

高温環境下での走運動による脱水が 骨格筋内の水分子の特性に及ぼす影響

大阪工業大学 石道峰典

Effects of The Dehydration on The Characteristics of Water Molecule in The Skeletal Muscles During Under Running Exercise High-temperature Environment

by

Minenori Ishido

*Section for Health-related Physical Education,
Division of Human Sciences, Faculty of Engineering,
Osaka Institute of Technology*

ABSTRACT

It is known that the dehydration is a major factor of onset of the heat stroke during sports activity under high-temperature environment. However, the relationship between the dehydration and the profiles of water molecule within the skeletal muscles are poorly understood during sports activity under high-temperature. The present study examined the effects of the dehydration on the characteristics of water molecule and its related factors in the skeletal muscles during running exercise under high-temperature. In slow muscles, in running group, both the muscle water content and free water content were significantly lower than that in control group, respectively ($p < 0.05$). On the other hand, in fast muscles, there were no significant differences in these factors between both groups. Neither expression levels of AQP4 nor AQP1, that were the selective water channel, were changed in the skeletal muscles during running exercise under high-temperature. Likewise, the changes of the expression levels of $\alpha 2$ Na,K-

ATPase, which was related to osmoregulation, were induced in skeletal muscles by running exercise under high-temperature. In conclusion, the present study indicated that the prime mover, i.e. slow muscles but not fast muscles, were induced significant loss of water, particularly free water, due to the dehydration during running exercise under high-temperature. On the other hand, it was suggested that the dehydration during running exercise under high-temperature may not participate in the regulation of the selective water channel AQP4 and AQP1 expression in both fast and slow muscles. Furthermore, it was suggested that the dehydration during running exercise under high-temperature may directly not induce the change of the intracellular osmotic pressure due to the change of $\alpha 2$ Na,K-ATPase expression levels. These findings indicated in the present study may be useful to understand the molecular properties of skeletal muscles in the heat stroke during sports activity under high-temperature environment.

要 旨

高温環境下のスポーツ活動による脱水が熱中症発症の主要因であることは広く知られている。本研究では、高温環境下で走運動より脱水が生じたラットの骨格筋における水分子、およびその関連因子の特性について検討した。高温環境下で走運動を行った結果、速筋（前脛骨筋）の水分含有率および自由水量に有意な変化は認められなかった。一方、遅筋（ヒラメ筋）においては、水分含有率および自由水量が高温環境下での走運動により有意に低下した。骨格筋における水分子輸送機構である AQP4 および AQP1、ならびに水分子を活用した浸透圧調節機構である $\alpha 2$ Na, K-ATPase の発現レベルに有意な変化は認められなかった。以上、本研究は、高温環境下の走運動による脱水により、主動筋では筋内の自由水を中心に水分子が著しく喪失することを明らかにした。一方、脱水は、水分子輸送機構や浸透圧調節機構を構成するタンパク質の発現レベルには影響を及ぼさない可能性が示唆された。

緒 言

近年、夏場のスポーツ活動において熱中症の予防は最重要事項の1つである。熱中症とは、暑い環境で生じる障害の総称であり、「熱失神」「熱疲労」「熱けいれん」「熱射病」の4つの病型に分類される。熱中症発症の生理的主要因の1つに脱水がある。高温環境下におけるスポーツ活動時の発汗により体から水分が失われることで細胞外液の浸透圧が上昇し、細胞内外の水分子動態が活性化する¹⁾。体液調整系のこのような反応は、皮膚血管拡張反応の低下や心拍出量の低下などを生じ、体温調節機能の抑制を引き起こす^{2,3)}。さらに先行研究において、高温環境下におけるスポーツ活動中の脱水による体重減少率が3%に達すると発揮筋力の低下が生じるなど、脱水がパフォーマンスの低下に関与していることが明らかにされている⁴⁾。

高温環境下におけるスポーツ活動による脱水により体液調整系に変調を来す要因となる水分子は、主に自由水であると考えられている。一般に細胞内に局在する水分子は、その状態から大きく「自由水」と「結合水」に分けられる。細胞内で

他の物質と結合することなく自由に動き回ることのできる水分子を「自由水」と呼び、タンパク質や炭水化物等の他の物質と結合し、分子運動が束縛されている水分子を「結合水」と呼ぶ。一方、骨格筋においても自由水や結合水が局在していると考えられているが⁵⁾、高温環境下におけるスポーツ活動による脱水時に骨格筋内の水分、特に自由水がどのように変化しているかについては、十分な理解が得られていないままである。

骨格筋内の水分子の移動には、水分子を選択的に通過させる水チャネル“アクアポリン4 (aquaporin 4: AQP4)”が関与している。AQP4は α 1-syntrophinと結合することで筋線維膜上に特異的に発現し、筋線維内外の水分子の移動を制御することで浸透圧の調節に貢献している^{6,7)}。過負荷によって肥大した骨格筋では、AQP4の発現レベルが相対的に維持されていたことから、AQP4は骨格筋の肥大に応じて発現量を増加させることで、相対的な水分子輸送能力を維持している可能性が示されている⁸⁾。さらに走運動による一定期間のトレーニングにより筋活動量が増加することで、AQP4の発現量が増加し、水分子の移動を亢進することで、筋持久力の向上に貢献していることが示されている⁹⁾。これらのことから、骨格筋の活動量に応じたAQP4の発現量の変化が水分子輸送能に関与していると考えられている。一方、骨格筋内の毛細血管にはAQP1が特異的に発現しており、筋線維側で発現しているAQP4との間で水分子の受け渡しを行うことで、筋線維内外の水分子輸送の制御を行っている¹⁰⁾。しかし、骨格筋内の水分子移動に密接に関与しているAQP4やAQP1に対し、高温環境下の走運動による脱水が及ぼす影響については明らかにされていない。

加水分解酵素であるATPaseは、細胞内の水分子を利用することでエネルギーを発生させる。ナトリウムポンプの1つである α 2 Na, K-ATPaseは、このエネルギーを利用して、細胞外に Na^+

を3つ放出し、細胞内に K^+ を2つ取り込み浸透圧の調節を行うことで骨格筋の水分子移動の制御に対し間接的に関与している¹¹⁾。したがって、 α 2 Na, K-ATPaseは筋線維内の水分子を利用することで細胞内の浸透圧の調節を行うと同時に、水分子自体の移動の制御にも関与している因子である。また、一過性の走運動により α 2 Na, K-ATPaseの活性が亢進することも報告されている¹¹⁾。しかし、高温環境下での走運動により体内から水分が喪失した際、 α 2 Na, K-ATPaseの発現にどのような影響が生じるかについては明らかにされていない。

本研究では、高温環境下での走運動による脱水が、骨格筋内の水分子の特性、特に自由水量や水分子輸送機構や水分子を利用した浸透圧調節機構に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

1. 研究方法

1. 1 実験概要

実験動物には、7週齢のFischer344系雌ラット(n=6/group)を用いた。実験に用いた被験筋は、前脛骨筋(tibialis anterior muscle: TA)及びヒラメ筋(soleus muscle: SOL)とした。実験群は、対照群(control group: CON)および高温環境下走運動群(running group: RUN)とした。実験動物は昼夜逆転した12時間の明暗サイクルの飼育小屋にて餌、飲水ともに自由摂取の環境下で飼育した。なお、本研究は、大阪工業大学ライフサイエンス実験倫理委員会の承認を得た上で実施した。

1. 2 走運動

高温環境下走運動群に対しては、強制回転かご(回転輪:直径307mm, 幅110mm, 走行距離0.965m/回転)(FWS-3006, メルクエスト, 富山)を用いた強制走を行わせた。ラットを常温環境下で数日間、強制回転かごによる強制走に慣れさせた。実

験当日は、室温 30℃、湿度 75% に保った部屋内で走速度 10m/min での走運動を実施した。走運動前にラットの体重を測定し、走運動中に体重が 3% 減少した段階で、走運動を終了させた。平均走運動時間は約 1 時間、平均走行距離は約 600m であった。走運動終了後、直ちにペントバルビターナトリウム麻酔下で屠殺し、左右脚から前脛骨筋とヒラメ筋をそれぞれ摘出した。右脚の被験筋は、水分活性値の測定をした後、筋重量及び水分含有率の測定に用いた。左脚の被験筋は、生化学的な分析まで -80℃ で凍結保存した。

1. 3 水分活性

各被験筋の水分活性は、静電容量式湿度センサー型水分活性測定装置 (SP-W, アズワン, 大阪) を用いて測定した。

1. 4 水分含有量

摘出した右脚の被験筋の筋湿重量を測定した後、100℃ で 24 時間、乾熱乾燥させ、筋乾燥重量を測定した。筋湿重量と筋乾燥重量から以下の式より、水分含有率を算出した。

水分含有率(%)=(筋湿重量-筋乾燥重量)/筋湿重量×100

1. 5 電気泳動およびウエスタンブロット法

被験筋におけるタンパク質発現量の分析には、先行研究 (7) で示されているプロトコルに基づいたウエスタンブロット法を用いた。筋サンプルを 1x Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostic, Dubai, UAE) を含んだ RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM sodium chloride, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% sodium dodecyl sulfate) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) でホモジナイズし、12000g で遠心した後、上清を回収した。その後、BCA protein assay kit (Thermo scientific, Rockford, IL) を用いて各サンプルのタンパク質濃度を均一に調整した。

筋サンプル (タンパク質: 10 μg) を 12.5% のポリアクリルアミドゲルを用いて 144mA, 45 分で電気泳動を行った。その後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜への転写を行った。PVDF 膜に対し、5% skim milk と 0.1% Tween-20 を含む Tris-buffered saline (TBS) (pH 7.6) を用いて 60 分間のブロッキング処理を行った。その後、各種一次抗体 [goat polyclonal anti-AQP4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit polyclonal Anti-Na⁺/K ATPase α-2 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), rabbit monoclonal Anti-AQP1 (Abcam, Cambridge, UK)] を 4℃, overnight でインキュベーションした。TBS で洗浄した後、各種二次抗体 [biotinylated anti-rabbit IgG (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) and biotinylated anti-goat IgG (Merck Millipore)] を室温で 1 時間インキュベーションした。TBS で洗浄した後、peroxidase conjugated streptavidin horseradish (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を室温で 1 時間インキュベーションした。最後に、化学発光試薬 (Immunostar zeta, 和光純薬工業, 大阪) を用いて標的タンパク質を可視化した。得られた画像から ImageJ software (ver. 1.48, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて、定量化した。

1. 6 統計処理

全ての測定値は、平均値 ± 標準偏差で示した。統計処理は、対照群と走運動群との比較は、Student's t-test を用いて行った。また、走運動前後の体重の比較は、paired t-test を用いて行った。有意水準は p<0.05 とした。

2. 研究結果

2. 1 高温環境下での走運動による体重および筋重量の変化

対照群と走運動群 (pre) の体重を比較した結果、両群に統計的有意差は認められなかった (表 1)。

表 1 Body weights and relative muscle weights in control and running groups

	control	running	
		pre	post
body weight (g)	125.67 ± 3.78	126.33 ± 9.16	121.83 ± 8.06* (3.52 ± 1.26%)
relative tibialis anterior muscle weights (mg/100g body weights)	172.16 ± 6.04		188.72 ± 5.25#
relative soleus muscle weights (mg/100g body weight)	38.29 ± 4.69		40.13 ± 4.23

All values were mean ± S.D. Values in parentheses shown the reduction rate of body weight in post- running, compared to that in pre-running.

*p<0.05 compared to pre-running. #p<0.05 compared to control.

一方、走運動群における pre に対する post の体重減少率は $3.52 \pm 1.26\%$ であり、有意な体重減少が認められた ($p<0.05$) (表 1)。

走運動群の TA の相対筋重量は、対照群に対し有意な高値を示した ($p<0.05$) (表 1)。一方、SOL の相対筋重量においては、対照群と走運動群との間に有意差は認められなかった (表 1)。

これらの結果は、高温環境下における走運動により脱水による有意な体重減少が生じたことを示す。

2. 2 高温環境下での走運動が骨格筋の水分含有率に及ぼす影響

本研究では、筋湿重量と筋乾燥重量より骨格筋における水分含有率を算出した。その結果、TA では、対照群と走運動群における水分含有率に有意差は認められなかった (図 1A)。一方、SOL の水分含有率においては、対照群に対し、走運動群で有意な低値が示された (図 1B) (表 1)。

これらの結果は、高温環境下での走運動による脱水は、遅筋である SOL の相対筋重量に影響を及ぼす一方で、速筋である TA の相対筋重量に影響を及ぼさないことを示す。

2. 3 高温環境下での走運動が骨格筋の水分活性に及ぼす影響

本研究では、骨格筋内の自由水量の変化を検討するために、水分活性を測定した。図 2A に示し

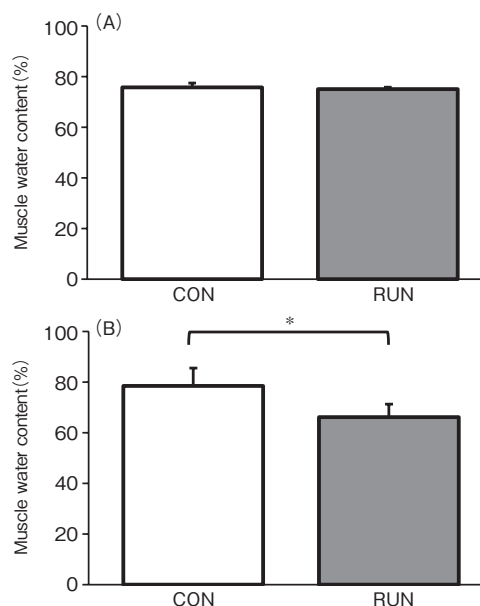


図 1 Muscle water content of tibialis anterior muscles (A) and soleus muscles (B) in control (CON) and running (RUN) groups.

Values are percentages and represent means ± SD.

Muscle water content (%) = (muscle wet weight - muscle dry weight) / muscle wet weight * 100

*p<0.05

たとおり、TA の水分活性値において、対照群と走運動群との間に有意差は認められなかった。一方、SOL においては、対照群の水分活性値に対し、走運動群の水分活性値は有意な低値を示した (図 2B) ($p<0.05$)。これらの結果は、高温環境下での走運動による脱水により、遅筋である SOL における自由水量が減少する一方で、速筋である TA では変化が生じていないことを示す。

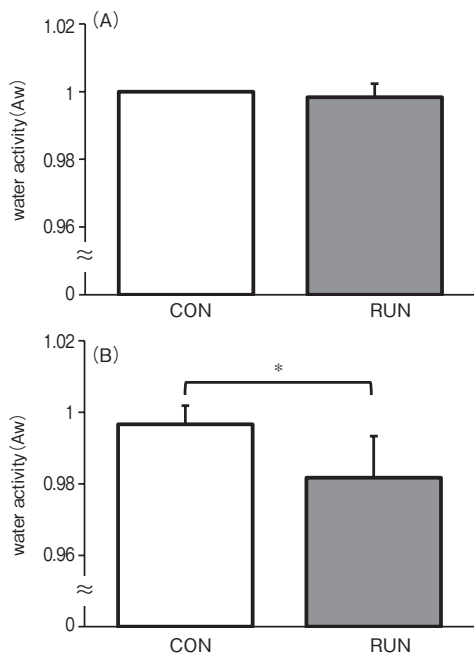


図2 Water activities of tibialis anterior muscles (A) and soleus muscles (B) in control (CON) and running (RUN) groups. Values were mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$

2. 4 高温環境下での走運動が骨格筋の AQP4 の発現量に及ぼす影響

本研究では、高温環境下での一過性の走運動による脱水が、筋線維に特異的に発現する水チャネル AQP4 の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、速筋である TA における AQP4 の発現レベルは、両群間に統計的有意差は認められなかった (図 3A)。さらに、遅筋である SOL においても対照群と走運動群との間に有意差は認められなかった (図 3B)。これらの結果は、高温環境下での走運動による脱水は、筋線維に特異的に発現する AQP4 の発現様式に影響を及ぼさないことを示す。

2. 5 高温環境下での走運動が骨格筋の AQP1 の発現量に及ぼす影響

AQP1 は、骨格筋内の毛細血管に特異的に発現する水チャネルである。本研究では、高温環境下での走運動による脱水が、AQP1 の発現に及ぼす影響を検討した。図 4A に示したように、速筋で

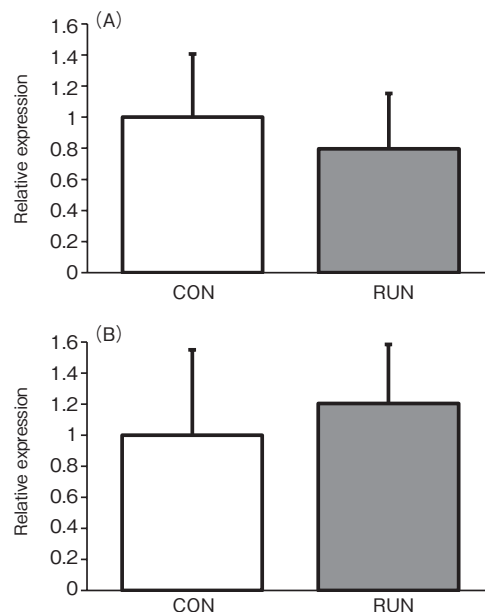


図3 Protein expression level of AQP4 in tibialis anterior muscles (A) and soleus muscles (B) in control (CON) and running (RUN) groups.

Values are means $\pm$ SD. Values are expressed relative to the values of control TA and SOL, respectively.

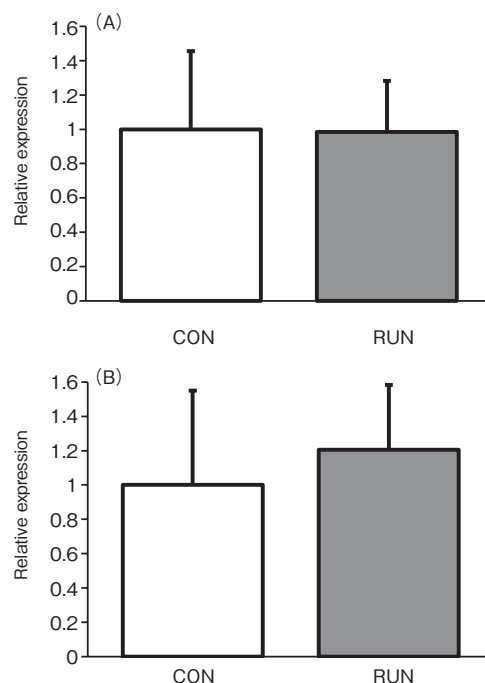


図4 Protein expression level of AQP1 in tibialis anterior muscles (A) and soleus muscles (B) in control (CON) and running (RUN) groups.

Values are means $\pm$ SD. Values are expressed relative to the values of control TA and SOL, respectively.

ある TA における AQP1 の発現レベルは、対照群と走運動群との間に有意差は認められなかった。同様に、遅筋である SOL においても両群間に統計的有意差は認められなかった (図 4B)。これらの結果は、高温環境下の走運動による脱水は、骨格筋内の AQP1 の発現レベルに影響を及ぼさないことを示す。

2. 6 高温環境下での走運動が骨格筋の $\alpha 2$ Na, K-ATPase の発現量に及ぼす影響

加水分解酵素である ATPase は、筋線維内の水分子を利用してエネルギーを生み出す。このとき発生したエネルギーを利用してナトリウムポンプである $\alpha 2$ Na, K-ATPase は活性化し、浸透圧を調整することで水分子の移動を制御している。そこで、本研究では、高温環境下での走運動による打脱水が $\alpha 2$ Na, K-ATPase の発現レベルに及ぼす影響を検討した。その結果、遅筋である TA における $\alpha 2$ Na, K-ATPase 発現レベルは、両群間に有意差は認められなかった (図 5A)。一方、遅筋である SOL においても、対照群と走運動群との間に統計的有意差は認められなかった (図 5B)。これらの結果は、高温環境下での走運動による脱水は、 $\alpha 2$ Na, K-ATPase の発現レベルに影響を及ぼさないことを示す。

3. 考 察

高温環境下での走運動により脱水が、身体機能の低下や熱中症発症の主要因であることは広く知られているが、骨格筋内の水分子の特性に関しては不明瞭なままである。本研究では、高温環境下での走運動により脱水が生じた場合、遅筋よりも遅筋の方が自由水を中心とした水分喪失が大きいことが明らかとなった。一方、脱水は、水分子輸送機構や水分子を利用した浸透圧超調節機構の制御因子の発現レベルに影響を及ぼさないことが示された。

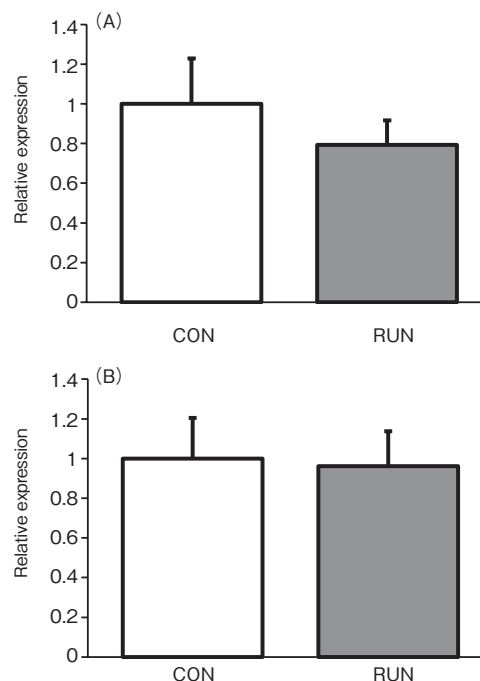


図5 Protein expression level of $\alpha 2$ Na, K-ATPase in tibialis anterior muscles (A) and soleus muscles (B) in control (CON) and running (RUN) groups.

Values are means $\pm$ SD. Values are expressed relative to the values of control TA and SOL, respectively.

高温環境下でのスポーツ活動での脱水による体重減少率が3%相当になると、筋力低下など運動機能に障害が発生することが示されており⁴⁾、スポーツ活動中の熱中症予防として体重減少率2%を超えないように水分補給することが推奨されている¹²⁾。本研究では、高温環境下での走運動による体重減少率3%に達した段階で、走力の低下や熱中症と思われる症状が観察された。したがって、本研究で実施した高温環境下での走運動による有意な体重減少は脱水によるものであり、本実験条件は、脱水による熱中症を発生させる上で適切であったと考えられる。

走運動群において遅筋である TA の体重 100g 当たりの相対筋重量が対照群に対し有意な高値を示した。これは、高温環境下の走運動によって生じた脱水により体重が減少した結果、相対筋重量の見かけ上の増加が生じたものと考えられる。実際、走運動群の TA の水分含有率や自由水量に有

意な変化は認められなかった。

一方、走運動群の遅筋である SOL の相対筋重量は、対照群と有意差は認められなかった。しかし、走運動群の SOL における水分含有率は、対照群に対し有意に低下していた。したがって、SOL の相対筋重量で両群間の有意差が認められなかった理由として、高温環境下での走運動による SOL 内の水分の喪失が考えられる。また、高温環境下での走運動による水分含有率の低下が遅筋である SOL でのみ認められた点は、実施した走運動の強度と関係していると考えられる。本研究では、分速 10m という比較的低強度の走運動を実施しており、この走速度では、遅筋よりも主に遅筋が積極的に動員される¹³⁾。運動時、積極的に動員される主動筋に対して血流量が増加することで、主動筋における水分子移動が促進されることが報告されている¹⁴⁾。したがって、本実験において、高温環境下での走運動による脱水により血漿浸透圧が上昇したことで、主動筋であった遅筋の SOL からの水分喪失が大きくなったものと考えられる。

我々の知る限り、本研究が初めて運動実施後の筋肉における自由水量の変化を明らかにした。一般に骨格筋内に局在する水分子は、その特性から自由水と結合水に大別できると考えられている⁵⁾。本研究では、走運動群の遅筋である SOL でのみ水分活性が有意な低下を示した。一般に、水分活性は自由水量を反映していることから、高温環境下で走運動を実施したことにより、SOL の自由水が有意に減少したことが明らかとなった。したがって、本研究では、高温環境下の走運動による SOL で低下した水分は、主に自由水である可能性が示唆された。従来、骨格筋内の水分子の特性は、核磁気共鳴法などを用いて評価されるのが一般的であった^{15, 16)}。しかし、これらの分析手法は、高度な分析装置を必要とし、結果の解釈も難解となるという課題があった。一方、本研究

で用いた水分活性の測定は、自由水のみしか検出できないという技術的限界はあるものの、簡易な分析装置で測定可能という点において、汎用性が非常に高い分析方法であると言える。

骨格筋内の水分子を利用して ATPase は、ATP を分解すると同時にエネルギーを発生させる。ナトリウムポンプの 1 つである $\alpha 2 \text{ Na, K-ATPase}$ は、発生したエネルギーを利用して、 Na^+ や K^+ を細胞内外に移動させることで細胞内浸透圧を調節している¹¹⁾。したがって、 $\alpha 2 \text{ Na, K-ATPase}$ は、骨格筋内の水分子を利用している因子の 1 つであることから、本研究では当初、高温環境下の走運動による脱水により、 $\alpha 2 \text{ Na, K-ATPase}$ の発現レベルに変化が生じることが期待された。しかし、得られた結果では、対照群と走運動群との間に $\alpha 2 \text{ Na, K-ATPase}$ の発現レベルに有意差は認められなかった。これらの結果は、高温環境下の走運動による脱水は、 $\alpha 2 \text{ Na, K-ATPase}$ の発現レベルに影響を及ぼさないことを示す。一方で、本研究では、 $\alpha 2 \text{ Na, K-ATPase}$ の活性を測定していないが、先行研究では一過性の運動により $\alpha 2 \text{ Na, K-ATPase}$ 活性が促進されることが報告されている¹¹⁾。したがって、高温環境下の走運動による自由水量の減少により、 $\alpha 2 \text{ Na, K-ATPase}$ 活性が低下している可能性が考えられる。骨格筋内の自由水量の変化が $\alpha 2 \text{ Na, K-ATPase}$ 活性に及ぼす影響については、今後のさらなる研究が必要である。

筋線維に特異的に発現する AQP4 と毛細血管に特異的に発現する AQP1 を介して、筋線維と毛細血管との間の水分子のやり取りが行われている^{6, 10)}。現在、AQP4 や AQP1 の発現量に応じて、筋線維の水分子の移動能が制御されていると考えられている⁶⁾。さらに、運動による筋活動量に応じて AQP4 の発現量が増加することが明らかにされている⁹⁾。したがって、本研究でも高温環境下での走運動による脱水により AQP4 や AQP1 の

発現レベルに変化が生じる可能性が期待された。しかし、AQP4 および AQP1 の発現レベルにおいて、対照群と走運動群との間にそれぞれ有意差は認められなかった。これらの結果は、高温環境下の走運動による脱水は、骨格筋内の AQP4 および AQP1 の発現レベルを引き起こさないことを示す。さらに速筋である TA だけでなく、水分含有率および自由水量が有意に減少していた遅筋の SOL においても、AQP4 および AQP1 の発現レベルに走運動による変化が見られなかった。これらの結果は、高温環境下の走運動による脱水により血漿浸透圧が上昇したことに応じて、主動筋である SOL において AQP4 や AQP1 の水分子透過機能が亢進したことにより、骨格筋内の著しい水分喪失が引き起こされた可能性を示唆するものである。脱水時における骨格筋の AQP4 および AQP1 の機能特性については、さらなる研究が必要である。

一方、本研究では AQP4 や AQP1 の mRNA の変化については検討を行っていない。我々の知る限り、一過性の急性運動が AQP4 や AQP1 の mRNA の発現に及ぼす影響に関する報告は未だにない。しかしラットへのリボ多糖類の投与後 4 時間で脳下垂体前葉での AQP4 mRNA の発現が急速に増加したことから、生体の恒常性の不均衡により AQP4 mRNA の急性反応が生じることが明らかにされている¹⁷⁾。したがって、本研究において脱水という恒常性不均衡に対し AQP4 や AQP1 の mRNA において急性の変化が生じていた可能性が考えられる。運動による脱水が、AQP4 や AQP1 mRNA の急性変化に及ぼす影響については今後のさらなる研究が必要である。

4. 結 語

本研究では、高温環境下での走運動による脱水が骨格筋内の水分子の特性に及ぼす影響を検討した。その結果、脱水により走運動の主動筋におい

て、水分含有率および自由水量の有意な低下が生じることを初めて明らかにした。一方で、水分子輸送機構である AQP4 や AQP1、および水分子を利用した浸透圧調節機構である $\alpha 2$ Na, K-ATPase の発現レベルは変化が生じないことが示された。したがって、脱水による AQP4 や AQP1 や $\alpha 2$ Na, K-ATPase の機能特性の変化を明らかにすることが今後の課題である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Costill D.L., Cote R., Fink W.: Muscle water and electrolytes following varied levels of dehydration in man, *J. Appl. Physiol.*, **40**:6-11 (1976)
- 2) Takamata A., Yoshida T., Nishida N., Morimoto T.: Relationship of osmotic inhibition in thermoregulatory responses and sweat sodium concentration in humans, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **280**:R623-9 (2001)
- 3) Nadel E.R., Fortney S.M., Wenger C.B.: Effect of hydration state of circulatory and thermal regulations, *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.*, **49**:715-721 (1980)
- 4) Yoshida T., Takanishi T., Nakai S., Yorimoto A., Morimoto T.: The critical level of water deficit causing a decrease in human exercise performance: a practical field study, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **87**:529-534 (2002)
- 5) 栗田太作, 灰田宗孝, 篠原幸人. 骨格筋における自由水の特性. 東海大学スポーツ医科学雑誌, **7**:99-104 (1995)
- 6) Frigeri A., Nicchia G.P., Balena R., Nico B., Svelto M.: Aquaporins in skeletal muscle: reassessment of the functional role of aquaporin-4, *FASEB J.*, **18**(7):905-907 (2004) .
- 7) Neely J.D., Amiry-Moghaddam M., Ottersen O.P., Froehner S.C., Agre P., Adams M.E.: Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein, *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U.S.A.*, **98**(24) :14108-14113 (2001)
- 8) Ishido M., Nakamura T.: Aquaporin-4 Protein Is Stably Maintained in the Hypertrophied Muscles by Functional Overload, *Acta. Histochem. Cytochem.*, **49**:89-95 (2016)
 - 9) Basco D., Blaauw B., Pisani F., Sparaneo A., Nicchia G.P., Mola M.G., Reggiani C., Svelto M., Frigeri A.: AQP4-Dependent Water Transport Plays a Functional Role in Exercise-Induced Skeletal Muscle Adaptations, *PLoS One*, **8**(3) :e58712 (2013)
 - 10) Jimi T., Wakayama Y., Inoue M., Kojima H., Oniki H., Matsuzaki Y., Shibuya S., Hara H., Takahashi J.: Aquaporin 1: examination of its expression and localization in normal human skeletal muscle tissue, *Cells Tissues Organs*, **184**:181-187 (2006)
 - 11) Pirkmajer S., Chibalin A.V.: Na,K-ATPase regulation in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **311**:E1-E31 (2016)
 - 12) 日本体育協会. スポーツ活動中の熱中症予防ガイドブック. 公益財団法人日本体育協会(2015)
 - 13) Dudley G.A., Abraham W.M.: Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle, *J. Appl. Physiol.*, **53**(4) :844-850 (1982)
 - 14) Kowalchuk J.M., Heigenhauser G.J., Lindinger M.I., Sutton J.R., Jones N.L.: Factors influencing hydrogen ion concentration in muscle after intense exercise, *J. Appl. Physiol.*, **65**(5) :2080-2089 (1988)
 - 15) Takemori S., Yamaguchi M., Kimura M.: Skinning effects on skeletal muscle myowater probed by T2 relaxation of ¹H-NMR, *Biophys. J.*, **92**:3610-3614 (2007) .
 - 16) Kimura M., Takemori S., Yamaguchi M., Umazume Y.: Differential osmotic behavior of water components in living skeletal muscle resolved by ¹H-NMR, *Biophys. J.*, **89**:1143-1149 (2005) .
 - 17) kuwahara-Otani S., Maeda S., Tanaka K., Hayakawa T., Seki M.: Systemic Administration of Lipopolysaccharide Increases the Expression of Aquaporin-4 in the Rat Anterior Pituitary Gland, *J. Vet. Med. Sci.*, **75**:1081-1084 (2013)