

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500789

研究課題名(和文)筋損傷後のアイシングや温熱負荷がその回復過程に及ぼす影響の比較検討

研究課題名(英文) Effects of different stimulus temperature on the regeneration of injured soleus muscles in rats

研究代表者

杉浦 崇夫 (SUGIURA, TAKAO)

山口大学・教育学部・教授

研究者番号：80136150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、筋損傷後のアイシング、温熱負荷およびそれらの組み合わせが、損傷後の筋再生にどのような影響を及ぼすのかについて、ラットヒラメ筋に筋損傷を誘発し検討した。

その結果、アイシングおよびアイシングと温熱刺激の組み合わせは、筋損傷からの量的な回復には影響を与えないが、温熱刺激は筋量・筋タンパク質量の回復を促進し、さらには成熟骨格筋では観察されない発達型MHCの消失を早める可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was investigated to clarify the effects of icing and/or heat stress on the regeneration of injured rat soleus muscle by bupivacaine injection (BPVC).

Icing immediately after muscle injury delayed the timing of the decrease in the injury-related increase in the expression of transforming growth factor- and accelerated the injury-related collagen deposition. Intermittent heat stress during the regeneration after injury enhanced the expression of CD68 and the number of Pax7-positive satellite cells at 3 or 7 days after injury, and inhibited the injury-related collagen deposition. Further, icing and intermittent heat stress after icing tended to retard the disappearance of embryonic and neonatal myosin heavy chain isoforms. These results strongly suggest that heat stress may be a beneficial treatment for injured skeletal muscle.

研究分野：運動生化学

キーワード：筋損傷 筋再生 温熱刺激 アイシング 筋衛生細胞 ミオシン重鎖 膠原線維

## 1. 研究開始当初の背景

スポーツ現場では、一般的に筋損傷後の処置として、RICE (resting 安静, icing 冷却, compression 圧迫, elevation 挙上) が原則として行われている。その後、急性期の炎症反応が沈静化した後、温熱療法や運動療法などにより患部血流を増加させることで筋再生を促す。

これまで、筋損傷後のアイシングの効果について、ラット長指伸筋 (EDL) を物理的に挫滅後、20分間のアイスパックによるアイシングを施した場合、筋再生に関与する食細胞であるマクロファージ、筋成長因子であるトランスフォーミング増殖因子β (TGF-β) あるいはインスリン様成長因子の発現はアイシングを施さないEDLよりも1日~2日遅延し、その結果受傷後28日目の筋線維横断面積が低値を示すことが報告されている (Takagi et al. 2011)。

これに対し、ラットヒラメ筋 (SOL) をブピバカイン (BPVC) により損傷し、その後48時間から後肢を42℃の温水に30分間、1日おきに浸水することにより衛星細胞が増加し、損傷2週間後では、温熱刺激を加えない損傷群よりも筋損傷の回復が促進することが示されている (Oishi et al. 2009)。このような筋損傷後の温度刺激についての検討に加え、近年、低体温で発現するコールドショックタンパク質と呼ばれる冷却誘導性RNA結合モチーフタンパク3 (RBM3) がタンパク合成やアポトーシスに関与することが報告された (Fedorov et al. 2008)。RBM3は筋管培養細胞において32℃、6時間で強く発現することが報告されている (Ferry et al. 2011)。このことから、低温刺激によってRBM3を発現させることにより、筋損傷後の再生過程に何らかの影響が及ぶのではないかと考えられるが明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究は、筋損傷後の処置として現在広く行われているアイシングに対し温熱負荷や体温よりもわずかに低い温度での処置が、損傷後の筋再生にどのような影響を及ぼすのか、また筋損傷3日後までのアイシングの後1日おきに温熱刺激を行う処置が、筋再生過程にどのような影響を及ぼすかについて、筋損傷後4週間にわたり比較検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 実験1:

8週齢のWistar系雄ラットを用い、ブピバカインにより損傷のみを施した損傷 (BPVC) 群、損傷後20分間のアイシング処置を行なうIce群 (Ice)、損傷後32℃の水浴を行なう32群 (32)、損傷後42℃の温浴を行なう42群 (Heat)、そして対照群 (Cont) に群分けし検討した。32群と42群には損傷後1日おきに、1回30分間の各刺激を14日後まで最

大7回の処置を行なった。そして、損傷3日後、7日後、15日後、28日後にラットを屠殺し、ヒラメ筋 (SOL) を摘出し検討した。

### 実験2:

8週齢のWistar系雄ラットを用い、対照群 (Cont)、損傷群 (BPVC)、損傷+アイシング群 (Ice)、損傷+熱ストレス群 (Heat)、損傷+アイシング+熱ストレス群 (I+H) の5群に群分けした。Ice群、I+H群には20分間のアイシングを損傷3日後まで毎日行った。Heat群には損傷2日後から、I+H群には損傷3日間のアイシングの後、最大14日後まで1日おきに42℃の温浴を30分間行った。損傷3日、7日、15日、28日後にラットを屠殺し検討した。

測定項目は体重、筋重量、相対筋重量、ウェスタンブロット法によるMyogenin発現量、MyoD発現量、Follistatin発現量、Myostatin発現量、IL-6発現量、TGF-β発現量、CD68発現量、Calcineurin発現量、PGC-1α発現量であった。また、免疫染色法により、Laminin、Pax7、DAPI染色により、基底膜、筋衛星細胞、筋核を、トリクロム染色により膠原線維面積を測定した。加えて、電気泳動法によりミオシン重鎖 (MHC) 分子種を測定した。

## 4. 研究成果

### 実験1:

- (1) 損傷4週後の相対ヒラメ筋重量は、BPVCとIce群ではCont群よりも有意に低い値であったが、Heat群では差は認められなかった。
- (2) 損傷後、Myogenin発現量およびMyoD発現量は損傷後3日で、Follistatin発現量は損傷後1週間まで高く、その後は時間の経過に伴い低い値であったのに対し、Myostatin発現量は損傷後1週間までは低く、その後は回復に伴い高い値であった。しかしこのような変化に対し、損傷後の異なる温度刺激による反応の違いは認められなかった。
- (3) IL-6発現量、TGF-β発現量は損傷3日後にピークを示し、その後損傷7日後以降ではそれよりも低い値を示したが、各処置群の間には有意差は認められなかった。これに対し、CD68発現量は、損傷3日後では、Ice群と比較してHeat群のCD68発現量は高い値を示す傾向にあった。
- (4) 回復4週ではBPVC群を除く全ての処置群で胎児型MHCは検出されず、Heat群においては新生児型MHCとMHC bは検出されなかった。
- (5) Ice群では筋衛星細胞の増殖や分化を遅延させること、またIce群と32群では膠原線維面積を増加させるのに対し、熱ストレスは膠原線維面積の増加を抑制する傾向にあった。

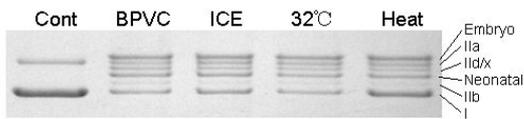


図 1. 筋損傷後の異なる温度刺激による損傷 1 週間後のラットヒラメ筋 MHC 分子種の泳動パターン

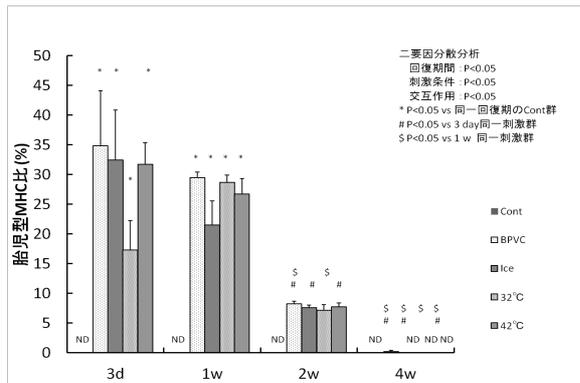


図 2. 筋損傷後の異なる温度刺激が回復過程における胎児型 MHC に及ぼす影響

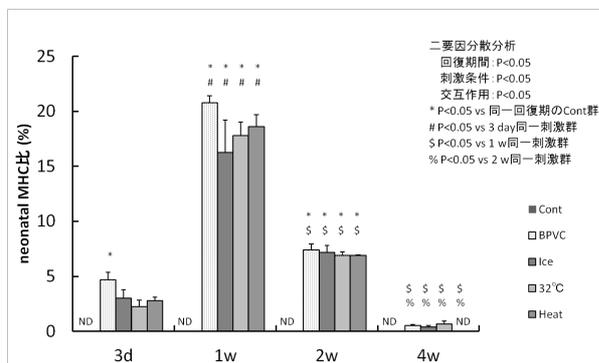


図 3. 筋損傷後の異なる温度刺激が回復過程における胎児型 MHC に及ぼす影響

#### 実験 2:

- (1) 相対筋重量、Calcineurin 発現量および PGC-1 $\alpha$  発現量は損傷によって減少し、回復に伴って増加したが、各処置群間に有意差は認められなかった。
- (2) 胎児型ミオシン重鎖分子種は、損傷 7 日後で BPVC 群と Heat 群が Ice 群より低値を示し、損傷 28 日後に Ice 群と I+H 群で検出されたが、BPVC 群と Heat 群では検出されなかった。
- (3) Heat 群の活性型ならびに分化筋衛星細胞数は、損傷 3 日後において他の処置群よりも有意に高い値を示した。
- (4) 膠原線維面積は、回復に伴い有意に高い値を示したが、各処置群間に有意差は認められなかった

以上の結果より、単回のアイシング、または複数回の冷温刺激およびアイシングと温熱刺激の組み合わせは、筋損傷からの量的な回復には影響を与えないが、温熱刺激は筋

量・筋タンパク質量の回復を促進し、さらには成熟骨格筋では観察されない胎児型や新生児型 MHC の消失を早める可能性が示唆された。しかしながら、本研究では先行研究で示されている、温熱刺激は損傷後の筋重量の回復を促進するのに対しアイシングは遅延させるという統計学的に有意な結果が得られなかったことから、刺激条件や損傷の方法などを含め今後さらに検討する必要がある。また、温熱刺激が胎児型や新生児型 MHC の消失を早めた機序についてこれらの発現に関与するシグナル伝達物質についても検討を加えていく必要があると考えられた。

#### 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)

[学会発表](計 5 件)

芝口 翼, 杉浦崇夫, 吉原利典, 内藤久士, 後藤勝正, 大平充宣, 吉岡利忠: 筋損傷後の異なる温度刺激が筋再生過程における筋線維組成の変化に及ぼす影響. 第 69 回日本体力医学会大会. 2014 年 9 月 19 日 ~ 21 日. 長崎大学, 長崎県長崎市.

杉浦崇夫, 芝口 翼, 吉原利典, 内藤久士, 後藤勝正, 吉岡利忠: 筋損傷後の回復過程におけるミオシン重鎖分子種に及ぼす異なる温度刺激の影響. 第 69 回日本体力医学会大会. 2014 年 9 月 19 日 ~ 21 日. 長崎大学, 長崎市長崎県長崎市.

杉浦 崇夫, 芝口 翼, 吉原 利典, 後藤 勝正, 内藤 久士, 吉岡 利忠: 筋損傷後の再生過程における温熱刺激がミオスタチン、フォリスタチン発現に及ぼす影響. 第 67 回日本体力医学会大会. 2014 年 9 月 14 日 ~ 16 日. 長良川国際会議場・岐阜都ホテル, 岐阜県岐阜市.

芝口 翼, 杉浦崇夫, 後藤勝正, 吉原利典, 内藤久士, 大平充宣, 吉岡利忠: 筋損傷後の異なる温度刺激がラットヒラメ筋再生過程に及ぼす影響. 第 22 回日本運動生理学会大会. 2014 年 7 月 19 日 ~ 20 日. 川崎医療福祉大学, 岡山県倉敷市.

杉浦崇夫, 芝口翼, 後藤勝正, 吉原利典, 内藤久士, 吉岡利忠: 刺激温度条件の違いが筋損傷後の再生過程の生化学的特性に及ぼす影響. 第 21 回日本運動生理学会大会. 2013 年 7 月 19 日 ~ 20 日. 東京国際大学, 埼玉県川越市.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 崇夫 (SUGIURA TAKAO)

山口大学・教育学部・教授  
研究者番号：80136150