

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500639

研究課題名（和文） 微弱電流は筋損傷の修復を促進させるか ～免疫組織化学的分析～

研究課題名（英文） Effects of microcurrent electrical neuromuscular stimulation on the regeneration of injured muscles -immunohistochemical approaches-

研究代表者

藤谷 博人 (FUJIYA HIROTO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：50278008

研究成果の概要（和文）：マウス損傷骨格筋の再生に対する微弱電流刺激の効果について、主として免疫組織化学的分析法を用いて検討した。微弱電流刺激により損傷骨格筋の再生過程における筋線維断面積、筋衛星細胞数ならびに中心核を有する筋細胞数の増加が観察され、筋タンパク質量の回復が促進した。また、筋タンパク合成に係る細胞内シグナル伝達系の Akt および p70 S6 kinase のリン酸化レベル、ならびに筋細胞分化に関わる p38 mitogen-activated protein kinase のリン酸化レベルも微弱電流刺激により増加した。したがって、損傷骨格筋に対する微弱電流刺激は再生を促進させる効果があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, the effect of microcurrent electrical neuromuscular stimulation (MENS) on the regeneration of injured mice skeletal muscles by using of immunohistochemical approaches. MENS stimulated the increases of muscle protein content, fiber diameter, satellite cells, and muscle cells having central nucleus during the regenerating phase. The mean expression levels of phosphorylation of Akt, p70 S6 kinase and p38 mitogen-activated protein kinase during the regenerating phase of injured skeletal muscle were up-regulated by MENS. These results strongly suggest that MENS may facilitate the regeneration of injured muscles via both the stimulation of muscle protein synthesis and the activation of muscle satellite cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ生理学

キーワード：微弱電流、筋損傷、骨格筋、生理学

## 1. 研究の背景

近年、スポーツ現場において筋損傷や筋疲

労の回復を促すために微弱電流を負荷する microcurrent electrical neuromuscular
--

stimulation (MENS) が行われている。MENS には損傷した組織の修復を促進させる可能性のあることが示唆されている。特に肉離れ等の筋損傷では受傷直後からの MENS 処置により、早期に競技復帰可能となる事例が知られている。しかしながら、損傷筋に対する微弱電流刺激の回復促進効果に関しての分子機構は明らかでない。

## 2. 研究の目的

本研究では、マウス骨格筋損傷モデルを用いて、筋損傷に対する微弱電流刺激の影響について、主として免疫組織化学的分析法を用い、損傷骨格筋の再生において中心的な役割を担っている筋衛星細胞の挙動を中心に検討することを目的とした。また、損傷骨格筋の再生において主要な役割を演じると考えられる筋タンパク合成系ならびに筋細胞分化に係る細胞内シグナルについても検討し、微弱電流刺激による損傷骨格筋の治癒促進のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

本研究の成果により損傷骨格筋に対する微弱電流刺激の治癒促進効果が認められれば、将来的に筋損傷に対する新しい標準的治療法の提案につながる可能性が高く、スポーツ医学分野においてその意義は大きいと考えられる。

## 3. 研究の方法

損傷骨格筋に対する微弱電流刺激の再生促進効果について、広範な骨格筋損傷モデルとしての壊死-再生サイクルおよび軽微な骨格筋損傷モデルとしての萎縮-再荷重負荷、の2つの実験系から検討した。本研究は、豊橋創造大学が定める動物実験規定に基づき、豊橋創造大学生命倫理委員会の審査・承認を経て実施された。

### (1) 広範な骨格筋損傷モデルとしての壊死-再生サイクルに及ぼす微弱電流刺激の影響

生後7週齢の雄性マウス (C57BL/6J) を用い、筋損傷 (CX) 群と筋損傷後に微弱電流刺激を行う (MX) 群の2群に分類した。両群の左前脛骨筋 (TA) に cardiotoxin (CTX: 10  $\mu$ M、0.1 ml) を筋注射し、筋損傷モデルを作成した。筋損傷惹起後、MX 群には Trio 300 (㈱伊藤超短波、東京) を用いて (図1)、微弱電流刺激 (20  $\mu$ A、0.3 Hz、250 msec) を1日1回60分間、週3回の頻度で麻酔下にて施行した。一方、CX 群に対しては麻酔のみを行った。

CTX筋注後1週、2週、3週の時点で、両群のTAを採取し、結合組織を除去後に筋重量測定し、筋組織を2等分した。一方の筋組織を用いて、筋タンパク量の定量を行った。も

う一方の筋組織は、液体窒素により冷却したイソペンタンにて急速凍結した。凍結した筋組織より厚さ7  $\mu$ mの連続凍結横断切片を作成し、病理学的解析のためにHE染色を、そして筋衛星細胞数の検討のためにPax7、lamininおよびdapiによる染色を施した。



図1. “Trio 300”

各サンプルの評価項目は、①体重当たりの筋乾燥重量、②体重当たりの筋タンパク量、③筋線維断面積、④筋線維数に対する中心核筋線維数の割合、⑤筋衛星細胞数、⑥全筋核数とした。

### (2) 軽微な骨格筋損傷モデルとしての萎縮-再荷重負荷に及ぼす微弱電流刺激の影響

生後10週齢の雄性マウス (C57BL/6J) を用い、筋損傷 (CS) 群と筋損傷後に微弱電流刺激を行う (MS) 群の2群に分別した。両群のマウスに対して後肢懸垂を2週間負荷してヒラメ筋 (SOL) を廃用性に萎縮させた。懸垂2週間後、通常飼育に戻して後肢に再荷重負荷することで、SOL に微細な筋損傷を惹起させた。再荷重負荷開始後、MS 群には微弱電流刺激 (20  $\mu$ A、0.3 Hz、250 msec) を1日1回60分間、3日に1回の頻度で麻酔下にて施行した。一方、CS 群は麻酔のみを行った。後肢懸垂開始を基準に、懸垂前、懸垂終了 (再荷重開始) 直後、1、3、5および7日後に両群のSOLを採取し、筋重量の測定を行った。

各筋組織は protease inhibitor および phosphatase inhibitor を含むライセートバッファーを用いてホモジネートし、Bradford法により筋タンパク量を測定した。さらにウェスタンブロッティング法により、Akt、p70 S6 kinase、p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) の総タンパク発現量ならびに各酵素のリン酸化タンパク発現量を測定し、総タンパクに対するリン酸化タンパクの相対的発現量を各酵素のリン酸化レベルとして評価した。

各サンプルの評価項目は、①筋タンパク量、②リン酸化 Akt レベル、③リン酸化 p70 S6 kinase レベル、④リン酸化 p38MAPK レベルとした。

### (3)統計処理

統計学的検討には、二元配置分散分析法とそれに続く多重比較を用い、危険率5%をもって統計学的に有意差ありと評価した。

## 4. 研究成果

### (1)広範な骨格筋損傷モデルとしての壊死－再生サイクルに及ぼす微弱電流刺激の影響

体重当たりの筋乾燥重量および筋タンパク量は、CTX筋注3週後においてMX群はCX群に比べて有意に高値を示した( $p < 0.05$ )。

CTX筋注後のTAの病理学的変化を検討したところ、両群共に1週後には筋細胞の崩壊と貪食細胞の浸潤が観察されたが、3週後には中心核線維が多数出現し、CTX筋注により壊死－再生過程が惹起されたことが確認された。

平均筋線維断面積を評価した結果、CTX筋注1週後では両群間に差は認められなかった。しかし、CTX筋注2週および3週後では、MX群の筋線維断面積はCX群に比べて有意に高値を示した( $p < 0.01$ )。

全筋線維数に対する中心核線維数の割合では、MX群はCX群に比べCTX筋注2週後において有意に低値を示した( $p < 0.05$ )。

Pax7陽性核を有し、かつlaminin陽性の基底膜の内側に存在する細胞(核)を筋衛星細胞として評価した。筋衛星細胞数は、CTX筋注1週および2週後において、MX群はCX群よりも有意に高値を示した( $p < 0.05$ )。

筋核に対するPax7陽性核の割合は、CTX筋注1週、そして2週後においてMX群はCX群よりも有意に高値を示した( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )。

### (2)軽微な骨格筋損傷モデルとしての萎縮－再荷重負荷に及ぼす微弱電流刺激の影響

後肢懸垂2週後の再荷重で、SOLには病理学的に微細な筋損傷が確認された。微弱電流刺激による体重への影響は認められなかった。2週間の後肢懸垂により、体重当たりのSOLの重量は有意に低下した( $p < 0.05$ )。しかし、懸垂により低下した筋湿重量および筋タンパク量は、懸垂後の通常飼育により徐々に回復する傾向が観察された。二元配置分散分析により、微弱電流刺激の有無により体重当たりの筋重量が有意に高値を示した( $p < 0.05$ )。また、体重当たりの筋タンパク量についても同様の変化が認められ、微弱電流刺激により筋タンパク量の回復は促進した。

本研究では、Akt、p70 S6 kinaseおよびp38MAPKの発現量は、各酵素のリン酸化タンパクの相対的発現量により評価した。Akt、p70 S6 kinaseおよびp38MAPKの発現量に懸

垂の影響は認められなかった。懸垂解除1日後に、p70 S6 kinaseの発現レベルの一時的な増加が認められた( $p < 0.05$ )。しかしながら、Aktおよびp38MAPKは、懸垂解除1日後では有意な変化は認められなかった。一方、微弱電流刺激は、Akt、p70 S6 kinaseおよびp38MAPKの発現量を有意に増加させた( $p < 0.05$ )。

### (3)考察

微弱電流刺激の効果については、疼痛抑制効果があることがヒトを対象にした臨床例より報告されている。その機序には、①損傷電流による治癒促進、②電子の作用による血流改善、③組織に滞留した発痛物質や疲労物質の分解促進と血流促進による除去など、いくつかの仮説が提唱されているものの、基礎的な研究は行われておらずその詳細は不明である。本研究では、損傷骨格筋に対する微弱電流刺激の影響について、実験動物を用いた2種類の骨格筋損傷モデルを用いて検討した。

その結果、微弱電流刺激は広範な骨格筋損傷モデル(壊死－再生サイクル)および軽微な骨格筋損傷モデル(萎縮－再荷重負荷)のいずれに対しても、損傷により低下した筋重量および筋タンパク量の回復を促進させ、また、筋線維断面積の増加も観察された。

骨格筋損傷後の再生過程において、筋線維数に占める中心核筋線維数の割合が一時的に増加する。これは、中心核を有する再生筋細胞が出現するためであり、再生過程の進行に伴い徐々に減少し、周辺核を持つ筋線維に移行するとされている。本研究では、微弱電流刺激により中心核線維数の減少が促進する傾向が認められた。微弱電流刺激がどのような機序で中心核線維を減少させるかは現時点では明らかでないものの、損傷骨格筋の再生が微弱電流刺激により促進することが推測された。

今回、筋衛星細胞の指標としてPax7陽性核を用いた。骨格筋組織においてPax7は筋衛星細胞に特異的に発現していることが知られておりその特異性は高い。一般に、筋損傷により筋衛星細胞数の増加が認められるが、本研究では、微弱電流刺激により筋衛星細胞数の増加が促進された。筋衛星細胞は損傷した骨格筋細胞の再生において中心的な役割を担っていることから、微弱電流刺激は筋衛星細胞数を増加させることで、損傷骨格筋の再生を促すことが示唆された。

本実験で用いた萎縮－再荷重負荷モデルにおいて、再荷重負荷後にp70 S6 kinaseのリン酸化レベルの増加、すなわち活性化が観察された。このp70 S6 kinaseは筋タンパク合成シグナルの1つとして考えられて

おり、萎縮後の再荷重負荷によりタンパク合成が刺激されていることが示唆された。しかしながら、同じタンパク合成シグナルの1つであるAktのリン酸化レベルには変化は認められなかったことから、p70 S6 kinaseの活性化はAktを介さないシグナル伝達経路の活性化によることが示唆された。また、p38MAPKについても変化が認められなかった。

一方、萎縮後の再荷重負荷時における微弱電流刺激は、Aktおよびp70 S6 kinaseのリン酸化レベルの再度増加を引き起こした。さらに、p38MAPKのリン酸化レベルも微弱電流刺激により増加、すなわち活性化が観察された。MyoDやmyogeninなどの筋特異的転写調節因子の発現はp38MAPKの活性化により増加することが報告されている。骨格筋の再生には筋衛星細胞の活性化が必要であり、MyoDおよびmyogeninの発現増加は筋衛星細胞の活性ならびにそれに続く筋形成を促進すると考えられる。

以上のことから、微弱電流刺激は筋タンパク合成を促進すると共に、筋衛星細胞を活性化させることで損傷骨格筋の再生を促進することが示唆された。

骨格筋損傷に対する初期治療は、従来よりRICE処置に代表される局所安静が基本とされている。しかしながら本研究結果によれば、むしろ受傷直後から微弱電流の刺激を与えた方が、より早期の治癒が期待できると考えられた。本研究は、実験動物を用いた基礎研究であるが、微弱電流刺激は将来的に骨格筋損傷の一般的な治療体系における新たな標準的手法となる可能性が高い。特にスポーツ現場において、早期復帰を渴望する選手にとってはきわめて有用な治療手段であると思われた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①西浦友香、後藤勝正、大野善隆、微弱電流による損傷骨格筋の回復促進とタンパク合成系細胞内シグナル伝達に関する基礎的研究、豊橋創造大学リハビリテーション学部理学療法学科卒業論文集、査読無、第3巻、2012、129-132

②後藤由美、中村文音、大野善隆、後藤勝正、荷重除去によって萎縮した骨格筋に対する再荷重による部分的筋損傷とマイクロカレント刺激の影響、豊橋創造大学リハビリテーション学部理学療法学科卒業論文集、査読無、第2巻、2011、135-140

③植松大喜、大橋和也、大野善隆、後藤勝正、マイクロカレント刺激が損傷骨格筋の再生

に及ぼす影響、豊橋創造大学リハビリテーション学部理学療法学科卒業論文集、査読無、第1巻、2010、7-12

[学会発表] (計7件)

①西浦友香、微弱電流によるタンパク合成系シグナル伝達の活性化と損傷骨格筋の回復促進に関する基礎研究、第46回日本理学療法学会学術大会、2011年5月27日、宮崎

②藤谷博人、骨格筋損傷に対するマイクロカレントの筋再生促進効果、第83回日本整形外科学会学術集会、2010年5月28日、東京

③後藤由美、荷重負荷によって萎縮した骨格筋に対する再荷重による部分的筋損傷とマイクロカレント刺激の影響、第45回日本理学療法学会学術大会、2010年5月27日、岐阜

④藤谷博人、マイクロカレント(MENS)は筋損傷後早期より筋衛星細胞を増加させ筋再生能を高める、第24回日本整形外科学基礎学術集会、2009年11月5日、横浜

⑤植松大喜、マイクロカレント刺激が損傷骨格筋の再生に及ぼす影響、第44回日本理学療法学会学術大会、2009年5月28日、東京

⑥藤谷博人、損傷骨格筋に対するマイクロカレント(微弱電流)の筋再生効果 -筋細胞レベルでの形態学的変化-、第19回日本臨床スポーツ医学会、2007年11月1日、幕張

⑦藤谷博人、損傷骨格筋に対するマイクロカレント(微弱電流)の効果、第63回日本体力医学会、2007年9月18日、別府

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤谷 博人 (FUJIYA HIROTO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：50278008

### (2) 連携研究者

後藤 勝正 (GOTO KATSUMASA)

豊橋創造大学・保健医療学部・教授

研究者番号：70239961

小倉 祐司 (OGURA YUJI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：90509952