

スポーツ活動中の熱中症発生と水分補給に伴う 骨格筋内の水分特性の変化

大阪工業大学 石 道 峰 典

Effects of Heat Stroke During Sports Activities and Subsequent Hydration on Changes in Water Molecule Properties in Skeletal Muscle

by

Minenori Ishido

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

ABSTRACT

Water molecule dynamics in vivo are important for heat stroke caused by exercise in high-temperature environments and its prevention. Water molecules in skeletal muscle and other living tissues can be broadly classified into “free water,” which can move freely without binding to other substances, and “bound water,” which is bound to other substances and whose molecular motion is constrained. However, the effects of hydration at the onset of heat stroke and afterward on water molecules of different properties, such as free water and bound water, are unclear. The present study examined the effects of running exercise-induced heat stroke caused in a high-temperature environment and subsequent hydration on water molecule properties and water transport mechanisms in skeletal muscle in rats. Running exercise at a running speed of 10 m/min was performed in a room maintained at a room temperature of $31 \pm 2^\circ$ and humidity of $45 \pm 5\%$. The exercise was terminated when the rats lost 3% of their body weight during the running exercise. Hydration was then provided ad libitum for 24 hours. As a result, it was demonstrated that muscle water content

changes in response to changes in free water volume due to running exercise-induced heat stroke and subsequent hydration. On the other hand, there was no change in hyaluronan concentration, suggesting that changes in bound water may not be affected. Furthermore, no significant changes were observed in the expression levels of AQP1 and AQP4, which are water molecule transport mechanisms. In the present study, it was suggested that running exercise induced heat stroke and subsequent hydration may affect the dynamics of free water, but not bound water. In addition, it was also indicated that the water molecule transport mechanism was hardly affected.

キーワード

骨格筋, 運動, 熱中症, 自由水, アクアポリン

Keyword

skeletal muscle, exercise, heat stroke, free water, aquaporin

要 旨

高温環境下での運動による熱中症やその予防において生体内での水分子動態は重要である。しかし、熱中症発症時やその後の水分補給が自由水や結合水といった異なる性質の水分子に及ぼす影響は不明瞭である。本研究では、ラットを用いて高温環境下での走運動による熱中症やその後の水分補給が骨格筋の水分子特性や水分輸送機構に与える影響を検討した。その結果、運動による熱中症やその後の水分補給により自由水量の変化に応じて筋水分含有率が変化することが明らかとなった。一方、ヒアルロン酸濃度に変化はなく、結合水の変化には影響していない可能性が示唆された。また水分子輸送機構であるAQP1やAQP4の発現レベルに有意な変化は認められなかった。本研究より運動による熱中症やその後の水分補給は、自由水の動態に影響を及ぼす一方で結合水には影響しない可能性が示唆された。また、水分子輸送機構はほとんど影響を受けないことも示された。

緒 言

近年の温暖化にともない夏場だけでなく一年の多くの期間でスポーツ活動中の熱中症予防が重要となってきた。スポーツ活動中の熱中症の多くは脱水により引き起こされる。スポーツ活動中の発汗などにより細胞外液の浸透圧が上昇することで細胞内の水分子は細胞外に流出していく¹⁾。例えば骨格筋の場合、体重の約3%の水分が失われることで発揮筋力の低下や筋容積の減少などが引き起こされる^{2,3)}。一方で、高温環境下での運動中や運動後に水分を補給することで発揮筋力や筋容積の維持や回復に効果的であることも明らかとなっている^{3,4)}。

このように高温環境下での運動による熱中症の発症やその予防において生体内での水分子動態が重要であることは明白である。しかし、生体組織内に異なる性質の水分子が局在していることはあまり知られていない。骨格筋などの生体組織における水分子は、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“自由水”と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“結合水”に大きく分類できる^{5,6)}。骨格筋内の自由水と結合水の割合は生後に確定したのちは大きく変動しないことが報告されている⁵⁾。また自由水の動態変化が筋ジストロフィーなどの筋疾患と関係しているとする報告もあり、自由水が骨格筋の恒常性を維持する上で重要な役割を担っている可能性が示されている⁷⁾。一方で生体組織内において結合水は様々な物質と結合しており、生理的役割は明らかになっていない。例えば、水分子はヒアルロン酸との親和性が高く、ヒアルロン酸と結合することで組織内に結合水として貯留されているが⁸⁾、結合水としての生理的役割に関する知見はほとんどない。その上、運動による筋活動の増加やそれにともなう熱中症により水分動態が著しく変動するにも関わらず^{1,9)}、熱中症発症時やその後の水分補給によって自由水や結合水の動態にどのような影響が生じているのかについては不明瞭なままである。

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であるアクアポリン1 (aquaporin 1: AQP1) とアクアポリン4 (aquaporin 4: AQP4) が重要な役割を担っている。AQP1は毛細血管側に特異的に発現し、AQP4は筋線維側に特異的に発現しており、この両者の間で水分子のやり取りが行われている¹⁰⁻¹²⁾。骨格筋におけるAQP4については、継続的な走運動により発現レベルが増加し水分子の移動性の亢進に貢献する一方で、脱水による細胞内浸透圧の著しい低下にあわせて発現レベルが低下するなどの報告がある^{13,14)}。しかし、高温環境下での走運動とその後の水分補給がこれらの水分子輸送機構に及ぼす影響は不明瞭である。

本研究では、高温環境下での走運動による熱中症およびその後の水分補給における骨格筋内の異なる水分子やヒアルロン酸濃度およびAQP発現レベルの変化を調べることで、熱中症と水分補給が骨格筋の水分子特性や水分貯留機構に与える影

響を検討した。

1. 研究方法

1. 1 実験概要

実験動物には、8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: C)、高温環境下走運動群(running group: R)高温環境下走運動後の水分補給群(hydration after running: HR)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 高温環境下における走運動

先行研究¹⁵⁾を参考にR群およびHR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, 日本)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 $31 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $45 \pm 5\%$ 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45分、平均走行距離は約450mであった。

1. 3 水分補給

HR群に対しては、高温環境下走運動終了後からの24時間に自由摂取による水分補給を行った。水分補給のための飲水として経口補水液(OS-1, 大塚製薬工場, 日本)を用いた。経口補水液100ml当たりの栄養成分量は、エネルギー:10kcal, タンパク質:0g, 脂質:0g, 炭水化

物:2.5g, 食塩相当量:0.292g, カリウム:78mg, マグネシウム:2.4mg, リン:6.2mgであった。また、電解質濃度は Na^+ :50mEq/l, K^+ :20mEq/l, Cl^- :50mEq/l, ブドウ糖:1.8%である。浸透圧は約260mOsm/Lである。

1. 4 サンプル採取

各群の実験終了後、直ちに吸引麻酔とチオペンタールナトリウムの過剰投与下で屠殺し、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. 5 水分活性

各被験筋の水分活性は、静電容量式センサーによる水分活性測定装置 (HygroPalm23-AW-A, rotronic, スイス) を用いて測定した。

1. 6 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 (%)

$$= (\text{筋湿重量} - \text{筋乾燥重量}) / \text{筋湿重量} \times 100$$

1. 7 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¹⁶⁾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、15000×g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% (AQP1とAQP4) および7.5% (CD44) のポリアクリルアミドゲルを用いて20 mA, 300 V, 70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、1% skim milkと0.1% Tween-20を含むTris-buffered saline (TBS) (pH 7.6) を用いて室温で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[rabbit polyclonal anti-AQP4 (Abcam, Cambridge, UK), rabbit monoclonal anti-AQP1 (Abcam), mouse monoclonal anti-CD44 (Proteintech, IL, USA) を4℃, overnightでインキュベーションした。TBSで洗浄した後、二次抗体 [biotinylated anti-rabbit IgG (Invitrogen, Camarillo, CA, USA), biotinylated anti-mouse IgG (Invitrogen)] 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, 日本) 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を用いて、定量化した。

1. 8 ELISA法によるヒアルロン酸濃度測定

本研究では、ヒアルロン酸濃度の測定にELISA法を用いた。被験筋をcell Lysis Buffer 2 (R&D systems, Minneapolis, USA) でホモジナイズし、15000×gで遠心した後、上清を回収した。BCA protein assay kit (Thermo scientific) 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 (0.1 μg/μl)。その後、Hyaluronan ELISA Kit (R&D systems) を用いて各サンプルのヒアルロン酸濃度を測定した。

1. 9 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、C群、R群とHR群間の比較は、Scheffé's検定による分散分析を用いて行った。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とその後の水分補給による体重および筋重量の変化

R群およびHR群の安静時 (pre) に対する高温環境下で走運動後 (post) の体重減少率は $4.41 \pm 1.37\%$ 、 $4.02 \pm 1.67\%$ であり、それぞれ有意な体重減少が認められた ($p<0.05$) (表1)。一方、HR群の水分補給24時間後の体重はpreとの間に有意差は認められなかった (表1)。

TAの相対筋重量においてC群とR群の間に統計的有意差は認められなかった。一方、HR群のTAの相対筋重量はC群やR群に対しそれぞれ有

意な高値を示した ($p<0.05$) (図1A)。

SOLの相対筋重量では、いずれ実験群間の比較においても統計的有意差は認められなかった (図1B)。

これらの結果は、高温環境下における走運動によりR群、HR群ともに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とその後の水分補給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、C群に対しR群で高値を示す傾向は見られたが、統計的有意差は認められなかった。一方、HR群はC群およびR群に対しそれぞれ有意な高値を示した ($p<0.05$) (図2A)。SOLの水分含有率においては、C群に対しR群で低値、HR群が高値を示す傾向がそれぞれ見られたが、いずれ

表1 Body weights in control, running and hydration after running (HR) groups

	Pre	Post	Recovery
C	158.71 ± 4.50		
R	162.50 ± 9.35	155.33 ± 9.16*	
HR	164.17 ± 4.83	156.00 ± 2.12*	160.40 ± 3.36

C: control, R: running, HR: hydration after running

Pre: resting state before running exercise, Post: immediately after running exercise, Recovery: hydration after running exercise.

All values were mean ± S.D. * $p<0.05$ compared to pre-running of same group.

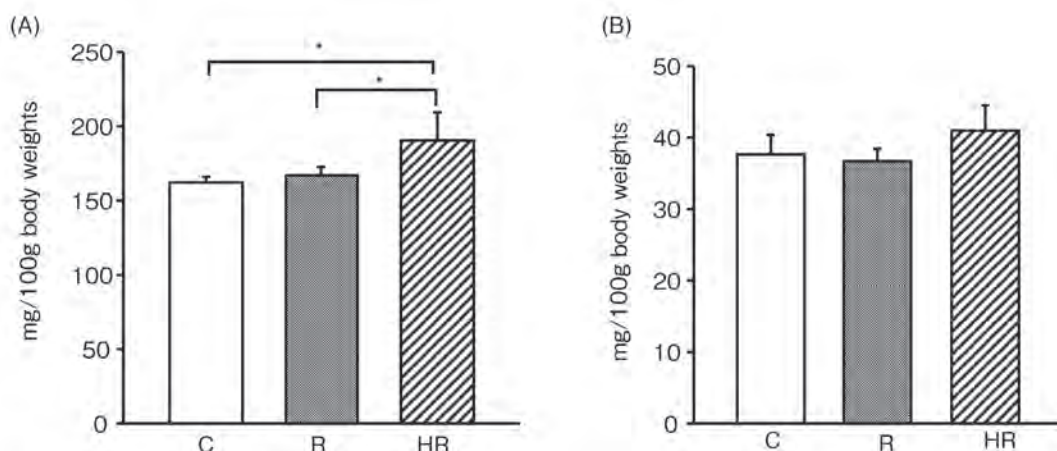


図1 Relative muscle weights of tibialis anterior muscles (A) and soleus muscles (B) in control (C), running (R) and hydration after running (HR) groups. Values were means ± SD. * $p<0.05$

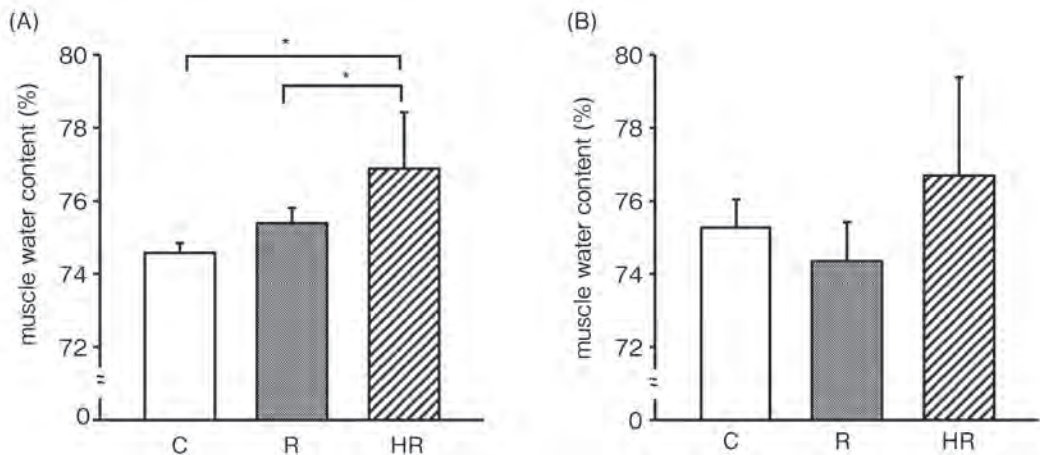


図2 Muscle water content of tibialis anterior muscles (A) and soleus muscles (B) in control (C), running (R) and hydration after running (HR) groups. Values were percentages and represent means $\pm$ SD. Muscle water content (%)=(muscle wet weight - muscle dry weight)/muscle wet weight*100 * $p<0.05$

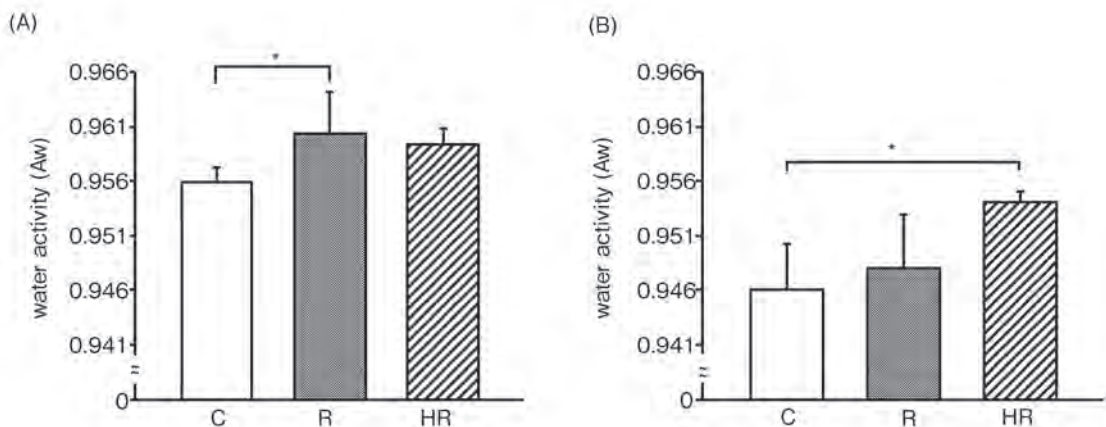


図3 Water activities of tibialis anterior muscles (A) and soleus muscles (B) in control (C), running (R) and hydration after running (HR) groups. Values were means $\pm$ SD. * $p<0.05$ * $p<0.05$

においても統計的有意差は認められなかった(図2B)。

これらの結果は、高温環境下での走運動の後の水分補給によって、遅筋であるSOLではなく速筋であるTAの水分含有率に変化が生じたことを示す。

2. 3 高温環境下での走運動とその後の水分補給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、水分活性値を測定した。TAの水

分活性値ではC群に対しR群が有意な高値を示した($p<0.05$)。一方、HR群はR群との間に有意差はなく、C群に対しても高値を傾向が見られた(図3A)。SOLの水分活性値では、R群はC群に対し高値を示す傾向は見られたものの、統計的有意差は認められなかった。一方、SOLの水分活性値ではHR群がC群に対し有意な高値を示した($p<0.05$)(図3B)。

これらの結果は、高温環境下での走運動やその後の水分補給が骨格筋の水分活性値の変化に影響を及ぼしたことを示す。

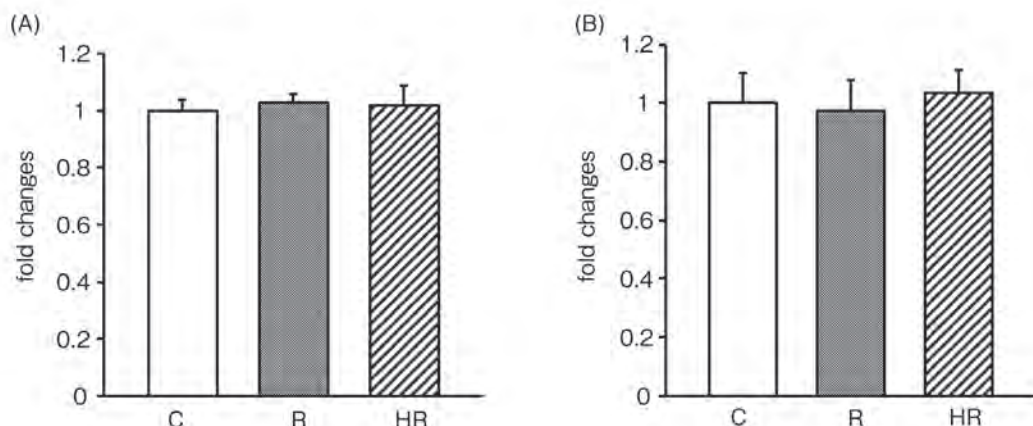


図4 Changes in hyaluronic acid concentration in tibialis anterior muscles (A) and soleus muscles (B) in control (C), running (R) and hydration after running (HR) groups. Values are means $\pm$ SD. Values were expressed relative to the values of control TA and SOL, respectively

2. 4 高温環境下での走運動とその後の水分補給が骨格筋のヒアルロン酸濃度の変化に及ぼす影響

本研究では、高温環境下での走運動とその後の水分補給が、ヒアルロン酸濃度の変化に及ぼす影響を検討した。その結果、TAにおけるヒアルロン酸の濃度はいずれの実験群間においても統計的に有意な変化としては認められなかった(図4A)。同様にSOLのヒアルロン酸濃度においても、いずれの実験群間においても有意な変化は認められなかった(図4B)。これらの結果は、高温環境下での走運動とその後の水分補給によって、骨格筋内のヒアルロン酸の濃度が直ちに变化するわけではないことを示す。

2. 5 高温環境下での走運動とその後の水分補給が骨格筋のCD44の発現量に及ぼす影響

CD44はヒアルロン酸受容体である。本研究では、高温環境下での走運動とその後の水分補給が、CD44の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、TAにおけるCD44の発現レベルはいずれの実験群間においても統計的に有意差は認められなかった(図5A)。同様にSOLのCD44の発現レベルにおいても、いずれの実験群間においても有意な変化

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とその後の水分補給によって、骨格筋内のCD44の発現レベルが直ちに变化するわけではないことを示す。

2. 6 高温環境下での走運動とその後の水分補給が骨格筋のAQP4の発現量に及ぼす影響

本研究では、高温環境下での走運動やその後の水分補給が、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、TAにおけるAQP4の発現レベルにおいて、いずれの群間においても統計的に有意差は認められなかった(図6A)。また、SOLにおいてもいずれの群間においても有意差は認められなかった(図6B)。これらの結果は、高温環境下での走運動やその後の水分補給は、筋線維に特異的に発現するAQP4の発現様式に直ちに影響を及ぼす要因ではないを示す。

2. 7 高温環境下での走運動とその後の水分補給が骨格筋の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し、筋線維側のAQP4との間で水分のやりとをしをしている水チャネルである。本研究では、高温

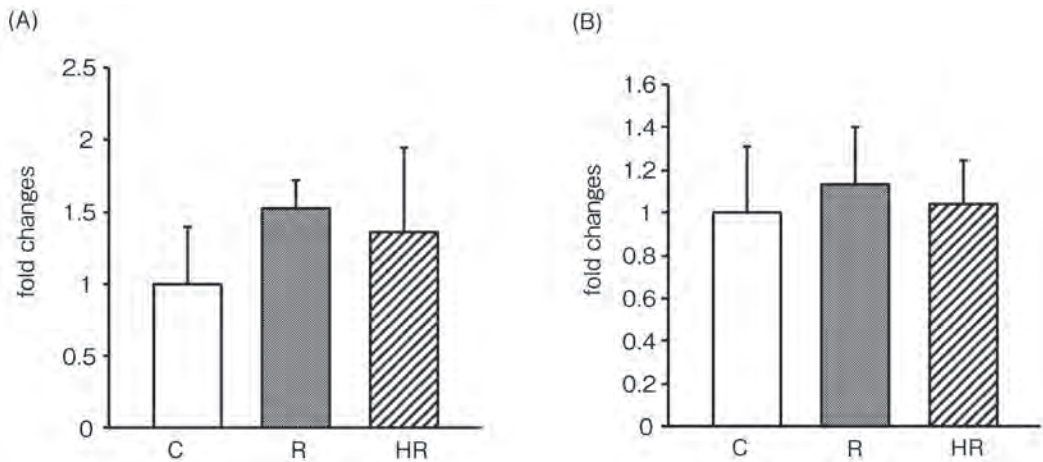


図5 Protein expression level of CD44 in tibialis anterior muscles (A) and soleus muscles (B) in control (C), running (R) and hydration after running (HR) groups. Values are means $\pm$ SD. Values were expressed relative to the values of control TA and SOL, respectively

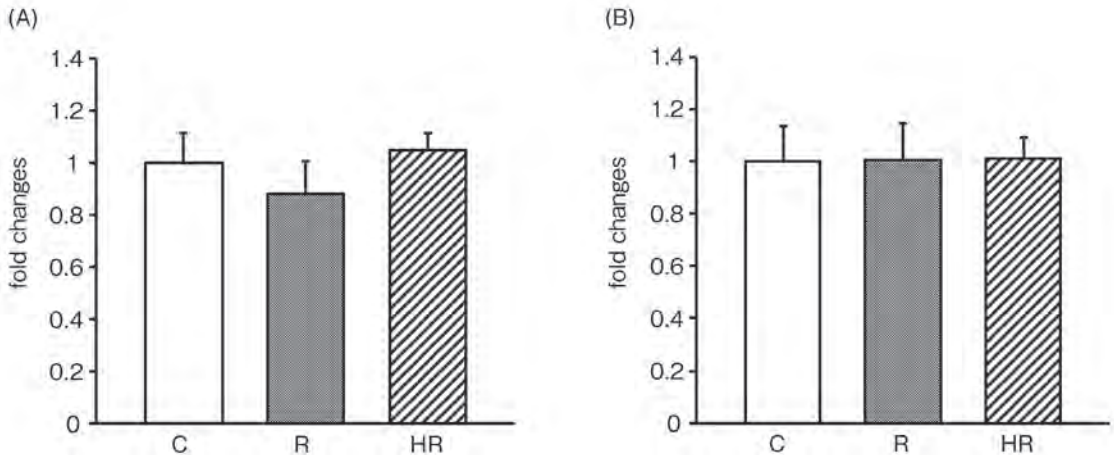


図6 Protein expression level of AQP4 in tibialis anterior muscles (A) and soleus muscles (B) in control (C), running (R) and hydration after running (HR) groups. Values are means $\pm$ SD. Values were expressed relative to the values of control TA and SOL, respectively

環境下での走運動とその後の水分補給が、AQP1の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、TAにおけるAQP1の発現レベルは、いずれの群間においても統計的有意差は認められなかった(図7A)。同様に、SOLのいずれの群間においても統計的有意差は認められなかった(図7B)。これらの結果は、高温環境下での走運動とその後の水分補給によって、骨格筋内のAQP1の発現レベルが直ちに变化するわけではないことを示す。

3. 考 察

高温環境下でのスポーツ活動による熱中症は脱水による体重減少率が約3%になると発症し始め、筋力低下などの運動機能における障害などが特長的な症状の一つとなる²⁾。本研究では、R群およびHR群ともに体重減少率が3%に近づくにつれて走運動の継続が困難となっていった。これらの現象は、先行研究による報告と類似していた¹⁵⁾。したがって、本研究における高温環境下での走運動による体重減少は脱水によるものであり、本研

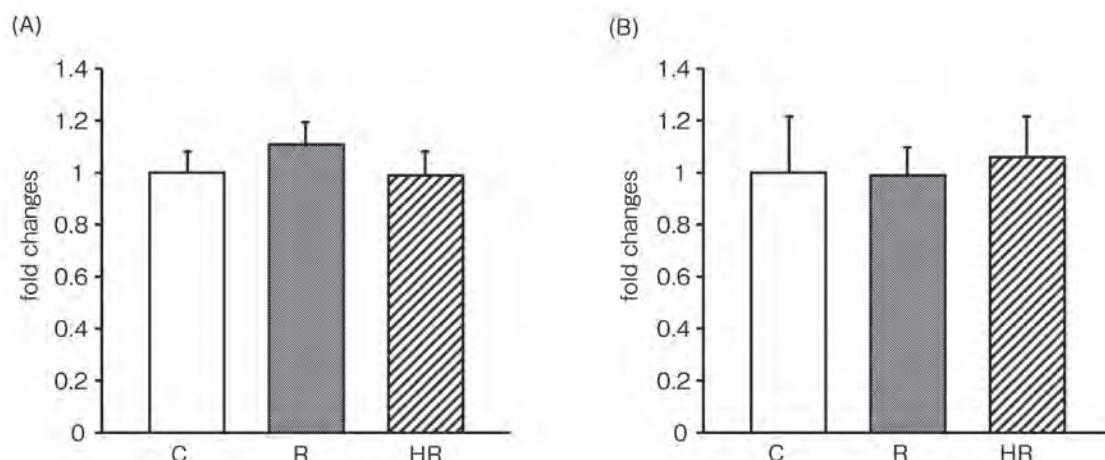


図7 Protein expression level of AQP1 in tibialis anterior muscles (A) and soleus muscles (B) in control (C), running (R) and hydration after running (HR) groups. Values are means $\pm$ SD. Values were expressed relative to the values of control TA and SOL, respectively

究における実験条件は熱中症を誘発する上で適切であったと考えられる。

本研究では、TAの体重100g当たりの相対筋重量においてHR群はC群やR群に対し有意な高値を示した。同様にTAの水分含有率においてもHR群はC群やR群に対し有意な高値を示した。したがって、HR群で見られた相対筋重量の有意な上昇は、水分含有率の上昇に起因する部分が大いものと考えられる。先行研究では運動による脱水後に水分補給をすることにより一定期間の間、摂取した水分の大部分が排泄されることなく体内に貯留されることが報告されている¹⁷⁾。本研究においてもHR群では脱水後の水分補給により骨格筋内の水分貯留能が一時的に亢進した可能性が示唆された。また統計的有意差は認められなかったが、R群の水分含有率はC群に対し高値を示す傾向が見られた。これらの傾向は、運動直後には一過性の水分含有率の上昇が誘発されることを報告した先行研究によって支持されるものであった¹⁸⁾。

一方、SOLの相対筋重量に群間の有意差は認められなかった。また水分含有率については、統計的有意差は見られなかったもののR群はC群に対して低値を示す傾向があり、HR群はC群に対し

高値を示す傾向がそれぞれ見られた。このようにSOLで見られた水分含有率の変化のパターンは、TAで見られたパターンとは異なっていた。先行研究では、脱水などによる浸透圧の変化に対する感受性は遅筋よりも速筋の方が高いことが報告されている¹⁴⁾。本研究で見られた水分含有率の変化のパターンにおけるTAとSOLの違いは、浸透圧の変化に対する感受性の違いが関与している可能性がある。しかし、本研究ではこの点に關与する分子メカニズムは明らかにできておらず、今後のさらなる研究が必要となる。

本研究では、骨格筋内の自由水量を反映する指標として水分活性値を測定した。TAではR群がC群に対し有意な高値を示す一方で、R群とHR群との間に有意差は認められなかった。またSOLではHR群がC群に対し有意な高値を示した。これらの結果は、TAとSOLの水分含有率の変化パターンと類似するものであり、自由水量の変化が水分含有率の変化に反映されていた可能性を示唆するものであった。先行研究では、生後の骨格筋において自由水と結合水の割合が確定したのちは、通常の水分摂取状態下では、その割合に変化が生じないことが報告されている⁵⁾。したがって、本研究で見られた水分活性値の変化は、高温環境

下での走運動による熱中症およびその後の水分補給という特異的な状況によって誘発された自由水量の変化を反映している可能性が示唆された。一方で生体組織内の自由水の測定は、核磁気共鳴法によるものが多く^{19, 20)}、運動などによって生じる一過性の自由水の変化やその生理的意義に関する報告はほとんどない。本研究においても水分活性値の変化から運動時の熱中症やその後の水分補給による自由水量の変化を検討可能であることは示されたが、その生理的意義については明らかにすることができなかった。生体組織内の自由水の生理的意義の解明にはさらなる研究が必要である。

我々の知る限り生体組織内の結合水を測定する方法はない。生体組織内においてヒアルロン酸は水分子と結合することで結合水を組織内に貯留する役割をもつ⁸⁾。そこで本研究では、高温環境下での走運動とその後の水分補給によるヒアルロン酸濃度の変化を測定することで骨格筋内の結合水の間接的な検討を試みた。その結果、TAおよびSOLともにいずれの実験群間においてもヒアルロン酸濃度に有意な変化は認められなかった。先行研究では、骨格筋内のヒアルロン酸濃度は一過性の運動の影響を受けないことが報告されている²¹⁾。この知見は、TAとSOLのいずれにおいてもR群とC群のヒアルロン酸濃度に有意差が認められなかった本研究結果と一致する。また肺ではヒアルロン酸濃度の上昇に伴い結合水も増加する可能性が示されている²²⁾。これらのことから、本研究では高温環境下での走運動による熱中症やその後の水分補給は、骨格筋内の結合水量の変化に影響を及ぼさなかった可能性が示唆された。

ヒアルロン酸は受容体であるCD44と結合することで骨格筋の恒常性維持にも関与している²³⁻²⁵⁾。本研究では、TAおよびSOLのいずれの実験群間においてもヒアルロン酸濃度に加えCD44の発現レベルでも有意差は認められなかった。これ

らのことから、本研究では、高温環境下での走運動による熱中症やその後の水分補給は、ヒアルロン酸経由の恒常性制御メカニズムにも影響を及ぼすものではなかった可能性が示唆された。

骨格筋内においてAQP4およびAQP1はそれぞれ筋線維側、毛細血管側に特異的に発現している水チャネルであり、これらの水チャネルを介して水分子のやり取りが行われている¹⁰⁻¹²⁾。本研究では、高温走直後および水分補給による回復期のいずれにおいてもTAでAQP4やAQP1の発現レベルの変化は認められなかった。これはSOLにおいても同様の結果であった。これらの結果は、高温環境下での一過性の走運動を行なった先行研究の結果と類似している¹⁵⁾。したがって、これらの結果により高温環境下での走運動のみならずその後の水分補給による回復期であっても、TAおよびSOLのいずれにおいてもAQP4やAQP1の一過性の発現レベルの変化を誘発する要因とはなり得ないことが示唆された。一方で先行研究では、筋活動量の増加に応じてAQP4の発現量が増加することが示されている¹³⁾。さらに細胞内の浸透圧変化の感受性は遅筋よりも速筋が高く、過度な脱水により細胞内の水分子が著しく消失することでAQP4の発現レベルが減少していくことが報告されている¹⁴⁾。したがって、本研究ではAQP4やAQP1のmRNAの発現レベルは検討していないが、高温環境下での一過性の走運動やその後の水分補給による回復期においてAQP4やAQP1のmRNA発現レベルの変化は誘発されていた可能性はある。一方で、本研究ではそれぞれのAQPの機能面の評価を行っていない。特にAQP4は、transient receptor potential vanilloid 4やNa,K-ATPaseなどの関連因子との機能的相互作用により浸透圧や形態の制御を行なっている^{10, 26, 27)}。したがって、本研究においても高温環境下での走運動による脱水やその後の水分補給によって浸透圧調整におけるAQPの機能的変化が誘発

されている可能性はある。高温環境下での走運動による脱水やその後の水分補給がAQPの機能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。

4. 結 語

本研究では、高温環境下での走運動による熱中症およびその後の水分補給が骨格筋内の水分含有量や水分子特性や水分子輸送機構に及ぼす影響を検討した。その結果、運動による熱中症やその後の水分補給による自由水量の変化を反映する形で水分含有率の変化が引き起こされることが明らかとなった。一方で高温環境下での走運動による熱中症やその後の水分補給ではヒアルロン酸濃度に変化は生じず、結合水の変化には影響していない可能性が示唆された。また走運動による熱中症やその後の水分補給が水分子の主たる輸送機構であるAQP1やAQP4の発現レベルに及ぼす影響は認められなかった。これらのことから本研究により高温環境下での走運動とその後の水分補給は、自由水の動態には影響を及ぼす一方で結合水の動態には影響しない可能性が示唆された。さらにこれらの異なる性質の水分子の動態が骨格筋の水分含有率に反映されている可能性が示された。

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に深く御礼申し上げます。

文 献

- 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)
- 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)
- Hackney K.J., Cook S.B., Fairchild T.J., Ploutz-Snyder L.L., Skeletal muscle volume following dehydration induced by exercise in heat, *Extrem. Physiol. Med.*, **1**:3 (2012)
- Harris P.R., Keen D.A., Constantopoulos E., Weninger S.N., Hines E., Koppinger M.P., Khalpey Z.I., Konhilas J.P., Fluid type influences acute hydration and muscle performance recovery in human subjects, *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, **16**:15 (2019)
- Berenyi E., Szendro Z., Rozsahegyi P., Bogner P., Sulyok E., Postnatal changes in water content and proton magnetic resonance relaxation times in newborn rabbit tissues, *Pediatr. Res.*, **39**:1091-1098 (1996)
- 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)
- Mankodi A., Azzabou N., Bulea T., Reyngoudt H., Shimellis H., Ren Y., Kim E., Fischbeck K.H., Carlier P.G., Skeletal muscle water T (2) as a biomarker of disease status and exercise effects in patients with Duchenne muscular dystrophy, *Neuromuscul. Disord.*, **27**:705-714 (2017)
- Comper W.D., Laurent T.C., Physiological function of connective tissue polysaccharides, *Physiol. Rev.*, **58**:255-315 (1978)
- Trombitas K., Baatsen P., Schreuder J., Pollack G.H., Contraction-induced movements of water in single fibres of frog skeletal muscle, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **14**:573-584 (1993)
- 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**:905-907 (2004)
- 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**:14108-14113 (2001)
- 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)
- 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**:e58712 (2013)
- 14) Farhat F., Grosset J.F., Canon F., Water deprivation decreases strength in fast twitch muscle in contrast to slow twitch muscle in rat, *Acta Physiol. (Oxf)*, **224**:e13072 (2018)
- 15) 石道峰典, 骨格筋における自由水の特徴. デサントスポーツ科学, **39**:224-233 (2018)
- 16) Ishido M., Hung Y.L., Machida S., Aquaporin 4 Expression Level Is Decreased in Skeletal Muscles with Aging, *Kobe J. Med. Sci.*, **69**:E40-E48 (2023)
- 17) Takamata A., Mack G.W., Gillen C.M., Nadel E.R., Sodium appetite, thirst, and body fluid regulation in humans during rehydration without sodium replacement, *Am. J. Physiol.*, **266**:R1493-502 (1994)
- 18) 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**:2080-2089 (1988)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) Piehl-Aulin K., Laurent C., Engstrom-Laurent A., Hellstrom S., Henriksson J., Hyaluronan in human skeletal muscle of lower extremity: concentration, distribution, and effect of exercise, *J. Appl. Physiol.*, **71**:2493-2498 (1991)
- 22) Nettelbladt O., Tengblad A., Hallgren R., Lung accumulation of hyaluronan parallels pulmonary edema in experimental alveolitis, *Am. J. Physiol.*, **257**:L379-84 (1989)
- 23) Armstrong S.E., Bell D.R. Relationship between lymph and tissue hyaluronan in skin and skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**:H2485-94 (2002)
- 24) Aruffo A., Stamenkovic I., Melnick M., Underhill C.B., Seed B., CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate, *Cell*, **61**:1303-1313 (1990)
- 25) Noble P.W., Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair, *Matrix Biol.*, **21**:25-29 (2002)
- 26) Illarionova N.B., Gunnarson E., Li Y., Brismar H., Bondar A., Zelenin S., Aperia A., Functional and molecular interactions between aquaporins and Na,K-ATPase, *Neuroscience*, **168**:915-925 (2010)
- 27) Benfenati V., Caprini M., Dovizio M., Mylonakou M.N., Ferroni S., Ottersen O.P., Amiry-Moghaddam M. An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes, *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**:2563-2568 (2011)