寒冷環境を活かした低負荷での運動効果
－筋量増加に働くマイオカインに着目して－

長　崎　大　学　　土　屋　吉　史

Effect of Low-Intensity Exercise under Cold Environment for Myokines, Involved in Muscle Mass

by

Yoshifumi Tsuchiya
Nagasaki University

ABSTRACT

It is important to maintain the skeletal muscle mass for extending healthy life expectancy. Recently, myokine which is released from skeletal muscle by muscle contraction has been paid attention for maintain of muscle mass. Many studies suggested that the myokoines are facilitated by high-volume exercise. The purpose of the present study was to verify that myokines, involved in maintain of muscle mass, are enhanced by low-intensity exercise under cold environment.

Six healthy males（Age: 22.4 ± 0.4 yrs, height: 171 ± 2.7 cm, weight: 63.8 ± 2.8 kg）conducted exercise with a normal temperature condition（n = 6）and exercise with a cold temperature condition（n = 6）. All subjects performed pedaling at 60% of maximal oxygen uptake（$\dot{V}O_2max$）for 60 min in each condition. Blood samples were collected before exercise, during exercise, immediately after exercise, and 1, 3, and 24 h after exercise.

Unanticipatedly, Irisin and FGF21 concentrations in blood did not show significant difference between groups. However, decreased blood insulin concentration was impaired in cold temperature condition, but not normal temperature condition.

Therefore, these results suggested that exercise with cold environment did not effective for myokines, involved in maintain muscle mass response to exercise.

要　旨

健康寿命の延伸を図るうえで，骨格筋量を維持することは重要である．近年では骨格筋収縮により血中に放出される「マイオカイン」が筋量維持の一端を担っていることが報告されている．マイオカインは多くの場合，高負荷や長時間の運動での応答が確認されている．本研究では，こうした運動が遂行困難な者でも，寒冷環境を利用することで低負荷での運動により筋量の維持に重要なマイオカイン分泌を合理的に促すことができるか否かを検証した．対象は，健康な成人男性 6 名（20-30 歳）とし 2 回の異なる温度環境条件下での運動試技（通常温 : 24℃，低温 : 15-19℃）を実施した．各温度環境下での運動は，40 分間の安静後に最大酸素摂取量の 60％の運動強度で 1 時間のペダリングとした．採血は運動前後において 6 回にわたり経時的（運動前，運動 30 分後，運動直後，運動終了 1，2，3 時間後）に行った．その結果，予想に反し寒冷環境下において筋量の維持に重要な運動誘発性のマイオカインである Irisin および FGF21 は，通常温度環境下でのそれらと有意な違いを示さなかった．その一方で，有酸素運動において FGF21 と逆の応答を示す insulin は，寒冷環境下での運動により減少が抑制されていた．

以上のことから，15-19℃ 程度の寒冷環境下での運動は筋量維持に重要なマイオカインは，通常温度環境下での応答と差異がないことが示唆された．

緒　言

急速な高齢化が進行する我が国において，健康寿命を延伸させる試みは生活の質を維持するうえで重要である．これまで「健康寿命の長さ」は「骨格筋量」と強く正相関することが示されており [1]，骨格筋が体全体に健康寿命を伸ばすよう働きかけていることが示唆されている．このことを証明するかのように近年では，運動によって骨格筋から分泌され局所の骨格筋や他の組織（脳や脂肪，肝臓など）対し生理作用を発揮する「マイオカイン」が注目されている．このマイオカインの生理作用は多岐に渡るが，主に運動による糖や脂質などの代謝改善効果を説明する因子としての報告が多い [2]．そんな中，筋量の維持に働く可能性のあるマイオカインである Irisin と FGF21（線維芽細胞増殖因子 21）は筋量維持に重要な鍵因子として期待されている [3]．

Irisin は 2012 年に発見されたマイオカインであり，肥満の原因である白色あるいは褐色脂肪様細胞を，高い熱産生能をもつ褐色脂肪細胞へ変化させることにより基礎代謝量を増加させる生理作用をもつ [2]．これは，これまであまり議論されることのなかった，運動による基礎代謝量増大を説明する突破口となった．この Irisin は，空腹時血漿インスリン濃度の低下や食後の血糖上昇の抑制効果もあることから，脂質代謝と糖代謝の双方に対する代謝改善効果をもつことが示されている [2]．近年では，これらの代謝改善効果だけでなく，筋量および筋力の維持にも重要であることが示されてきている [4, 5]．実際に，筋疾患モデルマウスに Irisin を投与することで筋線維横断面積の増加 [4] や，下肢筋の除神経に伴う筋萎縮抑制効果が観察されている [5]．これに加え，筋損傷に伴う筋の修復過程においても筋線維横断面積の増加やそれに伴う握力の増加も確認されていることから [5]，Irisin が筋の分化制御過程における機能維持にも

重要であることが示唆されている．

FGF21 も筋量維持に重要なマイオカインとしての報告がある[3]．この研究では，筋肥大に重要な AKT タンパク質を骨格筋特異的に過剰発現させると，骨格筋内の FGF21 たんぱく質発現量の増加および血清 FGF21 濃度の上昇がみられている．この結果は，血中の FGF21 は筋肥大シグナルの動態を推し量るバイオマーカーであることを示している．

これら 2 種のマイオカイン（Irisin・FGF21）はもともと，白色および褐色脂肪様細胞の褐色化を誘導する因子として知られていたため[7]，運動刺激だけでなく，寒冷環境下への曝露[8]に対する実験も行われてきている．実際，これらのマイオカインは寒冷暴露により血中濃度の上昇が報告されている[7]．特に，FGF21 は，マイオカインでありながら，寒冷環境下への曝露によっても肝臓から放出されることも報告されている[10]．

これらのマイオカインの機能は，細胞や初代培養細胞などの *In vitro* の実験にて証明されてきた．さらに今日では並行して，ヒトを用いた運動実験においても運動に対する血中のマイオカインの応答も確認されている．しかし，こうした運動実験では必ずしも一般の方に処方可能な負荷設定でない．そのため，マイオカインの恩恵を必要とする肥満や骨粗鬆症を抱えた運動習慣のない中・高齢者に対して誤った運動を処方する可能性がある．このような現状を打開するためには，低負荷であっても筋量の維持に重要なマイオカインを合理的に増加させる運動療法の構築が必要である．

上述したように，Irisin および FGF21 は骨格筋収縮のみならず，寒冷環境下への曝露のみでも産生が高まることが示されている．そこで我々は，寒冷環境を利用することで運動強度の高い運動をせずとも Irisin および FGF21 の産生量を効率的に増加させることができるのではないかと考えた．

1．方　法

1．1　被験者

被験者は，一般男性 6 名（年齢：22.4±0.4 歳，身長：171.6±2.7cm，体重：63.8±2.8kg）とした．本研究では，同一被験者が通常温度環境と寒冷温度環境下それぞれで 2 回運動を行うクロスオーバーデザインを採用した．被験者へのインフォームド・コンセントとして，予め研究の趣旨や内容とそれに伴うリスク，実験への参加の拒否と随時撤回の自由等を書面および口頭で十分に説明し，自主的な参加と実験の理解と同意が得られたものを被験者とした．本研究は，立命館大学倫理委員会の承認（承認番号 BKC-IRB-2015-006）を受けた上で実施した．

1．2　最大酸素摂取量測定

本実験に先立ち，各条件で用いる運動強度を決定するために最大酸素摂取量（$\dot{V}O_2max$）の測定を実施した．運動中の環境温度の違いは，同一の運動負荷であっても酸素摂取量に違いを生じる．このため，本研究ではこの影響を排除するために通常温（24℃）および低温環境下（15-19℃）にてそれぞれ $\dot{V}O_2max$ の測定を実施し（計 2 回），本実験では条件間における相対的運動強度を統一した．

$\dot{V}O_2max$ の測定にはペダリング運動を用い（828E, Monark, Uppsala, Sweden），呼気ガスによる代謝諸量を代謝分析測定機（AE300S, ミナト医科学社製，大阪，日本）を用いて測定した．被験者には，本実験で用いる各条件の温度を，あらかじめ設定した人工気象室に入室してもらい，温度順化のため 30 分間座位安静を保持してもらった．順化の確認には鼓膜音を指標として用い，順化の確認後に $\dot{V}O_2max$ の測定を実施した．被験者には，1kp の運動負荷で 5 分間のウォーミングアップ後，1kp の負荷から疲労困憊に至るまで 2 分毎に 0.5kp

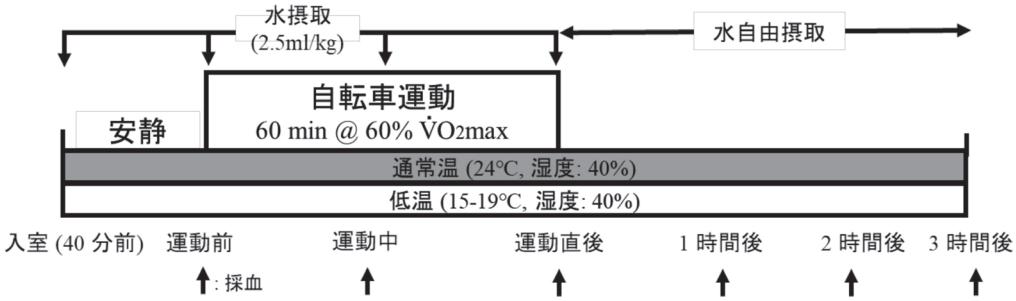

図1　実験デザイン

漸増させるペダリング運動をさせた．$\dot{V}O_2max$ の到達時の判定基準は 1）60rpm の回転数の維持が不可能，2）$\dot{V}O_2$ のプラトー，3）自覚的運動強度（Brog's scale）が 18 以上への到達，4）推定最高心拍数への到達の中から 2 つ以上の項目を満たす場合とした．

1．3　環境温度の設定

実験は，温度と湿度設定が可能な人工気象室を用いて行われた．本研究では，震えによる筋収縮が熱産生に及ぼす影響を排除するため，低温条件の温度を震えが生じない最低温度（15-19℃）に設定した．また，震えが生じる温度には個体差が生じることから，予備実験にて深部体温，鼓膜音および震えの有無をモニタリングしながら 15-19℃の範囲で温度を個別に設定した．なお，湿度は両運動条件で 40% に統一した（図 1）．

1．4　運動プロトコール

本実験における運動には，40 分の安静後に $\dot{V}O_2max$ の 60％の運動強度で 1 時間のペダリングを用いた．

1．5　測定項目

測定項目は，運動前後における深部体温の変動を把握するため直腸温と，採血による生化学的指標とした．直腸温は，専用のプローブの先端を直腸内に約 10cm 挿入して測定した．採血は，人工気象室入室から 40 分後の運動前，運動開始 30 分後，運動終了直後，運動終了 1 時間後，2 時間後，3 時間後に行った（図 1）．採血は全て空腹条件下で行われ，肘正中静脈から毎回 13-15ml の血液を採取した．採取した血液は，解析まで -60℃の超低温冷凍庫において保存した．血中乳酸濃度は採血直後に濃度分析器（アークレイ社製，東京，日本）にて測定した．血漿 Irisin および FGF21 濃度は，市販のキット（Phoenix pharmaceuticals, Germany および R&D systems, USA）を用いて，ELISA 法により測定した．

血中ヘモグロビンおよびヘマトクリット値，血清 insulin 濃度の測定は，株式会社 SRL に委託した．なお，運動中の発汗量に起因する条件間における血液濃縮の差（見かけ上の血液指標の上昇）を排除するために，ヘモグロビン値とヘマトクリット値から血液濃縮の補正値を算出した [9]．

1．6　統計解析

すべての値は，平均値 ± 標準誤差で示した．運動に伴う血液指標の経時変化の比較には，条件と時間を要因とする二元配置分散分析を用い，交互作用および主効果が認められた場合は，対応のある T 検定あるいは Tukey–Kramer 法による多重比較検定を行った．有意水準はすべて $P < 0.05$ とした．

2．結　果

2．1　直腸温

各条件における運動前後の直腸温は有意な交互

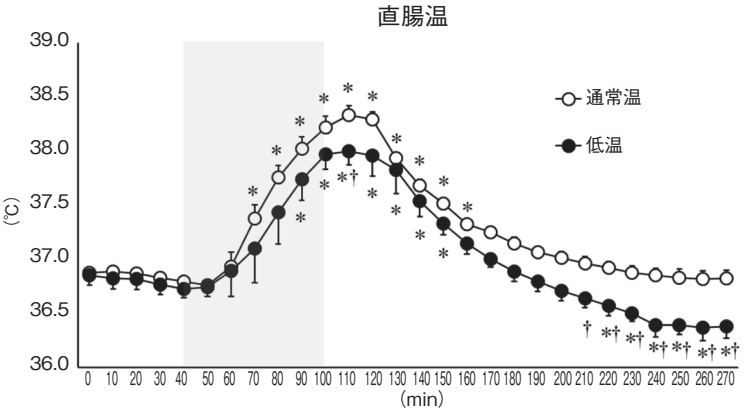

図2　直腸温の変化
Mean ± SE, *; P <0.05 vs. 運動前（40 min）. † ; P < 0.05 vs. 通常温

作用が認められた．運動に伴い通常温条件では，直腸温測定開始 70 － 160 分まで，低温は 90 － 150 分まで有意な高値を保ち続けた．さらに，低温条件では，220 － 270 分まで有意な低値を維持した．また, 低温条件は通常温条件に比べ 110 分, 210 － 270 分（実験終了）のまで有意に低い値示し続けた（図２）.

2．2　血中乳酸濃度

運動前後における血中乳酸濃度は，有意な交互作用が認められ，いずれの条件においても運動開始 30 分後の時点で有意に上昇した．しかし，通常温条件では運動直後まで有意な高値を維持していたのに対し，低温条件は運動前の値との間に優位性は認められなかった（図３）.

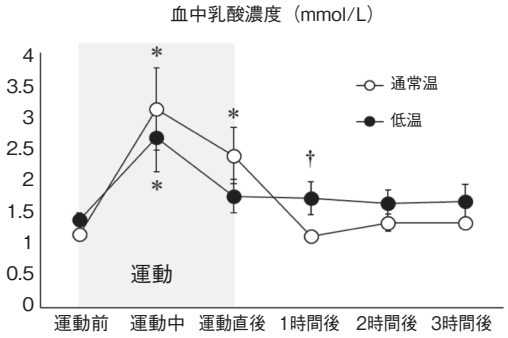

図3　血中乳酸濃度の変化
Mean ± SE, *; P<0.05 vs. 運動前（40 min）. † ; P < 0.05 vs. 通常温

2．3　血漿イリシン濃度

運動前後における血漿イリシン濃度は，交互作用およびいずれの主効果の有意性も認められなかった（図４）.

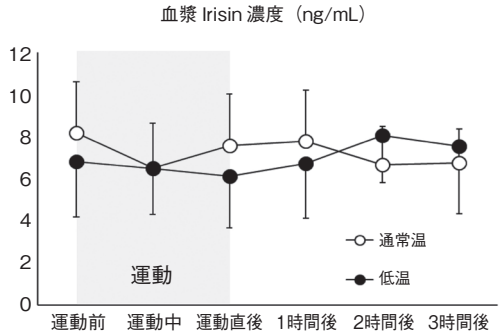

図4　血漿Irisin濃度の変化
Mean ± SE

2．4　血漿 FGF21 濃度

運動前後における血漿 FGF21 濃度は，有意な主効果（時間）が認められ，運動終了１時間後に

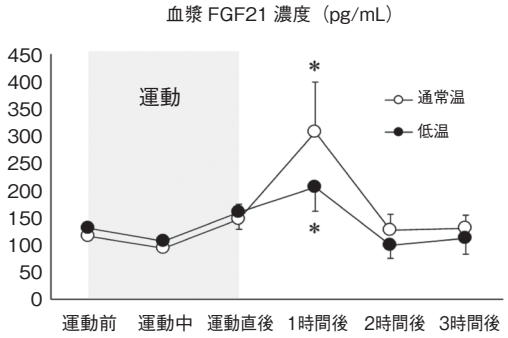

図5　血漿FGF21濃度の変化
Mean ± SE, *; P<0.05 vs. 運動前

いずれの条件でも有意に上昇したが，条件間の差は認められなかった（図５）．

２．５　血清 insulin 濃度

運動前後における血清 insulin 濃度は，有意な主効果（時間）が認められた．通常温条件では，運動時間に伴い低下し運動直後まで有意な低値を示し，低温条件では運動直後でのみ有意な低値を示した．また，運動前では低温条件が通常温条件に比べ有意な低値を示した（図６）．

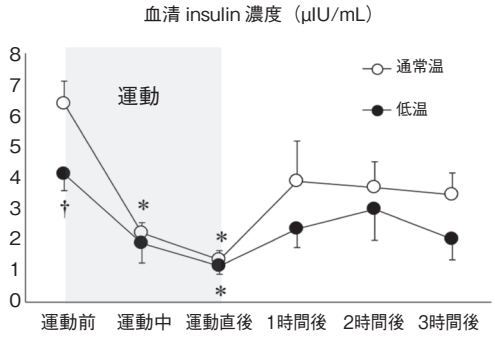

図６　血清 insulin 濃度の変化
Mean ± SE, *; P<0.05 vs. 運動前．† ; P < 0.05 vs. 通常温

２．６　$\dot{V}O_2max$

各条件における $\dot{V}O_2max$ は，通常温条件で 47.90±3.5ml/min/kg，低温条件で 47.5±3.3ml/min/kg であった．条件間における $\dot{V}O_2max$ に，有意な差は認められなかった（data not shown）．

３．考　察

本研究では，低強度の有酸素性運動に低温環境の要因を加えることにより，筋量維持に重要なマイオカインである Irisin と FGF21 濃度を通常温の環境下での運動時よりも上昇させることができるか否かを検証した．

本研究では本実験に先立ち，血液指標の動態を正しく評価するため，各条件において温度に対する生体の順化，相対的な運動強度の統一および運動後の血液濃縮補正を行った．運動前後における直腸温は，運動開始から運動終了後までを通し，通常温条件よりも低温条件で低値を示し，寒冷環境下に生体が順化した状態で運動を開始することができていたといえる．また環境温度の異なる環境下での運動は，ミトコンドリア系酵素活性の違いに起因する $\dot{V}O_2max$ に差異を生じてしまうことが知られている．このため条件毎に $\dot{V}O_2max$ の測定を実施し，相対的な運動強度（60% $\dot{V}O_2max$，通常温：28.74±2.1，低温：28.50±2.0）を統一した．実際に，血中乳酸濃度の動態には条件間に著しい違いは見られていない（図３）．さらに運動に伴う発汗量は，環境温度によって著しく異なるため，運動後の血液濃縮の影響も考慮したうえで各血液指標を比較しなければならない．そこで本研究では，ヘマトクリット値とヘモグロビン値から血液濃縮の影響を排除した．以上のことから本研究では，両条件下で実施した運動に対するマイオカインや血液指標の応答を評価するうえで重要な前提を満たすことができていたと考えられる．

血中 Irisin および FGF21 濃度は仮説とは異なり，時間と条件の交互作用および条件による主効果の有意性が得られなかった（図４，５）．この結果に対し，本研究で用いた低温よりもさらに厳しい低温（7℃）で同様の運動を実施した研究や，運動後の骨格筋への直接的な寒冷刺激を行った研究では，Irisin の上流因子である PGC-1α の mRNA 発現の有意な亢進（vs. 通常温 24℃）がみられている[8]．また，12℃の寒冷曝露のみでも血清 Irisin 濃度は上昇するが同時に筋活動も生じているため，寒冷曝露の影響というよりむしろ暴露に伴う震えが Irisin の分泌を促進させた可能性が指摘されている[6]．実際に，全身性振動刺激により血清 irisin 濃度の有意な増加が認められている[10]．本研究では，震えによる筋収縮を排除するために，震えが生じない最低温度を個別に選定した．したがって，Irisin の増加が観察されなかったことは，震えによる筋収縮の抑制が起因していた可能性がある．

血中 FGF21 は，有酸素性運動時には insulin と相反する応答を示す[11]．本研究においてもピークの時間差はあるものの，運動後の FGF21 の有意な増加と insulin 濃度の有意な減少が確認された．本研究では血中 FGF21 濃度は両条件とも有意に増加したが，条件間差は認められなかった．しかし興味深いことに，insulin との関係をみてみると，低温条件では血中 insulin 濃度の減少は抑えられていたにも関わらず FGF21 濃度は通常温条件と同程度上昇していた．これは，寒冷環境下で運動を実施した際の FGF21 の増加は，insulin の減少に因らないことを示唆する結果であった．本来 FGF21 は寒冷環境下では体温維持のために肝臓から放出されることから，今回の結果は，寒冷刺激に対する肝臓由来 FGF21 の増加分によるものと推察される．

本研究では，既存の研究に比べ運動前後に頻回のサンプリングポイントを設けたことで Irisin と FGF21 の経時変化を，震えの影響なしで観察することができた．これらのマイオカイン分泌応答を，運動を取り巻く環境と関連付けて検討した本知見が筋量維持に向けた運動方法構築に結び付くものとなることを期待する．

4. 結　論

本研究の結果から Irisin および FGF21 は，たとえ運動を実施しても震えが生じない 15-19℃程度の寒冷環境下では，通常温度環境下での応答と差異がないことが示唆された．

その一方で，運動に伴う insulin の減少は寒冷環境の要因を加えることで抑えられているにもかかわらず，FGF21 の分泌応答は通常温度環境と同程度増加することが示唆された．

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および関係者の皆様に厚く御礼申し上げます．

文　献

1) Ortega, F.B. et al.: Muscular strength in male adolescents and premature death: cohort study of one million participants, *BMJ*, 345: e7279 (2012)
2) Bostrom, P.J. et al.: A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis, *Nature*, 481 (7382): 463-468 (2012)
3) Izumiya Y. et al. : FGF21 is an Akt-regulated myokine, FEBS Lett. 2008 November 12; 582 (27): 3805–3810 (2008)
4) Reza M.M. et al., Irisin treatment improves healing of dystrophic skeletel muscle, *Oncotarget*, 6;8 (58): 98553-98566 (2017)
5) Reza M.M. et al., Irisin is a pro-myogenic factor that induces skeletal muscle hypertrophy and rescues denervation-induced atrophy, *Nat. Commun.*, 24;8 (1): 1104 (2017)
6) Lee P. et al.: Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans, *Cell Metabolism*, 19 (2), 302-309 (2014)
7) Salivka D.R. et al.: Human mRNA response to exercise and temperature, *Int. J. Sports Med.*, 33: 94-100 (2012)
8) Van der Lans A.A., et al.:Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis, *J. Clin. Invest.*, 123 (8) 3395-40 (2013)
9) Dill D.B. et al.: Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration, *J. Appl. Physiol.*, 37 (2) : 247-8 (1974)
10) Huh J.Y. et al.: Irisin response to acute and chronic whole-body vibration exercise in humans, *Metabolism.*, 63) 918-21 (2014)
11) Morville T. et al. : Divergent effects of resistance and endurance exercise on plasma bile acids, FGF19, and FGF21 in humans, *JCI Insight*. 2018; 3 (15): e122737 (2018)