

| | | | |
|---------|---|----------|----------|
| 氏名 | 早尾啓志 | | |
| 学位の種類 | 博士(保健学) | | |
| 学位記番号 | 甲第66号 | | |
| 学位授与の日付 | 2021年3月17日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 | | |
| 学位論文題目 | Myofiber Permeability and Force Production of Rat Muscles Following Eccentric Contractions: The Repeated Bout Effect Depends on the Interval ラット骨格筋への伸張性収縮による骨格筋の膜透過性と力発揮：繰り返しの効果はその間隔に依存する | | |
| 論文審査員 | 主査 | 新潟医療福祉大学 | 教授 大西秀明 |
| | 副査 | 新潟医療福祉大学 | 教授 田口徹 |
| | 副査 | 新潟医療福祉大学 | 准教授 大鶴直史 |

論文内容の要旨

【はじめに】伸張性収縮(Eccentric contraction; ECC)は短縮性収縮や等尺性収縮と比較して大きな筋力を発揮できる一方で、筋力低下や筋線維膜透過性亢進を伴った組織損傷を誘発しやすい。ECCでは、1度目と比較して2度目以降の試行で筋力低下や筋損傷程度が減弱する「繰り返しの効果(Repeated bout effect; RBE)」が報告されている。RBEは第1試行から第2試行までの間隔が延長するに伴い、その効果が減弱することが報告されているが、その組織学的変化については不明である。そこで本研究では、第2試行までの間隔延長に伴う機能的及び組織学的変化と第2試行直前の機能的及び組織学的回復程度についての検討することを目的とした。

【方法】実験にはFischer 344系雄性ラットを用い、対照群(Control), ECC1回実施群(Post 1st bout), ECC実施1, 2, 4週後の回復群(Pre 2nd bout_1w, Pre 2nd bout_2w, Pre 2nd bout_4w), 1, 2, 4週後に第2試行実施群(Post 2nd bout_1w, Post 2nd bout_2w, Post 2nd bout_4w)の8群(各群 n=8)を設けた。ECCは前脛骨筋(TA)の直上に電極を貼付し経皮的電気刺激によりTAの強収縮を惹起し、その際に他動的に足関節を底屈(角速度 200°/sec)するプロセスを80回実施した。第1試行と第2試行の刺激強度は同一とした。筋採取の24時間前に膜透過性亢進の評価指標であるEvans blue dye(EBD)を投与し、筋採取直前に電気刺激を用いてTAの最大等尺性筋収縮張力の計測を行った。採取した筋は凍結包埋し、厚さ10µmの凍結切片により各群のEBD浸潤筋線維数を計測した。また、各群において筋線維の再生マーカーであるdevelopmental-Myosin heavy

chain(d-MHC)と筋線維膜構造関連タンパク質であるジストロフィンの蛍光免疫染色を実施し、d-MHC 陽性及びジストロフィン陽性筋線維数の計測を行った。

【結果】体重あたりの TA 筋湿重量は Control 群と比較して Post 1st bout, Pre 2nd bout_4w, Post 2nd bout_4w 群で有意に高値を示した($P<0.05$)。TA 筋湿重量あたりの最大等尺性筋収縮張力は Control 群と比較して Post 1st bout 群で低値を示し($P<0.05$)、Pre 2nd bout_1w, Pre 2nd bout_2w, Pre 2nd bout_4w 群では有意な差は認められなかった。また、Post 1st bout 群と比較して Post 2nd bout_1w, Post 2nd bout_2w 群では有意に高値を示し($P<0.05$)、Post 2nd bout_4w 群では有意な差は認められなかった。EBD 浸潤筋線維は Control 群と比較して Post 1st bout 群で高値を示し($P<0.05$)、Pre 2nd bout_1w, Pre 2nd bout_2w, Pre 2nd bout_4w 群では有意な差は認められなかった。また、EBD 浸潤筋線維は Post 1st bout 群と比較して Post 2nd bout_1w, Post 2nd bout_2w, Post 2nd bout_4w 群では有意に低値を示し($P<0.05$)、Post 2nd bout_4w 群は Post 2nd bout_1w, Post 2nd bout_2w と比較して有意に高値を示した($P<0.05$)。d-MHC 陽性及びジストロフィン陽性筋線維数は Post 1st bout 群と比較して Pre 2nd bout_1w, Post 2nd bout_1w 群で有意に高値を示し($P<0.05$)、Pre 2nd bout_1w と Post 2nd bout_1w 群の間に有意な差は認められなかった。

【考察】本研究では以下の点について検討を行った：(i)ECC 実施 1, 2, 4 週後の組織学的及び機能的変化について (ii)1, 2, 4 週間隔での第 2 試行後の組織学的及び機能的な RBE の検討と間隔延長に伴う効果の減弱について。

ECC では筋線維膜損傷や機械的伸張刺激活性化チャンネル(Stretch activated channels; SACs)の活性化により筋線維内に細胞外液の流入し、細胞の膨化が生じる。筋線維内のカルシウムイオン濃度の上昇はカルシウム依存性プロテアーゼ(カルパイン)を活性化し、細胞膜構造関連タンパク質や筋収縮関連タンパク質の破壊を誘発する。本研究では、ECC 実施 1 週以降で EBD 浸潤筋線維はほとんど認められなくなり、TA 最大筋収縮張力も Control 群と有意な差が認められない程度まで回復することが明らかとなった。ECC による筋損傷の 1 週後には d-MHC の有意な増加が認められ、Pre 2nd bout_1w と Post 2nd bout_1w 群の間に有意な差は認められなかったことから、再生筋線維は RBE の要因である可能性が示唆された。筋線維内への細胞外液流入の経路として、アクアポリン 4(AQP4)が報告されており、筋損傷の 3-4 週後で発現が認められる。本研究では Post 2nd bout_1w, Post 2nd bout_2w と比較して Post 2nd bout_4w 群で膜透過性亢進筋線維の有意な増加を認め、RBE には AQP4 が関与する可能性が推察された。これまでに RBE についてはその要因について検討がなされているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。Limitation として、筋線維膜透過性に関連するタンパク質や遺伝子発現レベルでの解析が今後なされることによって、未解明の分子機序の理解に寄与できると思われる。しかしながら本研究は、RBE の間隔延長に伴った効果の減弱を膜透過性亢進筋線維の観点から検討を行った初めての報告であり、間隔の延長に

伴いその効果が減弱することが明らかとなった。

キーワード：伸張性収縮，筋損傷，繰り返し効果，筋線維膜透過性，最大等尺性筋収縮張力

論文審査結果の要旨

本論文は、伸張性収縮(Eccentric contraction; ECC)により生じる筋損傷の特徴を明らかにすることを目的とした研究である。ECCは短縮性収縮や等尺性収縮と比較して大きな筋力を発揮できる一方で、筋力低下や筋線維膜透過性亢進を伴った組織損傷を誘発しやすい。ECCでは、1度目と比較して2度目以降の試行で筋力低下や筋損傷程度が減弱する「繰り返し効果(Repeated bout effect; RBE)」が明らかになっている。RBEは第1試行から第2試行までの間隔が延長するに伴いその効果が減弱するが、その組織学的変化については不明である。本研究では、第1試行から第2試行までの間隔がRBEに及ぼす影響を機能的および組織学的に明らかにした点が独創的である。

実験にはFischer 344系雄性ラット64匹を用い、対照群(Control)、ECC1回実施群(Post 1st bout)、ECC実施1, 2, 4週後の回復群(Pre 2nd bout_1w, Pre 2nd bout_2w, Pre 2nd bout_4w)、1, 2, 4週後に第2試行実施群(Post 2nd bout_1w, Post 2nd bout_2w, Post 2nd bout_4w)の8群(各群n=8)を設けている。ECCは前脛骨筋(TA)の直上に電極を貼付し経皮的電気刺激によりTAの強縮を惹起し、その際に他動的に足関節を底屈するプロセスを80回実施している。筋採取の24時間前に膜透過性亢進の評価指標であるEvans blue dye(EBD)を投与し、筋採取直前に電気刺激を用いてTAの最大等尺性筋収縮張力を計測している。また、各群において筋線維の再生マーカーであるdevelopmental-Myosin heavy chain(d-MHC)と筋線維膜構造関連タンパク質であるジストロフィンの蛍光免疫染色を実施し、d-MHC陽性及びジストロフィン陽性筋線維数を計測している。結果、1週間後と2週間後の機能検査と1週間後、2週間後、4週間後の組織学的検査でRBEが認められており、筋線維透過性は2回目の投与前に間隔を延長すると効果が弱まることと、2回目までの間隔を延長するとRBEが弱くなることを明らかにしている。これらの知見は健康増進のためのリハビリテーションや、スポーツおよびフィットネス遂行中の筋肉損傷の予防のための戦略の開発に役立つ可能性がある。

学位論文提出者に対し、本論文の内容について説明を求めると共に、RBEが起こる分子レベルのメカニズムとRBEの意義について、今回の実験の限界について、本実験結果がリハビリテーションやトレーニングにどのように還元できるのか等について質

疑が行われ、それぞれに回答を得ることができた。今後、本研究で得られた結果の分子基盤についての更なる研究を期待したい。

以上のことから、審査委員会は本論文を博士論文に相応しいと認める。