

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01619

研究課題名(和文) どのような温熱刺激が低頻度疲労の軽減に有効か？

研究課題名(英文) The effects of thermal pretreatment on recovery of low frequency fatigue

研究代表者

和田 正信 (Wada, Masanobu)

広島大学・総合科学研究科・教授

研究者番号：80220961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 激しい筋収縮後、最大下張力が大きく低下する現象は低頻度疲労と呼ばれる。本研究の目的は、事前に筋を温める処置(温熱刺激処置)によって、低頻度疲労が軽減されるか否かおよび低頻度疲労からの回復が促進されるか否かを検討することであった。ラットを用いた実験から、以下の結果を得た。1)温熱刺激処置を施しても、低頻度疲労の程度は軽減されないが、疲労の回復は促進される。2) その原因は、疲労誘因性収縮によって低下した筋小胞体のカルシウム放出機能の回復が早まることにある。これらのことから、温熱刺激処置を行うことによって、スポーツ活動などによって起こる筋パフォーマンスの低下を抑制できることが示唆される。

研究成果の概要(英文)： Low frequency fatigue (LFF) is characterized by larger depressions in submaximal force than in maximal force. The aim of this study was to examine the effects of thermal pretreatment on LFF in rat fast-twitch muscles. The present results reveal that thermal pretreatment can facilitate recovery of LFF, which is mediated via a quick return of calcium release of sarcoplasmic reticulum to resting levels. These findings suggest that thermal pretreatment exerts beneficial effects, such as the restoration of muscle performance after physical activity.

研究分野：筋生理・生化学

キーワード：筋疲労 筋小胞体 カルシウム調節能 温熱処置 骨格筋

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 低頻度疲労とは

筋疲労とは、強度の高い筋収縮を行った結果、筋が発揮する張力が低下する現象を指す。疲労した筋において、高頻度刺激で誘起される張力と低頻度で誘起される張力とを比較すると、通常後者の方がその低下率が大きい。このような筋疲労を「低頻度疲労」と呼ぶ (Allen et al. 2008)。

### (2) 低頻度疲労の要因

本研究室で行ってきたこれまでの研究から、1) 低頻度疲労の要因は、筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum: SR) の  $Ca^{2+}$  放出機能および筋原線維の  $Ca^{2+}$  感受性の両方の低下にあること、2) これらの変化に細胞内の酸化・還元状態の変化が関与していることが明らかになった (Watanabe & Wada 2016)。酸化・還元状態は多くの要因によって変化するが、事前に筋を温めること (温熱刺激処置) によって、筋細胞内で生ずる酸化ストレスが緩和されることが、先行研究によって示されている (Tamura et al. 2015)。

これらのことから、温熱刺激処置によって、低頻度疲労が緩和されることが考えられるが、この点について検討した報告はなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、事前に温熱刺激を施すことによって、低頻度疲労が軽減されるか否かおよび低頻度疲労からの回復が促進されるか否かを、SR の機能に着目して検討することであった。

## 3. 研究の方法

### (1) 温熱刺激処置

本研究は、広島大学動物実験委員会の承認を得た後、実施した。実験には Wistar 系雄性ラットを用いた。これらを温熱刺激処置を施す H (heat-treated) 群と施さない Non (non-treated) 群に分けた。本研究では、ラットの下肢を 42 度の温水に 20 分間浸漬する処置を温熱刺激処置とした。なお、温熱刺激処置は、麻酔下にて実施した。H 群には、疲労誘因性収縮刺激 (fatiguing stimulation: FS; 下記参照) を実施する 5 日前から、この処置を 1 日 1 回、計 5 回行った。

H 群および Non 群を FS 直後に解剖する REC (recovery) 0 群と 60 分後に解剖する REC60 群に細分した。また、収縮を负荷した脚を S (stimulated) 群、负荷しなかった脚を R (rested) 群とした。

### (2) 疲労誘因性収縮刺激

FS は、5 回目の温熱刺激終了 24 時間後に実施した。ラットを麻酔下にて仰臥位に置き、左脚を張力系と連結したフットホルダーに固定した。左坐骨神経に電極を取り付け、電気刺激により腓腹筋の収縮を誘起し

た (Fig. 1)。

1 回の刺激時間は 0.35 秒 (70 Hz) とし、この刺激を 2 秒に 1 回、張力が初期値の 50% になるまで続けた。なお、FS の前後で、最大等尺性収縮力を測定した。

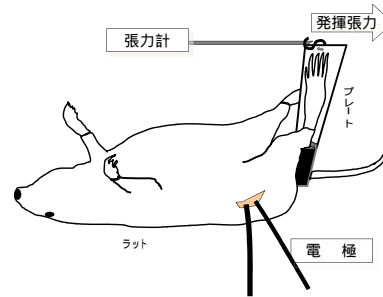


Fig. 1. Schematic diagram of fatiguing stimulation.

### (3) 生化学的分析

分析には腓腹筋表層部を用いた。これらをガラスホモジナイザーで均等化し、ウェスタンブロット法で、筋に含まれるヒートショックプロテイン (heat shock protein: HSP) 70、HSP25 および  $\alpha B$ -crystallin の量を測定した。

### (4) スキンドファイバーを用いた分析

腓腹筋表層部をパラフィンオイルに置き、顕微鏡下でメカニカルスキンドファイバーを作製した。分析項目は、活動電位誘因性張力、脱分極誘因性張力、 $Ca^{2+}$  誘因性最大張力、筋原線維の  $Ca^{2+}$  感受性であった。

## 4. 研究成果

### (1) 最大等尺性収縮力 (全筋)

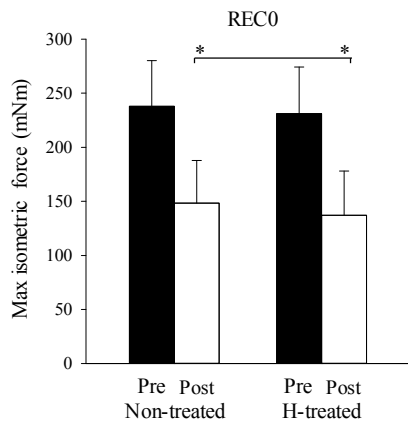
FS において、張力が初期値の 50% に低下するまでの時間には、4 群間で差異は認められなかった。REC0 における FS 前に対する FS 後の最大等尺性収縮力の比は、Non 群では 63%、H 群では 59% であった (Fig. 2)。また、REC60 においては、Non 群では 93%、H 群では 90% であり (Fig. 3)、REC0、REC60 とともに、FS による低下が認められた (主効果)。しかしながら、温熱刺激処置による効果は観察されなかった。

### (2) ヒートショックプロテイン

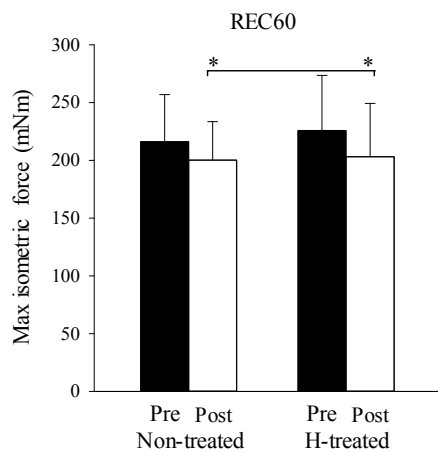
ヒートショックプロテインの量には、測定した 3 種類全てで、REC0、REC60 とともに、FS による変化も温熱刺激処置による変化も認められなかった。

### (3) 活動電位誘因性張力 (スキンドファイバー)

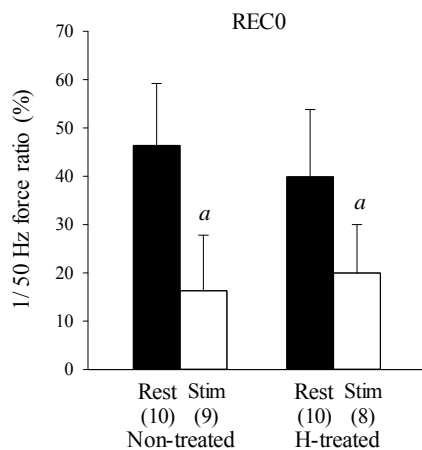
活動電位誘因性張力は、1 Hz と 50 Hz の電気刺激頻度で測定し、50 Hz の張力に対する 1 Hz の張力の比 (1/50 比) を算出した。REC0 における 1/50 比は、Non 群、H 群ともに R 脚に対して S 脚で有意な低値が認められた (Fig. 4)。REC60 においては、Non 群では R 脚に対して S 脚で有意な低値が観察されたが、H 群では差異は示されなかった (Fig. 5)。



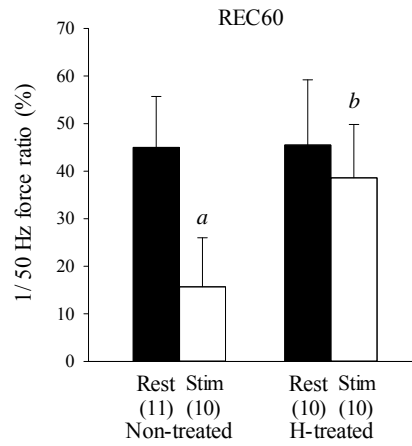
**Fig. 2. Effects of fatiguing stimulation and heat treatment on maximum isometric force in whole muscle at REC0.** Values are means + SD (N = 8 for each muscle). \* $P < 0.05$ , significant main effect for stimulation (pre > post).



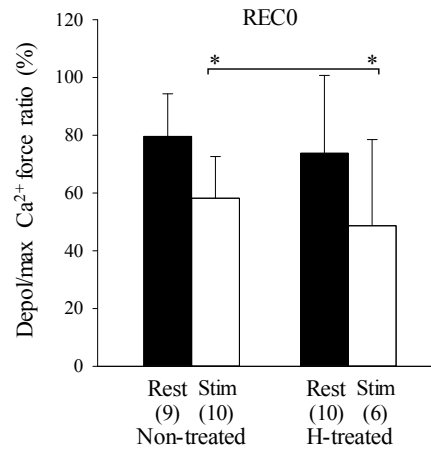
**Fig. 3. Effects of fatiguing stimulation and heat treatment on maximum isometric force in whole muscle at REC60.** Values are means + SD (N = 8 for each muscle). \* $P < 0.05$ , significant main effect for stimulation (pre > post).



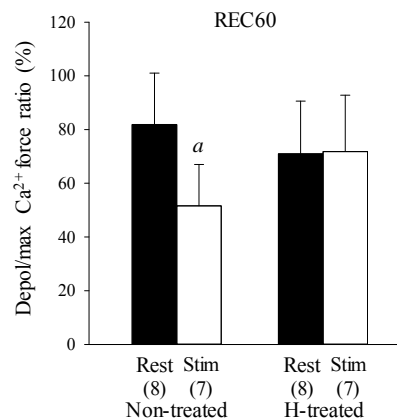
**Fig. 4. Effects of fatiguing stimulation and heat treatment on low-to-high force ratio (1 vs. 50 Hz) in skinned fiber at REC0.** Values are means + SD. "n" denotes number of fibers. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , significantly different from rested muscles.



**Fig. 5. Effects of fatiguing stimulation and heat treatment on low-to-high force ratio (1 vs. 50 Hz) in skinned fiber at REC60.** Values are means + SD. "n" denotes number of fibers. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , significantly different from rested muscles; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , significantly different from stimulated muscles from non-treated rats.



**Fig. 6. Effects of fatiguing stimulation and heat treatment on depolarization-induced force in skinned fiber at REC0.** Values are means + SD. "n" denotes number of fibers. \* $P < 0.05$ , significant main effect for stimulation (rested > stimulated).



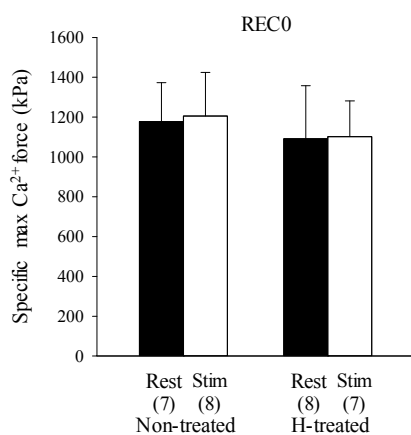
**Fig. 7. Effects of fatiguing stimulation and heat treatment on depolarization-induced force in skinned fiber at REC60.** Values are means + SD. "n" denotes number of fibers. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , significantly different from rested muscles.

#### (4) 脱分極誘因性張力

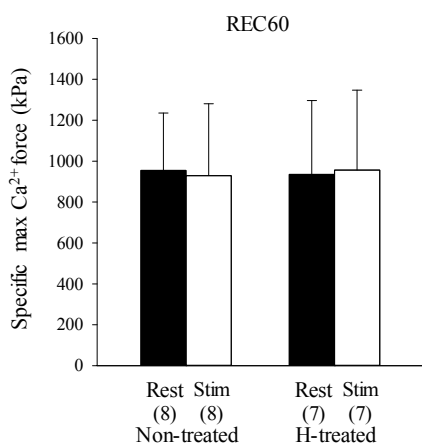
脱分極誘因性張力とCa<sup>2+</sup>誘因性最大張力を同時に測定し、最大張力に対する脱分極誘因性張力の比 (dep/max 比) を算出した。REC0における dep/max 比は、R 脚に対して S 脚で有意な低値が認められた (Fig. 6; 主効果)。REC0においては、Non 群では R 脚に対して S 脚で有意な低値が観察されたが、H 群では両脚間に差異はみられなかった (Fig. 7)。

#### (5) Ca<sup>2+</sup>誘因性最大張力

Fig. 8 に、単位断面積当たりの Ca<sup>2+</sup>誘因性最大張力を示した。REC0, REC60 とともに、FS による変化も温熱刺激処置による変化も観察されなかった (Figs. 8 and 9)。



**Fig. 8. Effects of fatiguing stimulation and heat treatment on maximum Ca<sup>2+</sup> force in skinned fiber at REC0.** Values are means + SD. "n" denotes number of fibers.

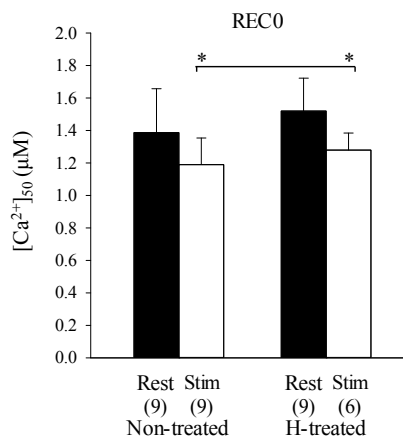


**Fig. 9. Effects of fatiguing stimulation and heat treatment on maximum Ca<sup>2+</sup> force in skinned fiber at REC60.** Values are means + SD. "n" denotes number of fibers.

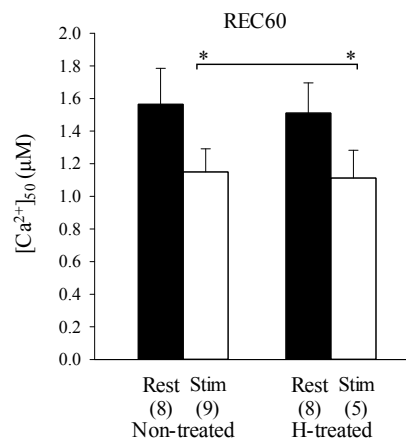
#### (6) 筋原線維の Ca<sup>2+</sup>感受性

筋原線維の Ca<sup>2+</sup>感受性は、最大値の 50%の張力発揮に必要な Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>50</sub>) で評価した (Figs. 10 and 11). このパラメーターでは、値が低いほど感受性が高いことになる。REC0, REC60 とともに、R 脚に対して S 脚で有意な低値が観察された (主効果)。一方、温熱刺激処

置による変化は認められなかった。



**Fig. 10. Effects of fatiguing stimulation and heat treatment on myofibrillar Ca<sup>2+</sup> sensitivity in skinned fiber at REC0.** Values are means + SD. "n" denotes number of fibers. \**P* < 0.05, significant main effect for stimulation (rested > stimulated).



**Fig. 11. Effects of fatiguing stimulation and heat treatment on myofibrillar Ca<sup>2+</sup> sensitivity in skinned fiber at REC60.** Values are means + SD. "n" denotes number of fibers. \**P* < 0.05, significant main effect for stimulation (rested > stimulated).

#### (7) 結論

本研究で得られた最も重要な知見は、温熱刺激処置によって、低頻度疲労の程度は緩和されないが、疲労からの回復は促進されることである。スキンドファイバーを用いた解析により、このような効果が生ずる要因は、FS により低下した SR の Ca<sup>2+</sup>放出機能が迅速に安静レベルに戻るためであることが明らかとなった。

これらのことから、温熱刺激処置は、スポーツ活動などによって起こる筋パフォーマンスの低下を抑制する効果を有することが示唆される。

#### (8) 今後の課題

本研究では、SR の Ca<sup>2+</sup>放出機能の回復が促進されるメカニズムを解明するまでには至らなかった。Ca<sup>2+</sup>放出機能の低下は、活性

酸素種の1つであるスーパーオキシドが、 $\text{Ca}^{2+}$ 放出に關与するタンパク質を酸化的に修飾によって生ずることが報告されている (Bruton et al. 2008) . 細胞内には、酸化されたアミノ酸を還元する酵素が存在する (Mary et al. 2004) . 温熱刺激処置によって、これらの酵素が活性化されることが、 $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能の回復促進に寄与していると推察される . 今後、この点を含め、回復促進の作用機序について検討する必要がある .

#### <参考文献>

Allen et al. (2008) *Physiol Rev* 88: 287-332  
Bruton et al. (2008) *J Physiol* 586: 175-184  
Mary et al. (2004) *Exp Gerontol* 39: 1117-1123  
Tamura et al. (2015) *J Physiol* 593: 2707-2720  
Watanabe & Wada (2016) *Am J Physiol* 311: R919-R929

#### 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

相原千尋，渡邊大輝，瀬戸口稜二，平野勝俊，和田正信 . 熱刺激によるプレコンディショニングが筋の疲労耐性に及ぼす影響 . 第71回日本体力医学会 . 2016年9月23~25日 . 盛岡市 .

Aibara C, Watanabe D, Fukatsu S, Wada, M. Effects of heat treatment on force recovery after fatiguing contraction in rat fast-twitch muscle. 46<sup>th</sup> European Muscle Conference. 19-22 Sep 2017, Potsdam.

〔図書〕(計2件)

和田正信，松永智，長谷川博，奥本正 . ステップアップ運動生理学 . 杏林書院，2018，(総頁数未定)  
渡邊大輝，和田正信 . 低頻度疲労はなぜ起こる . 八田秀雄 編 : 運動と疲労の科学 . 朝倉書店，2018，(総頁数未定)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/wada/index.htm>

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

和田 正信 (WADA MASANOBU)  
広島大学・総合科学研究科・教授  
研究者番号 : 80220961

(2) 研究分担者

松永 智 (MATSUNAGA SATOSHI)  
宮崎大学・教育学部・教授  
研究者番号 : 70221588

矢中 規之 (YANAKA NORIYUKI)  
広島大学・生物圏科学研究科・准教授  
研究者番号 : 70346526

(3) 連携研究者

神崎 圭太 (KANZAKI KEITA)  
川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師  
研究者番号 : 30637286