

健康の維持・増進を目指した 運動処方の人およびラットにおける再検討

大 阪 大 学 大 平 充 宣
(共同研究者) 同 中 井 直 也
鶴 川 接 骨 院 岡 部 洋 興
台湾国立体育学院 陳 全 寿

Reconsideration of Exercise Prescription for Maintenance and Improvement of Health in Human and Rats

by

Yoshinobu Ohira, Naoya Nakai

Graduate School of Medicine,

Osaka University

Hirooki Okabe

Tsurukawa Bone-setting Institute

Chuan-Shou Chen

Taiwan National College of Physical Education

ABSTRACT

Effects of exercise on the utilization of soleus muscle as the countermeasures for prevention of atrophy caused by inhibition of antigravity activity were studied in 7 healthy male subjects. Electromyogram (EMG) activities in soleus were recorded during 1) treadmill walking at 4 and/or 6 km/hr, with 0, 6, 10, and/or 15% uphill inclination, 2) cycling at 70, 130, and/or 170W, by pedaling using arch or front sole, and 3) weight lifting (isometric and/or squat push up) by whole sole or front sole. The greater EMG levels were observed, when the load was increased and the

subjects pedalled by front sole. EMGs were also greater, when the weight lifting was performed by using front sole than whole sole. These results clearly suggested that plantarflexion of ankle joints are essential for stimulation of soleus. As for the walking, two different patterns were noted. EMGs in subjects, who step on the floor using heel, were increased when the inclination and speed were elevated. But those in other subjects, who step on the floor using whole sole, were decreased when the work intensities were increased. It is suggested that the individual differences in the walking patterns should be considered for the prescription of walking exercise. Roles of afferent input on the regulation of protein expression in brain were also investigated in adult rats. Deafferentation was performed bilaterally at L4-6 segmental level of spinal cord. Expression of proteins related to glycolytic enzymes and inhibition of cell death was lowered in hypothalamus and thalamus by deafferentation. But the responses in hippocampal proteins were minor. It is suggested that afferent input, which is influenced by activity of leg muscles, plays an important role in the regulation of brain function.

要 旨

トレッドミル歩行や自転車エルゴメータ運動、膝伸展運動が、ヒトにおけるヒラメ筋活動に及ぼす影響を追求した。その結果、膝伸展および自転車エルゴメータ運動では、足関節の底屈が必須であることが示唆された。かかとから着地するヒトでは、歩行速度や登り勾配が増すほどヒラメ筋活動は増大したが、足裏前部で着地するヒトでは逆に減少した。歩行運動処方には個人の歩行パターンを考慮する必要があることが明らかとなった。また、脊髄 L4-6 における後根神経の両側切除が、脳タンパク質発現に及ぼす影響をラットで追求した。その結果、感覚神経切除 2 週間後、視床および視床下部における解糖系酵素発現、細胞死抑制因子等に関与するタンパク質発現が減少した。しかし海馬には大きな変化はなかった。脚筋活動の影響を受ける感覚神経を介した情報が、脳機能に重要な影響を及ぼすことが示唆された。

緒 言

不慮の事故や疾病、老化等による長期間の bed rest や宇宙飛行等は、抗重力筋の委縮^{1, 5, 7, 12-14, 16, 17, 19, 20)}を誘発する。国際宇宙ステーション (ISS) が完成し、日本人宇宙飛行士の長期間にわたる宇宙滞在も始まった現在、長期間の微小重力環境での運動不足で誘発されるヒラメ筋等の抗重力筋の委縮や機能低下防止策として、自転車エルゴメータ漕ぎやトレッドミル歩行等が利用されているが、それらの効果は必ずしも目的に合った "positive" なものではない²¹⁾。実験等に多忙な宇宙飛行士であるので、運動だけに時間を費やす訳に行かない事情もその原因の一つでもあろうが、果たして個々人の特性に応じた運動がなされているのか疑問も生じる。

1-G の地球上でも、長期間の bed rest 等と同じような健康問題を誘発し、適切な運動処方の開発が求められている。そこで、筋力アップ、有酸素性作業能の改善、肥満の改善等を目指した運動機器の開発、販売やスポーツクラブ等で

の使用などに関する情報は、連日のニュースをにぎわせている。しかし、トレッドミル走、自転車エルゴメータ運動…等により、それぞれの目的に応じた特異的な効果が得られるか否かについては、“ただし、効果の得られ方には個人差があります…”という逃げの言い訳をよく耳にする。そこで、“運動はやればいいに越したことはない”という常識に再度目を向けて、“同じ器具を使った運動でも、目的に応じた運動様式の解明”を目指した研究を実施した。

発育期における脚運動の抑制は、脊髄運動神経の発育抑制も招く¹¹⁾。また、ラット後肢懸垂は、筋電図により推測される筋活動のみならず、脊髄において測定された求心性神経活動の抑制も誘発する⁸⁾。これらの現象が関係しているものと思われるが、9週間にわたるラットの後肢懸垂による歩行抑制は、正常コントロールには見られない足関節伸筋と屈筋が同時に活動する異常な歩行パターン (co-contraction) も報告されている¹⁵⁾。後肢懸垂前は正常な歩行をしていたラットが、長期間の脚運動抑制により意図したような筋運動ができなくなっている現象である。宇宙飛行から地球へ帰還した直後の宇宙飛行士たちも、意図したような歩行等が困難だとよく口にする。このような現象は、ラットにしてもヒトにしても、まもなく回復するが、筋からの感覚神経情報が長期間抑制されると、随意的なモーターコントロールに支障が出ることを示唆するものである。

さらには、脚運動の不足または抑制が脳の特性に及ぼす影響も憂慮されている。たとえば、DeFelipe ら⁶⁾は16日間の宇宙飛行により発育期のラット脳に顕著な変化が生じたと報告している。Yasuhara ら²⁴⁾も後肢懸垂による抗重力活動の抑制は、成熟ラットの海馬における神経発生を抑制すると報告している。このような現象は、体力のみならず、日常生活における quality

of life の低下や健康への影響も招き、憂慮される問題である。健康の維持や増進には身体運動が必須であることには、疑いをはさむ余地はないが、詳細な機構は明らかではない。そこで、脳への影響は感覚神経を介した末梢からの情報が非常に重要な役割を果たしているという仮説に基づき、感覚神経切断が脳タンパク質発現に及ぼす影響も追求した。

1. 研究方法

1.1 ヒトにおける研究

本研究では、運動に伴う各種危険性等を説明した上で、健康な成人男子7名 (19-50歳) より実験への参加に同意を得た後、被験者としての協力をお願いした。現在ISSで実施されている3種類の運動が、抗重力筋活動低下による委縮が顕著なヒラメ筋に好ましい効果を及ぼしているのか否か追求した。左ヒラメ筋に双曲の皿電極を装着し、筋電図を記録することによりヒラメ筋の活動レベルを推定した。次に述べる3種類の運動は素足で実施した。

1.1.1 トレッドミル歩行

トレッドミルの角度や速度を変えた場合のヒラメ筋の筋電図を記録し、筋の利用度を追求した。安静立位の筋電図記録後、0, 6, 10, それに15%の上り勾配での歩行を、4および6 km/hrの速度で実施し、筋電図を記録した。筋電図は積分値 (mV/sec) として算出し、データ分析を行った。また、ビデオ撮影により歩行および着地パターンも分析した。

1.1.2 自転車エルゴメータ運動

自転車エルゴメータ運動では、70, 130, および170 Wの負荷強度 (回転数は常に60 rpm) での運動を、足裏の土踏まずまたは足裏前部をペダルに当てて漕ぐ運動中の筋電図記録を行った。

1.1.3 ウェイトリフティング運動

最大筋力発揮によるアイソメトリックおよび

20 kg のバーベルを担いだスクワット膝伸展運動を、足裏全体を使った場合と足首を伸展（底屈）させる努力をしながらの場合で実施し、筋電図記録を行った。

1.2 ラットにおける研究

感覚神経切除モデルを用いて、後肢筋からの感覚フィードバックを慢性的に抑制した場合の影響を検討した。生後14週齢のウィスターハノーバー雄ラットを感覚神経切除群、偽手術群に分けた。感覚神経切除群のラットは、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与（5 mg/100 g 体重）による麻酔下において背部を切開し、後肢筋を支配する脊髄 L4-6 腰椎由来の後根神経を両側で切除した。偽手術群でも同様に後根神経を露出させたが、神経接続はそのままにした。手術後、十分な餌と水を与えて2週間飼育した。

2週間後、ラットをペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与（5 mg/100 g 体重）により麻酔し、心臓切除により血液を抜き、脳を摘出した。摘出した脳から直ちに視床下部および海馬を切り分け、液体窒素中で瞬間凍結した。その後、液体窒素で冷却したステンレス乳鉢に凍結サンプルを入れ、パウダー状になるまですりつぶし、サンプルは1.5 mL のポリプロピレンチューブに移し、1 % triton X-100 を含む緩衝液をサンプル体積の約3倍程度加え、4℃で一晩振とうした。翌日、3,700 rpm で10分間遠心分離し、上澄みを採取した。この上澄みをさらにウルトラフリー（ミリポア）を用いてフィルターにかけ、ゲノムDNA やその他の大きな混入物を除去した後、プロテオミクス解析を行った。

2. 結果および考察

2.1 ヒトにおける研究

2.1.1 トレッドミル歩行

6名の被験者は、膝関節を伸ばしかかから着地する歩行であったが、1名における歩行は膝関節は少々屈曲したまま、足裏前部からの着地をするパターンであった。前者の場合、トレッドミル角度が増大するほどヒラメ筋活動は増し、同一角度でも歩行速度が速いほど筋電図レベルは増大した（図1）。ところが、後者では、安静立

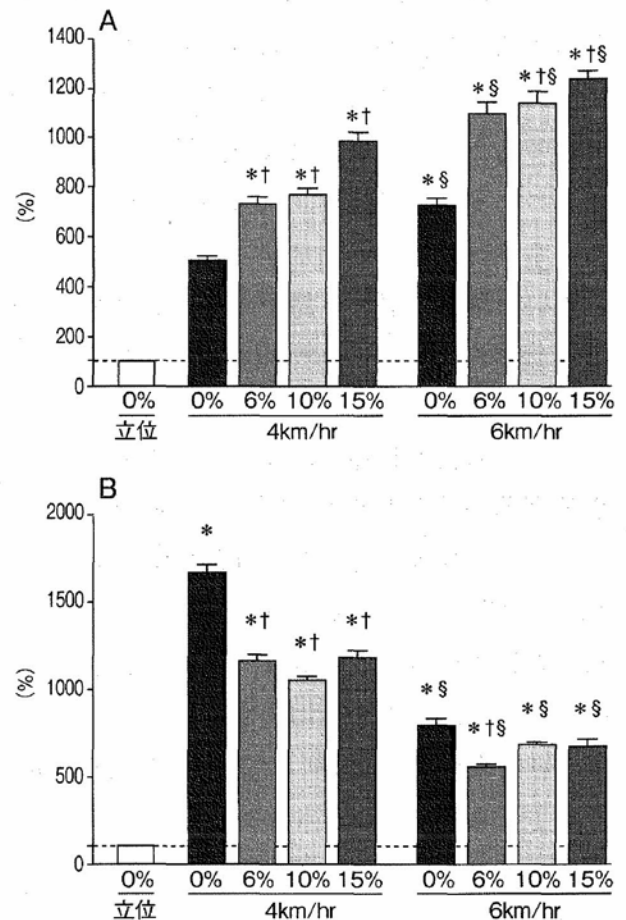


図1 A: かかとから着地するヒトにおける歩行中の筋電図活動の変化。B: 足裏前部から着地するヒトにおける歩行中の筋電図活動の変化。安静立位時（100%）に比較した相対的变化。Mean ± SEM. *, †, and §: $p < 0.05$ vs. 立位（0%）、0%での歩行、それに4 km/hrでのそれぞれの角度での歩行。

位時よりは運動時筋電図は増したものの、4 km/hrでのフラット（0%勾配）なトレッドミル歩行時の筋活動が最大であった。速度が6 km/hrに増

えると、どの角度の場合も筋電図レベルは有意に減少した。また、トレッドミル角度が6, 10, それに15%の場合、それぞれの間に差はなかったが、いずれの場合も0%での歩行よりも低値であった。これらの結果、トレッドミル歩行運動における速度や勾配を処方する場合、個人の歩行パターンをあらかじめ把握しておく必要性が示唆された。

2.1.2 自転車エルゴメータおよびウェイトリフティング運動

自転車エルゴメータ運動中のヒラメ筋筋電図レベルは、負荷に比例的に増大した(図2)。ところが、いずれの負荷においても、足裏前部でペダルを漕ぐ場合が土踏まず部をペダルにあて

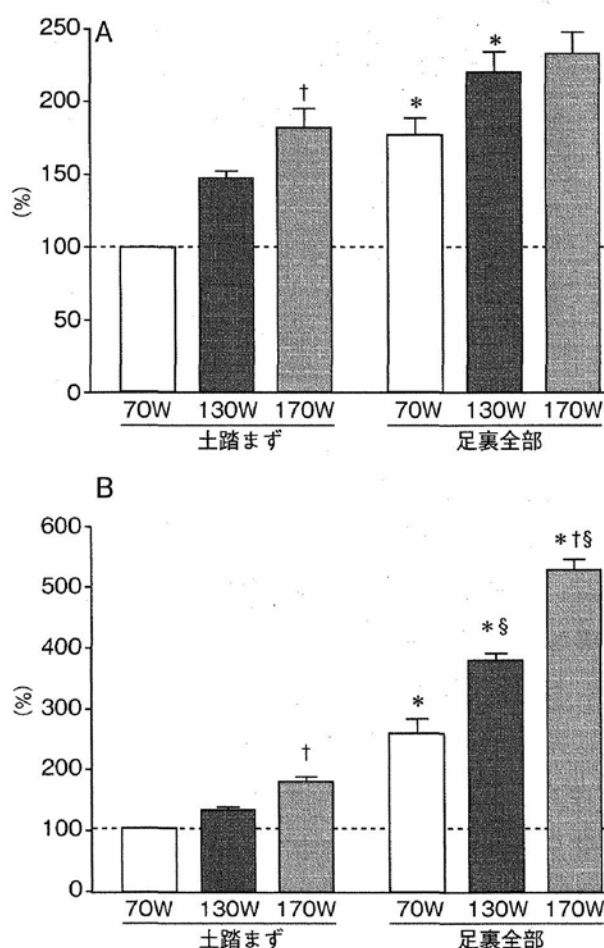


図2 土踏まずまたは足裏前部をペダルに当てて、自転車エルゴメータ運動した場合のヒラメ筋筋電図の比較
A: 歩行でかかとから着地するヒトにおける筋電図活動の変化。
B: 歩行で足裏前部から着地するヒトにおける筋電図活動の変化。土踏まずをペダルに当てて70 Wの強度で漕いだ場合の値(100%)に比較した相対的变化を示してある。Mean $\pm$ SEM. *, †, and §: $p < 0.05$ vs. 土踏まずを使った各強度での運動, それぞれの部位を使った運動における70 Wおよび130 W。

て漕ぐ場合より高値であった。着地パターンが異なる被験者間にトレッドミル歩行における筋電図の反応に大きな違いが見られたような現象は、自転車エルゴメータ運動には認められなかった。アイソメトリックおよびスクワット膝伸展運動時のヒラメ筋筋電図レベルも、足関節を底屈させようと努力した場合が有意に高値であった。これらの結果、ヒラメ筋の活動を高レベルに維持するための自転車エルゴメータおよびウェイトリフティング運動では、足関節を底屈させる努力をしながらの運動が必須であることが示唆された。

2.2 ラットにおける研究

感覚神経切除群と偽手術群の視床下部および海馬の抽出液を用いて2次元電気泳動を行った結果、図3に示したように13個のスポットにおいて感覚神経切除処置により発現量の増大または減少が認められた。ゲル面左上の最も濃いスポットは微小管構成タンパク質チューブリンであり、内因性コントロールタンパク質として広く用いられているため、泳動に使われた細胞数を反映していると考えることができる。視床下部と海馬ではスポット濃度が大きく異なったが、感覚神経切除処置による影響は見られなかった。従って、感覚神経切除群および偽手術群ではほぼ同等数の細胞からの抽出タンパク質がスポットに反映されていることが明らかである。

プロテオミクス解析の結果、感覚神経を切除したラットの視床では、①解糖系酵素発現 (Spot #1: enolase 1, alpha, Spot #2: pyruvate kinase, muscle, Spot #3: Triosephosphate isomerase 1) の減少²³⁾, ②細胞死抑制因子 (Spot #4: Synuclein, beta, Spot #5: Nucleotide diphosphate kinase A, Spot #6: Nucleotide diphosphate kinase B, Spot #8: Cofilin 2, muscle, Spot #9 and 10: Peptidylprolyl isomerase A, Spot #11:

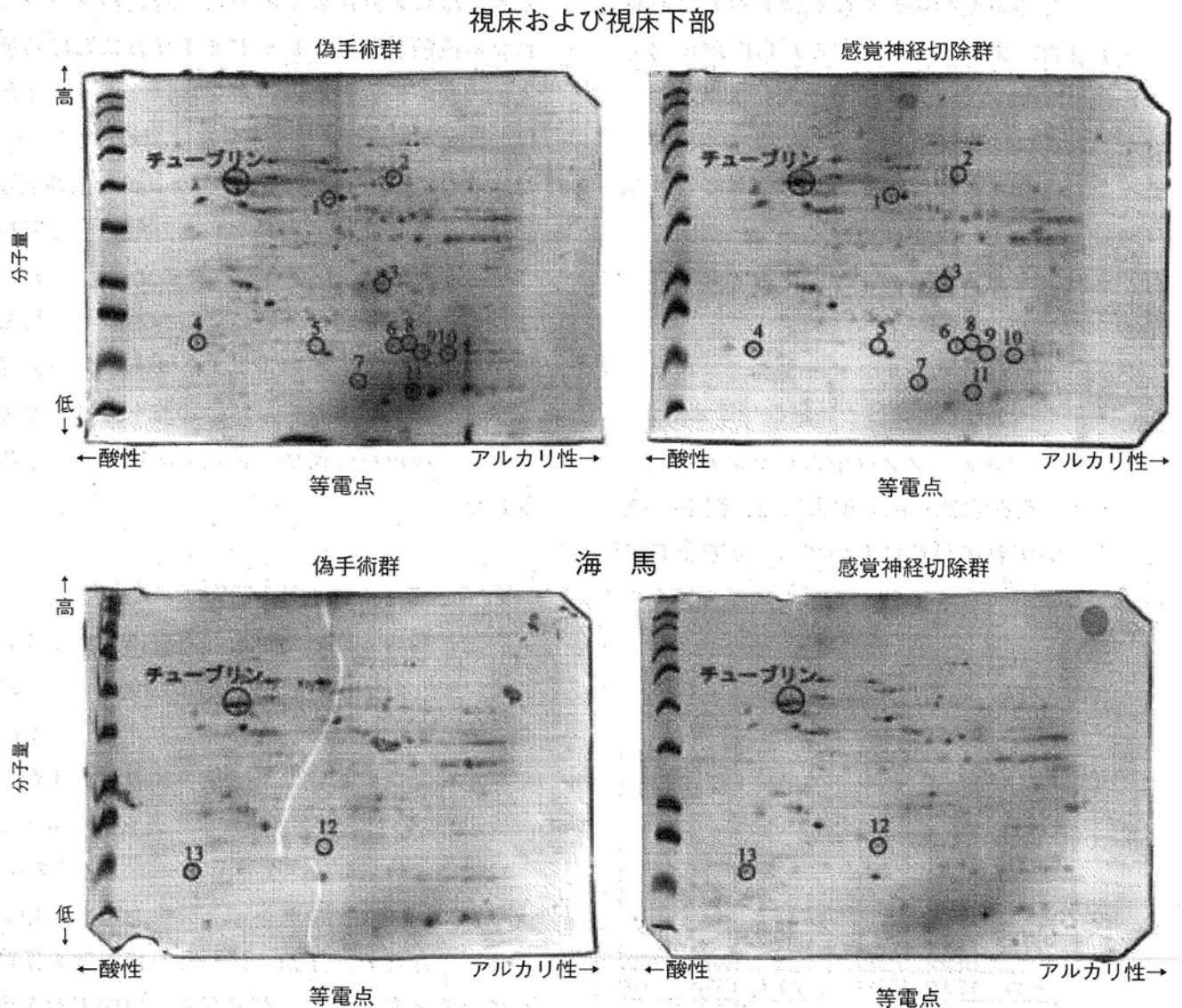


図3 視床下部（上）および海馬（下）における2次元電気泳動のスポット発現パターン。
ゲル染色にはクマシーブリリアントブルーを用いた。

Hemoglobin alpha 1 chain) の減少^{2, 9, 10, 18, 22)}、
③ドーパミン作動性ニューロン関連因子 (Spot #7: Histidine triad nucleotide binding protein 1) への影響 (3) を誘発した。いずれもニューロンの機能や生存性を低下させると考えられる変化であったが、視床そのものの output としてどのような機能的変化 (例えばホルモン分泌等への影響) があったかは不明である。一方、海馬では2種のタンパク質 (Spot #12: ATP synthase D chain, mitcondial, Spot #13: Synuclein, beta) の発現増大が認められたが、これらの変化に共通した影響を見出すことはできなかった^{4, 22)}。し

かし、海馬と連携して働く視床において大きな機能的変化が推測されるため、記憶・学習能にも少なからず影響はあったのではないかと考えられる。また本研究では、視床に発現するタンパク質に大きな発現変化が認められたため、記憶・学習能のみならず情動や自律神経系への影響も引き起こされる可能性が示唆された。

3. まとめ

ヒトにおける膝伸展および自転車エルゴメータ運動では、足関節の底屈が必須であることが示唆された。かかとから着地するヒトでは、歩行速

度や登り勾配が増すほどヒラメ筋活動は増大したが、足裏前部で着地するヒトでは逆に減少した。歩行運動処方には個人の歩行パターンを考慮する必要があることが明らかとなった。また、ラットにおける脊髄 L4-6 における後根神経の両側切除が、視床および視床下部における解糖系酵素発現、細胞死抑制因子等に関与するタンパク質発現を減少させるという結果が得られた。脚筋活動の影響を受ける感覚神経を介した情報が、脳機能に重要な影響を及ぼすことが示唆された。

謝 辞

本研究は、財団法人・石本記念デサントスポーツ科学振興財団・平成 22 年度研究委託および日本学術振興会科学研究補助（基盤 S・19100009）によって実施した。また、大阪大学医学系研究科・河野史倫氏および尾家慶彦氏、それに生命機能研究科・大平宇志氏には実験およびデータ整理等において、多大なご協力を得た。厚くお礼申しあげます。

文 献

- 1) Allen L., Yasui W., Tanaka T., Ohira Y., Nagaoka S., Sekiguchi C., Hinds W.E., Roy R.R., Edgerton V.R., Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J. Appl. Physiol.*, 81: 145-151 (1996)
- 2) Balastik M., Lim J., Pastorino L., Lu K.P., Pinl in Alzheimer's disease: multiple substrates, one regulatory mechanism? *Biochim. Biophys. Acta.*, 1772: 422-429 (2007)
- 3) Barbier E., Zapata A., Oh E., Liu Q., Zhu F., Undie A., Shippenberg T., Wang J.B., Supersensitivity to amphetamine in protein kinase-C interacting protein/HINT1 knockout mice. *Neuropsychopharmacology*, 32: 1774-1782 (2007)
- 4) Basso M., Giraudo S., Corpillo D., Bergamasco B., Lopiano L., Fasano M., Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics*, 4: 3943-3952 (2004)
- 5) Caiozzo V.J., Baker M.J., Herrick R.E., Tao M., Baldwin K.M., Effects of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of slow muscle. *J. Appl. Physiol.*, 76: 1764-1773 (1994)
- 6) DeFelipe J., Arellano J.I., Merchan-Perez A., Gonzalez-Albo M.C., Walton K., Llinas R., Spaceflight induces changes in the synaptic circuitry of the postnatal developing neocortex. *Cereb. Cortex.*, 12: 883-891 (2002)
- 7) Edgerton V.R., Roy R.R., Neuromuscular adaptations to actual and simulated spaceflight. In: *Handbook of Physiology, Sect 4, Environmental Physiology, III. The Gravitational Environment*, Ed. by Fregly M.J., and Blatteis C.M., Oxford University Press, New York, pp. 721-763 (1996)
- 8) Kawano F., Ishihara A., Stevens J.L., Wang X.D., Ohshima S., Horisaka M., Maeda Y., Nonaka I., Ohira Y., Tension- and afferent-input-associated responses of neuromuscular system of rats to hindlimb suspension and/or tenotomy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 287: R76-R86 (2004)
- 9) Kimura N., Shimada N., Ishijima Y., Fukuda M., Takagi Y., Ishikawa N., Nucleoside diphosphate kinases in mammalian signal transduction systems: recent development and perspective. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 35: 41-47 (2003)
- 10) Kojima N., Shirao T., Synaptic dysfunction and disruption of postsynaptic drebrin-actin complex: a study of neurological disorders accompanied by cognitive deficits. *Neurosci. Res.*, 58: 1-5 (2007)
- 11) Nagatomo, F., Ishihara A., Ohira Y., Effects of hindlimb unloading at early postnatal growth on cell body size in spinal motoneurons innervating soleus muscle of rats. *Int'l. J. Develop. Neurosci.*, 27: 21-26 (2009)
- 12) Ohira Y., Neuromuscular adaptation to microgravity environment. *Jpn. J. Physiol.*, 50: 303-314 (2000)
- 13) Ohira Y., Edgerton V.R., Neuromuscular adaptation to gravitational unloading or decreased contractile activity. *Adv. Exer. Sports Physiol.*, 1: 1-12 (1994)
- 14) Ohira Y., Jiang B., Roy R.R., Oganov V., Ilyina-Kakueva E., Martin J.F., Edgerton V.R., Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, 73: 51S-57S

- (1992)
- 15) Ohira Y., Nomura T., Kawano F., Sato Y., Ishihara A., Nonaka I., Effects of nine weeks of unloading on neuromuscular activities in adult rats. *J. Gravit. Physiol.*, 9: 49-60 (2002)
 - 16) Ohira Y., Yoshinaga T., Nonaka I., Ohara M., Yoshioka T., Yamashita-Goto K., Izumi R., Yasukawa K., Sekiguchi C., Shenkman B.S., Kozlovskaya I.B., Histochemical responses of human soleus muscle fibers to long-term bedrest with or without countermeasures. *Jpn. J. Physiol.*, 50: 41-47 (2000)
 - 17) Ohira Y., Yoshinaga T., Ohara M., Nonaka I., Yoshioka T., Yamashita-Goto K., Shenkman B.S., Kozlovskaya I.B., Roy R.R., Edgerton V.R., Myonuclear domain and myosin phenotype in human soleus after bed rest with or without loading. *J. Appl. Physiol.*, 87: 1776-1785 (1999)
 - 18) Oyama R., Yamamoto H., Titani K., Glutamine synthetase, hemoglobin alpha-chain, and macrophage migration inhibitory factor binding to amyloid beta-protein: their identification in rat brain by a novel affinity chromatography and in Alzheimer's disease brain by immunoprecipitation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1479: 91-102 (2000)
 - 19) Riley D.A., Ilyina-Kakueva E.I., Ellis S., Bain J.L., Slocum G.R., Sedlak F.R., Skeletal muscle fiber, nerve, and, blood vessel breakdown in space-flown rats. *FASEB J.*, 4: 84-91 (1990)
 - 20) Tischler M.E., Henrickson E.J., Munoz K.A., Stump C.S., Woodman C.R., Kirby C.R., Spaceflight on STS-48 and earth-based unweighting produce similar effects on skeletal muscle of young rats. *J. Appl. Physiol.*, 74: 2161-2165 (1993)
 - 21) Trappe S., Costill D., Gallagher P., Creer A., Peters J.R., Evans H., Riley D.A., Fitts R.H., Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station. *J. Appl. Physiol.*, 106: 1159-1168 (2009)
 - 22) Windisch M., Wolf H.J., Hutter-Paier B., Hofmeister A., Wronski R., Is alpha-synuclein pathology a target for treatment of neurodegenerative disorders? *Curr. Alzheimer Res.*, 4: 446-457 (2007)
 - 23) Yamada K., Noguchi T., Regulation of pyruvate kinase M gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 256: 257-262 (1999)
 - 24) Yasuhara T., Hara K., Maki M., Matsukawa N., Fujino H., Date I., Borlongan C.V., Lack of exercise, via hindlimb suspension, impedes endogenous neurogenesis. *Neuroscience*, 149: 182-191 (2007)