

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500802

研究課題名(和文) 骨格筋損傷の修復に対するアイシングの影響と微弱電流併用効果に関する研究

研究課題名(英文) Combined effects of Microcurrent electrical neuromuscular stimulation and icing for injured skeletal muscles in mice.

研究代表者

藤谷 博人 (FUJIYA, HIROTO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50278008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨格筋損傷モデルを用いて、微弱電流とアイシングの併用が、筋再生過程に及ぼす影響について免疫組織的に検討を行った。

その結果、筋線維断面積、Pax7陽性細胞数、Akt量は高値を示した。また病理的所見として、炎症性細胞の浸潤は軽快した。これらのことから、微弱電流にアイシングを併用すると、筋の修復、再生が促進される可能性が示された。また外傷時に広く行われているアイシングには疼痛、腫脹の軽減効果があることから、この微弱電流とアイシングの併用療法は、骨格筋損傷に対する画期的な治療手技であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effect of Microcurrent electrical neuromuscular stimulation (MENS) combined with icing on the regeneration process in injured skeletal muscle in mice using immunohistochemical technique.

The cross sectional area of muscle fiber, number of Pax7-positive nuclei and Akt were increased by the combined effect of MENS and icing. In pathological investigation, infiltration of inflammatory cells was decreased by MENS with icing. These results suggested that a combination of MENS and icing for damaged skeletal muscles has an effect of acceleration muscle repair and regeneration. Since icing, which is widely performed in actual settings, has an effect of reducing pain and swelling, it is suggested that a combination of MENS and icing is epoch-making treatment method for skeletal muscle injuries.

研究分野：健康・スポーツ科学・スポーツ生理学

キーワード：微弱電流 アイシング 筋損傷 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

近年、一部のスポーツ現場において、骨格筋損傷の修復、再生を促進させる手法の1つとして、微弱電流刺激 (Microcurrent Electrical Neuromuscular Stimulation: MENS) が経験的に用いられている。肉ばなれ等の骨格筋損傷は、スポーツ現場で多くみられるが、復帰まで数ヵ月を要するケースもあり、早期復帰を望む現場のアスリート達にとっては深刻な問題となっている。

このことから研究代表者は、前回(基盤 C: 21500639)の研究において、マウス骨格筋損傷モデルを用いて、MENS が筋衛星細胞の活性化を促し、筋重量、筋線維の断面積、等の増加を認めたことから、損傷骨格筋の修復を促進させることを分子生物学的に国内外で初めて明らかにした (Fujiya H., et. al: Microcurrent Electrical Neuromuscular Stimulation facilitates regeneration of injured skeletal muscle in mice. Journal of Sports Science and Medicine 14, 297-303, 2015)。

一方、実際のスポーツ現場において骨格筋損傷が発生した際には、救急処置として受傷直後からのアイシングがほとんどのケースで実施されている。一般にアイシングは、疼痛、および炎症(腫脹、出血)の軽減に効果があるとされている。しかしながら、筋損傷の修復、再生の観点からみると、損傷筋線維の変性を軽減させ、再生の促進の可能性があるとする報告や、他方、炎症を抑制し逆に筋再生を遅らせるとの先行研究もあり、アイシングの損傷骨格筋に対する生理的作用については未だ明らかでない。

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、MENS と現場で実際に行われているアイシングを併用することが、筋再生過程にどう影響するかを免疫組織化学的に検討することを目的とした。損傷骨格筋の再生に中心的な役割を持つ筋衛星細胞の挙動を中心に検証を行い、また損傷骨格筋の再生における筋タンパク合成系、そして筋細胞分化に関わる細胞内シグナルについても一部検討を行った。

本研究の成果により、損傷骨格筋の修復促進効果のある MENS の単独使用よりも、MENS とアイシングの併用の方が、さらに治癒を早めることが判明すれば、現場の実情に即した画期的な骨格筋損傷の新たな治療手技として確立される可能性があり、スポーツ医学分野においてその意義はきわめて大きいと考えられる。

3. 研究の方法

損傷骨格筋に対する MENS とアイシング

の併用効果を検討するために、(1)骨格筋損傷後のアイシングの時期の違いが筋再生に及ぼす影響、そして(2)骨格筋損傷に対する MENS とアイシングの併用の影響、と段階的に検討を行った。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学大学院実験動物管理研究施設の動物実験委員会の審査・承諾 (承諾番号: 1404008 号)を得た後、聖マリアンナ医科大学実験動物指針に従い実施された。

(1) 骨格筋損傷後のアイシングの時期の違いが筋再生に及ぼす影響

生後 8 週齢の雄性マウス (C57BL/6J) を用い、100 μ M の濃度に希釈した cardiotoxin (CTX) を前脛骨筋 (TA) の proximal、middle、distal の 3 か所に 27-gauge needle にて合計 1ml を注入し (0.03-0.04 ml)、骨格筋損傷 (壊死-再生サイクル) を惹起させた (CX) 群 (n=12)、CTX 筋注 1 時間後 (筋衛星細胞発現のピーク前) にアイシングした (IE) 群 (n=12)、CTX 筋注 8 日後 (筋衛星細胞発現のピーク後) にアイシングした (ID) 群 (n=12) の 3 群に分類した。アイシングはマウスを網状の籠に固定した後、両下肢を垂らして氷冷水 (4) に入れ TA を冷却した (20 分間)。冷却中、尾部は上方に持ち上げ周囲に固定した。CTX 筋注 2 および 4 週間後に全てのマウスより TA を摘出した。筋湿重量を測定後、液体窒素にて急速凍結させ -80 にて保存した。その後、連続凍結切片を作製し、HE 染色、および免疫組織化学染色 (Pax7、Laminin、DAPI) を行った。

評価項目は、筋湿重量、病理学的所見、中心核を有する筋線維数の割合、中心核を有する筋線維の断面積、全筋核数に対する Pax7 陽性核 (筋衛星細胞) 比とした。

(2) 骨格筋損傷に対する MENS とアイシングの併用の影響

実験動物には、生後 7 週齢の雄性マウス (CL57/6J) 72 匹を用い、未処置の (C) 群 (n=14)、筋損傷のみの (X) 群 (n=14)、筋損傷後に MENS のみを行う (XM) 群 (n=14)、筋損傷後にアイシングと MENS を行う (XIM) 群 (n=14) の 4 群に分類した。

X 群、XM 群、XIM 群のマウスは麻酔下にて、100 μ M の濃度に希釈した CTX を TA に、上記 (1) と同様に合計 1ml を注入した (0.03-0.04 ml)。C 群のマウスには同量の生理食塩水を注入した。XIM 群は CTX 筋注直後に (1) と同様の方法でアイシングを施行し、冷却時間は 20 分間とした。

XM 群および XIM 群については CTX 筋注後、翌日から MENS を施行した。MENS は麻酔下にてトリオ 300 (株伊藤超短波、東京) を用いて行い、頻度は週 3 回で 1 回 60 分間とし、MENS の設定は、出力 20 μ A、周波数は 0.3HZ、pulse width は 250msec とした。MENS の低周波導子パルス (電極) は剃毛した大腿部と足関節に巻きつけ、TA 全体に通電するように装

着した。C 群、X 群についても一連の同様の処置を行った。

処置後 1 週および 3 週の時点で TA を摘出し、筋湿重量を測定後、TA は筋腹中央部で横切し、液体窒素にて急速凍結させて -80 にて凍結保存した。一方の TA で連続凍結切片を作成し HE 染色、および免疫組織化学染色 (Pax7, Laminin, DAPI) を行った。また他方はタンパク量の測定に用い、またウエスタンブロッティング法により、Akt の総タンパク量ならびにリン酸化タンパク発現量を測定した。

評価項目は、筋湿重量、筋タンパク量、病理学的所見、中心核を有する筋線維の断面積、全筋核数に対する Pax7 陽性核(筋衛星細胞)比、酵素タンパク (Akt) 相対的発現量とした。

(3) 統計処理

統計学的検討には、いずれも 2 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有りとした ($p < 0.05$)。

4. 研究成果

(1) 骨格筋損傷後のアイシングの時期の違いが筋再生に及ぼす影響

筋損傷の 1 時間後にアイシングした IE 群では、筋湿重量 (2, 4 週)、および中心核を有する筋線維の横断面積 (2 週) は、他の 2 群よりも有意に低い値を示し ($p < 0.05$)、これらのいわゆる筋量の減少は、筋修復が遅延したことを示すものであった。また一方、筋損傷の 8 日後にアイシングした ID 群では、筋衛星細胞数 (2 週) が他群よりも有意に多い結果となり ($p < 0.05$)、アイシングにより筋修復が促進された可能性が観察された。したがって、骨格筋損傷後の時期によりアイシングの効果は異なって現れる可能性が示された。

本実験系の限界として評価が 2 時期のみであるため今後さらなる検証が必要と思われるが、これらのことから、骨格筋損傷後の時期によりアイシングの影響が異なる可能性が考えられ、受傷後のアイシングを実施する時期は骨格筋損傷の回復に影響することが示された。

(2) 骨格筋損傷に対する MENS とアイシングの併用の影響

MENS の影響

今回の結果から X 群と XM 群を比較し、MENS 単独の影響についてみると、筋湿重量は、1 週にて XM 群は X 群よりも有意に高値を示し ($p < 0.05$)、タンパク量については、有意差はみられなかったものの同様の傾向が認められた。筋線維断面積は、1 週では差がなかったものの、3 週では XM 群が同様に有意に高値を示し ($p < 0.05$) (図 1)、筋衛星細胞数は、XM 群は X 群よりも 1 週で有意に多かった

($p < 0.05$) (図 2)。また病理学的所見では、1 週における炎症所見には大きな差は認められなかった (図 3)。

MENS 処置により筋衛星細胞が活性化し、その後筋線維断面積の増加が認められたことは、筋再生が促されたことを示すものであり、これらのことから、MENS には損傷骨格筋の修復促進効果があることが確認された。

アイシングの影響

本研究結果で XM 群と XIM 群を比較してアイシングの影響をみてみると、筋線維断面積は 1 週で、XIM 群は XM 群よりも有意に大きく ($p < 0.05$) (図 1)、またタンパク量については差が無かったものの、Akt のリン酸化レベルは XIM 群は XM 群に比べやや高い傾向が示された (1 週) ($p = 0.09$)。また病理学的所見として、1 週で、XIM 群は XM 群に比べ、浮腫、炎症性細胞浸潤が明らかに少ないことが観察された (図 3)。

これらのことから考えると、アイシングにより筋損傷の炎症性変化は抑制され、筋のさらなる二次損傷のエリア拡大を防いだことが、XIM 群で筋の修復がより早期に完成に近づいた要因の 1 つと推測した。

MENS + アイシングの併用効果

X 群と XIM 群を比較して両者の併用効果についてみてみると、筋湿重量、タンパク量には大きな変化がみられなかったものの、筋線維断面積、および筋衛星細胞数においては、1 週そして 3 週ともに、XIM 群は X 群よりも全てが有意に高値を示した ($p < 0.05$) (図 1, 2)。また病理学的所見において、1 週では X 群に、浮腫、炎症性細胞浸潤等の炎症所見が著明だったのに対し、XIM 群ではそれらの所見はほとんど認められなかった。また 3 週では、X 群にみられた中心核を有する (幼若な) 筋線維は、XIM 群には顕著に少ないことが観察された (図 3)。

以上のことより、骨格筋損傷に対して MENS とアイシングを併用することは、筋の修復、再生を促進させる効果があり、また MENS 単独の効果と比較すると、その効果は同等、あるいはより大きい可能性が示された。

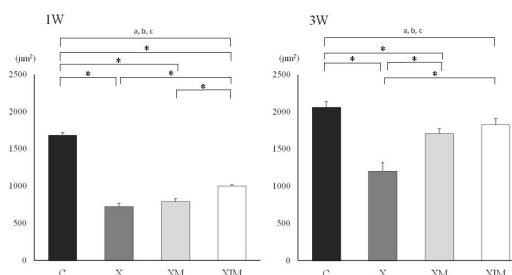


図 1. 筋線維断面積

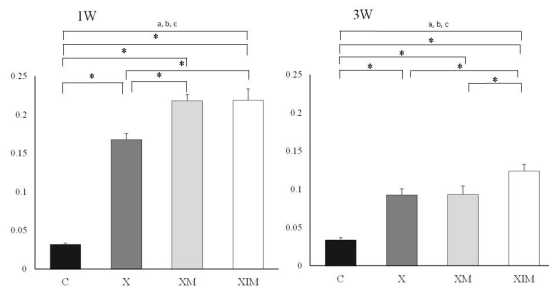


図 2. 筋衛星細胞数/全筋核数

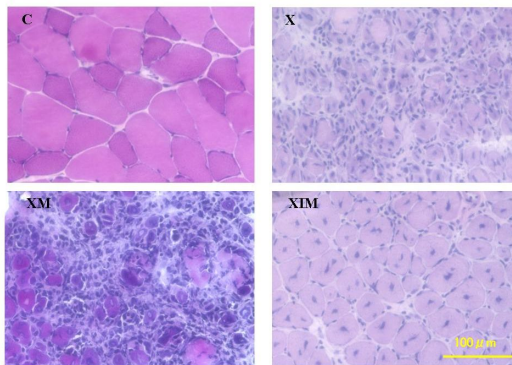


図 3. HE 染色(1 週)

(3) 考察

先行研究において、MENS には腱損傷、靭帯損傷、創傷、皮膚潰瘍、褥瘡、等の軟部組織損傷に対しても、骨格筋損傷と同様に治癒促進効果のあることが知られている。本研究ではこの MENS と、スポーツ現場での救急処置として広く一般に行われているアイシングとの併用が、損傷骨格筋の修復過程に及ぼす影響について検討を行った。

その結果、MENS とアイシングの併用効果として、筋線維断面積、および筋衛星細胞数が、全観察期間において有意に大きいことが認められた。筋衛星細胞は、通常、基底膜と細胞膜の間にて静止状態にあるが、成熟骨格筋の損傷時には活性化・増殖して損傷部位に遊走し、修復、再生の中心的な役割を担っている。したがって、MENS とアイシングの併用は、タンパク合成を促進させるとともに、筋衛星細胞を活性化することで損傷骨格筋の再生を促進させることが明らかとなった。

今回、アイシングの時期に関する実験系において、筋損傷後早期のアイシングは筋の修復、再生に不利であることを示唆する結果が得られたが、本実験条件下において、MENS と損傷直後のアイシング併用の結果をみると、MENS の再生促進の影響は、アイシングの再生抑制の影響を上回る大きな効力を持つことが考えられた。

またこの MENS とアイシングの併用の影響を、MENS 単独の影響と比べてみると、同等、あるいはさらに早く損傷組織を治癒させる可能性のあることが確認された。

また、アイシングの作用には従来より、腫脹の軽減、および疼痛の緩和があることがよく知られている。

したがってこれら一連のことから考えると、比較的簡便で安全性の高い MENS と、スポーツ外傷の救急処置で広く一般に認知されているアイシングとの併用は、疼痛を抑え、かつ骨格筋損傷の治癒をさらに早めることのできる、画期的な新しい治療手技であり、将来的には骨格筋損傷の標準的治療法になる可能性が示唆された。また、修復、再生の促進による治療期間の短縮は、臨床現場での医療費抑制にも繋がり、社会経済的にも貢献できることから、本研究の意義はきわめて大きいものと考えた。

MENS のメカニズムについては、ATP の生成増加によるアミノ酸の能動輸送、タンパク質合成促進がその要因とされているが、未だ詳細は明らかでなく、今後さらなる検証が必要である。

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 2 件)

Tatsuto Ito, Hiroto Fujiya, Katsumasa Goto, Yuji Ogura, Mitsuyasu Kurosaka, Kanaka Yatabe, Satoshi Kishiro, Atsuhiko Yoshida, Hirotaka Yoshioka, Koh Terauchi, Moroe Beppu, Toshiya Funabashi, Tatsuo Akema, Haruki Musha, Icing at early stage depresses skeletal muscle regeneration. Journal of St. Marianna University, 査読有, Vol. 4, 2013, pp. 61-67

Yoshitaka Ohno, Hiroto Fujiya, Ayumi Goto, Ayane Nakamura, Yuka Nishiura, Takao Sugiura, Yoshinobu Ohira, Toshitada Yoshioka, Katsumasa Goto, Microcurrent electrical nerve stimulation facilitates regrowth of mouse soleus, International Journal of Medical Science, 査読有, 10(10), 2013, pp1286-1294, DOI:10.7150/ijms.5985

[学会発表](計 2 件)

Hiroto Fujiya, Yuji Ogura, Yoshitaka Ohno, Ayumi Goto, Haruhito Aoki, Haruki Musha, Katsumasa Goto, Microcurrent electrical neuromuscular stimulation stimulates regenerative potential of injured skeletal muscle in mice, 34th Annual Meeting

International Gravitational
Physiology, 6/24/2013, Honokuni
Toyohashi Art Center (Toyohashi,
Aichi)

伊藤龍登、藤谷博人、後藤勝正、小倉裕
司、黒坂光寿、木城智、谷田部かなか、
別府諸兄、船橋利也、明間立雄、武者春
樹、損傷骨格筋に対するアイシングの影
響-損傷後のアイシングの時期による検
討-、第 28 回日本整形外科学会基礎学術
集会、2013 年 10 月 17 日、幕張メッセ(千
葉県千葉市)

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・准教授
研究者番号：50278008

(3)連携研究者

後藤 勝正 (GOTO KATSUMASA)
豊橋創造大学大学院・健康科学研究科・教
授
研究者番号：70239961

小倉 裕司 (OGURA YUJI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号：90509952