

区分	課程
----	----

(論文 様式)

遅発性筋痛における繰り返し効果の 発症機序に関する研究

スポーツ科学研究科

スポーツ科学専攻

207D03

浦井 久子

研究指導

浜田 拓 教授

目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 文献研究	5
1. 筋の痛みを感じるしくみ	5
2. 遅発性筋痛	7
3. 繰り返しの効果	9
4. 遅発性筋痛に関与する物質	11
4.1. ブラジキニン (BK)	11
4.2. 神経成長因子 (NGF)	13
4.3. プロスタグランジン (PG)	14
4.4. シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2)	15
4.5. グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)	17
4.6. アデノシン 3 リン酸 (ATP)	19
第 3 章 研究課題 1 遅発性筋痛の繰り返しの効果における NGF 発現関与の検証	21
1. 目的	21
2. 方法	22
2.1. 実験動物	22
2.2. 筋機械疼痛閾値の測定	22
2.3. 繰り返しの伸張性筋収縮	25
2.4. 筋サンプル摘出	26
2.5. HOE140 処理	27
2.6. 筋 mRNA 抽出	27
実験前の準備事項	27
RNA 抽出	28
RNA 濃度測定	30
cDNA 合成 (逆転写)	30
PCR	31
アガロースゲル電気泳動	32
2.7. 統計処理	33
3. 結果	33

3.1. 筋機械痛覚過敏の繰り返し効果	33
3.2. NGF mRNA	35
3.3. HOE140 処理	35
4. 考察	36
第 4 章 研究課題 2 遅発性筋痛の繰り返し効果における COX-2 発現関与の検証 ...	39
1. 目的	39
2. 方法	40
2.1. 実験動物	40
2.2. 筋機械疼痛閾値の測定	40
2.3. 繰り返し伸張性筋収縮	40
2.4. 筋サンプル摘出	42
2.5. Celecoxib 処理	42
2.6. 筋 mRNA 抽出	42
2.7. 統計処理	42
3. 結果	43
3.1. 2 回の LC 後の筋機械疼痛閾値	43
3.2. COX-2 mRNA	44
3.3. Celecoxib 処理	44
4. 考察	46
第 5 章 まとめ	49
参考文献	50
謝辞	72

《略語と記号》

ART: artemin, アルテミン

ATP: adenosine triphosphate, アデノシン 3 リン酸

BK: bradykinin, ブラジキニン

B2 受容体: B2 ブラジキニン受容体

COX-2: cyclooxygenase-2, シクロオキシゲナーゼ 2

CXB: celecoxib, 選択的 COX-2 阻害剤. ※図表のみ

DEPC: diethylpyrocarbonate, ジエチルピロカーボネート

DNA: deoxyribonucleic acid, デオキシリボ核酸

cDNA: complementary DNA, 相補的 DNA

dNTP: deoxynucleoside triphosphate, デオキシヌクレオシド三リン酸

DOMS: delayed onset muscle soreness, 遅発性筋痛

DRG: dorsal root ganglion, 後根神経節

EtBr: ethidium bromide, 臭化エチジウム

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素

酵素

GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factor, グリア細胞株由来神経栄養因子

GFR α 1: GDNF family receptor alfa-1, GDNF ファミリー受容体 α 1

LC: lengthening contraction, 伸張性筋収縮

M-MLV RT: moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, モロニーマウス白血病ウ

イルス由来逆転写酵素

NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs, 非ステロイド性抗炎症剤

NGF: nerve growth factor, 神経成長因子

NTN: neurturin, ニュールツリン

PBS: phosphate buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水

PCR: polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応

PG: prostaglandin, プロスタグランジン

PSP: persephin, ペルセフィン

RNA: ribonucleic acid, リボ核酸

mRNA: messenger RNA, 伝令 RNA, メッセンジャー-RNA

RT: reverse transcription, 逆転写

TAE: tris-acetate-ethylenediaminetetraacetic acid, トリス-酢酸-エチレンジアミン四酢酸

(EDTA)緩衝液

TGF- β : transforming growth factor-beta, トランスフォーミング増殖因子 β

TrkA: tyrosine kinase receptor A, チロシンキナーゼ受容体 A

第1章 緒言

不慣れな運動を行った際や久々に運動をした際、アスリートが新たなトレーニングを取り入れた際や激しい試合の後、半日～1日後になって“筋肉痛”が発症する。これは遅発性筋痛 (delayed onset muscle soreness; DOMS) と呼ばれている現象である。DOMS の痛みは運動中や直後に生じる急性痛とは異なり、一般的に運動後 12～24 時間の“痛みのない期間”があり、その後痛みが発生し、24～72 時間後にピークを迎え、7 日以内に消失する (Armstrong 1984, Connolly et al. 2003, Mizumura & Taguchi 2016)。痛みの特徴は機械痛覚過敏と呼ばれる運動誘発性疼痛と圧痛 (Bajaj et al. 2000) であり、自発痛は重度の場合以外ではみられない (Weerakkody et al. 2001, Graven-Nielsen & Arendt-Nielsen 2003)。DOMS は一般的に医療処置を必要とせず回復するため、亜臨床 (subclinical) な扱いではあるが、DOMS を伴うような運動が繰り返し行われることは、さらなる慢性的な運動器障害や痛覚過敏といった中枢神経系の不可逆的な変化をもたらす可能性が危惧されている (Hayashi et al. 2011, Mizumura & Taguchi 2016)。

DOMS における痛みの神経機構は Taguchi et al. (2005b) によって明らかにされてきた。伸張性筋収縮 (lengthening contraction; LC) をラットに惹起させ、機械痛覚過敏が最も強く現れた LC2 日後の長指伸筋-総腓骨神経標本において、筋無髄神経 (C) 線維の機械刺激に対する反応の亢進が見出されたことにより、ラットにおける DOMS モデルが構築された (Taguchi et al. 2005b)。DOMS の発症原因は、LC による筋線維や結合組織の損傷とその後の炎症反

応であることが示唆されてきた (Newham 1988, Newham et al. 1988, Smith 1991). なぜなら, DOMS の発症, 筋線維や筋線維間の結合組織の崩壊は, 短縮性筋収縮や等尺性筋収縮よりも LC 後の筋において観察されてきたためである (Hough 1902, Asmussen 1956, Armstrong 1984). しかしながら, 近年他の収縮様式 (Aldayel et al. 2010) や, 筋損傷の所見がなくとも (Fujii et al. 2008, Hayashi et al. 2017), DOMS が生じることが報告されている. また, 先行研究の知見から, 単純に筋線維の損傷は DOMS の誘発と一致していないことが示されている (Mizumura & Taguchi 2016). さらに, 損傷部位への好中球や単球の浸潤といった炎症反応が, LC だけでなく短縮性筋収縮やストレッチ後にも見られる (Pizza et al. 2002) ことから, 筋線維や結合組織の損傷とその後の炎症反応は DOMS の決定因子でないことが推測できる. しかしながら, DOMS 発症には何らかの原因が筋神経線維の機械感受性を高めていると考えられる. その候補となる因子として, ヒスタミン, キニン, カリウム, カルシウム (Hnik et al. 1976, Smith 1991), 乳酸 (Schwane et al. 1983), グルタミン酸, サブスタンス P (Tegeder et al. 2002), ATP (Li et al. 2003), プロスタグランジン (prostaglandin; PG) E (Smith et al. 1993, Tegeder et al. 2002) が考えられてきた. 近年では, Murase et al. (2010) が運動中に骨格筋内で産生されるブラジキニン様物質 (Arg-bradykinin; BK) が B2 受容体の活性化を介して, 神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) 発現を増大させ, NGF が機械刺激に対する筋 C 線維の応答を感作することにより, DOMS がもたらされることをラットで明らかにした. さらに, PGE は DOMS 発症に関連する可能性が示唆されてきた (Smith 1991) が, その上流である PGE 合成酵素のシ

クロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase; COX-)2 の活性化も LC 後の筋機械痛覚過敏をもたらす要因であることも示されてきた (Murase et al. 2013, Mizumura & Taguchi 2016).

DOMS を生じさせる運動を数日の休息後に再度行くと、痛みが初回の運動後よりも減弱することも知られている。この現象は適応 (adaptation) や繰り返し効果 (Clarkson & Dedrick 1988, Nosaka & Clarkson 1995) と呼ばれている。繰り返し効果は痛みだけでなく、筋力低下、関節可動域制限、炎症マーカーの増加においても、再度 LC を行った後はそれぞれ軽減することが知られている (McHugh 2003)。しかしながら、繰り返し効果の研究において、主要な研究課題は筋力や負荷の検討など、スポーツパフォーマンスやトレーニングに関連した研究報告が多く、DOMS に着目した研究は少ない。DOMS の繰り返し効果における分子機序に関しては、ほとんど解明されていないのが現状である。繰り返し効果の機序には、神経性の適応、機械的な適応、細胞性の適応、その他の機構による適応の 4 つの仮説が挙げられてきた (McHugh 1999, 2003)。細胞性仮説における 1 つには、炎症反応の適応が挙げられている。この適応は、受動的ストレッチや等尺性収縮によって明確な筋損傷なしに炎症反応を引き起こしても、次の繰り返し LC 後の炎症反応を鈍らせたため (Koh & Brooks 2001, Pizza et al. 2002, McHugh 2003)、初回運動後の炎症反応が繰り返し効果に貢献すると考えられてきた (McHugh 2003)。しかしながら、DOMS の発症には必ずしも明確な炎症反応を必要としない (Fujii et al 2008) ことから、炎症反応だけではない筋細胞での適応が繰り返し効果をもたらしている可能性がある。

そこで、本論文は、DOMS における繰り返し効果の発症機序を検証することを目的として、LC 後の筋機械痛覚過敏をもたらすとされる NGF と COX-2 に着目し、2 つの研究課題に取り組んだ。研究課題 1 として、ラット長指伸筋に繰り返し LC を実施した際、筋における機械痛覚過敏と NGF 産生の変化を検証した上で、繰り返し LC による NGF 産生の変化に対する B2 ブラジキニン受容体の関与を検証した。研究課題 2 として、繰り返し LC を実施した際における COX-2 活性化の関与について検証した。

第2章 文献研究

1. 筋の痛みを感じるしくみ

“痛み”は、国際疼痛学会において“An unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage.”と定義されており (International association for the study of pain 1994), 日本ペインクリニック学会により“実際に何らかの組織損傷が起こった時,あるいは組織損傷が起こりそうな時,あるいはそのような損傷の際に表現されるような,不快な感覚体験および情動体験”と翻訳されている (日本ペインクリニック学会 2015). このように“痛み”は, 生体組織が損傷もしくは何らかの異常によって引き起こされる感覚だけでなく, 身体に損傷や異常が見られないにもかかわらず痛みや不快な情動をもたらすケースも含まれる. 前者のような組織損傷や異常は, 組織を侵害しうる刺激 (侵害刺激) として組織に張り巡らされた感覚神経線維の固有受容器 (侵害受容器) に作用し, 痛みを生じさせる. 感覚神経線維はその直径と伝導速度により分類され, A・B・C の文字式分類 (Erlanger & Gasser 1937) と I・II・III・IV のローマ数字式分類 (Lloyd 1943) が存在する (表 1). ローマ数字式は筋の求心性線維の分類に用いられていたが, 現在では一般的に深部組織 (筋, 筋膜, 関節, 腱, 靭帯など) の神経線維に用いられている (Mense 2010, 2013). また, 神経線維は分類ごとに伝達する感覚も異なり, 骨格筋の痛みは III と IV 群線維 (Aδ と C 線維) が伝達し, その末梢側の終末は自由神経終末と呼ばれている (Mense 2013). 自由神経終末は光学顕微鏡下で受容構造 (小体) が確認されなかった (Stacey 1969) ことから

表 1. 末梢神経線維の文字式分類と対応する筋腱求心性神経線維の数字式分類

文字式	髄鞘	直径 (mm)	伝導速度 (m/s)	機能	数字式	
A	α	有髄	12-20	70-120	筋腱固有感覚, 骨格筋への遠心性神経	Ia, Ib
	β	有髄	5-12	30-70	触, 圧	II
	γ	有髄	3-6	15-30	筋紡錘への遠心性線維	該当なし
	δ	有髄	2-5	12-30	痛, 温度, 触	III
B		有髄	< 3	3-15	交換神経節前線維	該当なし
C		無髄	0.4-1.2	0.5-2	痛	IV
		無髄	0.3-1.3	0.7-2.3	交感神経節後線維	該当なし

なお, 本論文では引用文献により数字式と文字式が混在するが, III 群線維と A δ 線維, IV 群線維と C 線維は同義として扱う。

その名が付けられ, いわば裸の神経線維であり, その終末に侵害刺激を電気信号へ変換する侵害受容器が存在する(丸山 2014)。III 群線維は軸索の周りを髄鞘で囲まれている有髄線維であり, 皮膚の A δ 線維に相当し, IV 群線維は髄鞘がない無髄線維であり, 皮膚の C 線維に相当する(Mense 2010)。

自由神経終末で発生した活動電位は, 神経線維を伝導して脊髄後角へ入り, 介在ニューロンを経由するか, もしくは直接 2 次ニューロンに接続する(Mense 2010, 丸山 2014)。これらのニューロンはシナプス接続されており, 1 次または介在ニューロンを伝導してきた活動電位は, そのシナプス前膜から神経伝達物質(グルタミン酸またはアスパラギン酸)を放出させる(Mense 2010, 丸山 2014)。放出された神経伝達物質が 2 次ニューロンのシナプス後膜に結合することにより, 2 次ニューロンに再び活動電位が発生し, より上位の中樞神経系へ伝達される(Mense 2010, 丸山 2014)。この 2 次ニューロンには筋以外の他の組織からの情報も混在するため, 筋からの侵害受容情報のみを伝える 2 次ニューロンや上行経路は存在しないと

されている(Mense 2010).

この先は A δ 線維と C 線維でルートが異なる。A δ 線維は脊髄視床路を上行し、視床後方の外側脊髄視床路から大脳新皮質の体性感覚野に至り、痛みの局在を知らせる(丸山 2014)。それと同時に、視床後方から内側脊髄視床路に分かれ、大脳辺縁系に至り、不快感といった情動ももたらす(丸山 2014)。C 線維は脊髄網様体路の脊髄中脳路、脊髄腕傍路、脊髄延髄路を経て、大脳辺縁系へ至ることで不快感をもたらす、一部は体性感覚野に到達して痛みをもたらす(丸山 2014)。DOMS においては、LC を行った筋からの侵害情報の伝達に C 線維は必須であり、A δ 線維は決定的に関与しないと報告されている(Mizumura & Taguchi 2016)。

2. 遅発性筋痛

DOMS に関する研究は古く、1902 年に Hough が運動後の筋の張り(stiffness)と痛みを報告した研究が最初とされている(Hough 1902)。DOMS をもたらす運動が LC であると明らかになったのは、1956 年 Asmussen の報告による(Asmussen 1956)。その後、DOMS の発症機序はヒトおよび動物の組織学的(光学顕微鏡レベルから超微細構造レベルまで)および生化学的知見に基づいて乳酸、筋スパズム、結合組織損傷、筋損傷、炎症、酸化ストレスなどが提案されてきた(Armstrong 1984, Smith 1991, Cheung et al. 2003)。これまでに DOMS の原因として幅広く支持されていた説は、LC によってもたらされる筋、結合組織、筋膜の損傷や炎症であった(Smith 1991, Pyne 1994)。スポーツ科学の分野においても、DOMS は運動誘発性筋損

傷の特徴の1つとして認識されており(Brentano & Martins 2011, Peake et al. 2017), DOMSと筋損傷は当然の因果関係にあると考えられてきた。しかし, 筋の損傷および炎症は DOMSに不可欠でなく, これらが関連しないことを示唆する報告も出はじめている(Malm et al. 2004, Crameri et al. 2007, Paulsen et al. 2010a, Hayashi et al. 2017)。現に我々の研究室では LC 後のラットにおいて, 光学顕微鏡レベルでの筋線維の損傷や炎症なしに筋機械痛覚過敏が生じることを報告した(Fujii et al. 2008)。Taguchi et al. (2005a)はラット長指伸筋の機械逃避反応閾値(機械疼痛閾値)を測定することにより, LC 後に筋機械痛覚過敏の発症を報告した。この筋機械痛覚過敏はヒトの DOMS と同様の, LC 実施後 1~3 日目に生じるという時間経過であり(Taguchi et al. 2005a), これによりラット DOMS モデルが誕生した。LC 後のラット長指伸筋へ機械刺激を与えると, 末梢組織からの侵害刺激を二次ニューロンへ伝達する場である(Cervero & Connell 1984, Ling et al. 2003) 脊髄後角表層に, 神経細胞活動の指標である c-Fos 発現の増加が認められる(Taguchi et al. 2005a)。さらに Taguchi et al. (2005b)は, 機械痛覚過敏が最も強く現れた LC2 日後のラットの長指伸筋-総腓骨神経標本において, 筋無髄神経(C)線維の機械刺激に対する反応が促進されたことを示し, この C 線維の亢進した反応こそが LC 後の筋機械痛覚過敏, すなわち DOMS の末梢神経機構であることを示唆した。

DOMS をもたらす原因物質を探るため, これまでに運動後の骨格筋から放出される物質が特定されてきた。その中でも痛みに関与するものは, カリジン様ペプチド(ラットの場合 Arg-ブラジキニン, Boix et al. 2002), アデノシン, カリウムイオン(Hnik et al. 1976), ATP(Li et al.

2003, Santos et al. 2003), PG (Smith et al. 1993, Tegeder et al. 2002) が挙げられる。近年, DOMS 発症の機構として, B2 ブラジキニン (B2) 受容体-NGF 経路と COX-2-GDNF 経路の 2 経路の存在が報告されたが (Mizumura & Taguchi 2016), それらが活性化するさらなる上流の機構までは明らかにされていない。

3. 繰り返し効果

繰り返し効果の研究は Highman & Altland (1963) による報告が最初とされ, トレーニング効果, 適応 (adaptation), 防御効果 (protective effect) などと呼ばれてきたが, Nosaka & Clarkson (1995) の報告以降, 繰り返し効果 (repeated bout effect) と呼ばれるようになった (McHugh 1999, 2003)。繰り返し効果における DOMS の扱いは, これまでの認識と同様に運動誘発性筋損傷の特徴の 1 つとして捉えられてきた。繰り返し効果の機序について, McHugh (1999, 2003) はいくつかの仮説を挙げている。神経性の適応, 機械的な適応 (動的な筋張力の増加または受動的な筋力の増加), 細胞性の適応 (筋節の長軸方向への加増, 炎症反応の適応, 興奮収縮連関を維持するための適応), その他の機構による適応 (熱ショック蛋白, 筋節のリモデリング, 細胞外マトリクスのリモデリング)。

神経性の適応については, 電気刺激による筋収縮によっても繰り返し効果がもたらされたことから (Sacco & Jones 1992), 繰り返し効果の出現に中枢神経系の関与は少なく, 末梢神経系が重要な役割を果たしていると考えられている (Nosaka et al. 2002)。しかしながら, 非運動

側の筋にも繰り返しの効果が見られた (Howatson & van Someren 2007, Starbuck & Eston 2012)

といった報告から、中枢神経系が関与する説も支持されている。

機械的な適応については、LC トレーニングが動的と受動的な筋の stiffness, 腱あるいはクロスブリッジの stiffness を増加させたことから、筋節の整列や構造維持に関わる細胞骨格蛋白の適応が考えられている (McHugh 2003)。LC 後の筋損傷の極早期に中間径フィラメントである desmin が消失することから、desmin は損傷に対する第一線の防御機構であり、そのリモデリングは繰り返しの筋節に掛かる過大な力に抵抗するための機械的な強化とも考えられる (McHugh 2003)。また、LC 後の筋内結合組織の増加も次の LC による筋原線維へのストレスを放散すると言われている (Lapier et al. 1995, McHugh 2003)。

細胞の適応については、よく支持されているのが筋節の追加 (sarcomerogenesis; Proske & Morgan 2001) である。筋損傷は、筋長-張力曲線 (Gordon et al. 1966) の下降脚 (descending limb) において筋節が過大な力を受けることにより生じると言われている (Armstrong et al. 1991)。すなわち、筋長の長い状態において LC を行う方がより損傷が大きくなるため、LC 中の筋長は筋損傷の程度を左右する重要な因子であり (McHugh 2003)、分解プロセスにより直列に筋節が増加することで、繰り返しの LC での筋節への負荷が減り、損傷する筋原線維が制限されるという説である (Morgan 1990, McHugh 2003)。初回 LC からの回復後に筋長-張力関係が右へシフトする (張力ピーク時の筋長がより長くなる) 現象は、筋節の長軸方向の追加の結果であると考えられている (McHugh 2003)。しかしながら、繰り返しの効果が筋節の追加に

よるものであれば、繰り返し LC を初回よりも長い筋長で行うと、初回 LC と同様の損傷をもたらすと予想される (McHugh 2003). 炎症反応説については、繰り返し LC を行った際に好中球や単球の活性化といった炎症反応が鈍ることは筋原線維の機械的な崩壊の拡大を防ぐための適応を反映している、と McHugh (2003) が述べている. 初回 LC の代わりに受動的ストレッチや等尺性収縮を行うと、明確な筋損傷なしに炎症反応を引き起こすことができ、次の繰り返し LC 後の炎症反応を鈍らせたことから (Koh & Brooks 2001, Pizza et al. 2002, McHugh 2003), 初回にもたらされた炎症反応が繰り返し効果に貢献すると考えられている. しかしながら、繰り返し LC 後の炎症反応の軽減は、繰り返し LC に対する機械的な崩壊、すなわち細胞骨格等の損傷の減少をシンプルに反映しているにすぎず (McHugh 2003), その元となる機械的な崩壊の減少の原因や炎症反応の機序は明らかにされていない.

4. 遅発性筋痛に関与する物質

4.1. ブラジキニン (BK)

BK はアミノ酸 9 個からなるポリペプチドであり、1949 年に Rocha e Silva がハハラカ (ヘビ) 毒を注射したイヌの血清において、強力な血圧下降および平滑筋刺激効果があることを報告したのが最初であった (Rocha e Silva et al. 1949, Mizumura et al. 2009). BK は組織損傷において血管内皮細胞から血漿に放出され、炎症性滲出液にも見られ、侵害受容器を感作する作用がある (Couture et al. 2001). BK の受容体には、B1, B2 の 2 つのサブタイプがあり、B1,

B2 ノックアウトマウスは痛み刺激に対して感覚鈍麻を示すことから、BK と B1, B2 受容体は痛み伝達経路に関与する (Rupniak et al. 1997, Pesquero et al. 2000, Okuse 2007). B1, B2 受容体いずれも G 蛋白共役型受容体で構造は類似しているが、機能は異なる. B1 受容体は健康な組織において一般的に存在しないもしくは発現が非常に少なく、組織損傷や内因性因子 (エンドトキシン, サイトカイン, 成長因子) によって誘導される (Couture et al 2001, Sharma & Al-Sherif 2006). 一方, B2 受容体は常在性であり、侵害受容器, 血管内皮細胞, 線維芽細胞, 単球, 肥満細胞において発現し、発痛, 血管拡張, 血管透過性亢進に関与する (Dutra 2017). BK は侵害受容器, 特に機械刺激に対して感作をもたらす (Mense & Meyer 1988) だけでなく、非神経性細胞から他の炎症物質を放出させることで間接的にも感覚神経を刺激する役割があり、BK 受容体活性化は Ca^{2+} とリン酸化依存性のホスホリパーゼ A_2 活性化をもたらすし、アラキドン酸放出, PG 産生をもたらすことが知られている (Slivka & Insel 1988, Leeb-Lundberg et al. 2005). しかしながら、DOMS において BK は筋機械痛覚過敏がピークとなる LC2 日後の筋中には存在せず、LC 中や LC 直後 (1 時間以内) で活性化することが示されている (Mizumura & Taguchi 2016). これは B2 受容体阻害剤の HOE140 を LC 直後や 2 日後に投与しても筋機械痛覚過敏は抑制されないが、LC 実施前に投与すると抑制されることから証明されている (Murase et al. 2010). また、B1 受容体阻害剤の des-Arg¹⁰-HOE140 は、投与タイミングに関係なく筋機械痛覚過敏に影響を及ぼさなかったことから、LC 後の筋機械痛覚過敏のトリガーには B2 受容体を介した BK の関与が考えられている (Murase et al. 2010,

Mizumura & Taguchi 2016).

4.2. 神経成長因子 (NGF)

NGFをはじめとする神経栄養因子は、神経細胞の長期生存、成長、分化を調節する因子として知られており、NGFは哺乳動物の胎生期では侵害受容器の成長と分化を促進し、生後は侵害受容器を感作する作用がある(Daws et al. 2013)。NGFは神経栄養因子の中でも最初に発見された。その発見は1948年にBuekerが、3日齢のニワトリ胚に体壁移植されたマウス180肉腫片の顕著な感覚神経支配について報告したのが最初とされ、その後Levi-Montalciniが1954年にマウス肉腫180から核タンパク粒子を単離し、NGFと命名した(Levi-Montalcini & Angeletti 1968)。その後1996年に先天性無痛無汗症の3家系において、NGFの受容体であるチロシンキナーゼ受容体(TrkA)遺伝子変異が報告され、侵害受容機能におけるNGFの重要性が認識された(Indo et al. 1996)。NGFは炎症促進サイトカインによって線維芽細胞、ケラチノサイト、シュワン細胞、リンパ細胞、マクロファージ、肥満細胞などから放出される(Ringkamp et al. 2013)。骨格筋においては、虚血や神経損傷後に発現増大することも知られている(Mizumura & Taguchi 2016)。また、1次求心性神経末梢側の終末に直接作用することで熱痛覚過敏をもたらす(Chuang et al. 2001)、骨格筋への注射は持続的な筋機械痛覚過敏を引き起こす(Svensson et al. 2003)。NGFとDOMSの関係については、Murase et al. (2010)がラットを用いて、運動中の筋血管内皮細胞から放出されるBK(Arg-BK)によって

NGF が産生されること, NGF の産生は筋細胞または筋衛星細胞における B2 受容体の活性化を介していること, 産生された NGF が機械刺激に対する筋 C 線維受容器を感作したこと, LC 後の筋への抗 NGF 抗体投与により NGF 産生を阻害すると筋機械痛覚過敏が大幅に軽減されることなどを報告してきた. しかしながら, NGF の DOMS の繰り返し効果への関与は不明である.

4.3. プロスタグランジン (PG)

PG は生理活性物質の 1 つであり, ほぼ全身の臓器に存在し, 生体の恒常性維持や炎症に関係する. その歴史は 1933 年に Goldblatt がヒト精漿内から平滑筋を収縮させる生理活性物質を発見し, 1934 年から 1937 年にかけて Ulf Svante von Euler が同様の機能を持つ物質をヒト, イヌ, ウサギの前立腺, 成熟したウシの精囊腺から検出したことに始まる (Flower 2006). 当初は前立腺 (prostate gland) 由来と考えられ PG と命名されたが, 後に他の臓器においても合成されることが示されてきた. BK をはじめとした様々な刺激により細胞内カルシウム濃度が高まると, ホスホリパーゼ A_2 が活性化し, 細胞膜リン脂質に作用することにより, 細胞膜にエステル結合していたアラキドン酸が細胞質内へ遊離され, アラキドン酸カスケードと呼ばれる代謝経路を経て PG が合成される (Okuse 2007, Das et al. 2007). 遊離したアラキドン酸は COX によってエンドペルオキシド含有プロスタグランジン G_2 (PGG_2) に変換され, 続いて PGE_2 , PGI_2 , PGD_2 , PGF_2 の 4 種のプロスタノイドに変換される (Narumiya et al. 1999, Das et

al. 2007). これらプロスタノイドは、それぞれ PGE₂:EP, PGI₂:IP, PGD₂:DP, PGF₂:FP と特有の受容体が存在し、さらに EP 受容体は EP₁₋₄ のサブタイプに分けられる (Narumiya et al. 1999). プロスタノイド受容体は G 蛋白共役受容体であり、その結合パターンによって生化学的役割が決定するため、PG は存在組織によって役割が全く異なる (Daws et al. 2013). PG と DOMS との関係については、LC を伴う運動後に血漿中の PGE 増加と DOMS 発症の時間経過において有意な相互関係 (P < 0.05) が示され (Smith et al. 1993), DOMS 発症に対する PGE 増加の関与が示唆されてきた (Smith 1991). さらに近年になって、LC を行うと筋細胞もしくは筋衛星細胞に COX-2 が活性化し、合成された PGE₂ が EP₂ 受容体に結合して GDNF を発現増加させる一連の経路が報告されてきた (Mizumura & Taguchi 2016). しかしながら、この経路が繰り返し効果においても関与するかどうかは明らかにされていない.

4.4. シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2)

プロスタグランジン発見の後、PGG₂ を産生するために細胞膜リン脂質から遊離されるアラキドン酸は酵素環化されることが Hamberg & Samuelsson (1973) によって明らかにされた. COX はアラキドン酸を触媒して PG を合成する酵素である (Süleyman et al. 2007). COX には COX-1, 2, 3 の 3 種類が同定されている. COX-1 はほぼ全ての組織に存在し、“ハウスキーピング”の役割をする構成 (常在) 型とされる (Daws et al. 2013). COX-2 は誘導型であり、炎症に関わる細胞 (マクロファージ, 単球, 滑膜細胞) によって発現が誘導され、PG を合成し、急性

あるいは慢性炎症状態をもたらす(Daws et al. 2013). COX-3 は COX-1 のスプライスバリエーション(COX-1b)であり, 神経組織における発現が強い(Kis et al. 2006)とされているが, その働きについては不明な部分が多い. ラットに対して, 選択的 COX-2 阻害剤の celecoxib と zaltoprofen を LC1 時間前に単回経口投与すると, LC1, 2, 3 日後の筋機械痛覚過敏を抑制するが, これらを筋機械痛覚過敏が生じている LC2 日後に投与しても疼痛抑制効果は得られない(Murase et al. 2013). 一方, 選択的 COX-1 阻害剤の SC560 または ketrolac は, LC1 時間前あるいは LC2 日後に投与しても, いずれも筋機械痛覚過敏を抑制しない(Murase et al. 2013). これらの事実は DOMS 発症には COX-1 ではなく, COX-2 活性化が必要であることを示している. COX-2 活性化は GDNF の発現増大をもたらし, 筋 A δ 線維受容器を感作して筋機械痛覚過敏をもたらすことが報告されている(Murase et al. 2013, 2014). LC 前の COX-2 阻害剤の投与は, DOMS 発症を抑制し, LC12 時間~1 日後にかけて発現増大する GDNF mRNA 発現を抑制するが, NGF mRNA には影響しない(Murase et al. 2013).

また, COX-2 は DOMS に関与するだけでなく, 筋の再生においても重要な役割を果たしており, COX-2 や COX-2 由来 PG が, 骨格筋蛋白の合成, 筋芽細胞の増殖, 分化, 融合に影響することが報告されている(Bondesen et al. 2004, Burd et al. 2010, Paulsen et al. 2010b, 2012). マウス後肢吊り下げ中に選択的 COX-2 阻害剤(SC-236)を与えると, 再加重後のヒラメ筋損傷回復期における筋核数の増加が抑制され, COX-2 欠損マウスにおいては筋芽細胞数が野生型ほど増加しなかった(Bondesen et al. 2004). COX-1 と COX-2 両方を阻害する非

ステロイド系抗炎症剤は、筋衛星細胞数の増加 (Mikkelsen et al. 2009)、筋線維の肥大や筋蛋白の合成 (Trappe et al. 2001, 2002) を抑制すると言われている。選択的 COX-2 阻害剤は筋衛星細胞の活動に影響をもたらさない (Paulsen et al. 2010b, 2012, Mackey 2013) とする報告がある一方、損傷後の筋の回復を遅らせた (Shen et al. 2005) 報告もある。

COX-2 と繰り返し効果については、ヒトを対象として COX 阻害剤を使用した研究が行われてきたが、その多くは筋量や筋力を対象としたものである。COX 阻害剤を 1.5 ヶ月から 4 ヶ月にわたって連用したヒトの実験の場合には、トレーニング効果は減弱せず、逆に高齢者では服用によって筋量増大が促進されると報告されている (Trappe & Liu 2013)。Paulsen et al.

(2010b) の報告では、celecoxib を 1 回目 LC の前日から 12 日間連続投与し、21 日後に 2 回目の LC を実施した。1 回目と 2 回目の LC 後における筋力と筋損傷の変化についてはプラセボと有意な差は見られなかったが、DOMS については 1 回目、2 回目共にプラセボよりも軽減していた。しかし、1 回目 LC 後の DOMS は celecoxib 投与でも完全に抑制されていなかった。このように、COX-2 の筋代謝および DOMS の繰り返し効果に及ぼす影響は不明な点が多く、さらなる研究が必要である。

4.5. グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)

侵害受容ニューロンはその神経栄養因子に基づき、TrkA 受容体を発現してターゲット組織由来の NGF を利用するニューロンと、受容体型 RET チロシンキナーゼと GDNF ファミリー受

容体 $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$)を発現して, GDNF ファミリーを栄養因子とするニューロンの 2 種に分類される (Molliver et al. 1997, Murase et al 2014). GDNF ファミリーには, GDNF, NTN, ART, PSP が同定されており, 構造的には TGF- β スーパーファミリーのサブグループに分類される (Airaksinen et al. 1999). GDNF ファミリーの主な役割はニューロンの生存と生後早期の成熟である (Jankowski & Koerber 2010). GDNF は中脳のドーパミン作動性ニューロンの生存と軸索伸張に特異的に作用する栄養因子として発見され (Lin et al. 1993), 主にパーキンソン病や神経変性疾患治療のために研究されてきた. 骨格筋においては, GDNF の発現が多発筋炎患者の骨格筋線維とデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の再生筋線維 (Suzuki et al. 1998a) に認められ, 特に神経筋接合部において顕著であった (Suzuki et al. 1998b). ラット骨格筋への GDNF の注射は機械痛覚閾値を低下させ (Hendrich et al. 2012), 筋注 1 時間以降になって筋 A δ 線維の機械閾値を低下させると報告されている (Murase et al. 2014). LC 後の骨格筋において, 12 時間~1 日後の筋細胞あるいは衛星細胞の核の周囲に GDNF mRNA の増加が報告されており, 2 日後の筋痛覚過敏を抗 GDNF 抗体の筋注がいくらか緩和したことから, LC 後の筋機械痛覚過敏に GDNF の関与が示唆された (Murase et al. 2013). なお, 他の GDNF ファミリー (NTN, ART, PSP) は LC の影響を受けなかった (Murase et al. 2013). GDNF は筋 A δ 線維にのみ機械刺激に対する感作をもたらし, C 線維には影響しない (Murase et al. 2014). これらのことから, DOMS は B2 受容体-NGF:C 線維, COX-2-GDNF:A δ 線維, この 2 つの機構により生じることが提言されてきた (Mizumura & Taguchi

2016). しかしながら, この経路が DOMS の繰り返し効果に関与するかどうかは明らかにされていない.

4.6. アデノシン 3 リン酸 (ATP)

ATP は哺乳類細胞の細胞質基質に存在し, 生命維持活動に欠かせない物質としてよく知られているが, ヒト皮膚水疱内に ATP を投与すると痛みをもたらした 1966 年の報告 (Collier et al. 1966) から, ATP は痛みにも関与することが知られてきた. 細胞が損傷や死滅すると, ATP が細胞外に漏出して感覚神経終末の ATP 受容体に作用し, 痛みをもたらす (Reinöhl et al. 2003, Burnstock 2013). ATP 受容体は存在する組織によってサブタイプが異なり, 痛みに関しては DRG ニューロンに P2X₃ と P2X_{2/3} (P2X₂ と P2X₃ のヘテロマー) 受容体が, 脊髄マイクログリアに P2X₄ 受容体が同定されている (Inoue 2006). 髄腔内への NGF と GDNF の投与, 骨格筋への NGF 投与は, DRG ニューロンに P2X₃ 受容体の発現を増加させる (Daws et al. 2013). ラットの骨格筋へアデノシンを投与すると, 直後から濃度依存性にキニンペプチドの増加をもたらすことが知られている (Boix et al. 2002). 収縮筋由来のアデノシンは BK と同様, 筋収縮中の血流とグルコースの取り込みの調節を行い, この作用の一部はカリクレイン-キニン系を介していると考えられている (Boix et al. 2002). さらに血管床のキニンペプチドを遊離させ, B2 受容体を介して筋細胞へトクバックされる可能性がある (Boix et al. 2002). このようにアデノシンとキニン系は活動筋細胞と血管システムの交互作用を仲裁する 2 つの要素であ

ると考えられている(Boix et al. 2002). また, ヒト尿路上皮細胞は BK 濃度依存性に ATP を放出し, その ATP 放出にはストレッチ刺激によるカルシウム濃度の上昇が必要とされている(Ochodnický et al. 2013). ATP はこれまでに述べてきた BK などの物質と比較して, DOMS やその繰り返し効果への関与はほとんど研究されておらず, 今後の DOMS 研究における重要な因子となることが期待される.

第3章 研究課題1 遅発性筋痛の繰り返し効果における NGF 発現関与の検証

1. 目的

これまで DOMS 発症の原因として、乳酸 (Schwane et al. 1983), BK (Boix et al. 2002), カリウム (Hnik et al. 1976, Smith 1991), ATP (Li et al. 2003, Santos et al. 2003), PG (Smith et al. 1993, Tegeder et al. 2002) などが報告されてきたが、いずれも DOMS との関連は明確にされてこなかった。Murase et al. (2010) が LC 実施前に B2 受容体阻害剤により NGF 産生を抑制しておくと、LC 後の筋機械痛覚過敏発症が抑制されることを報告した。これにより、B2 受容体を介して産生増大する NGF が DOMS 発症に重要であることが明らかになってきた。しかしながら、DOMS の繰り返し効果においても NGF の産生が関与するかどうかまでは明らかにされていない。そこで本研究はラット DOMS モデル (Taguchi et al. 2005a) を用いて、DOMS の繰り返し効果に対する NGF の関与を明らかにし、DOMS の痛みが NGF 由来であることを裏付けるため、NGF mRNA の発現増大が 2 回目の LC 後にどのように変化するかを検討した。さらに繰り返し効果が BK の放出および NGF 産生を刺激する B2 受容体の活性化、あるいは B2 受容体活性化後の NGF 産生を発現増大する過程、どちらで生じるのか検証する必要がある。そこで、B2 受容体阻害剤を 1 回目の LC 前にのみ投与し、2 回目の LC 後に筋機械痛覚過敏と NGF mRNA の変化を確かめることにより、繰り返し効果が B2 受容体の上流と下流のどちらで生じるかを検証した。

2. 方法

2.1. 実験動物

全ての実験は名古屋大学における動物実験等に関する取扱規程の認可の下に行われた。実験動物として、127 匹の雄性 Sprague-Dawley (SD) 系ラット(日本 SLC 株式会社, 浜松, 日本, 実験開始時は 9~10 週齢)を用いた。ラットは, 室温 22~24 °C, 12 時間の明暗サイクル(明期 7 時~19 時)に調整された環境において, 1 ケージあたり 2 または 3 匹で飼育し, 飲水と摂餌は自由にさせた。本研究では 2 つのシリーズに分けて実験を行った(図 1)。ラットの内訳として, 最初のシリーズでは機械痛覚過敏の測定に 18 匹, 長指伸筋における NGF mRNA の測定に 72 匹, 2 つ目のシリーズでは B2 受容体阻害剤の効果を調べるために機械痛覚過敏の測定では 15 匹, NGF mRNA の測定に 22 匹を用いた。

2.2. 筋機械疼痛閾値の測定

ラット長指伸筋に対する機械疼痛閾値測定の様子を図 2 に示した。測定にはランダルセリット式鎮痛効果測定装置(Ugo Basile, Verese, Italy)を用いた。ラットを落ち着かせるためにラットの胴体をタオルで拘束し, 測定中はラットを刺激しないよう慎重に取り扱った。下腿の毛を剃り, 装置の台座の上にラットの下腿を乗せ, 直径 2.6 mm の円錐型をしたプローブ(自家製)を長指伸筋の筋腹へ向かうように垂直にセットした。このプローブは既製品よりも先端を太くすることで皮膚を介した筋機械逃避反応閾値(筋機械疼痛閾値)の測定を可能にする(Nasu et al.



図 2. ラット長指伸筋に対する機械疼痛閾値の測定の様子

2010). 測定者がペダルスイッチを踏むと、157 mN/s に設定されたスピードでラットの長指伸筋にプローブを介して機械刺激(圧迫)が与えられ、ラットがもがく、下腿を台座から退かす、などの逃避行動を起こしたときにペダルを離す。ペダルを離すとただちにモーターが停止するため、ラットに必要以上の圧迫がかからない仕組みになっている。ペダルを離した時の加重(mN)をスケールの目盛りから読み取り、その回の筋機械疼痛閾値とした。組織損傷を防ぐための上限値は 2450 mN とし、この時点まで反応しなかった場合には 90 秒の休息時間を空け、再度測定した。測定は概日リズムの影響を減らすため同じ時間帯に行った。ラットを測定環境に慣らせるためのトレーニングは 6 日間行った。測定は 1 回につき 90 秒間の休息をはさみ、10 回測定した。後半の 5 回の平均値をそのラットの筋機械疼痛閾値とした。なお、筋機械

疼痛閾値の測定時には、どのラットが何の処置を受けたか、測定者に分からないようブラインド処置を施した。

2.3. 繰り返し伸張性筋収縮

ラットの長指伸筋に対して LC を行う様子を図 3 に示した。繰り返し LC を 2 回行い、1 回目の LC (1st LC) を行った日を 0 日目とし、1st LC から 5 日後に 2 回目の LC (2nd LC) を行った。5 日間空けた理由は、同モデルの先行研究において、LC 後の機械痛覚過敏が 5 日後に完全に消滅したことが示されているからである (Taguchi et al. 2007, Murase et al. 2010)。LC 負荷は、Taguchi et al. (2005a) に倣って以下のとおりに行った。ラットを pentobarbital (50 mg/kg) を

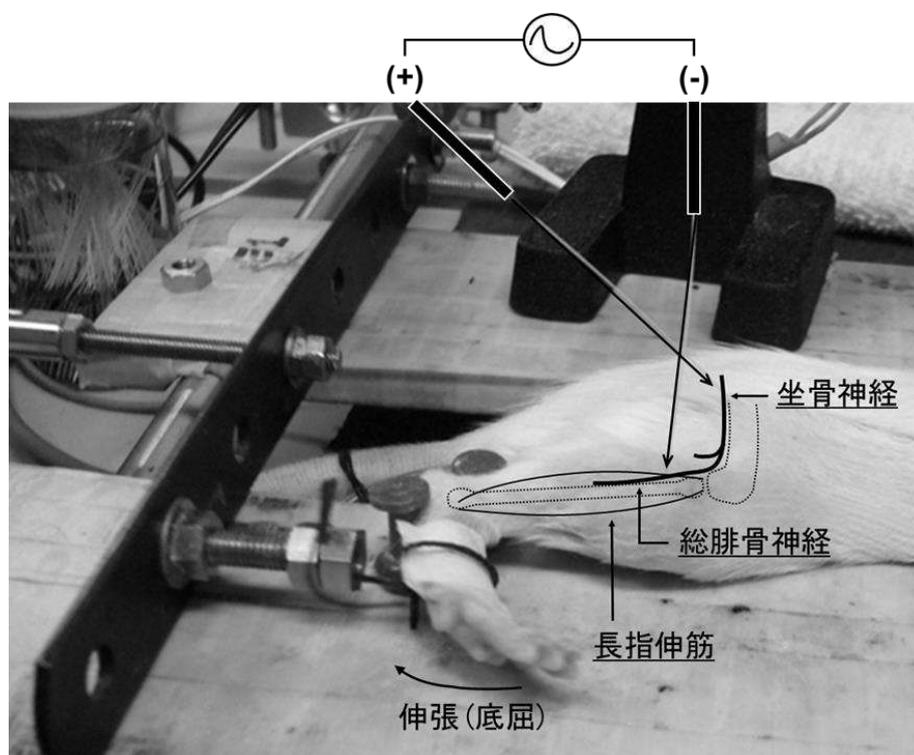


図 3. ラット長指伸筋 LC の様子

腹腔内投与して麻酔し、体温が 37°C に保たれるようにホットパッドを敷いた状態で LC 負荷を行った。麻酔されたラットを側臥位に寝かせ、総腓骨神経の近傍に刺した 2 本の針電極の位置を微妙に調整することにより、長指伸筋を特異的に収縮させた。神経の電気刺激は、電流強度を単収縮閾値 (<100 μ A) の 3 倍、刺激パルス幅は 1 ms、周波数は 50 Hz の条件で、1 秒間刺激—3 秒間休止のサイクルで行った。足関節の屈曲には直線化モーター (CPL28T08B-06C2T, オリエンタルモーター株式会社, 日本) を用いた。足関節のスタートポジションは足関節角度 45° とし、電気刺激と同期してモーターが作動し、長指伸筋が収縮した状態で強制的に足関節を 90° の位置まで 1 秒間かけて底屈させ、3 秒間かけてスタートポジションへ戻す。このサイクルを 500 回行った。LC 後、麻酔から醒めたラットには飲水摂餌行動を自由にさせた。

2.4. 筋サンプル抽出

LC 後の筋における NGF mRNA 発現の変化を調べるために、安静 (control) 群と 1st LC と 2nd LC のそれぞれ 5 日後のラット (各 n = 4)、1st LC と 2nd LC のそれぞれ 0, 6, 12 時間後と 1 日後のラット (各 n = 6) から、pentobarbital 麻酔下 (50 mg/kg, 腹腔内投与) で長指伸筋を抽出した。

2.5. HOE140 処理

B2 受容体阻害剤の HOE140 (0.1 mg/kg, Sigma, St. Louis, Missouri, USA) を用いて, B2 受容体を阻害した状態での 1st LC が 2nd LC 以降の筋機械痛覚過敏にどのような影響を与えるか調べた. HOE140 群 (n = 7) と非 HOE 処置の control 群 (n = 8) に分け, 筋機械疼痛閾値は 1st LC 前, 2, 5 日後, 2nd LC 2 日後に測定した. NGF mRNA 測定のための筋サンプルは, 安静 (control), 1st LC12 時間, 1 日, 2nd LC12 時間, 1 日後に摘出した (n = 4, control 群のみ n = 6). これらの時間に設定した理由は, LC による筋機械痛覚過敏は 2 日後に, NGF mRNA の発現増大は 12 時間と 1 日後にピークを迎えるからである (Taguchi et al. 2005a, Murase et al. 2010). HOE140 は生理食塩水に溶解し, 1st LC の 30 分前にラット背部の皮下に注射した. control 群に対しては phosphate buffered saline (PBS, 0.01 M) を注射した.

2.6. 筋 mRNA 抽出

実験前の準備事項

長指伸筋における総 RNA の抽出には, RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いた. 10 μ l の β -メルカプトエタノールを 1 ml の Buffer RLT に添加した (室温で最高 1 ヶ月まで保存が可能である). Buffer RPE にを 4 倍量のエタノール (96~100%) を添加して, ワーキング溶液を作成した. RNase フリーの注射針とシリンジを用いて, DNAase I バイアルに 550 μ l の RNase フリー水を注入し, ボルテックスは使用せず静かに転

倒混和した。DNAase I は 1 回分 45 μ l ずつ分注した(-20°C で最高 9 ヶ月まで、解凍後は-4°C で最高 6 週間まで保存が可能である)。

RNA 抽出

後の手順にて proteinase K 分解を行うため、あらかじめブロックインキュベーターを 55°C に温めておいた。摘出した長指伸筋から 1 匹あたり約 30 mg の筋を標本として分離した。標本を分離する際は 30 mg を超えないよう、凍結標本の場合は解凍しないよう氷上で手早く行った。標本をホモジナイズ用チューブに入れ、300 μ l の Buffer RLT を添加して 20~40 秒間ホモジナイズした。ライセートを 1.5 ml チューブに移し、590 μ l の RNase フリー水、10 μ l の proteinase K を加えた。ブロックインキュベーターに移し、55°C で 10 分間インキュベートした。遠心分離機へ移し、10,000 \times g, 20~25°C で 3 分間遠心操作を行った。約 900 μ l の上清を 200 μ l チップのピペットでペレットが混入しないよう新たな 1.5 ml チューブへ移し、0.5 容量(約 450 μ l)のエタノール(96~100%)を添加した。RNeasy Mini Spin Column を 2 ml コレクションチューブの中にセットし、700 μ l のサンプルを Spin Column 内へ添加した。Spin Column の蓋は閉じずにチューブを 20~25°C, 10,000 rpm(8,000 \times g 以上)で 15 秒間遠心操作し、コレクションチューブの底に溜まったろ液をペーパータオルの上に棄て、再び残りの 700 μ l も同様に Spin Column 内へ添加、遠心操作、ろ液の破棄を行った。Spin Column 内のメンブレン洗浄のため、350 μ l の Buffer RW1 を Spin Column 内へ添加し、20~25°C, 10,000 rpm

(8,000 × g 以上)で 15 秒間遠心操作し、ろ液を破棄した。10 μl の DNase I ストック溶液を 70 μl の Buffer RDD に添加し、静かに転倒混和した。80 μl の DNase I インキュベーション溶液をカラム内のメンブレンにピペットで確実に滴下し、室温 (20~30°C) で 15 分間インキュベートした。インキュベート後、メンブレン洗浄のため 350 μl の Buffer RW1 を Spin Column 内へ添加し、20~25°C, 10,000 rpm (8,000 × g 以上) で 15 秒間遠心操作し、ろ液とコレクションチューブを破棄した。新たな 2 ml コレクションチューブにカラムをセットし、メンブレン洗浄のため 490 μl の Buffer RPE を Spin Column へ添加し、20~25°C, 10,000 rpm (8,000 × g 以上) で 15 秒間遠心操作し、ろ液を破棄した。再びメンブレン洗浄のため、500 μl の Buffer RPE を 20~25°C, 10,000 rpm (8,000 × g 以上) で 2 分間遠心操作し、ろ液を破棄した。RNA 溶出中にエタノールがキャリーオーバーしないよう、さらにメンブレンを乾燥させるために、20~25°C, 10,000 rpm (8,000 × g 以上) で 1 分間遠心操作した。Spin Column を新たな 1.5 ml コレクションチューブにセットし、50 ml の RNase フリー水をメンブレンに直接添加し、Spin Column の蓋を静かに占めて 10 分間親水させた。RNA 溶出のため、20~25°C, 10,000 rpm (8,000 × g 以上) で 1 分間遠心操作した。コレクションチューブの底に溜まった RNA 溶液は -80°C で保存した。RNA をより長期的に保存するために、エタノール沈殿を行った。エタノール沈殿にあたり、あらかじめ遠心分離機を 4°C に設定し、フリーズドライヤーを起動しておいた。氷上で 80 μl の DEPC 水に 20 μl (1 μg 分) の RNA 溶液, 0.1 容量 (10 μl) の酢酸ナトリウム, 2.5 倍量 (300 μl) のエタノール (99%) を添加し、ボルテックスで混和、スピンドウンした。スピンドウン

後、 -80°C で 15 分間置いた。RNA ペレットを沈殿させるため、 4°C 、12,000 rpm で 15 分間遠心操作した。遠心分離機にチューブを残したまま、チューブの内側にチップが当たらないよう静かに上清を破棄し、新たに 200 μl のエタノール (70 %, -30°C) を滴下した後、再び 4°C 、12,000 rpm で 5 分間遠心操作した。再び上清を破棄した後、フリーズドライヤーにて 10 分間乾燥させ、15 μl の DEPC 水により RNA のペレットをボルテックスで溶解した。

RNA 濃度測定

総 RNA の濃度測定には Nano Drop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。測定前の準備として、1 μl の滅菌水をセンサーへ滴下して清掃、滅菌水を拭き取った後、再び 1 μl の滅菌水を滴下してブランクの測定を行った。1 μl のサンプル RNA を滴下し、RNA 濃度 ($\text{ng}/\mu\text{l}$) を測定した。“260/280 Ratio” が 1.8 以上であれば、純粋な RNA が測定できたことを示す。測定部は 1 サンプル測定ごとにペーパータオルで拭き取り、測定終了後は滅菌水でセンサーを清掃した。

cDNA 合成 (逆転写)

RNA サンプルから cDNA の合成には、M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) を用いた。新たなマイクロチューブに 8.7 μl の滅菌水を入れ、1 μg 分の RNA サンプルを添加して 1 μl の Oligo-dT primer (10 pmol/ μl) を滴下し、静かに混和した。プライマー

のアニーリングのため、70°C、3 分間保温した後、氷上へ 1 分間急冷した。RNase inhibitor は使用直前に-30°C のフリーザーから取り出し、タッピングとスピンドウンで混和したのち、0.3 µl をピペッティングせずに添加した。4 µl の 2.5 mM dNTP と 4 ml の M-MLVRT 5× Reaction Buffer を添加し、スピンドウンの後に 42°C、2 分間インキュベートした。1 µl の M-MLVRT 酵素は使用直前に-30°C のフリーザーから取り出し、タッピングとスピンドウンで混和したのち、1 µl をピペッティングせずに添加した。サンプルを DNA の重合化のために 42 °C で 50 分間、酵素不活性化のために 70°C で 15 分間インキュベートした後、急冷し、cDNA に逆転写した。

逆転写過程で不要になった mRNA を分解、除去するため、0.6 µl の RNase H buffer と 0.4 µl の RNase H を-30°C のフリーザーから取り出し、cDNA サンプルに添加した。RNase H buffer は室温に戻して使用するが、RNase H は温度変化を極力避けるため、凍結保存ボックスに入れたまま手早く作業を行った。サンプルを 55°C で 10 分間インキュベートし、インキュベート後は 80 µl の MilliQ 水を加えて-30°C で保存した。

PCR

PCR 反応液は、1 反応分あたり 18.8 µl の滅菌水、3 µl の 10 × PCR バッファー、1 µl の 10 mM dNTP、1 µl のセンス(フォワード)プライマー、1 µl のアンチセンス(リバーズ)プライマー、最後に 0.2 µl の Taq DNA polymerase を優しく混和することで作成した。25 µl の PCR 反応液を PCR 用 0.2 ml チューブへ移し、5 µl の cDNA を添加してスピンドウンした。サンプルの入

表 2. RT-PCR で用いたプライマー配列

	Sequence of primers	Cycle conditions
Nerve growth factor (NGF)	5'-ttcggacactctggatttagact-3'	30 s at 94 °C, 30s at 55 °C,
	5'-gatttggggctcggcacttg-3'	1 min at 72°C, 33 cycles
Cyclooxygenase-2 (COX-2)	5'-gtgaaggtcgggtgcaacggattt-3'	30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C,
	5'-cacagtcttctgagtggcagtgat-3'	1 min at 72 °C, 33 cycles
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	5'-gtgaaggtcgggtgcaacggattt-3'	30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C,
	5'-cacagtcttctgagtggcagtgat-3'	1 min at 72 °C, 21 cycles

った PCR 用チューブを PCR 装置へ移し、表 2 の条件にて増幅を行った。GAPDH は内部標準として用いた。

アガロースゲル電気泳動

アガロースゲルは大 40 ml, 小 20 ml であるため、200 ml の 1.5%アガロースゲルの作成を作成する場合は、エルレンマイヤーフラスコに入れた 200 ml の 1 × TAE バッファーへ 3 g のアガロース粉末を加え、500W の電子レンジで加熱した。加熱中、泡が出始めるとその都度取り出して攪拌し、沸騰したら粉末が完全に溶けるまで 1～3 分加熱した。アガロース溶液を室温でゆっくり冷却し、手で触れられる温度まで低下すると 10 μl の EtBr 溶液を加えた。EtBr は DNA と結合すると紫外線照射により発光する性質があり、この性質により DNA 濃度測定を可能にする。ただし、発ガン性物質のため取り扱いや破棄には厳重に注意した。アガロース溶液をゲルメーカーへ流し込み、コームを挿して 30～40 分間室温で冷却と固化を行った。固まっ

たゲルを電気泳動槽にセットし、1×TAEバッファーをゲルが浸るまで流した。PCRチューブ1本あたり5µlのローディングバッファーをDNA溶液と混和し、ゲルのウェルへ静かに滴下し、電気泳動を開始した。電気泳動により分離され、EtBrにより染色されたDNAバンドをUVトランスイルミネーターにより検出し、その濃度をImage J software (free software developed by National Institutes of Health, USA)により分析した。測定値はGAPDHに対する割合として標準化した。

2.7. 統計処理

全ての値は平均 ± 標準誤差で表した。筋機械痛覚過敏の評価は1回目と2回目に分け、それぞれ繰り返しのある二元配置分散分析を用いてcontrol群とLC群間を比較した。さらに、1st LC 前日 (day -1) と2nd LC 前日 (day 5) に対しては、Bonferroni の多重比較検定を行った。NGF mRNA の比較には一元配置分散分析を用い、control 群または2nd LC 前日に対しては Bonferroni の多重比較検定を行った。P < 0.05 を有意水準とした。

3. 結果

3.1. 筋機械痛覚過敏の繰り返し効果

繰り返し効果の出現を確認するため、2回のLCを行った際の筋機械痛覚過敏の変化を調べた。ラットを2つの群に分け、1つは0日目(1st LC)と5日目(2nd LC)にLCを行ったrLC

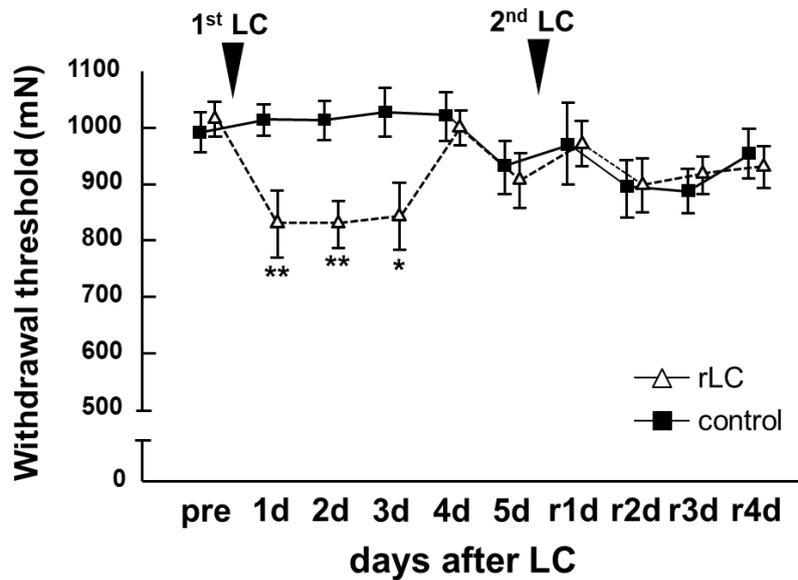


図 4. 2 回の LC 後の筋機械疼痛閾値の経日的変化

横軸は LC 後の日数, 縦軸は逃避反応閾値 (mN). 繰り返し LC (rLC) 群: Δ , 非運動 (control) 群: \blacksquare , 各群 $n = 9$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, LC 直前 (pre) の値との比較.

群 (図 4, Δ , $n = 9$) と, もう 1 つは運動を行わない control 群 (図 4, \blacksquare , $n = 9$) として, 長指伸筋の機械疼痛閾値を測定した.

1st LC 後ラットの筋機械疼痛閾値において, rLC 群ではベースライン (図 4, pre) 値の 1015 ± 30 mN から 830 ± 60 mN へと 1st LC 1 日後から有意に低下し, 3 日後まで続いた ($P < 0.05$). 4, 5 日後にはベースライン値まで戻った. control 群では筋機械疼痛閾値の有意な低下は見られなかった. 2 群を繰り返しのある二元配置分散分析により比較したところ, 時間 ($P < 0.001$) と処置 (LC の有無, $P < 0.005$) それぞれに有意な効果が見られ, 時間と処置の間にも有意な相互関係 ($P < 0.005$) が認められた. 1st LC 5 日後に行った 2nd LC 後の筋機械疼痛閾値において, 2 群の間に時間, 処置, 時間と処理の相互関係, いずれにおいても有意な差は見られず, 2 群ともに有意な低下も認められなかった.

3.2. NGF mRNA

1st LC 後の長指伸筋における NGF mRNA レベルは、12 時間後と 1 日後に有意な発現増大を見せ、5 日後に LC 前レベルへ戻った(図 5)。2nd LC 後は、12 時間後と 1 日後にわずかな発現増大を見せたが、この変化は 1st LC 5 日後と有意な差はなかった。NGF mRNA の結果は、筋機械疼痛閾値の変化と平行して繰り返し効果が表れていたことを示唆するものであった。

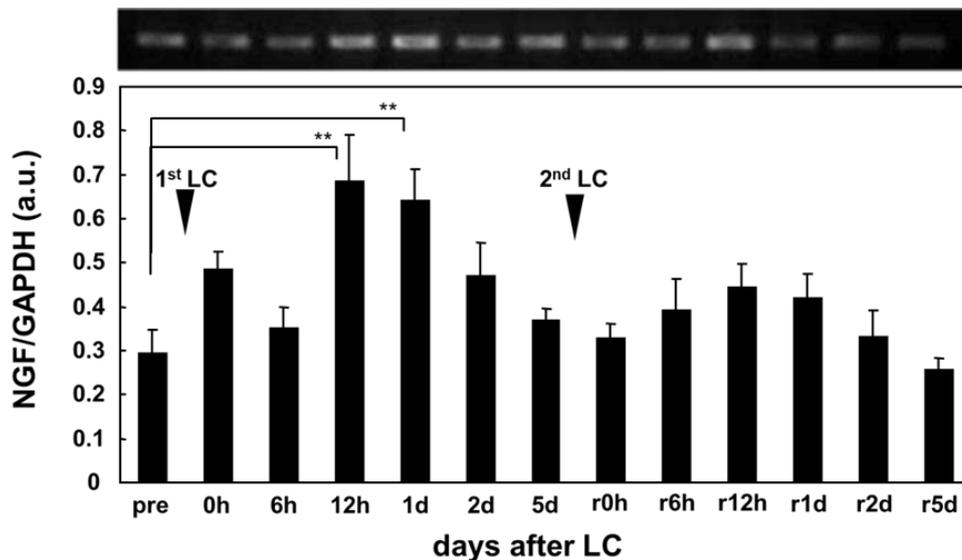


図 5. 2 回の LC 後の運動筋 NGF mRNA 発現の変化

横軸は LC 後の日数, 縦軸は NGF mRNA レベル(任意単位). NGF mRNA レベルは GAPDH に対する割合で表した. control(pre)と LC 5d, rLC 5d は n = 4, 他は n = 6. **P < 0.01, pre との比較.

3.3. HOE140 処置

HOE140 を 1st LC 前に 1 回のみ投与すると、1st LC 後の筋機械疼痛閾値の低下が抑制さ

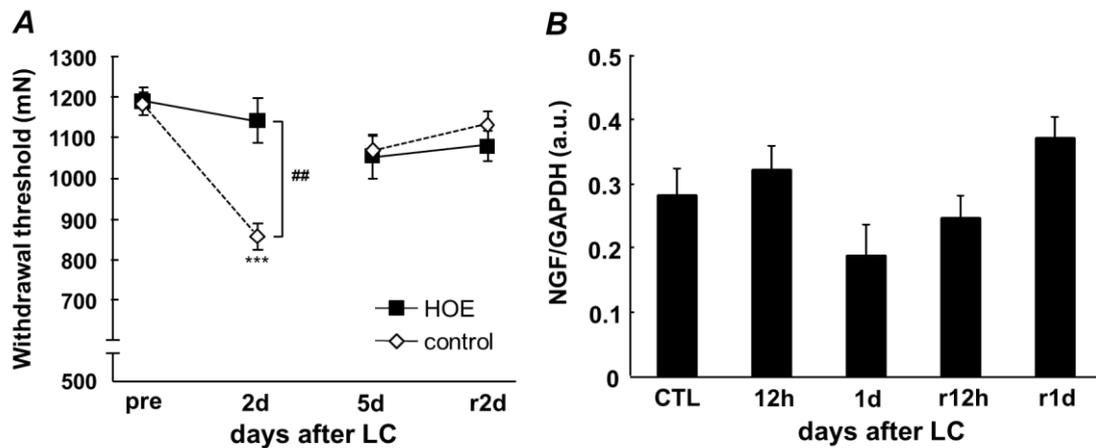


図 6. 筋機械疼痛閾値と NGF mRNA に対する HOE140 の影響

HOE140 を 1st LC 前に 1 回のみ投与し、その後の長指伸筋における機械疼痛閾値(A)と NGF mRNA 発現(B)の変化を検討した。A:横軸は LC 後の日数、縦軸は逃避反応閾値(mN)。control 群:非 HOE 処置(◇, n = 8), HOE 処置群(■, n = 7)。pre: 1st LC 前, 2d:1st LC 2 日後, 5d:2nd LC 前, r2d:2nd LC 2 日後。***P < 0.001, pre との比較, ##P < 0.01, control 群との比較。B: 横軸は LC 後の日数、縦軸は筋 NGFmRNA レベル(任意単位)。n = 4, CTL のみ n = 6。

れた(図 6A, ■)。2nd LC 後においては、HOE140 投与が 1st LC 前 1 回のみであったにもかかわらず、筋機械疼痛閾値の低下が生じなかった。PBS を投与した control 群では、1st LC 後に筋痛覚過敏が生じていたが(図 6A, ◇)、5 日後に行った 2nd LC 後には生じておらず、筋機械疼痛閾値は低下しなかった。NGF mRNA においては、HOE140 を 1st LC 前に投与すると、12 時間後と 1 日後に発現増大を現さなかった(図 6B)。2nd LC 後においては筋機械疼痛閾値の時と同様、HOE140 投与が 1st LC 前 1 回のみであったにもかかわらず、NGF mRNA の発現増大が生じなかった。

4. 考察

本研究において、2nd LC 後に筋機械疼痛閾値の低下が生じなかったことにより、これまでに

報告されたような筋機械痛覚過敏への適応, すなわち繰り返し効果 (Clarkson et al. 1987, Nosaka & Clarkson 1995) が生じていたことが示された. さらに, LC 後の筋機械痛覚過敏の原因因子と報告されている (Murase et al. 2010), NGF mRNA の発現増大が 2nd LC 後に生じなかった. これらの結果は, 運動後の筋 NGF mRNA 発現増大と筋機械痛覚過敏の間に生じる関係 (Murase et al. 2010) をより一層強く証明した. 筋収縮力は LC 直後に減少し, 元に戻るのに 1 週間以上かかるとの報告 (Chen et al. 2007, Paulsen et al. 2010b) から, 2nd LC 中の筋収縮力は, 1st LC 時よりも減少していた可能性はあるが, 2nd LC を行うまでに 5 日間設けたことにより, 2nd LC 後の筋機械疼痛閾値への影響は小さいと考えられる.

B2 受容体阻害剤の HOE140 は 1st LC 前に 1 回投与しただけで, 1st LC だけでなく 2nd LC 後の筋機械痛覚過敏と NGF mRNA の発現増大をも抑制した. HOE140 の効果は数時間しか持続しないことから (Bao et al. 1991), 投与 5 日後の 2nd LC 実施中およびその後にも作用していたとは考えにくい. それにもかかわらず, 2nd LC 後に見られた筋機械痛覚過敏と NGF mRNA 発現増大の抑制は, HOE140 処置を受けずに 1st LC の過程を経た control 群と同様であった. もし LC への適応が B2 受容体の下流で生じていれば, B2 受容体の上流に適応は生じず, LC から DOMS 発症への一連の過程が 1st LC 後に変化してないことになるため, 2nd LC 後にも筋機械痛覚過敏や NGF mRNA の発現増大が 1st LC 後と同様のレベルで見られていたはずである. しかしながら, 今回 2nd LC 後に筋機械痛覚過敏も NGF 発現増大も生じなかったことから, 繰り返し効果 (適応) は B2 受容体の上流で生じたと考えられる. B2 受容体の

リガンドである BK は、アデノシン受容体の刺激を受けて筋の血管内皮細胞から放出され、そのアデノシンは運動筋から放出される (Boix et al. 2002). このことから、繰り返し効果の可能性のある箇所は、骨格筋の血管内皮細胞からの BK 産生または放出の段階、あるいは筋細胞からのアデノシンの産生または放出の段階で生じている可能性が示唆された.

第4章 研究課題2 遅発性筋痛の繰り返し効果におけるCOX-2発現関与の検証

1. 目的

研究課題1において、我々はDOMSの繰り返し効果における骨格筋内NGF発現増大の関与を示唆した。その後、DOMSの発症にNGF産生を介さないCOX-2-GDNF経路も存在することが明らかにされてきた(Mizumura & Taguchi 2016)。COX-2はPGを合成する酵素であり(Süleyman et al. 2007)、骨格筋においてCOX-2活性化はGDNFの発現増大をもたらす(Murase et al. 2013, 2014)だけでなく、筋A δ 線維受容器を感作して筋機械痛覚過敏をもたらす(Murase et al. 2013, 2014)だけでなく、COX-2やPGは骨格筋蛋白の合成、筋芽細胞の増殖、分化、融合などに影響することも知られている(Bondesen et al. 2004, Burd et al. 2010, Paulsen et al. 2010b, 2012, Ho et al. 2017)。DOMSの繰り返し効果におけるCOX-2の関与はPaulsen et al. (2010b)がヒトを対象に選択的COX-2阻害剤を用いて検討したが、プラセボとの違いは明確に表れなかった。そこで本研究は、DOMSの繰り返し効果へのCOX-2の関与を明らかにするために、ラットDOMSモデル(Taguchi et al. 2005a)を用いてCOX-2 mRNAの発現が2回目のLC後にどのように変化するか、選択的COX-2阻害剤を用いて、繰り返し効果がCOX-2活性の上流あるいは下流どちらで生じているかを検証した。

2. 方法

2.1. 実験動物

研究課題 1(第 3 章 2.1.)と同様に, 全ての実験は名古屋大学における動物実験等に関する取扱規程の認可の下に行われた. 102 匹の雄性 SD 系ラット(日本 SLC 株式会社, 浜松, 日本. 実験開始時は 9~10 週齢)を用いた. 本研究は 2 つのシリーズに分けて実験を行った(図 7). ラットの内訳として, 最初のシリーズでは長指伸筋の機械痛覚過敏の測定に 14 匹, 長指伸筋における COX-2 mRNA の測定に 72 匹, 2 つ目のシリーズでは, 筋機械痛覚過敏に対する COX-2 阻害剤の効果を調べるために 16 匹を用いた. ラットの飼育環境は研究課題 1(第 3 章 2.1.)と同様であった.

2.2. 筋機械疼痛閾値の測定

研究課題 1(第 3 章 2.2.)と同様に行った.

2.3. 繰り返し伸張性筋収縮

研究課題 1(第 3 章 2.3.)と同様に, ラットの長指伸筋に 2 回の LC を行った. 1 回目の LC (1st LC)を行った日を 0 日目とし, 1st LC から 5 日後に 2 回目の LC (2nd LC)を行った.

1st LC 実施 30 分前に PBS をラット背部へ皮下投与して LC を行う群 (PBS + rLC 群), その対象群として PBS 背部皮下投与のみで LC を負荷しない群 (PBS 群) を用意した.

2.4. 筋サンプル摘出

1st LC 直後(0 時間), 6, 12 時間, 1, 2, 5 日後, 2nd LC0, 6, 12 時間, 1, 2 日後に, pentobarbital 麻酔下(50 mg/kg, 腹腔内投与)のラットから長指伸筋を摘出し, COX-2 mRNA の経時的変化を検証した(各 n = 6).

2.5. Celecoxib 処理

Murase et al.(2013)の報告により, celecoxib を 1st LC の前に投与するとその後の筋機械痛覚過敏が抑制されることから, 1st LC の前に 1 度のみ celecoxib を投与した場合における 2nd LC 後の筋機械痛覚過敏への影響を検討した. celecoxib (10 mg/kg, 日本ケミファ株式会社から提供を受けた)を PBS に溶解し, 1st LC30 分前にラット背部の皮下に投与した(CXB + rLC 群, n = 9). 対象群として PBS のみを背部皮下投与した群を作成した(PBS + rLC 群, n = 7).

2.6. 筋 mRNA 抽出

研究課題 1(第 3 章 2.6.)と同様に行った.

2.7. 統計処理

全ての値は平均 ± 標準誤差で表した. 筋機械疼痛閾値の評価には一元配置分散分析を用いた後に Bonferroni 多重比較検定を実施した. COX-2 mRNA の比較には一元配置分散

分析を用いた後に Dunnet 多重比較検定を実施した. $P < 0.05$ を有意水準とした.

3. 結果

3.1. 2 回の LC 後の筋機械疼痛閾値

1st LC 30 分前に PBS をラットの背部皮下へ投与し, LC を 2 回実施した時の筋機械疼痛閾値の変化を検討した(図 8). PBS + rLC 群において, 1st LC 2 日後に機械疼痛閾値の有意な低下が見られたものの, 2nd LC の後には見られなかった(図 8, ▲, $P < 0.01$). PBS 群においては測定期間中に筋機械疼痛閾値の有意な変化は見られず(図 8, ◇), 背部皮下への PBS 投与は長指伸筋の筋機械痛覚過敏に影響を及ぼさなかった.

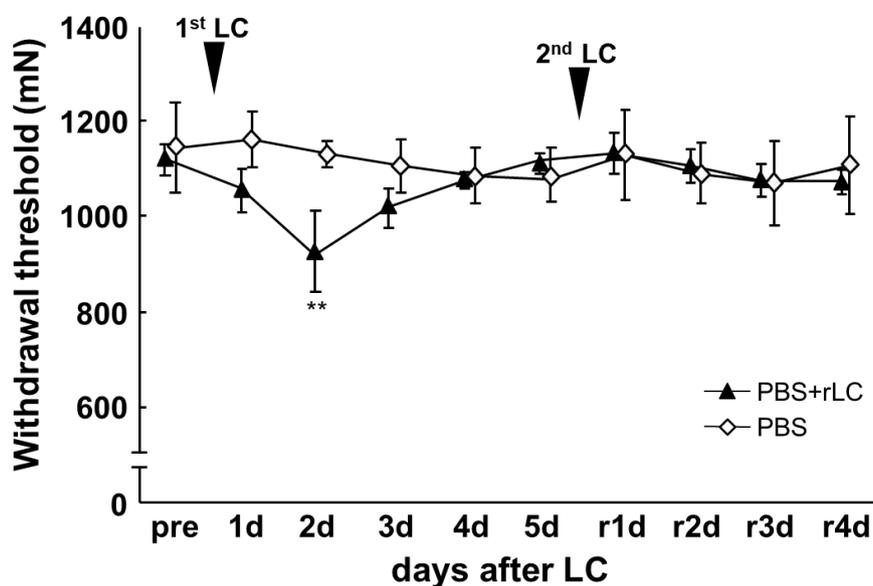


図 8. 2 回の LC 後の筋機械疼痛閾値の経日的変化

横軸は LC 後の日数, 縦軸はランダルセリット式鎮痛効果測定装置を用いた逃避反応閾値 (mN). 1st LC 実施日を 0 日目とし, 2 回目 LC (2nd LC) 実施は 5 日目の測定を終えた後 (r0d) とした. PBS + rLC 群: PBS 投与後 2 回 LC (▲, $n = 7$). PBS 群: PBS 投与のみ (◇, $n = 7$). ** $P < 0.01$, pre との比較.

3.2. COX-2 mRNA

COX-2 mRNA は 1st LC 前(図 9, CTL)と比較して 1st LC 直後(0h)に有意な発現増大を示した(図 9, $P < 0.01$). 2nd LC 後において, 2nd LC 前(5d)と比較して 2nd LC 直後(r0h)に有意な増加は見られなかった. したがって, COX-2 mRNA においても 2nd LC 後に発現増大の抑制, すなわち繰り返し効果が認められた.

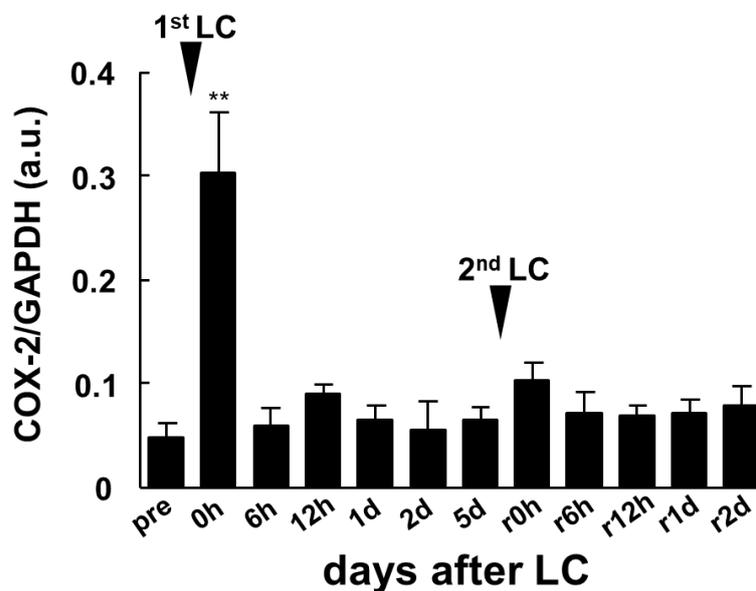


図 9. 2 回の LC 後の筋 COX-2 mRNA 発現の変化

横軸は LC 後の日数, 縦軸は筋 COX-2 mRNA レベル(任意単位). COX-2 mRNA レベルは GAPDH に対する割合で標準化した(各 $n = 6$). ** $P < 0.01$, CTL との比較.

3.3. Celecoxib 処理

1st LC 30 分前に PBS または celecoxib をラット背部皮下へ投与し, LC を 2 回実施した時の筋機械疼痛閾値の変化を検討した(図 10). CXB + rLC 群に対して, 1st LC 実施 30 分前にラ

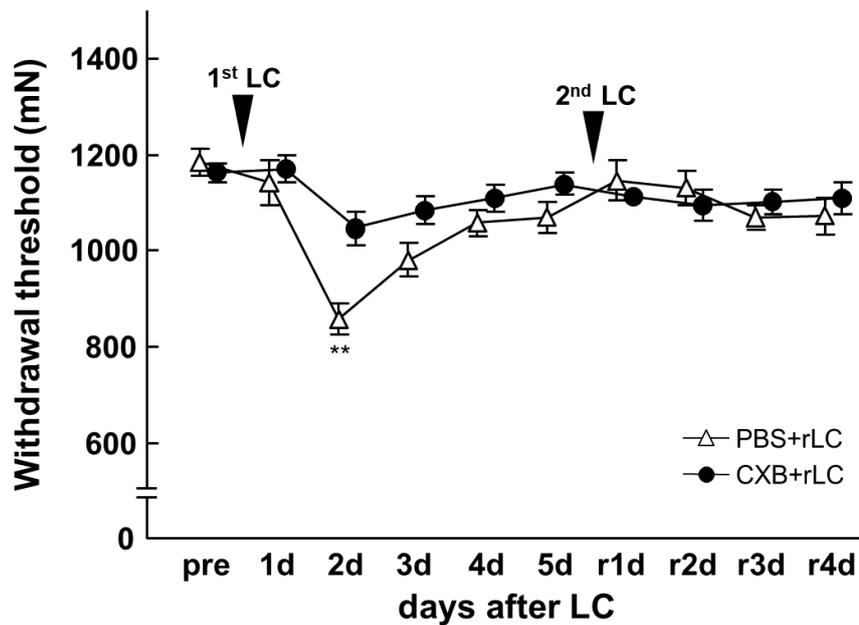


図 10. 2 回の LC 後の筋機械疼痛閾値に対する celecoxib の影響

横軸は LC 後の日数, 縦軸は逃避反応閾値 (mN). CXB + rLC 群: celecoxib 投与と 2 回 LC (●, n = 9). PBS + rLC 群: PBS 投与と 2 回 LC 群 (△, n = 7). **P < 0.01, pre との比較.

ット背部の皮下へ celecoxib を投与したところ, 筋機械疼痛閾値は 2 日後から低下したものの, 有意な低下は見られなかった (図 10, ●). また, 1st LC 5 日後に実施した 2nd LC 後においても, celecoxib を投与していないにもかかわらず, 筋機械疼痛閾値に有意な低下は見られなかった. PBS + rLC 群においては, 1st LC 後 2 日目に有意な筋機械疼痛閾値の低下が見られた (図 10, △, P < 0.01) が, 5 日後に実施した 2nd LC 後に有意な低下は見られなかった. したがって両群共に 2nd LC 後では筋機械痛覚過敏の抑制が見られ, 繰り返し効果が認められた.

4. 考察

本研究において、1st LC 後の長指伸筋に見られた COX-2 mRNA の発現増大が 2nd LC 後には認められなかった。1st LC 実施 30 分前に celecoxib をラット背部皮下へ投与したところ、筋機械痛覚過敏の抑制は 1st LC 後だけでなく、2nd LC 後においても生じていた。以上の結果から、LC 後筋内の COX-2 mRNA 発現の増減が DOMS の繰り返しの効果に関与すること、その繰り返しの効果は COX-2 活性化の上流で生じたことが示唆された。

研究課題 1 において、B2 ブラジキニン受容体阻害剤である HOE140 を 1st LC 実施前に投与したところ、機械痛覚過敏と NGF mRNA の増加が 1st LC 後だけでなく、2nd LC 後も観察されなかったことを報告した。今回 COX-2 においても、1st LC 実施前に celecoxib 投与により 1st LC 後だけでなく、2nd LC 後においても筋機械痛覚過敏は生じなかった。本研究では COX-2 下流の GDNF を測定していないが、おそらく GDNF の発現上昇も抑制されたと推測される。Ota et al. (2018) の研究によると、COX-2 から GDNF への経路の途中には EP₂ 受容体がかかわっており、COX-2 により産生された PG による EP₂ 受容体の活性化が COX-2 の発現増大を起こすというポジティブフィードバックの存在が示唆されている。本研究も celecoxib 投与によって 1st LC 後の PG 産生活動は抑制され、そのポジティブフィードバックが抑制されることにより、COX-2 発現増大がさらに抑制されていた可能性がある。それにもかかわらず、celecoxib 投与なしで 1st LC を経験した後のような筋機械痛覚過敏が 2nd LC 後に生じなかったことから、DOMS の繰り返しの効果はアラキドン酸カスケードにおける COX-2 活性化の上流ですでに生じ

ていたと考えるのが妥当である。HOE140 は NGF だけでなく、GDNF と COX-2 の mRNA と蛋白に対して、LC12 時間後における発現上昇も抑制する (Murase et al. 2013)。したがって、研究課題 1 でも述べたように、DOMS の繰り返し効果は B2 受容体の下流で生じるのではなく、その上流の血管内皮細胞からの BK 放出、もしくは筋細胞からのアデノシン(おそらく ATP) 放出の過程 (Mizumura & Taguchi 2016)、あるいはその前段階で生じる適応現象であると結論付けられる。

これらの繰り返し効果がもたらされた原因として、COX-2 は筋蛋白の合成、筋芽細胞の増殖、分化、融合に影響する (Bondesen et al. 2004, Burd et al. 2010, Paulsen et al. 2010b, 2012) ことから、繰り返し効果の仮説 (McHugh 2003) の 1 つである、細胞骨格の適応 (cytoskeletal adaptations) が考えられる。筋節を構成する骨格蛋白質の desmin は、ラット下り坂走 5 分後に筋細胞からその免疫反応が消え (Lehti et al. 2007)、24~72 時間後には転写レベルがピークとなる (Peters et al. 2003, Lehti et al. 2007)。このような desmin の変化は、構造的な適応またはリモデリングメカニズムの 1 つのサインである (Lehti 2007, Yu et al. 2003) と述べられている。

また、desmin mRNA は下り坂走を 5 回繰り返した後の筋よりも、1 回の下り坂走後の筋の方において有意な増加を示した (Lehti et al. 2007) ことから、desmin の増強は繰り返した運動後よりも、初回の運動後に必要とされることが推察されている (Lehti et al. 2007)。また、2 回目の LC 後にはクレアチンキナーゼの筋からの漏出も減少する (Paulsen et al. 2010b) ことから、細胞膜が変化している可能性も考えられる。しかしながら、本研究の LC プロトコルは光学顕微鏡レベ

ルであるが、筋損傷なしで DOMS を発症させることが証明されている (Fuji et al. 2008, Hayashi et al. 2017). Hyldahl et al. (2017) は、初回に行う運動が激しい筋損傷を伴わない低強度 (10~20%) の LC や、筋長の長い状態での等尺性収縮であっても、繰り返し効果を生じさせることを報告した。筋再生に重要な役割を果たす筋衛星細胞は、損傷や炎症を伴うことなく筋への負荷や収縮によって増殖、活性化することから、損傷からの回復だけでなく、筋への負荷に対する適応にも必要とされている (Mikkelsen et al. 2009)。本研究と同じプロトコルを用いた LC 直後の骨格筋において、COX-2 mRNA は筋核、筋衛星細胞、血管平滑筋細胞、筋芽細胞、筋外膜結合組織細胞に発現が認められている (Murase et al. 2013)。1st LC によってこれらの細胞に COX-2 が活性化し、細胞膜の変化や細胞骨格蛋白質の発現増大などが生じることで、次の“損傷に対する機械的な防御機能を備えた (Peters et al. 2003)”と考えられるが、むしろ LC という筋への機械的ストレスに対する抵抗性 (適応) を増大させ、2nd LC 後は COX-2 mRNA の産生が減少したとの可能性も考えられる。これら繰り返し効果をもたらす可能性のある、細胞膜や細胞骨格の変化、または筋への機械的ストレスに対する抵抗性の実態が何であるかを明らかにすることは今後の大きな課題である。

第5章 まとめ

本研究は, DOMS における繰り返し効果の発症機序を検証することを目的として, LC 後の筋機械痛覚過敏をもたらすとされる NGF と COX-2 に着目し, 2 つの研究課題に取り組んだ結果, 以下の知見を得た.

研究課題 1 の結果

- 1) 1st LC 後のラット長指伸筋において筋機械痛覚過敏と NGF mRNA 発現増大が生じたが, 筋機械痛覚過敏が回復した 1st LC 5 日後に行った 2nd LC 後にはどちらも生じなかった.
- 2) 1st LC 前の B2 ブラジキニン受容体阻害剤 HOE140 単回投与は, 1st LC 後のみならず 2nd LC 後の筋機械痛覚過敏と筋 NGF mRNA の発現増大を抑制した.

研究課題 2 の結果

- 1) 1st LC 直後に見られた COX-2 mRNA 発現増大は, 2nd LC 後に認められなかった.
- 2) 1st LC 前の選択的 COX-2 阻害剤 celecoxib 単回投与は, 1st LC 後のみならず, 2nd LC 後の筋機械痛覚過敏も抑制した.

以上の結果より, DOMS の繰り返し効果には LC 後の筋における NGF と COX-2 の発現増大が関与していることが示唆された. 本研究の結果は, 繰り返し効果の発症機序の一端を明らかにする上で, 有益な知見になると考える.

参考文献

Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M (1999) GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 13(5): 313-325

Aldayel A, Jubeau M, McGuigan MR, Nosaka K (2010) Less indication of muscle damage in the second than initial electrical muscle stimulation bout consisting of isometric contractions of the knee extensors. *Eur J Appl Physiol* 108(4): 709-717

Armstrong RB (1984) Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 16(6): 529-538

Armstrong RB, Warren GL, Warren JA (1991) Mechanisms of exercise-induced muscle fiber injury. *Sports Med* 12(3): 184-207

Asmussen E (1956) Observations on experimental muscular soreness. *Acta Rheumatol Scand* 2(2): 109-116

Bajaj P, Graven-Nielsen T, Wright A, Davies II, Arendt-Nielsen L (2000) Muscle

hyperalgesia in post exercise muscle soreness assessed by single and repetitive ultrasound stimuli. *J Pain* 1(2): 111-121

Bao G, Qadri F, Stauss B, Stauss H, Gohlke P, Unger T (1991) HOE 140, a new highly potent and long-acting bradykinin antagonist in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 200(1): 179-182

Boix F, Rosenborg L, Hilgenfeldt U, Knardahl S (2002) Contraction-related factors affect the concentration of a kallidin-like peptide in rat muscle tissue. *J Physiol* 544(Pt 1): 127-136

Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM, Pavlath GK (2004) The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(2): C475-C483

Brentano MA, Martins Kruegel LF (2011) A review on strength exercise-induced muscle damage: applications, adaptation mechanisms and limitations. *J Sports Med Phys Fitness* 51(1): 1-10

Burd NA, Dickinson JM, Lemoine JK, Carroll CC, Sullivan BE, Haus JM, Jemiolo B, Trappe SW, Hughes GM, Sanders CE Jr, Trappe TA (2010) Effect of a cyclooxygenase-2 inhibitor on postexercise muscle protein synthesis in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(2): E354-E361

Burnstock G (2013) Purinergic mechanisms and pain - An update. *Eur J Pharmacol* 716(1-3): 24-40

Cervero F, Connell LA (1984) Fine afferent fibers from viscera do not terminate in the substantia gelatinosa of the thoracic spinal cord. *Brain Res* 294(2): 370-374

Chen TC, Nosaka K, Sacco P (2007) Intensity of eccentric exercise, shift of optimum angle, and the magnitude of repeated-bout effect. *J Appl Physiol* 102(3): 992-999

Cheung K, Hume P, Maxwell L (2003) Delayed onset muscle soreness: treatment strategies and performance factors. *Sports Med* 33(2): 145-164

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D

(2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 411(6840): 957-962

Clarkson PM, Byrnes WC, Gillis E, Harper E (1987) Adaptation to exercise-induced muscle damage. *Clin Sci (Lond)* 73(4): 383-386

Clarkson PM, Dedrick ME (1988) Exercise-induced muscle damage, repair, and adaptation in old and young subjects. *J Gerontol* 43(4): M91-96

Collier H, James G, Schneider C (1966) Antagonism by aspirin and fenamates of bronchoconstriction and nociception induced by adenosine-5'-triphosphate. *Nature* 212(5060): 411-412

Connolly DA, Sayers SP, McHugh MP (2003) Treatment and prevention of delayed onset muscle soreness. *J Strength Cond Res* 17(1): 197-208

Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429(1-3): 161-176

Cramer RM, Aagaard P, Qvortrup K, Langberg H, Olesen J, Kjaer M (2007) Myofibre damage in human skeletal muscle: effects of electrical stimulation versus voluntary contraction. *J Physiol* 583(Pt 3): 365-380

Das S, Chandrasekhar S, Yadav JS, Grée R (2007) Recent developments in the synthesis of prostaglandins and analogues. *Chem Rev* 107(7): 3286-3337

Daws JM, Andersson DA, Bennett DL, Bevan S, McMahon SB (2013) Inflammatory mediators and modulators of pain. In: *Wall & Melzack's Textbook of pain 6th ed.* McMahon S, Koltzenburg M, eds. Elsevier Churchill Livingstone: Amsterdam, 48-67

Dutra RC (2017) Kinin receptors: Key regulators of autoimmunity. *Autoimmun Rev* 16(2): 192-207

Erlanger J, Gasser HS (1937) *Electrical Signs of Nervous Activity.* Philadelphia, University of Pennsylvania Press

Flower RJ (2006) Prostaglandins, bioassay and inflammation. *Br J Pharmacol* 147(Suppl 1):

S182-S192

Fujii Y, Ozaki N, Taguchi T, Mizumura K, Sugiura Y (2008) TRP channels and ASICs mediate mechanical hyperalgesia in models of inflammatory muscle pain and delayed onset muscle soreness. *Pain* 140(2): 292-304

Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ (1966) The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol* 184(1): 170-192

Graven-Nielsen T, Arendi-Nielsen L (2003) Induction and assessment of muscle pain, referred pain, and muscular hyperalgesia. *Curr Pain Headache Rep* 7(6): 443-451

Hamberg M, Samuelsson B (1973) Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 70(3): 899-903

Hayashi K, Ozaki N, Kawakita K, Itoh K, Mizumura K, Furukawa K, Yasui M, Hori K, Yi SQ, Yamaguchi T, Sugiura Y (2011) Involvement of NGF in the rat model of persistent muscle pain associated with taut band. *J Pain* 12(10): 1059-1068

Hayashi K, Katanosaka K, Abe M, Yamanaka A, Nosaka K, Mizumura K, Taguchi T

(2017) Muscular mechanical hyperalgesia after lengthening contraction in rats depends on stretch velocity and range of motion. *Eur J Pain* 21(1): 125-139

Hendrich J, Alvarez P, Chen X, Levine JD (2012) GDNF induces mechanical hyperalgesia in muscle by reducing I_{BK} in IB4+ nociceptors. *Neuroscience* 219: 204-213

Highman B, Altland PD (1963) Effects of exercise and training on serum enzyme and tissue changes in rats. *Am J Physiol* 205: 162-166

Hnik P, Holas M, Krekule I, Kriz N, Mejsnar J, Smiesko V, Ujec E, Vyskocil F (1976) Work-induced potassium changes in skeletal muscle and effluent venous blood assessed by liquid ion-exchanger microelectrodes. *Pflugers Arch* 362(1): 85-94

Ho ATV, Palla AR, Blake MR, Yucel ND, Wang YX, Magnusson KEG, Holbrook CA,

Kraft PE, Delp SL, Blau HM (2017) Prostaglandin E2 is essential for efficacious skeletal muscle stem-cell function, augmenting regeneration and strength. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(26): 6675-6684

Hough T (1902) Ergographic studies in muscular soreness. *Am J Physiol* 7: 76-92

Howatson G, van Someren KA (2007) Evidence of a contralateral repeated bout effect after maximal eccentric contractions. *Eur J Appl Physiol* 101(2): 207-214

Hyldahl RD, Chen TC, Nosaka K (2017) Mechanisms and Mediators of the Skeletal Muscle Repeated Bout Effect. *Exerc Sport Sci Rev* 45(1): 24-33

Indo Y, Tsuruta M, Hayashida Y, Karim MA, Ohta K, Kawano T, Mitsubuchi H, Tonoki H, Awaya Y, Matsuda I (1996) Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Nat Genet* 13(4): 485-488

Inoue K (2006) ATP receptors in pain. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 127(3): 166-170 (in Japanese)

International association for the study of pain (1994) "IASP Terminology", <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Pain> (cited 2018-05-30)

Jankowski MP, Koerber HR (2010) "Chapter 2 Neurotrophic Factors and Nociceptor Sensitization." *Translational Pain Research From Mouse to Man*. Kruger L & Light AR ed. CRC

Press/Taylor & Francis, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57265/> (cited 2018-03-08)

Kis B, Snipes JA, Gaspar T, Lenzser G, Tulbert CD, Busija DW (2006) Cloning of cyclooxygenase-1b (putative COX-3) in mouse. *Inflamm Res* 55(7): 274-278

Koh TJ, Brooks SV (2001) Lengthening contractions are not required to induce protection from contraction-induced muscle injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(1): R155-R161

Lapier TK, Burton HW, Almon R, Cerny F (1995) Alterations in intramuscular connective tissue after limb casting affect contraction-induced muscle injury. *J Appl Physiol* (1985) 78(3): 1065-1069

Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57 (1): 27-77

Lehti TM, Kalliokoski R, Komulainen J (2007) Repeated bout effect on the cytoskeletal

proteins titin, desmin, and dystrophin in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 28(1): 39-47

Levi-Montalcini R, Angeletti PU (1968) Nerve growth factor. *Physiol Rev* 48(3): 534-56

Li J, King NC, Sinoway LI (2003) ATP concentrations and muscle tension increase linearly with muscle contraction. *J Appl Physiol* 95(2): 577-583

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260(5111): 1130-1132

Ling LJ, Honda T, Shimada Y, Ozaki N, Shiraishi Y, Sugiura Y (2003) Central projection of unmyelinated (C) primary afferent fibers from gastrocnemius muscle in the guinea pig. *J Comp Neurol* 461(2): 140-150

Lloyd, DPC (1943) Neuron patterns controlling transmission of ipsilateral hind limb reflexes in cat. *J Neurophysiol* 6, 293-315

Mackey AL (2013) Does an NSAID a day keep satellite cells at bay? *J Appl Physiol* 15(6): 900-908

Malm C, Sjödin TL, Sjöberg B, Lenkei R, Renström P, Lundberg IE, Ekblom B (2004) Leukocytes, cytokines, growth factors and hormones in human skeletal muscle and blood after uphill or downhill running. *J Physiol* 556(Pt 3): 983-1000

丸山一男 (2014) *痛みの考えかた しくみ・何を・どう効かす*. 南江堂: 東京

McHugh MP, Connolly DA, Eston RG, Gleim GW (1999) Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect. *Sports Med* 27(3): 157-70

McHugh MP (2003) Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports* 13(2): 88-97

Mense S, Meyer H (1988) Bradykinin-induced modulation of the response behaviour of different types of feline group III and IV muscle receptors. *J Physiol* 398: 49-63

Mense S (2010) Functional anatomy of muscle: muscle, nociceptors and afferent fibers. In:
Muscle pain: understanding the mechanisms. Mense S, Grwin RD eds. Springer: Heidelberg,
17-48

Mense S (2013) Basic mechanisms of muscle pain. In: *Wall & Melzack's textbook of pain 6th ed.* McMahon S, Koltzenburg M, eds. Elsevier Saunders: Amsterdam, 620-628

Mikkelsen UR, Langberg H, Helmark IC, Skovgaard D, Andersen LL, Kjaer M, Mackey AL (2009) Local NSAID infusion inhibits satellite cell proliferation in human skeletal muscle after eccentric exercise. *J Appl Physiol* 107(5): 1600-1611

Mizumura K, Sugiura T, Katanosaka K, Banik RK, Kozaki Y (2009) Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? *Exp Brain Res* 196(1): 53-65

Mizumura K, Taguchi T (2016) Delayed onset muscle soreness: Involved of neutrophilic factors. *J Physiol Sci* 66(1): 43-52

Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadonian AS, Doster K, Wen D, Yan Q, Snider

WD (1997) IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* 19(4): 849-861

Morgan DL (1990) New insights into the behavior of muscle during active lengthening. *Biophys J* 57(2): 209-221

Murase S, Terazawa E, Queme F, Ota H, Matsuda T, Hirate K, Kozaki Y, Katanosaka K,

Taguchi T, Urai H, Mizumura K (2010) Bradykinin and nerve growth factor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (delayed onset muscle soreness). *J Neurosci* 30(10): 3752-3761

Murase S, Terazawa E, Hirate K, Yamanaka H, Kanda H, Noguchi K, Ota H, Queme F,

Taguchi T, Mizumura K (2013) Upregulated glial cell line-derived neurotrophic factor through cyclooxygenase-2 activation in the muscle is required for mechanical hyperalgesia after exercise in rats. *J Physiol* 591(12): 3035-3048

Murase S, Kato K, Taguchi T, Mizumura K (2014) Glial cell line-derived neurotrophic factor sensitized the mechanical response of muscular thin-fibre afferents in rats. *Eur J Pain* 18(5):

629-638

Nasu T, Taguchi T, Mizumura K (2010) Persistent deep mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. *Eur J Pain* 14(3): 236-244

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79(4): 1193-1226

Newham DJ (1988) The consequences of eccentric contractions and their relationship to delayed onset muscle pain. *Eur J Appl Physiol* 57(3): 353-359

Newham DJ, Jones DA, Ghosh G, Aurora P (1988) Muscle fatigue and pain after eccentric contractions at long and short length. *Clinical Sci* 74(3): 553-557

日本ペインクリニック学会 (2015) “ペインクリニック用語集 改訂第4版”. 日本ペインクリニック学会用語委員会編. https://www.jspc.gr.jp/Contents/public/pdf/yogosyu_01_06.pdf (cited 2018-05-30)

Nosaka K, Clarkson PM (1995) Muscle damage following repeated bouts of high force eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 27(9): 1263-1269

Nosaka K, Newton M, Sacco P (2002) Responses of human elbow flexor muscles to electrically stimulated forced lengthening exercise. *Acta Physiol Scand* 174(2): 137-14

Ochodnický P, Michel MB, Butter JJ, Seth J, Panicker JN, Michel MC (2013) Bradykinin modulates spontaneous nerve growth factor production and stretch-induced ATP release in human urothelium. *Pharmacol Res* 70(1): 147-154

Okuse K (2007) Pain signalling pathways: from cytokines to ion channels. *Int J Biochem Cell Biol* 39(3): 490-496

Ota H, Katanosaka K, Murase S, Furuyashiki T, Narumiya S, Mizumura K (2018) EP2 receptor plays pivotal roles in generating mechanical hyperalgesia after lengthening contractions. *Scand J Med Sci Sports* 28(3):826-833

Paulsen G, Cramer R, Benestad HB, Fjeld JG, Morkrid L, Hallen J, Raastad T (2010a)

Time course of leukocyte accumulation in human muscle after eccentric exercise. *Med Sci*

Sports Exerc 42(1): 75-85

Paulsen G, Egner IM, Drange M, Langberg H, Benestad HB, Fjeld JG, Hallen J, Raastad

T (2010b) A COX-2 inhibitor reduces muscle soreness, but does not influence recovery and

adaptation after eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports* 20(1): e195-e207

Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T, Peake JM (2012) Leucocytes, cytokines and satellite

cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise?

Exerc Immunol Rev 18: 42-97

Peake JM, Neubauer O, Della Gatta PA, Nosaka K (2017) Muscle damage and inflammation

during recovery from exercise. *J Appl Physiol* 122(3): 559-570

Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T, Oliveira

SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, Bader M (2000) Hypoalgesia and

altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*

97(14): 8140-8145

Peters D, Barash IA, Burdi M, Yuan PS, Mathew L, Fridén J, Lieber RL (2003)

Asynchronous functional, cellular and transcriptional changes after a bout of eccentric exercise in the rat. *J Physiol* 553(Pt 3): 947-957

Pizza FX, Koh TJ, McGregor SJ, Brooks SV (2002) Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. *J Appl Physiol* 92(5): 1873-1878

Proske U, Morgan DL (2001) Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J Physiol* 537(Pt2): 333-345

Pyne DB (1994) Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. *Aust J Sci Med Sport* 26(3-4): 49-58

Reinöhl J, Hoheisel U, Unger T, Mense S (2003) Adenosine triphosphate as a stimulant for nociceptive and non-nociceptive muscle group IV receptors in the rat. *Neurosci Lett* 338(1): 25-28

Ringkamp M, Raja SN, Campbell JN, Meyer RA (2013) Periphernal mechanisms of

cutaneous nociception. In: *Wall & Melzack's Textbook of pain 6th ed.* McMahon S, Koltzenburg M, eds. Elsevier Churchill Livingstone: Amsterdam, 1-30

Rocha e Silva E, Beraldof WT, Rosenfeld G (1949) Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* 156: 261-273

Rupniak NM, Boyce S, Webb JK, Williams AR, Carlson EJ, Hill RG, Borkowski JA, Hess JF (1997) Effects of the bradykinin B1 receptor antagonist des-Arg9[Leu8]bradykinin and genetic disruption of the B2 receptor on nociception in rats and mice. *Pain* 71(1): 89-97

Sacco P, Jones DA (1992) The protective effect of damaging eccentric exercise against repeated bouts of exercise in the mouse tibialis anterior. *Exp Physiol* 77(5): 757-760

Santos DA, Salgado AI, Cunha RA (2003) ATP is released from nerve terminals and from activated muscle fibres on stimulation of the rat phrenic nerve. *Neurosci Lett* 338(3): 225-228

Sharma JN, Al-Sherif GJ (2006) Pharmacologic targets and prototype therapeutics in the

kallikrein-kinin system: bradykinin receptor agonists or antagonists. *Scientific World Journal* 6:

1247-1261

Shen W, Li Y, Tang Y, Cummins J, Huard J (2005) NS-398, a cyclooxygenase-2-specific

inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. *Am*

J Pathol 167(4): 1105-1117

Schwane JA, Watrous BG, Johnson SR, Armstrong RB (1983) Is Lactic Acid Related to

Delayed-Onset Muscle Soreness? *Phys Sportsmed* 11(3): 124-131

Slivka SR, Insel PA (1988) Phorbol ester and neomycin dissociate bradykinin receptor-

mediated arachidonic acid release and polyphosphoinositide hydrolysis in Madin-Darby canine

kidney cells. Evidence that bradykinin mediates noninterdependent activation of phospholipases

A2 and C. *J Biol Chem* 263(29): 14640-14647

Smith LL (1991) Acute inflammation – the underlying mechanism in delayed onset muscle

soreness. *Med Sci Sports Exerc* 23(5): 542-551

Smith LL, Wells JM, Houmard JA, Smith ST, Israel RG, Chenier TC, Pennington SN

(1993) Increases in plasma prostaglandin E2 after eccentric exercise. A preliminary report.

Horm Metab Res. 25(8): 451-452

Starbuck C, Eston RG (2012) Exercise-induced muscle damage and the repeated bout effect:

evidence for cross. Eur J Appl Physiol 112(3): 1005-1013

Stacey MJ (1969) Free nerve endings in skeletal muscle of the cat. J Anat 105: 231-254

Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y (2007) Anti-inflammatory and side effects of

cyclooxygenase inhibitors. Pharmacol Rep 59(3): 247-258

Suzuki H, Hase A, Kim BY, Miyata Y, Nonaka I, Arahata K, Akazawa C (1998a) Up-

regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in regenerating

muscle fibers in neuromuscular diseases. Neurosci Lett 257(3): 165-167

Suzuki H, Hase A, Miyata Y, Arahata K, Akazawa C (1998b) Prominent expression of glial

cell line-derived neurotrophic factor in human skeletal muscle. J Comp Neurol 402(3): 303-312

Svensson P, Cairns BE, Wang K, Arendt-Nielsen L (2003) Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain* 104(1-2): 241-247

Taguchi T, Matsuda T, Tamura R, Sato J, Mizumura K (2005a) Muscular mechanical hyperalgesia revealed by behavioural pain test and c-Fos expression in the spinal dorsal horn after eccentric contraction in rats. *J Physiol* 564(Pt 1): 259-268

Taguchi T, Sato J, Mizumura K (2005b) Augmented mechanical response of muscle thin-fiber sensory receptors recorded from rat muscle-nerve preparations in vitro after eccentric contraction. *J Neurophysiol* 94(4): 2822-2831

Taguchi T, Matsuda T, Mizumura K (2007) Change with age in muscular mechanical hyperalgesia after lengthening contraction in rats. *Neurosci Res* 57: 331-338

Tegeder L, Zimmermann J, Meller ST, Geisslinger G (2002) Release of algescic substances in human experimental muscle pain. *Inflamm Res* 51(8): 393-402

Trappe TA, Fluckey JD, White F, Lambert CP, Evans WJ (2001) Skeletal muscle PGF_{2a} and PGE₂ in response to eccentric resistance exercise: Influence of Ibuprofen and Acetaminophen. *J Clin Endocrinol Metab* 86(10): 5067-5070

Trappe TA, White F, Lambert CP, Cesar D, Hellerstein M, Evans WJ (2002) Effect of ibuprofen and acetaminophen on postexercise muscle protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(3): E551-E556

Trappe TA, Liu SZ (2013) Effects of prostaglandins and COX-inhibiting drugs on skeletal muscle adaptations to exercise. *J Appl Physiol* 115(6): 909-919

Yu JG, Fürst DO, Thornell LE (2003) The mode of myofibril remodelling in human skeletal muscle affected by DOMS induced by eccentric contractions. *Histochem Cell Biol* 119(5): 383-393

Weerakkody NS, Whitehead NP, Canny BJ, Gregory JE, Proske U (2001) Large-fiber mechanoreceptors contribute to muscle soreness after eccentric exercise. *J Pain* 2(4): 209-219

謝辞

本博士論文を執筆するにあたり、多くの方々にご支援、ご協力を賜りましたこと、深謝申し上げます。

指導教授である浜田 拓先生には、後期課程再入学の相談に伺った際からの的確で熱意のあるご指導を頂いて参りました。先生には私の未熟さにより度々ご面倒をおかけしましたが、いつも温かく大らかな心で向き合って下さり、ここまで至ることができました。心より御礼を申し上げます。

副査の岡村浩嗣先生、前島悦子先生には、審査発表会や口頭試問において細部にわたったディスカッションをさせて頂き、論文執筆に多大なお力添えを頂きました。

増原光彦先生(大阪体育大学名誉教授)には、学部生時代からスポーツ生理学について多くのことを学ばせて頂きました。また、岡村先生、前島先生、増原先生には、学部生の頃より講義を受けていたため、先生方のお陰でスポーツ科学の研究に興味を持ち、今日に至ることができました。研究以外の面においても支えて頂きましたこと、感謝申し上げます。

お名前は書ききれませんが、大阪体育大学・大学院の先生方、事務室の皆さま、先輩、同期、後輩の皆さまにも多くのご協力とご支援を頂きましたこと、厚く御礼申し上げます。

水村和枝先生(日本大学専任講師、名古屋大学名誉教授)には、関連論文を執筆するにあたり、ここでは書ききれないほど、長年にわたり大変お世話になりました。本当にありがとうございました。名古屋大学環境医学研究所水村研究室でお世話になった皆さまにも、所外者に

もかかわらず温かく迎えて頂き、基礎研究のイロハや筋痛・痛みについてハイレベルな多くのことを学ばせて頂きましたこと、重ねて御礼申し上げます。

馬場礼三先生(中部大学教授)、堀田典生先生(中部大学准教授)には、いつも気にかけて頂き、多くの叱咤激励を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

ここには書ききれないほど多くの方々の支えがあって、今日まで研究や博士論文を進めることができました。本当に皆様のお陰です。拝謝申し上げます。