

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：33801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700640

研究課題名(和文)冷刺激や温刺激はマクロファージの動態を変化させ、筋損傷からの回復を促進するか？

研究課題名(英文)Icing promote skeletal muscle repair, and macrophage plasticity

研究代表者

縣 信秀 (AGATA, Nobuhide)

常葉大学・保健医療学部・助教

研究者番号：00549313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：再現性のある筋損傷モデルラットを作製し、冷刺激が筋損傷からの回復を促進できるかどうかを明らかにすることを目的とした。8週齢のWistar系雄性ラットに対して、50、100、200、400 deg/secの角速度で遠心性収縮を行い、再現性の高い筋損傷モデルを作製できることを確認した。この筋損傷モデルに対し10度の冷水に下腿を30分間浸し、冷刺激による筋損傷からの回復促進効果を検証した。その結果、冷刺激によって足関節背屈トルクの回復が促進すること、筋線維横断面積の回復が促進することが示唆された。今後、これらの現象がどのようなメカニズムによって生じているのか検討していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：The repeatability muscle damage model rat was produced, and it verified whether an icing stimulus could promote recovery from muscle damage. The Wistar male rat of eight-week age, eccentric contraction was performed by 50, 100, 200, and 400 deg/sec angular velocity, and it confirmed that a muscle damage model rat with high repeatability was produced. The lower thigh muscle was dipped in cold water of 10 degrees for 30 minutes to this muscle damage model, and the recovery facilitatory effect from the muscle damage by icing stimulus was verified. As a result, it was suggested that recovery of isometric torque of the ankle joint dorsal extension promotes by icing stimulus and that recovery of muscle fiber cross sectional area promotes. It is necessary to examine by what kind of mechanism these phenomena have arisen.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション 理学療法学 細胞・組織 再生医学

1. 研究開始当初の背景

筋損傷を受けた理学療法対象者が、早期に ADL 能力を獲得するためには、できるだけ早く筋損傷を回復させる必要がある。理学療法では損傷の初期に生じる炎症を抑制する為に、患部への冷刺激が処方される。一方、温刺激が筋衛星細胞を活性化し、筋損傷からの回復を促進することが報告されている。このように、冷刺激や温刺激による筋損傷からの回復促進効果に統一した見解がなく、そのメカニズムも不明な点が多い。冷刺激や温刺激の筋損傷に対する効果が明らかにできなかった原因に、常に一定量の筋損傷を持つモデル動物がないことが挙げられる。そこで、我々は、ラットの関節運動を制御し、同時に関節トルクを測定することができる小動物用他動的足関節背屈装置を開発した。この装置と電気刺激装置を併用することで、ラットに様々な条件の遠心性収縮を行わせることができるようになった。また、本装置は等尺性収縮力を関節トルクとして測定することができ、筋損傷の回復を筋収縮力という生理学的な面から評価することができる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、一定量の筋損傷を持つモデルラットを作製するため遠心性収縮の条件を検討し、筋損傷の回復に対する冷刺激や温刺激の効果を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 遠心性収縮による筋損傷モデルラットの作製

再現性の高い筋損傷モデルラットを作製するために、50、100、200、400 deg/sec の角速度で遠心性収縮を行い、角速度と筋損傷量の関係を生理学的・組織学的評価を用いて明らかにした。

遠心性収縮の方法

麻酔下にて、ラット(Wistar 系雄)の足部を小動物用足関節運動装置の足底板にセットした(図1)。次に、電気刺激装置と表面電極を用いて、ラット前脛骨筋に電気刺激を行い、筋収縮と同時に足底板を底屈方向へ回転させ、前脛骨筋に遠心性収縮を加えた。回転軸に取り付けてあるトルクセンサーで足関節に加わるトルクを感知し、遠心性収縮時に加わるトルクを測定した。角速度の条件を変えて遠心性収縮を行った。

生理学的評価

小動物用足関節運動装置と電気刺激装置を用いて、足関節背屈筋群の等尺性収縮時の足関節背屈トルクを測定し、筋損傷による筋力低下を評価した。

組織学的評価

Evans Blue Dye 法(細胞膜損傷の指標)と Dystrophin 染色を用いて損傷筋線維の量を

測定し筋損傷量として評価した。

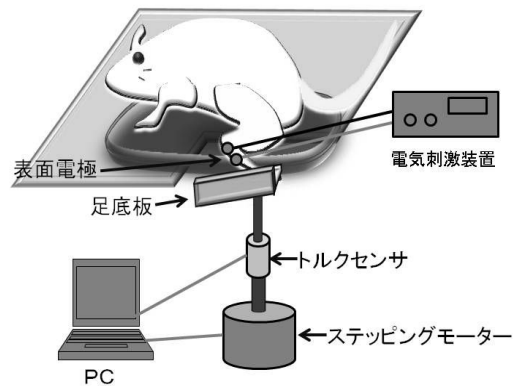


図1. 小動物用足関節運動装置の概要。ステッピングモーターの回転によって、様々な条件の関節運動ができる。電気刺激によって筋を収縮させながら、関節運動を行うことで遠心性収縮ができる。また、トルクセンサで関節トルクを計測することで、関節運動の力を制御できる。

(2) 筋損傷からの回復過程の解析

再現性の高い条件により遠心性収縮を行ってから経時的に生理学的評価(筋力)を行った。筋力測定後に前脛骨筋を採取し組織学的・生化学的評価を行った。

生理学的評価

小動物用足関節運動装置と電気刺激装置を用いて、経時的に遠心性収縮前、2、7、14、18、21 日後に足関節背屈筋群の等尺性収縮時の足関節背屈トルクを測定した。

組織学的評価

凍結横断切片を作製し、骨格筋に特異的に発現する Dystrophin の免疫染色を行った。また H-E 染色も行い、筋線維横断面積の計測を行った。

(3) 冷刺激が筋損傷からの回復を促進するかどうかを明らかにする

遠心性収縮後に冷刺激を加え、筋損傷からの回復促進効果を生理学的、組織学的に評価した。

冷刺激の方法

冷刺激は、冷却循環装置とウォーターバスを用いて 10 に設定した水にラットの下腿部を浸した。10 の水に 30 分間浸すと前脛骨筋の筋温度が約 12 に低下することを確認した(図2)。

生理学的評価

小動物用足関節運動装置と電気刺激装置を用いて、足関節背屈筋群の等尺性収縮時の足関節背屈トルクを測定した。

組織学的評価

遠心性収縮 21 日後に、前脛骨筋を採取し、凍結横断切片を作製し、骨格筋に特異的に発現する Dystrophin の免疫染色を行い、筋線維横断面積の計測を行った。

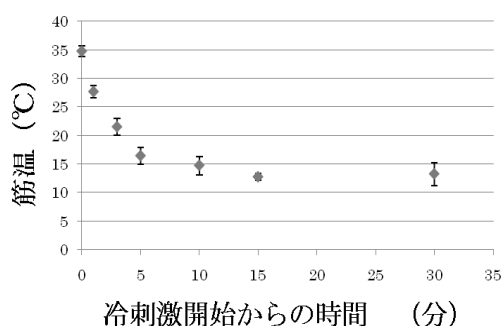


図 2. 冷刺激時 (10) の筋温変化 (n=5)。冷刺激開始から 1, 3, 5, 10, 15, 30 分後の前脛骨筋の筋温を測定した。開始 30 分後に筋温は 12 度になった。

4. 研究成果

(1) 遠心性収縮による筋損傷モデルラットの作製

遠心性収縮の角速度の違いによる筋損傷の評価を行うために、筋腹横断面中の EBD 陽性筋線維数を測定した。その結果、遠心性収縮を行わなかった群では EBD positive 筋線維数はみられなかった。また、50 deg/sec (31.9 ± 14.0 本) に比べて、100 deg/sec (598.8 ± 241.4 本) では約 20 倍、200 deg/sec (1681.7 ± 133.2 本) では約 50 倍、400 deg/sec (2252.6 ± 285.8 本) では約 70 倍と、角速度依存的に EBD positive 筋線維数は多くなった。また、遠心性収縮の角速度の違いによる遠心性収縮後の筋力低下量を調べるために、遠心性収縮 2 日後の足関節背屈トルクを調べた。その結果、遠心性収縮前 (26.0 ± 0.4 mNm) に比べて、50 deg/sec では 87.4% (22.7 ± 0.5 mNm)、100 deg/sec では 60.2% (15.7 ± 1.4 mNm)、200 deg/sec では 38.2% (9.9 ± 0.5 mNm)、400 deg/sec では 32.2% (8.4 ± 1.1 mNm) と、角速度依存的に小さくなった。

この条件の中で、200 deg/sec で遠心性収縮を行うと、比較的安定した筋損傷モデルが作製できることがわかった。

(2) 損傷筋の組織学的、生理学的評価による経時的变化

200 deg/sec の角速度で遠心性収縮を行ったときの、前脛骨筋の組織学的、生理学的な変化を経時的に評価した。その結果、各群の Dys 陽性筋線維横断面積の平均値を比較すると、損傷 10 日後、14 日後は、5 日後に比べ有意に大きかった。さらに 14 日後は 7 日後に比べ有意に大きかった。また、すべての群の Dys 陽性筋線維横断面積を測定し、ヒ

ストグラムを作成した。遠心性収縮 5 日後の Dys 陽性筋線維横断面積のヒストグラムは、 $600 \mu\text{m}^2$ と $1400 \mu\text{m}^2$ をピークとする二峰性の山となり、小径の Dys 陽性筋線維が多数観察された。そこで、筋損傷からの回復過程において、小径の Dys 陽性筋線維がどれくらい存在しているのかを確認するために、各群の $800 \mu\text{m}^2$ 以下の Dys 陽性筋線維の割合を算出した。その結果、遠心性収縮 3 日後で 7.0%、5 日後で 25.0%、7 日後で 19.8%、10 日後で 9.5%、14 日後で 7.8% となり、小径の Dys 陽性筋線維は 7 日後から徐々に減少し、ヒストグラムが上方へ移動していった。一方、回復過程において、新生筋線維がどのくらい存在しているのかを確認するために、Dys 陽性筋線維のうち、D-MHC 陽性筋線維の割合を算出した。その結果、Dys 陽性筋線維のうち、D-MHC 陽性筋線維の割合は、3 日後で 0.8%、5 日後で 21.9%、7 日後で 5.7% となり、10 日後と 14 日後では D-MHC 陽性筋線維はほとんど観察されなかった。5 日後では、Dystrophin 陽性筋線維横断面積が $800 \mu\text{m}^2$ 以下の 84.1% が D-MHC 陽性筋線維であった。また、遠心性収縮の前と、2、3、5、7、10、14 日後に足関節背屈トルク測定を行った。遠心性収縮を加える前の足関節背屈トルクは、Control 群と有意な差はなかった。一方、遠心性収縮 2 日後、3 日後、5 日後、7 日後、10 日後、14 日後は、遠心性収縮を加える前に比べて有意に小さかった。また、10 日後、14 日後の足関節背屈トルクは、2 日後、3 日後と比較して有意に大きかった。さらに 14 日後の足関節背屈トルクは 5 日後、7 日後と比較して有意に大きかった。ただ、遠心性収縮 14 日後の足関節背屈トルクは、同週齢のコントロール群に比べて有意に小さかった。

(3) 冷刺激が筋損傷からの回復を及ぼす影響

200 deg/sec の角速度で遠心性収縮を行い、その 2 時間後に、10 度の冷水にラットの下腿を 30 分間浸し、前脛骨筋の生理学的、組織学的変化を経時的に評価した。その結果、遠心性収縮のみ行った群の足関節背屈トルクは、遠心性収縮 2 日後に遠心性収縮前に比べ 40% に、7 日後に 62%、14 日後に 90%、18 日後に 107%、21 日後に 133% となった。一方、遠心性収縮後に冷刺激を行った群では、遠心性収縮 2 日後に、35%、7 日後に 75%、14 日後に 113%、18 日後に 136%、21 日後に 156% となり、遠心性収縮のみに比べ、冷刺激を行うことで、足関節背屈トルクの回復は促進されることが示唆された (図 3)。また、21 日後に前脛骨筋を採取し、筋線維横断面積を測定した。その結果、遠心性収縮のみ行った群では $2524 \pm 528 \mu\text{m}^2$ に対して、冷刺激を行った群では、 $2801 \pm 612 \mu\text{m}^2$ となり、遠心性収縮のみに比べ、冷刺激を行うことで、筋線維横断面積の回復は促進されることが

示唆された(図4)。

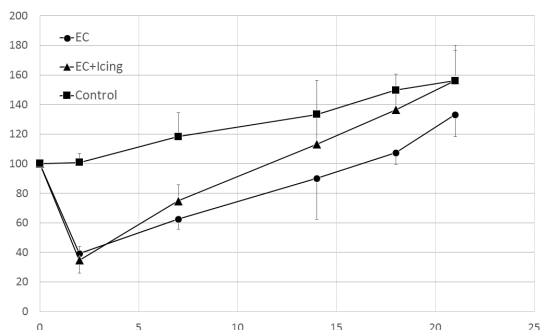


図3. 冷刺激による足関節背屈トルクの変化

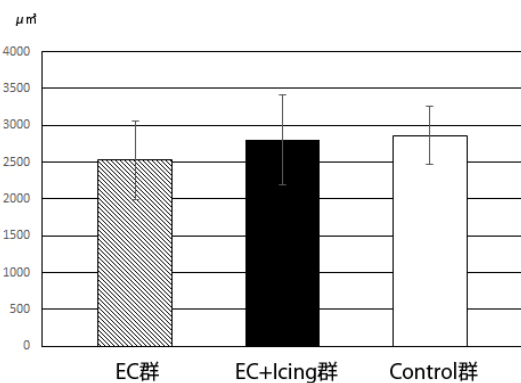


図4. 冷刺激による筋線維横断面積の変化

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)

[学会発表](計 6件)

- (1) Atsushi Shibata, Tomonori Mori, Nobuhide Agata, Yasunori Miyamoto, Masumi Inoue-Miyazu, Keisuke Kawakami: Ultrasonic stimulation to promote recovery from muscle injury. WCPT-AWP & ACPT Congress 2013. 平成 25 年 9 月 8 日. Nan Shan Education and Training Center, Taichung, Taiwan
- (2) 柴田篤志、森友洋、懸信秀、宮本靖義、宮津真寿美、河上敬介: 超音波刺激が筋損傷の回復過程に与える影響. 第 48 回日本理学療法学会. 平成 25 年 5 月 26 日. 名古屋国際会議場、愛知
- (3) 森友洋、懸信秀、柴田篤志、宮津真寿美、宮本靖義、河上敬介: 伸張刺激による筋損傷からの機能的回復促進効果. コメディカル形態機能学会第 11 回学術集会. 平成 24 年 9 月 22 日、首都大学東京、東京
- (4) 森友洋、懸信秀、柴田篤志、宮津真寿美、河上敬介: 再現遠心性収縮による筋損傷モデルの組織学的・機能

的回復. 第 47 回日本理学療法学会. 平成 24 年 5 月 25 日-27 日、神戸国際展示場、兵庫

- (5) Nobuhide Agata, Akito Kataoka, Masumi Inoue-Miyazu, Kimihide Hayakawa, Keisuke Kawakami: INFLUENCE OF DURATION AND FREQUENCY AT SUPPRESSIVE EFFECT OF REPETITIVE STRETCHING ON MUSCLE ATROPHY IN RATS. 16th International WCPT Congress. 平成 23 年 6 月 20 日-23 日、Amsterdam
- (6) Nobuhide Agata, Akito Kataoka, Masumi Inoue-Miyazu, Kimihide Hayakawa, Masahiro Sokabe, Keisuke Kawakami: Passive stretch suppresses muscle atrophy in rats: effects of duration and frequency of stretch. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. 平成 23 年 6 月 1 日-5 日、Nagoya, Aichi

6. 研究組織

(1) 研究代表者

懸 信秀 (AGATA, Nobuhide)
常葉大学・保健医療学部・助教
研究者番号: 00549313