、筋重量の減少も抑制されていたとしている。また、われわれもこれまでNaitoらの報告¹¹⁾を参考に、熱刺激によるラット骨格筋の廃用性筋萎縮の進行抑制効果を組織化学的、生化学的に検討してきた。その結果、1週間のHSの過程において毎日60分間、約42度の温水浴によって後肢骨格筋に熱刺激を負荷すると、ヒラメ筋のタイプI・II線維、長指伸筋のタイプI・IIA線維は筋線維萎縮の進行が抑制され、両筋ともにHSP72含有量の増加が認められた¹²⁾。

* New Method of Training to Attenuate Muscle Atrophy Using Heat Stress; From a View of Experiment with Animal Model

1) 長崎記念病院リハビリテーション部
(〒851-0301 長崎県長崎市深堀町1-11-54)

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

2) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 理学・作業療法学講座

Jiro Nakano, RPT, PhD: Division of Physical Therapy and Occupational Therapy Sciences, Graduate School of Health Sciences, Nagasaki University

3) 西九州大学リハビリテーション学部

Minoru Okita, RPT, PhD: Faculty of Rehabilitation, Nishikyushu University

キーワード：加齢、廃用性筋萎縮、熱刺激

加齢が熱刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果におよぼす影響

熱刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果を検討した報告は散見されるが、われわれの先行研究も含めこれまでの報告はすべて若齢ラットが対象に用いられており、加齢の影響は明らかにされていない。一方、Locke¹³⁾は、老齢ラットの骨格筋においても成熟ラットと同様に熱刺激によってHSP72の発現増加が認められたと報告している。つまり、この結果から考えると、高齢者の廃用性筋萎縮の進行抑制に対しても熱刺激の効果が期待できる。そこで今回、7週齢の若齢ラットと60週齢の加齢ラットを対象に用い、加齢が熱刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果におよぼす影響を検討した。

1. 材料と方法

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承認を受けた後、同委員会が定める動物実験指針に基づき長崎大学先導生命科学研究センター比較動物医学分野において実施した。

1) 実験動物

実験動物には7週齢のWistar系雄ラット（以下、若齢ラット）9匹と60週齢のWistar系雄ラット（以下、加齢ラット）9匹を用い、若齢・加齢ラットそれぞれを無処置のままの対照群3匹と実験群6匹に無作為に振り分けた。実験群の各ラットは、腓腹筋に廃用性筋萎縮を惹起させる目的で、両側足関節を最大底屈位の状態でギブス固定し、腓腹筋を弛緩位で不動化した。そして、実験群はさらに固定のみの群（以下、固定群）3匹と、固定期間中に熱刺激を負荷する群（以下、固定+熱刺激群）3匹に振り分けた。ギブス固定は2週間継続して行い、ギブスの緩みや浮腫が発生した際には適宜ギブスを巻き替えた。なお、ラットは前肢にて飼育ケージ内を移動可能で、餌と水は自由摂取とした。

2) 熱刺激の負荷方法

固定+熱刺激群の各ラットには、ギブス固定開始直前、ギブス固定3日目、6日目、9日目、12日目において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。そして、約42度に設定した温水浴内に60分間、ラットの後肢全体を浸漬することで熱刺激を負荷した。また、麻酔による成長不良などの影響を考慮し、若齢・加齢ラットそれぞれの対照群、固定群にも同期間、同頻度で麻酔のみを行った。なお、熱刺激の頻度の設定はOishiら¹⁴⁾の報告を参考にした。すなわち、この報告によれば腓腹筋内のHSP72発現量は熱刺激から48時間後までは増加し、その後は低下し続け、60時間後には通常状態に戻るとされている。したがって、HSP72発現量が熱刺激前の状態に戻ると考えられる3日目に再度熱刺激を負荷することで腓腹筋内のHSP72発現量を増加した状態に維持できると考えた。

3) 材料採取と検索方法

実験期間終了後は、全ての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。そして、両側の腓腹筋内側頭を採取し、以下の検索材料に供した。

①組織化学的検索

筋試料の一部は、トラガントガムに包埋後、液体窒素で冷却したイソペンタン液内で急速凍結した。そして、クライオスリットを用いて、6 μm厚の連続横断切片を作製し、酸性前処置ならびにアルカリ前処置（pH 4.5, pH 10.5）によるミオシンATPase染色を施し、腓腹筋をタイプI・II A・II B線維に分別した。定量解析としては、ミオシンATPase染色像を顕微鏡用デジタルカメラ（FUJI FILM HC-300Z）で撮影し、パソコン用コンピューターに取り込んだ。そして、画像解析ソフト（Scion Image）を用い、各タイプの筋線維直径を1筋につき各々100本以上計測した。

②生化学的検索（Western Blot法）

筋試料の一部は細切りし、トリス緩衝液（10 mM Tris, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.6）を加えてホモジエネートした。ホモジエネート後は、4°C、遠心加速度12000 gの条件で15分間遠心分離を行い、上清液を回収、タンパク質濃度を1 mg/mlに調整し、Western Blot法の試料とした。そして、沖田ら¹⁵⁾の方法に従ってWestern Blot法を行い、HSP72のバンドを検出した。検出したバンドの濃度はコンピューターにて数値化し、対照群の平均値を100%としてそれに対する各群の割合を算出した。

4) 統計処理

各タイプの筋線維直径、ならびにHSP72含有量を若齢ラット、加齢ラットの各群で比較するため一元配置分散分析（以下、ANOVA）を適用し、有意差を判定した。そして、ANOVAにて有意差を認めた場合には、多重比較検定にBonferroni/Dunn法を適用し、2群間の比較を行った。なお、すべての統計手法とも有意水準は5%未満とした。

2. 結果

1) 筋線維直径の比較

ミオシンATPase染色像をみると、若齢ラット、加齢ラットとも、固定群はすべてのタイプの筋線維が対照群のそれより縮小し、筋線維萎縮の発生が認められた。また、固定+熱刺激群は固定群よりも筋線維径が大きい傾向が認められた（図1）。

次に、平均筋線維直径を比較すると、若齢ラット、加齢ラットとも、すべての筋線維タイプにおいて対照群に比べ固定群、固定+熱刺激群は有意に低値を示し、固定群と固定+熱刺激群を比較すると固定+熱刺激群が有意に高値を示した（表1）。

2) HSP72含有量の比較（図2）

若齢ラット、加齢ラットとともにWestern Blot法で検出されたHSP72のバンド像を各群で比較すると、固定+熱刺激群は対照群や固定群より濃染していた。そして、各群のHSP72含有量を比較すると、若齢ラット、加齢ラットともに対照群と固定群の間には有意差を認めず、固定+熱刺激群は対照群、固定群より有意に高値を示した。

3. 考察

今回の結果から、若齢ラット、加齢ラットともに固定+熱刺激群のHSP72含有量は、対照群や固定群のそれより有意に高値で、本実験で用いた熱刺激の条件や頻度でもHSP72の発現

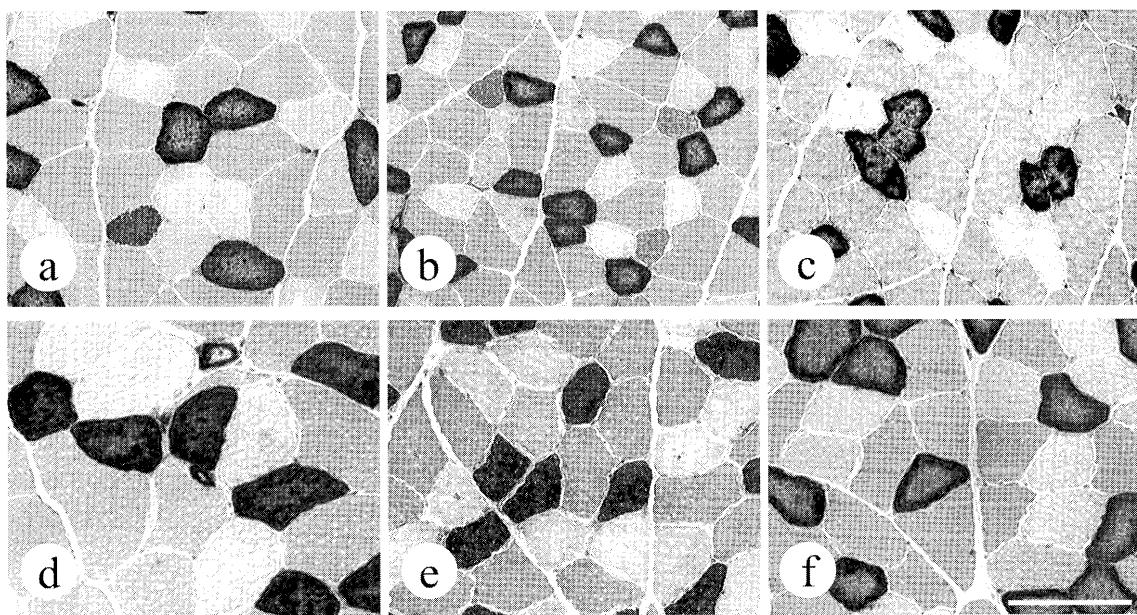


図1 ATPase染色像

濃染した筋線維はタイプI線維、淡染した筋線維はタイプII A線維、中間色の線維はタイプII B線維で、スケールは100 μmを示す。
上段は若齢ラット（a：対照群、b：固定群、c：固定+熱刺激群）、下段は加齢ラット（d：対照群、e：固定群、f：固定+熱刺激群）のATPase染色像を示す。

表1 筋線維直径の結果

	対照群	熱刺激群	固定+熱刺激群
筋線維直径 (μm)			
若齢ラット			
タイプI線維	37.5 ± 7.6	26.9 ± 5.5 ^a	28.3 ± 5.6 ^{a,b}
タイプII A線維	37.7 ± 6.2	27.8 ± 4.7 ^a	29.9 ± 5.4 ^{a,b}
タイプII B線維	43.3 ± 9.1	33.5 ± 6.8 ^a	35.3 ± 7.9 ^{a,b}
加齢ラット			
タイプI線維	45.6 ± 8.9	36.7 ± 7.1 ^a	42.5 ± 7.8 ^{a,b}
タイプII A線維	48.0 ± 8.9	38.5 ± 7.5 ^a	44.2 ± 7.9 ^{a,b}
タイプII B線維	55.0 ± 11.7	44.0 ± 9.2 ^a	47.1 ± 10.2 ^{a,b}

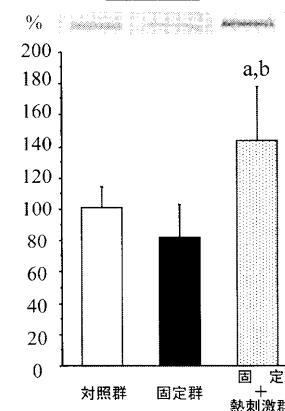
平均値±標準偏差。

^a；対照群との有意差、^b；固定群との有意差。

増加が認められた。先行研究では、肺や皮膚などの組織は加齢に伴い熱刺激によるHSP72の発現増加が少なくなると報告されている¹⁶⁾。しかし、今回の結果やLocke¹³⁾の報告を参考にすると骨格筋は加齢の影響をあまり受けず、熱刺激によるHSP72の発現増加といった応答性は老齢期においても若壮年期と同様の反応を示す可能性が高いと思われる。

次に、若齢ラット、加齢ラットともに固定+熱刺激群の各タイプの平均筋線維直径は固定群のそれより有意に高値を示し、熱刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果が認められた。つまり、このことは熱刺激の負荷により筋細胞内にHSP72が誘導され、これが持つ分子シャペロン機能、すなわち、タンパク質合成の促進作用や変性タンパク質の修復作用¹¹⁾などによって廃用性筋萎縮の進行抑制が図られたものと推察される。そして、今回の結果から、熱刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果は加齢の影響をあまり受けず、熱刺激は高齢障害者の廃用性筋萎縮の予防方法として有用である可能性が示唆された。

若齢ラット



加齢ラット

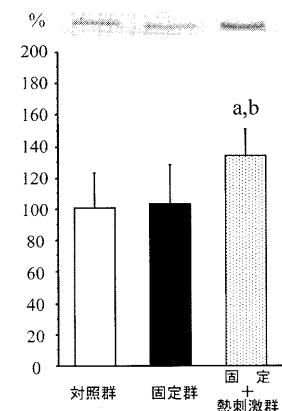


図2 HSP72の発現状況 (western blot法)

平均値±標準偏差。

^a；対照群との有意差、^b；固定群との有意差

サルコペニア対策としての熱刺激の可能性

熱刺激の効果としては、廃用性筋萎縮の予防だけでなく、運動負荷に伴う乳酸の蓄積を抑え、運動耐久性の向上につながることも報告されている¹⁷⁾。また、この点に関する具体的な事例として2002年のソルトレーク冬季オリンピックのクロスカントリースキーにおいて、熱刺激を負荷した2日～3日後に試合に臨んだ選手はオリンピック直前のワールドカップより好成績を上げたと報告されている¹⁷⁾。

一方、サルコペニアの関連因子の1つとして酸化ストレスがあげられるが³⁾、この酸化ストレスは加齢だけでなく、運動や骨格筋の不活動によっても上昇することが報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。そして、Selsbyら²⁰⁾は、事前に熱刺激を負荷し、筋細胞内にHSP72を発現させておけば、骨格筋の不活動による筋細胞内の酸化ストレスの発生を抑えることが可能であると報告している。

以上のように、今回のわれわれの結果や上記の先行研究の結果をあわせて考えると、サルコペニア対策としても熱刺激の可能性が推察される。すなわち、毎日の筋力トレーニングを中心とした運動療法プログラムに加えて、2日～3日に1度の頻度で熱刺激を負荷し、HSP72の発現を増加させておけば、乳酸の蓄積減少による運動能力と耐久性の向上が期待でき、酸化ストレスの発生も抑えることができ、筋の喪失抑制と筋肥大促進効果が期待できるのではないかと考えられる。

おわりに

今回、筋萎縮に対する熱刺激を利用した新たなトレーニング方法の提案に関する話題提供を行ったが、われわれの検討はまだ動物実験の段階である。また、最後に示したサルコペニア対策としての熱刺激の可能性についても仮説の域を脱していない。したがって、今後もさらに基礎的・臨床的検討の積み重ねが必要であると思われる。

文 献

- 1) 池田 聰、川平和美：高齢化と筋肉・筋力の運動生理。総合リハ 34: 7-11, 2006.

- 2) 石川愛子、長谷公隆・他：Disuse syndrome（廃用症候群）と Sarcopenia. Geriat Med 42: 895-902, 2004.
- 3) 小齒康範：Sarcopeniaの発生起序. Geriat Med 42: 889-893, 2004.
- 4) Kamel HK: Sarcopenia and aging. Nutrition Reviews 61: 157-167, 2003.
- 5) Schulze K, Gallagher P, et al.: Resistance training preserves skeletal muscle function during unloading in humans. Med Sci Sports Exerc 34: 303-313, 2002.
- 6) Fluckey JD, Dupont-Versteegden EE, et al.: A rat resistance exercise regimen attenuates losses of musculoskeletal mass during hindlimb suspension. Acta Physiol Scand 176: 293-300, 2002.
- 7) Kannus P, Jozsa L, et al.: Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. J Appl Physiol 84: 1418-1424, 1998.
- 8) Graham SC, Roy RR, et al.: Effects of periodic weight support on medial gastrocnemius fibers of suspended rat. J Appl Physiol 67: 945-953, 1989.
- 9) Brown M, Hasser EM: Weight-bearing effects on skeletal muscle during and after simulated bed rest. Arch Phys Med Rehabil 76: 541-546, 1995.
- 10) 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.
- 11) Naito H, Powers SK, et al.: Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. J Appl Physiol 88: 359-363, 2000.
- 12) 片岡英樹、沖田 実・他：熱負荷によるラット骨格筋の廃用性筋萎縮の進行抑制効果について. 理学療法学 31: 331-336, 2004.
- 13) Locke M: Heat shock transcription factor activation and Hsp72 accumulation in aged skeletal muscle. Cell Stress & Chaperones 5: 45-51, 2000.
- 14) Oishi Y, Taniguchi K, et al.: Differential response of HSPs to heat stress in slow and fast regions of rat gastrocnemius muscle. Muscle Nerve 28: 587-594, 2003.
- 15) 沖田 実、中居和代・他：廃用性筋萎縮の予防方法としての熱負荷の影響に関する研究. 理学療法学 31: 63-69, 2004.
- 16) 東 藍：高齢者のストレス応答. 臨床検査 45: 371-376, 2001.
- 17) 田澤賢次、小川耕平・他：生態外部刺激による熱ショックタンパク質の生体防御. 生体物理刺激と生体防御. 大森豊明（監），フジ・テクノシステム，2004, pp733-740.
- 18) Powers SK, Criswell D, et al.: Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. Am J Physiol 266: R375-R380, 1994.
- 19) Ji LL, Dillon D, et al.: Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. Am J Physiol 258: 918-923, 1990.
- 20) Selsby T, Dodd L: Heat treatment reduces oxidative stress and protects muscle mass during immobilization. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289: R134-R139, 2005.