

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650337

研究課題名(和文)超音波を用いた筋損傷に対する新しい治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the new treatment for the muscle injury using ultrasonic stimulation

研究代表者

宮本 靖義(MIYAMOTO, Yasunori)

中部大学・医療技術実習センター・講師

研究者番号：00612665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、どのような超音波刺激が筋損傷からの回復を促進できるかどうかを検証した。8週齢のWistar系雄性ラットの前脛骨筋に対して、遠心性収縮による筋損傷を与え、その超音波刺激を与えた。筋損傷からの回復の評価には、機能的評価、組織学的評価、生化学的評価を用いた。その結果、超音波刺激を行うことで、足関節背屈トルクの回復と筋線維横断面積の回復が促進されることが分かった。また、超音波刺激を与えることで、筋衛星細胞の活性の指標であるMyoD、Myogeninタンパク質の発現量が増加することが分かった。以上のことから、超音波刺激は、筋損傷からの回復促進のための新しい治療法になると考える。

研究成果の概要(英文)：This research verified ultrasonic stimulation can promote recovery from muscle damage. We produced the model of injured rats is caused by eccentric contraction of anterior tibial muscle. The anterior tibial muscle was pulsed 10 minutes by ultrasonic stimulation. Functional evaluation, histological evaluation, and biochemical evaluation were used for evaluation of recovery from muscle damage. As a result, ultrasonic stimulation added 2 hours after eccentric contraction is effective in promoting recovery from injury. Moreover, the expression level of MyoD and Myogenin protein which are an active index of a satellite cell increases by ultrasonic stimulation. The examination suggested that an ultrasonic stimulus becomes a new treatment for the promotion of recovery from muscle damage.

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 発生・分化 ラット 細胞・組織 理学療法学

1. 研究開始当初の背景

筋損傷は、遠心性収縮のように不慣れな、高強度の運動を行うと生じると言われており、疼痛や筋力低下、関節可動域の低下などの機能障害を引き起こす要因となる。筋損傷からの回復を促進させることは、機能障害の低下を軽減し、日常生活やスポーツ活動への早期の復帰に重要である。超音波刺激には、組織の温度を上昇させる温熱作用と、非温熱作用がある。超音波の非温熱作用では、組織の温度上昇と関係のない多くの生理学的効果を有すると言われている。超音波刺激の非温熱作用に関する研究は、実験系モデルで、皮膚潰瘍、外科的皮膚切開創、腱損傷、骨折の治癒促進が報告されている。この治癒促進効果は、超音波によるマクロファージの反応性の増強、血流量の増加、細胞の増殖、タンパク質の合成促進が要因だと言われている。これらの変化は組織回復に不可欠な要因であるため、筋損傷への応用も十分に期待される。超音波の非温熱効果を検証するために、低強度超音波が用いられるが、近年、その低強度超音波が筋損傷からの回復を促進する効果があることが報告された。しかし、この研究では、超音波刺激の条件が種類しか行われておらず、筋損傷からの回復促進に効果的な超音波刺激の方法、量、期間は明らかにされていない。また、超音波による筋損傷からの回復促進のメカニズムについても十分な見解は得られていない。

2. 研究の目的

(1) 定量的な筋損傷量を持つモデル動物を用いて、筋損傷からの回復を促進するのに効果的な超音波刺激の方法、量、期間を、組織学的、生理学的手法を用いて定量的に評価する。

(2) 筋損傷からの回復促進に最も効果的な超音波刺激条件を用いて、超音波によってマクロファージや筋衛星細胞などがどのような影響を受けるのかを組織学的、生化学的に評価し、超音波による筋損傷からの回復促進効果のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 定量的な筋損傷量を持つモデル動物を用いて、超音波刺激による筋損傷からの回復促進効果を組織学的、生理学的手法を用いて定量的に評価した。

筋損傷モデルの作製方法

麻酔下にて、ラット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、足関節背屈筋群の最大収縮力が発揮される条件の電気刺激を行い、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。遠心性収縮時の角速度は 200 deg/sec、足関節の運動範囲は 90 deg、運動回数は 10 回を 5 セットとし、セット間を 1 分とした。この方法で定量的な筋損傷モデルが作製できることは確認済みである。

性収縮時の角速度は 200 deg/sec、足関節の運動範囲は 90 deg、運動回数は 10 回を 5 セットとし、セット間を 1 分とした。この方法で定量的な筋損傷モデルが作製できることは確認済みである。

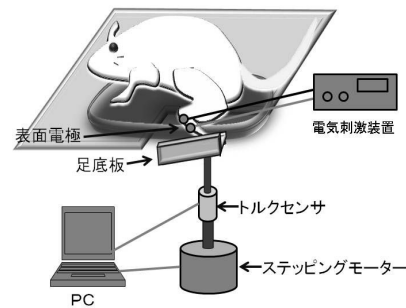


図1. 小動物用足関節運動装置の概要。ステッピングモーターの回転によって、様々な条件の関節運動ができる。電気刺激によって筋を収縮させながら、関節運動を行うことで遠心性収縮ができる。また、トルクセンサで関節トルクを計測することで、関節運動の力を制御できる。

超音波刺激の方法

麻酔下にて、ラットの下腿を固定して、超音波刺激装置のプロープ中心が下腿長の中点に当たるように固定した。超音波刺激は、周波数が 3MHz、照射様式が間歇的照射、照射出力強度 0.5 W/cm²、照射時間が 10 分間とした。実験期間を 21 日間とし、超音波刺激を、筋損傷直後 2 時間後に 1 回のみ、筋損傷 24 時間後に 1 回のみ、筋損傷 24 時間後から 1 日おきに行う群を作製した。

生理学的评价

麻酔下にて、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最大足関節背屈トルクを、筋損傷から 21 日目まで経時的に測定した。

組織学的評価

筋損傷から 21 日目に、麻酔下にて前脛骨筋を採取し、凍結横断切片を作製し Dystrophin の免疫染色を行い筋線維横断面積の計測を行い、筋損傷からの回復を定量的に評価した。

(2) (1) の研究で明らかになった筋損傷からの回復を促進できる条件の超音波刺激によって筋衛星細胞が活性化するのかわかを生化学的に評価した。

筋損傷モデルの作製方法

麻酔下にて、ラット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、足関節背屈筋群の最大収縮力が発揮される条件

の電気刺激を行い、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。遠心性収縮時の角速度は 200 deg/sec、足関節の運動範囲は 90 deg、運動回数は 10 回を 5 セットとし、セット間を 1 分とした。

超音波刺激の方法

超音波刺激は、周波数が 3MHz、照射様式が間歇的照射、照射出力強度 0.5 W/cm²、照射時間が 10 分間とし、筋損傷 24 時間後に 1 回のみ行った。

生化学的評価

筋分化調節因子である MyoD、Myogenin、の発現量をウェスタンブロット法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 定量的な筋損傷量を持つモデル動物を用いて、筋損傷からの回復を促進するのに効果的な超音波刺激の方法を、組織学的、生理学的手法を用いて定量的に評価した。

遠心性収縮を行ったすべての群で 2 日後の最大足関節背屈トルクは、遠心性収縮前に比べ約 25-30%に低下した。その後、遠心性収縮のみ行った群 (EC 群) の足関節背屈トルクは、徐々に回復し、遠心性収縮後 21 日目で、遠心性収縮前の約 106%まで回復した。一方、遠心性収縮 2 時間後 (EC+US 群) 24 時間後 (EC+US1 回 24h 群) に超音波刺激を行った群は、経過とともに徐々に回復し、遠心性収縮 21 日目で、遠心性収縮前に比べ各々約 123%、121%まで回復した。超音波刺激を遠心性収縮 24 時間後から 1 日おきに行った群 (EC+US1 日おき群) では、遠心性収縮 21 日目で、遠心性収縮前に比べ 116%まで回復した (図 2)。この結果から、超音波刺激は、筋損傷により低下した筋力の回復を促進することが考えられた。

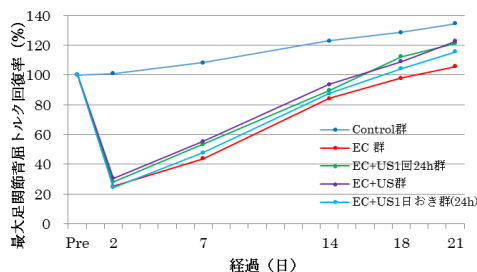


図 2. 最大足関節背屈トルクの回復率
各群の遠心性収縮前を 100%としたときの、遠心性収縮後の最大足関節背屈トルクを変化を示したグラフである。

遠心性収縮のみ行った群 (EC 群) の 21 日後の筋線維横断面積は、遠心性収縮を行っていない群 (Control 群) に比べ有意に小さかった。一方、遠心性収縮 2 時間後に超音波刺激を行った群の遠心性収縮後 21 日後の筋線維横断面積は、Control 群と有意な差はなかった (図 3)。この結果から、超音波刺激は、筋線維横断面積の回復を促進することが考えられた。

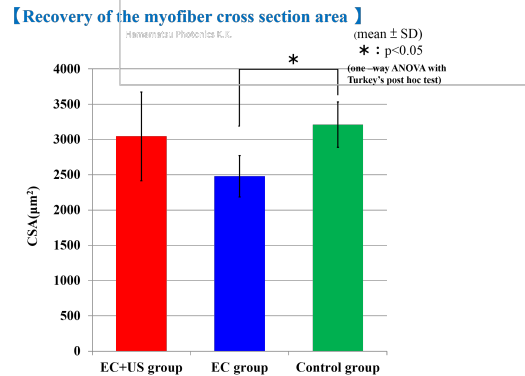


図 3. 筋線維横断面積
遠心性収縮 21 日後の各群の筋線維横断面積を示す (平均 ± 標準偏差)。

(2) 超音波刺激によって筋衛星細胞がどのような影響を受けるのかを生化学的に評価した。

遠心性収縮のみを行った群の MyoD タンパク質発現量は、遠心性収縮 12 時間後では 1.6 倍、24 時間後では、2.8 倍、48 時間後では 1.5 倍となった。一方、超音波刺激を行った群の MyoD タンパク質発現量は、遠心性収縮 12 時間後では 5.6 倍、24 時間後では 6.6 倍、48 時間後では、3.2 倍となった。以上のことから、遠心性収縮による筋損傷後に行う超音波刺激は MyoD タンパク質の発現量を増加させる効果があることがわかった (図 4)。

遠心性収縮のみを行った群の Myogenin タンパク質発現量は、遠心性収縮 12 時間後では 1.2 倍、24 時間後では 1.5 倍、48 時間後では 1.2 倍となった。一方、超音波刺激を行った群の Myogenin タンパク質発現量は、遠心性収縮 12 時間後では 1.7 倍、24 時間後では 1.9 倍、48 時間後では 1.4 倍となった。以上のことから、遠心性収縮による筋損傷後に行う超音波刺激は Myogenin タンパク質の発現量を増加させる効果があることがわかった (図 4)。

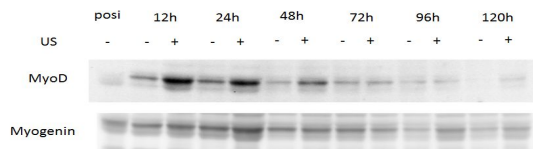


図 4 . MyoD、Myogenin タンパク質の発現量の変化

各群の遠心性収縮後の時間経過と MyoD、Myogenin タンパク質の発現量の変化をウェスタン・プロット法を用いて評価した。

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)

[学会発表] (計 2 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、縣信秀、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, 名古屋, 愛知

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 靖義 (MIYAMOTO, Yasunori)
 中部大学・医療技術実習センター・講師
 研究者番号 : 00612665

(2) 研究分担者

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