

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01632

研究課題名(和文) 微弱電流と高気圧酸素の併用による骨格筋損傷の修復促進効果

研究課題名(英文) effect of combination microcurrent electrical neuromuscular stimulation and hyperbaric oxygen therapy on the regeneration of injured skeletal muscle

研究代表者

藤谷 博人 (Fujiya, Hiroto)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：50278008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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、骨格筋損傷の治癒促進に有用とされている微弱電流、および高気圧酸素を併用することにより、それぞれの単独よりも筋再生がさらに促進されるかについて検討した。治療介入後2週において、筋線維断面積、および筋線維の断面積増加率は有意に増大することが認められ、その結果、微弱電流と高気圧酸素の併用は、微弱電流あるいは高気圧酸素単独に比べ、骨格筋損傷の修復をさらに促進させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated, in an animal model of skeletal muscle injury, whether microcurrent electrical neuromuscular stimulation (MENS) and hyperbaric oxygen therapy (HBO) used in combination (MENS and HBO) enhances the restorative benefits conferred by these treatments alone. Two weeks after the treatment, both the mean fiber cross-sectional area (CSA) and percentage increase in the fiber CSA were significantly greater by the combination therapy. Our data indicate that combination MENS and HBO therapy enhances regeneration of injured skeletal muscle more than these treatments alone.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：微弱電流 高気圧酸素 骨格筋損傷 再生

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋損傷はスポーツ外傷の中で比較的頻度が高く、競技復帰には長期間を要することが多いことから、可能な限り早い復帰を渴望するスポーツ選手にとっては深刻な問題となっている。一般に、骨格筋損傷の治療は安静加療が標準的な手法とされているが、近年一部のアスリートの間で、局所への微弱電流刺激により競技復帰が早くなることが経験されている。微弱電流は50~1000 $\mu$ Aの非常に弱い直流電流であるが、最近、研究代表者は、マウス骨格筋損傷モデルを用いて、微弱電流刺激が筋衛星細胞の活性化を促し、筋重量の増加、筋線維断面積の増加、筋衛星細胞数/全核数比の増加)が有意にみられたことから、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, 2015)。

一方、骨格筋損傷を修復促進させる他の方法として高気圧酸素療法が最近注目されている(James, 1993、柳下, 2010、Horie, 2014)。高気圧酸素療法は、2絶対気圧(ATA)以上の高気圧環境下で100%酸素を投与する方法(Grim, 1990)であり、その安全な実施方法(2~2.8気圧、60~90分間)も確立されている(柳下, 2010)。骨格筋損傷モデルを用いた先行研究では、損傷骨格筋の病理学的な早期回復(Best, 1998)、再生筋線維面積、および筋張力の回復促進(Gregorevic, 2000)、そしてMyoD、myogenin、IGF-1のmRNA発現の増加(Horie, 2014)が認められており、最近では一部の施設において実際に臨床応用されてきている(井上, 2009)。

これら「微弱電流刺激」、および「高気圧酸素療法」における修復促進のメカニズムについては必ずしも明らかでないが、微弱電流はATPの合成能の増加(Cheng, 1982、宮崎, 2009)が、そして高気圧酸素は血中溶解型酸素の増加(堀江, 2014、Grim, 1990)が、それ

ぞれ関与するとされている。したがってこれらのことから考えると、骨格筋損傷に対し、微弱電流と高気圧酸素を併用することによって、その異なる作用機序から、微弱電流単独よりもさらに早い修復促進効果が生じることが期待できる。生体の組織損傷の修復をどこまで早められるかを検証することは大変興味深いだが、このような異なる修復促進の手法を組み合わせるその相乗効果を検証した先行研究はみられない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、微弱電流と近年その有効性が注目されている高気圧酸素を併用することで、微弱電流単独よりもさらに骨格筋損傷の修復が促進されるかを検証することである。本研究結果により、微弱電流、あるいは高気圧酸素の単独使用よりも、両者の併用の方が、さらに治癒を早めることが判明すれば、スポーツ現場の実情に即した画期的な新しい治療手技として確立できる。

## 3. 研究の方法

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・承認(承認番号:1508002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。

生後7週齢、雄性マウス(C57BL/6J)48匹を用い、筋損傷(X)群、筋損傷後に微弱電流のみ行う(XM)群、筋損傷後に高気圧酸素のみ行う(XH)群、筋損傷後に微弱電流+高気圧酸素を行う(XMH)群、の4群に分類した(各群n=12)。各群の前脛骨筋:TAにcardiotoxin:CTX(0.01mM, 0.1ml)を注射し、骨格筋損傷モデルを作製した。

XM群およびXMH群は、麻酔下で微弱電流発生機器(トリオ300、(株)伊藤超短波、東京)(図1)にて微弱電流刺激(10 $\mu$ A、0.3Hz、

200msec)を週3回行った(各回、XM群:60分、XMH群:60分)。

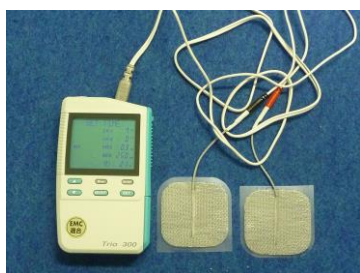


図1. 微弱電流発生機器

XH群およびXMH群は麻酔下で、小動物用高気圧チャンバー(P-5100S、(株)パロテックハニユウダ、東京)(図2)にて高気圧酸素(2.5ATA、100%酸素)環境下で各々30分間放置した。



図2. 小動物用高気圧チャンバー

処置後1週、2週の時点で各群とも6匹ずつを検体に供し、TAを採取して筋湿重量の測定を行った。その後、各検体は液体窒素と冷却イソペンタンにて急速凍結させ、厚さ $8\mu\text{m}$ の連続凍結切片を作製し $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存し、HE染色を行った。評価項目は、①筋湿重量、②病理学的所見、③筋線維の断面積、④筋線維の断面積増加率とした。

なお統計学的検討には、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%にて統計学的に有意差有りとした( $p<0.05$ )。

#### 4. 研究成果

本研究結果において、処置後2週の筋線維断面積では、XMH群はX群よりも有意に大きく、またXM群、あるいはXH群よりも大きい傾向が示された。

#### (1) 微弱電流単独の影響

先行研究においては、微弱電流は骨格筋損傷にて、その筋再生に中心的な役割も持つ筋衛星細胞の増殖を活性化し、タンパク質合成を刺激するものとされている。今回、筋湿重量では差は認められなかったものの、筋線維の断面積、筋線維の断面積増加率については、微弱電流単独の刺激にてそれぞれ123%、118%と大きくなる傾向が認められた(vs X群)。また図3の如く病理組織像では、1週の時点でX群に比べXM群では、炎症性細胞浸潤が消退し、中心核を有する筋線維が増加しており、微弱電流にて筋修復が促進していることが示された。

#### (2) 高気圧酸素単独の影響

一方、高気圧酸素は、過去の報告においては損傷組織内の酸素レベルを高くすることで組織修復を促し、骨格筋においては筋衛星細胞を活性化させるとされている。本研究において、高気圧酸素単独の影響は、筋湿重量においては特に差はみられなかったが、筋線維の断面積、筋線維の断面積増加率においては、高気圧酸素単独でそれぞれ120%、119%と増加傾向が観察された(vs X群)。また病理組織像(図3)では、1週においてX群に比べXH群では炎症性細胞浸潤の減少、中心核を有する筋線維の増加が認められており、高気圧酸素により筋修復が促進したものと考えられた。

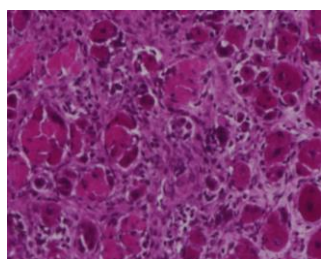
#### (3) 微弱電流と高気圧酸素の併用の影響

微弱電流と高気圧酸素を併用(XMH群)すると、筋湿重量では差は認められなかったものの、2週において筋線維断面積、筋線維の断面積増加率は有意( $p<0.05$ )に増加した(vs X群)。また病理組織像(図3)においても、X群に比べXMH群では、炎症性細胞浸潤の著明な減少、中心核を有する筋線維の増加が認められた。したがってこの両者の併用は、微弱電流単独、

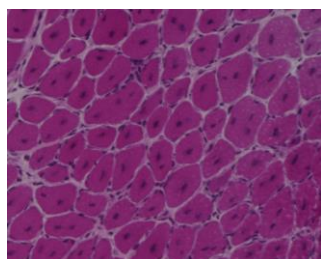
あるいは高気圧酸素単独よりも、より筋修復が促進した可能性が示された。

#### (4) 結論

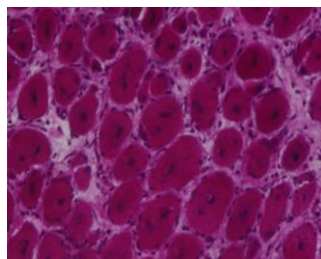
微弱電流、および高気圧酸素には先行研究と同様に骨格筋損傷の再生を促進させる傾向が認められた。また微弱電流と高気圧酸素を併用すると、微弱電流、あるいは高気圧酸素の単独使用よりも、骨格筋損傷の修復をさらに促進させることが明らかとなった。



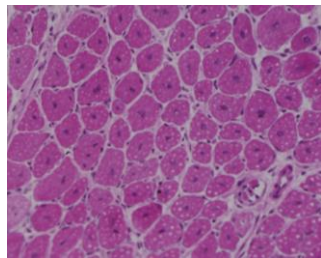
X 群



XM 群



XH 群



XMH 群

図 3. 処置後 1 週の病理組織像

#### 〈引用文献〉

- ① Fujiya H, Ogura Y, Ohno Y, Goto A, Nakamura A, Ohashi K, Uematsu D, Aoki H, Musha H, Goto K. Microcurrent electrical neuromuscular stimulation

facilitates regeneration of injured skeletal muscle in mice. Journal of Sports Science and Medicine, 14, 2015, 297-303

- ② Yoshida A, Fujiya H, Goto K, Kurosaka M, Ogura Y, Yatabe K, Yoshioka H, Terauchi K, Funabashi T, Akema T, Niki H, Musha H. Regeneration of injured tibialis anterior muscle in mice in response to microcurrent electrical neuromuscular stimulation with or without icing. Journal of St. Marianna University, 6, 2015, 57-67

#### 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 1 件)

- ① Takaaki Kudo, Hiroto Fujiya, Katsumasa Goto, Mitsutoshi Kurosaka, Yuji Ogura, Kanaka Yatabe, Mahiro Ohno, Hajime Kobayashi, Hisateru Niki, Haruki Musha, Effect of combination microcurrent electrical neuromuscular stimulation and hyperbaric oxygen therapy on the regeneration of injured skeletal muscle in mice. Journal of St. Marianna University, 査読有, 8, 2017, pp. 1-8 <http://www.jssm.org>

〔学会発表〕 (計 1 件)

- ① 工藤貴章、藤谷博人、後藤勝正、黒坂光寿、小倉裕司、谷田部かなか、大野真弘、小林創、船橋利也、幸田和久、仁木久照、武者春樹、微弱電流刺激と高気圧酸素療法の併用による骨格筋損傷の修復促進効果、第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017 年

#### 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・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

黒坂 光寿 (KUROSAKA, Mitsutoshi)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40553970