

筋温上昇による熱ショックタンパク質発現と 筋損傷・筋肉痛の予防効果

横浜市立大学 野坂和則

Protective Effect of Increased Muscle Temperature to Induce Heat Shock Proteins on Muscle Damage and Muscle Soreness

by

Kazunori Nosaka

Exercise and Sports Science

Graduate School of Integrated Science

Yokohama City University

ABSTRACT

This study investigated the hypothesis that eccentric exercise-induced muscle damage would be attenuated in muscles subjected to passive hyperthermia to a level where heat shock proteins (HSPs) were produced. Eleven male students performed a bout of 24 maximal eccentric actions of the elbow flexors of one arm, and the opposite arm performed the same exercise 2-4 weeks later. One day prior to the exercise, the elbow flexors of one arm received microwave diathermy treatment resulting in muscle temperature elevation from 33-35 °C to 40-42 °C. The contralateral arm acted as an untreated control. Maximal isometric force (MIF), range of motion (ROM), upper arm circumference, muscle soreness with palpation, extension (SORE), and flexion, plasma creatine kinase and aldolase activity, and myoglobin concentration were measured one day prior to exercise, immediately pre- and post-exercise, and then daily for 4 days. The control arm repeated a second bout of the same exercise 4-6 weeks after the first. Changes in the criterion measures were compared between conditions (treatment vs control), or between bouts (first vs second for the control arm) by a repeated measures ANOVA. Significance level was set at

$P < 0.05$. The hyperthermia treatment had no short-term effects on muscle function prior to the exercise bout and force output and total work during exercise were not significantly different between treatment and control arms. All measures changed significantly following exercise, but the treatment arm showed significantly smaller decreases in MIF and ROM after exercise, and significantly smaller development of SORE compared to the control arm. However, these attenuation effects were not as strong as those observed following the second bout in the control arm. No significant differences between conditions were shown for other measures. These results demonstrate that elevation of muscle temperature one day prior to eccentric exercise was effective in reducing muscle damage to some extent. Although HSPs may play some role in the repeated bout effect, it is likely that other also contribute to this phenomenon.

要 旨

あらかじめ筋温を上昇させておいた筋では、伸張性筋活動に伴う筋損傷・筋肉痛が抑制され、回復も早まるという仮説を検討することを目的とした。被験者 ($n=11$) は上腕屈筋群が最大筋力発揮下で肘関節屈曲位から伸展位に15秒に1回、24回繰り返し強制的に引き伸ばされる伸張性筋運動を2~4週間の間隔において、右腕、左腕それぞれで行った。一方の腕では、運動実施1日前に、上腕屈筋群に極超短波を20分間照射し、筋温を41度程度まで上昇させた (T条件)。他方の腕では筋温上昇を行わずに運動を実施した (C条件)。運動に伴う、等尺性最大筋力 (筋力)、肘関節可動域 (ROM)、筋肉痛などの運動前から運動直後ならびに1~4日後の変化を、二元分散分析を用いて両条件間で比較した。運動直後の筋力低下率はC条件に比べT条件で有意に小さく、回復もT条件で有意に早かった。ROMの減少もT条件で有意に小さく、筋肉痛の程度もT条件で有意に低かった。筋温上昇によって熱ショックタンパク質が発現し、伸張性筋活動の損傷刺激を減弱させた可能性が考えられる。

緒 言

生体は、体温の上昇、放射線、虚血、活性酸素種などのストレスから細胞を保護し、恒常性を維持させ、損傷を受けた場合には修復する機能を持つストレスタンパク質を誘導することが知られている^{7,13)}。ストレスタンパク質には多くの種類があり、その分子量によって5つのファミリーに分類されている⁷⁾。熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein: HSP) はストレスタンパク質であり、分子量が70kDa前後のファミリー (HSP70) は、体温上昇などによって誘導され、タンパク質凝集の抑制や変性タンパク質の修復に関与している^{7,10,13)}。Naito et al.¹⁰⁾ は、温熱刺激によってHSP70を誘導すると、廃用性筋萎縮が軽減することを報告している。これまでの動物を用いた研究から、あらかじめ非致死的な熱ストレスによってHSPの発現が増大した細胞は、その後の熱ストレス以外のストレスに対しても高い抵抗性を示すことが知られている^{6-8,10)}。

伸張性筋活動に伴って、筋細胞内膜系 (T管、筋小胞体、筋細胞膜)、中間径フィラメントなどの細胞骨格、細胞外マトリックス、筋原線維の損傷が生じる^{4,5,14,16)}。損傷は、運動直後では筋原

線維レベルの限定された範囲で観察されるのみであるが、その後、損傷した筋線維には好中球やマクロファージをはじめとする単核細胞の浸潤が起り、再生に至るまでの炎症反応が進行する^{1,3,14-16)}。筋損傷の直接的な指標は、これらの組織学的変化である^{1,19)}が、間接的な損傷指標としては、筋力の低下、関節可動域 (ROM) の減少、運動筋の腫脹などが用いられている^{2,11,19)}。また、筋線維が損傷すると、筋細胞内に存在するタンパク質 (たとえば、ミオグロビンや細胞質中に存在する酵素など) がリンパを介して血液中に出てくることが知られている^{2,19)}。遅発性筋痛 (Delayed Onset Muscle Soreness: DOMS) も、伸張性筋活動に伴って特異的に生じることから、筋・結合組織の損傷・炎症と関係していると考えられている^{1,2,11,15)}。

伸張性筋活動が常に筋損傷を引き起こすとは限らない。伸張性負荷によって損傷した筋は、その修復・再生過程において、同様な伸張性負荷に対する耐性を獲得することが知られている^{2,3,9,12)}。たとえば、上腕屈筋群の伸張性運動後の等尺性最大筋力の回復は、1回目に比べ2回目で有意に早くなり、血漿CK活性値は2回目の運動後には全く上昇しない^{2,12)}。この適応は「繰り返し効果 (repeated bout effect)」と呼ばれ^{2,12)}、効果は繰り返しの間隔が長くなるにつれて減弱していくが、6～9カ月程度は残存することが報告されている¹²⁾。また、DOMSにおいても、2～8週間後の運動では顕著にその程度が軽減される^{2,9)}。

繰り返し効果のメカニズムは解明されていないが、神経系、結合組織、筋細胞それぞれで適応が生じている可能性がある^{2,3,9)}。筋細胞での適応としては、筋節数の増加や細胞骨格タンパク質の再構築¹⁴⁾の他、HSP発現の関与も指摘されている^{3,6,17)}。Thompson et al.¹⁸⁾は、伸張性筋活動後にHSPの発現が高まることを報告している。もし、HSPが繰り返し効果に関わっているとすれば、筋

温を上昇させてHSPの発現を高めておいても、伸張性筋活動に伴う筋損傷・筋肉痛が抑制され、回復も早まるのではないかと予想される。

そこで本研究は、この仮説を検証するために、伸張性筋活動1日前の筋温上昇の間接的筋損傷の変化に対する影響について検討することを目的とした。

1. 研究方法

1. 1 被験者

被験者にはレジスタンストレーニングを行っていない学生11名を用いた。被験者の平均 (範囲) 年齢、身長、体重は、それぞれ23.9 (20～31) 歳、173.1 (159～180) cm、65.0 (55～80) kgであった。実験期間中は、各種栄養サプリメントや抗炎症薬など一切の薬品の摂取を禁止し、運動も制限した。また、運動の前日の入浴は禁止し、シャワーも必要最小限とするように指示した。被験者には、実験の内容やこれらの留意事項について事前に口頭および文書で説明し確認した上で、全員からインフォームドコンセントを得た。

1. 2 運動

被験者は上腕屈筋群が最大筋力発揮下で肘関節屈曲位 (90度) から伸展位 (180度) に15秒に1回、24回繰り返し強制的に引き伸ばされる伸張性筋運動^{2,11,12)}を右腕、左腕それぞれで行った。右、左の腕での運動は少なくとも2週間以上の間隔をあけて実施した。

1. 3 トリートメント

どちらか一方の腕の運動を実施する約1日 (16～20時間) 前に、上腕屈筋群に極超短波治療器 (伊藤超短波株式会社製、MICRORADAR, Model KTM-250) を用い、150Wにて約15cmの距離をおいて極超短波を20分間照射し、これをトリートメントとした (T条件)。このトリートメント

によって、上腕二頭筋の温度（皮膚から約1.5cmの深さ）が41度程度まで上昇することを、あらかじめ本研究の被験者とは異なる被験者4名を用いて確かめた。他方の腕ではこのような筋温上昇はあらかじめ行わずに、運動を実施した（コントロール：C条件）。

1. 4 筋温測定

トリートメントに伴う筋温の変化は、N451注射針型温度プローブをN550型サーモメータ（共に日機装YSI株式会社製）を用いて測定した。なお、この測定では、上腕二頭筋内に約2cm針を挿入する侵襲的なものであり、後述する測定項目に影響を与える可能性が考えられたので、各被験者についての測定は、両条件での運動、測定が終了した後に実施した。

1. 5 実験デザイン

先行研究では、利き腕と非利き腕間でレスポンスに大きな違いはないこと、1回目と2回目で異なる腕を使用した場合も、順序による影響は受けなかったことを確認している²⁾。しかし、念のためT条件、C条件の順序ならびに利き腕、非利き腕について考慮し、被験者間でバランスをとった。すなわち、11名の被験者中、6名がT条件を先に、5名がC条件を先に行い、利き腕を先に実施した者が、前者のうちの3名、後者のうちの2名であった。

1. 6 筋損傷指標とその統計処理

運動に伴う、肘関節角度80、90、100度での等尺性最大筋力（以下筋力）、肘関節可動域（以下ROM）、上腕部周径囲、筋肉痛（圧痛、伸展痛、屈曲痛：5cmの線を用いたVAS法による¹¹⁾）、血液生化学成分（血漿 creatine kinase: CK, aldolase: ALD 活性値、血漿 myoglobin: Mb 濃度）、Bモード超音波画像による筋厚、エコー強度の運

動1日前、運動直前、運動直後ならびに1～4日後にかけての変化を、二元分散分析を用いて両条件間で比較した。また、T条件においては、トリートメント直後（5分以内）での筋力、ROM、上腕部周径囲の測定を行い、トリートメントに伴うこれらの指標の変化を一元分散分析にて比較した。有意水準は5%以下とした。なお、各指標の測定方法は、先行研究^{2,11,12)}に従った。

1. 7 繰り返し効果の確認

同じ運動を2回目に実施したときの、各筋損傷指標の変化を1回目と比較するため、C条件の腕に、同じ運動を2～4週間後に負荷した。1回目と2回目での各筋損傷指標の運動前から運動直後ならびに1～4日後の変化を、二元分散分析を用いて比較した。有意水準は5%以下とした。また、T条件とC条件の2回目の運動との比較も行った。

2. 研究結果

2. 1 筋温の変化

本研究のトリートメントによって、上腕二頭筋の皮膚より約1.5cmの深さでの筋温は、トリートメント前の34.2（33.8～34.7）℃からトリートメント直後には41.4（40.2～42.0）℃に上昇し、トリートメント5分後には38.0（37.4～39.0）℃に低下した。このトリートメントの前後で、筋力、ROM、上腕部周径囲、超音波画像に有意な変化はなかった。また、すべての筋損傷指標は、運動1日前と運動直前間では有意な変化を示さなかったが、運動に伴って有意な変動を示した。

2. 2 筋力

図1には、肘関節角度90度での筋力の変化を示した。T条件とC条件を比較すると、運動直後の筋力低下率がC条件（55.3±2.8%）に比べT条件（44.6±3.8%）で有意に小さく、回復もT条件で有意に早かった。また、C条件の腕で2回

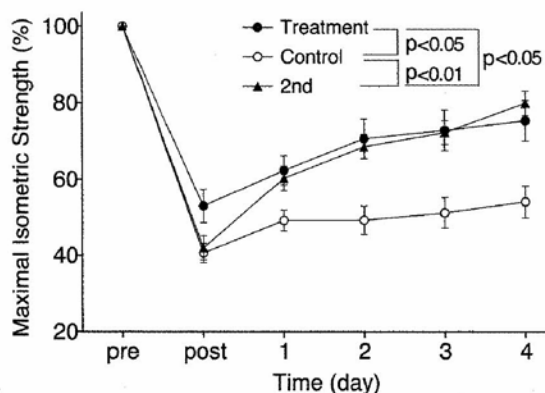


図1 肘関節角度90度における等尺性最大筋力の伸張性運動前値 (pre) を100とした時の運動直後 (post) および1~4日での変化. 筋温上昇条件 (Treatment) とコントロール (Control), コントロールの腕での2回目 (2nd) を比較した.

目の運動を行った結果, 運動直後の筋力低下率は1回目の運動後と全く同じであったが, 運動4日後迄に1回目の運動では, 運動前値の $54.0 \pm 4.2\%$ までにしか回復していなかったのに対し, 2回目では $79.9 \pm 3.2\%$ 迄回復しており, 筋力の回復率は有意に高かった. 肘関節角度80度および100度においても, 傾向は同様であった.

2. 3 ROM

図2に示した運動前値からのROMの変動幅も, C条件に比べT条件で有意に小さかった. ROMの減少は運動3日後に最大であったが, C条件で

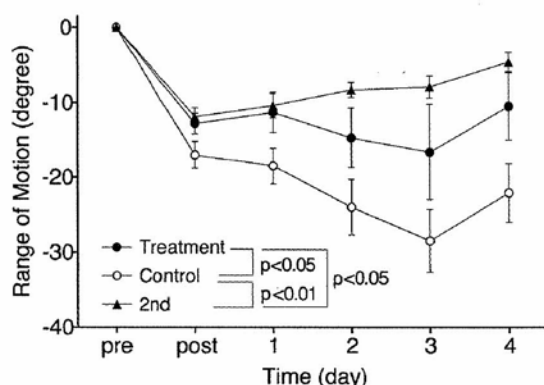


図2 肘関節可動域の伸張性運動前値 (pre) を基準 (0) にした時の運動直後 (post) および1~4日後での変化量. 筋温上昇条件 (Treatment) とコントロール (Control), コントロールの腕での2回目 (2nd) を比較した.

は 28.5 ± 4.2 度であったのに対し, T条件では 16.6 ± 6.4 度と, 10度以上も異なった. C条件の2回目の運動後のROMの変化は1回目と比べ有意に小さく, T条件と比べても有意に小さかった.

2. 4 上腕部周径囲

上腕部周径囲は, 腫脹を反映する指標^{2,11)} である. 上腕部周径囲の運動前値からの増加量を図3に示した. 運動3~4日後に最大となり, 運動前値に比べ約13mmの増加を示したが, T条件とC条件間に有意差は認められなかった. C条件の2回目の運動後の増加は有意に小さく, 運動1日後以降の増加はなく, 運動3~4日後では1回目の半分以下であった. Bモード超音波画像から得られる筋厚やエコー強度の変化も, 腫脹を反映する指標である¹¹⁾ が, これらの変化にも両条件間で有意差は認められなかった.

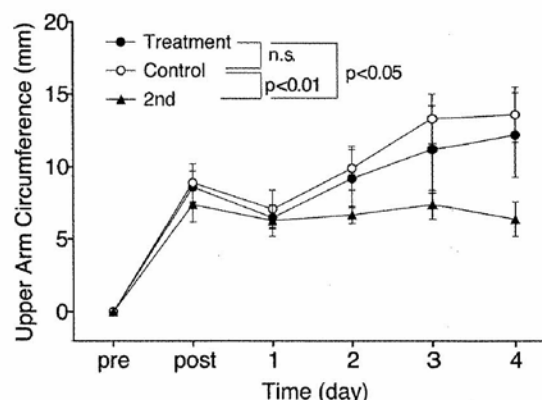


図3 上腕部周径囲 (筋腹中央部) の伸張性運動前値 (pre) を基準 (0) にした時の運動直後 (post) および1~4日後での変化量. 筋温上昇条件 (Treatment) とコントロール (Control), コントロールの腕での2回目 (2nd) を比較した.

2. 5 筋肉痛

図4に, 伸展痛の変化を示した. T条件, C条件とも運動1日後よりDOMSが出現し, 2~3日後にピークとなり, 4日後でも消失しなかった. 筋肉痛はC条件に比べ, T条件で有意に軽度であり, 運動2日後の値を比較すると, 前者では 37.9 ± 4.1 mmであったのに対し, 後者では $25.4 \pm$

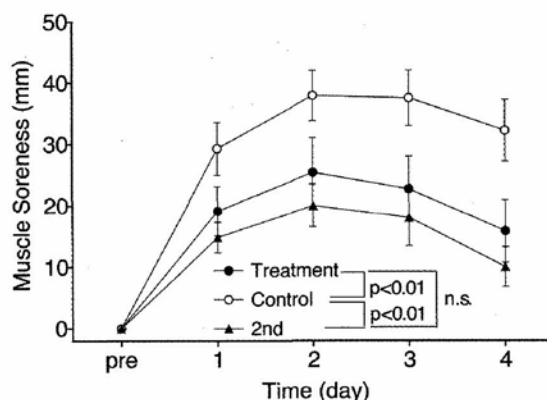


図4 肘関節を伸展した時の上腕屈筋群の痛みの伸張性運動に伴う運動前 (pre) および運動1～4日後の変化。筋温上昇条件 (Treatment) とコントロール (Control), コントロールの腕での2回目 (2nd) を比較した。

5.6mmであった。C条件の2回目の運動後の筋肉痛の程度は、T条件と有意差はなかった。しかし、圧迫痛、屈曲痛については、C条件の1回目に比べ2回目で有意に軽度であったものの、両条件間には有意差は認められなかった。

2. 6 血液中の筋由来タンパク質

血漿CK, ALD 活性値, 血漿Mb濃度には、両条件間に有意差は認められなかった。図5に示したように、血漿CK活性値は運動1日後より上昇し、両条件とも、運動3～4日後に10,000 IU/Lを超える大きな増加を示した。C条件の2回目の運動後の増加は1回目に比べて有意に小さく、ピー

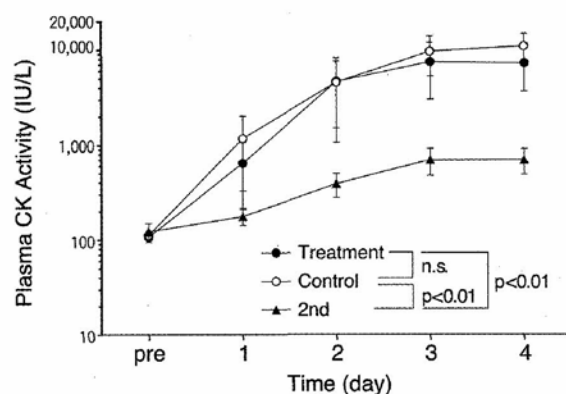


図5 血漿CK活性値の伸張性運動前 (pre) から運動1～4日後での変化。筋温上昇条件 (Treatment) とコントロール (Control), コントロールの腕での2回目 (2nd) を比較した。Y軸は対数表示。

ク値も1,000 IU/L以下であった。血漿ALD活性値においても、1回目の運動後のピークは運動4日後で約110 IU/Lであったのに対し、2回目では約10 IU/Lに過ぎなかった。血漿Mb濃度のピークは運動3日後で、1回目の運動後には約850 μ g/Lであったのに対し、2回目では約60 μ g/Lであった。

3. 考 察

筋温上昇トリートメントの前後では、間接的筋損傷指標の有意な変動は認められなかったことから、筋温上昇それ自体が筋損傷指標に影響を及ぼすことはないと考えられる。しかし、筋温を1日前に上昇させておいた筋では、伸張性運動後の筋機能 (筋力・ROM) の低下 (図1, 2) や遅発性筋肉痛 (図4) が軽度であることが示された。間接的筋損傷指標の中で、筋力とROMは損傷の程度をよく反映する指標であるとされており¹⁹⁾、運動1日前に筋温を上昇させておくことで、筋損傷の程度が軽減されたと結論づけられる。

筋力の変化に注目すると、C条件に比較してT条件では、運動直後での筋力低下が既に小さく、運動直後から4日後の筋力回復率も高かった (図1)。これは、伸張性運動を同じ腕で2回目に行った場合、運動直後には1回目と同じ程度の筋力低下があった (図1) 現象とは異なる。また、先行研究^{2,11,12)}と同様に、明らかな繰り返し効果が見られた上腕部周径囲 (図3) や血漿CK活性値 (図5) の変化に対しては、筋温上昇効果は認められなかった。また、ROM (図2) に関しても、繰り返し効果の方が、筋温上昇効果よりも顕著な減少抑制効果を示していた。これらのことから、繰り返し効果と筋温上昇効果には共通点はあるものの、筋温上昇による筋損傷抑制効果は繰り返し効果とは異なるメカニズムで生じた可能性も考えられる。

筋肉痛においては、伸展痛にのみ有意な筋温上昇効果が認められ、この程度は繰り返し効果と差

がなかった。これには、図2に示したROMの減少が関連している可能性が大きい。肘関節のROMの減少は、肘関節の最大屈曲角度と最大伸展角度の減少によって生じる^{2,11)}が、最大伸展角度の減少が生じている状態で、筋をストレッチすると筋痛が引き起こされる²⁾。筋温上昇によって、ROMの変化が小さく抑えられたことにより、伸展痛の程度も抑制されたと考えられる。

筋温上昇がどのように作用した結果として、筋損傷や筋肉痛の抑制効果が得られたのかは、推察の域を出ないが、一つの可能性として、HSPの関与が考えられる。HSP70は、体温上昇によっても誘導され、タンパク質変性を防ぎ、変性タンパク質の修復に関与している^{7,13)}。Naito et al.¹⁰⁾は、温熱刺激によってHSP70を誘導した筋では廃用性筋萎縮が起こりにくいことを報告している。Lepore et al.⁸⁾は、温熱刺激を与えた筋は、虚血—再還流に伴う筋細胞の壊死が起こりにくくなることを報告している。これらの報告から、温熱ストレスによって発現するHSPが、温熱以外のストレスに対しても機能することは興味深い。

本研究では、トリートメント直後において、筋温が40℃以上に上昇しており、HSPの発現が高まる温度^{7,10,13)}には達していたと考えられる。また、仮にHSPが発現したとした場合、1日後でも量的・質的に保たれていると考えられる¹³⁾。本研究のプロトコルにおいてどんな種類のHSPが、どの程度発現したかは未だ明らかにしておらず、今後の課題である。

Thompson et al.¹⁸⁾は、本研究と同様な上腕屈筋群伸張性運動の48時間後に、上腕二頭筋から採取した筋サンプルにおいて、HSP27とHSP70が大きく増加していたことを報告している。また、Koh⁶⁾は、分子量が18～30kDaと小さなHSPが、伸張性運動に伴う筋損傷を防御する機構に関与している可能性を指摘している。繰り返し効果のメカニズムにも、筋節数の増加¹⁴⁾、細胞骨格タン

パク質の再構築^{4,16)}と共に、HSPの発現^{3,6,16)}が関わっていることが指摘されている。繰り返し効果は、1回目と2回目の間隔が長くなるにつれて減弱していくが、6カ月程度は残存し、1年後には完全に消失することが確かめられている¹²⁾。このような長期的な効果が筋温上昇にも見られるのかについても、今後検討していく必要がある。

さらに、本研究で示されたように、筋温上昇が筋損傷や遅発性筋肉痛の予防に有効であるとした場合、それが筋温を上昇させる簡便な方法である入浴等によっても、同様な効果が得られるのか、もし、そうだとした場合、至適な湯の温度や入浴時間はどのくらいかなど、応用に向けてはさらなる研究が必要である。

4. 結 論

本研究の結果から、久しぶりの運動や、普段やり慣れない運動、通常より量的あるいは質的に強度の高いトレーニングを行う必要がある時など、筋損傷や筋肉痛が生じやすい条件で伸張性筋活動を含む運動を行う前日に、筋温を41度程度まで上昇させておくと、多少なりとも筋肉痛の発現を抑制し、筋機能の低下を抑制する効果が期待できる。そのメカニズムにはHSPが関与している可能性が考えられるが、詳細は不明である。

謝 辞

本研究に対し助成下さいました、財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に、心から感謝申し上げます。今後、この研究をさらに発展させ、さらに詳細で、かつ具体的な提言ができるように努力して参りたいと思います。

文 献

- 1) Armstrong R.B., Warren G.L., Warren, J.A.: Mechanisms of exercise induced muscle fibre injury. *Sports Med.*, 12, 184-207 (1991)

- 2) Clarkson P.M., Nosaka K., Braun B.: Muscle function after exercise induced muscle damage and rapid adaptation. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 24, 512-520 (1992)
- 3) Clarkson P. M., Sayers, S. P.: Etiology of exercise-induced muscle damage. *Can. J. Appl. Physiol.*, 24, 234-248 (1999)
- 4) Fridén J. Lieber R. L.: Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. *Acta Physiol. Scand.*, 171, 321-326 (2001)
- 5) Gibala M.J., MacDougall J.D., Tarnopolsky M.A., Stauber W.T., Florriaga A.: Changes in human skeletal muscle ultrastructure and force production after acute resistance exercise. *J. Appl. Physiol.*, 78, 702-708 (1995)
- 6) Koh T.J.: Do small heat shock proteins protect skeletal muscle from injury? *Exerc. Sports Sci Rev.*, 30, 117-121 (2002)
- 7) Kregel K.C.: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.*, 92, 2177-2186 (2002)
- 8) Lepore D.A., Hurley J.V., Stewart A.G., Morrison W.A., Anderson R.L.: Prior heat stress improves survival of ischemic-reperfused skeletal muscle in vivo. *Muscle & Nerve*, 12, 1847-1855 (2000)
- 9) McHugh M. P., Connolly D.A.J., Eston R.G., Gleim G.W.: Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect. *Sports Med.*, 27, 157-170 (1999)
- 10) Naito H., Poweres S.K., Demirel H.A., Sugiura T., Dodd S.L., Aoki J.: Heat stress attenuate skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J. Appl. Physiol.*, 88, 359-363 (2000)
- 11) Nosaka K., Clarkson P.M.: Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 28, 953-961 (1996)
- 12) Nosaka K., Newton M., Sacco P.: How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last? *Med. Sci. Sports Exerc.*, 33, 1490-1495 (2001)
- 13) Oishi Y., Taniguchi K., Matsumoto H., Ishihara A., Ohira Y., Roy R.R.: Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSP73 during recovery after elevation of muscle temperature. *J. Appl. Physiol.*, 92, 1097-1103 (2002)
- 14) Proske U., Morgan D.L.: Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, and adaptation and clinical applications. *J. Physiol.*, 537, 333-345 (2001)
- 15) Pyne D.B.: Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. *Aust. J. Sci. Med. Sport*, 26, 49-58 (1994)
- 16) Stauber W.T., Smith C.A.: Cellular responses in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol. Cell. Biochem.*, 179, 189-196 (1998)
- 17) Thompson H.S., Clarkson P.M., Scordilis S.P.: The repeated bout effect and heat shock proteins: intramuscular HSP27 and HSP70 expression following two bouts of eccentric exercise in humans. *Acta Physiol. Scand.*, 174, 47-56 (2002)
- 18) Thompson H.S., Scordillis S.P., Clarkson P.M., Lohrer W.A.: A single bout of eccentric exercise increases HSP27 and HSC/HSP70 in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.*, 171, 187-193 (2001)
- 19) Warren G.L., Lowe D.A., Armstrong R.B.: Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med.*, 27, 43-59 (1999)