

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19700437
 研究課題名（和文）サルコペニア対策としての熱刺激の有用性に関する実験的アプローチ
 研究課題名（英文）Heat stress prevents disuse muscle atrophy and sarcopenia in rat

研究代表者
 中野 治郎（NAKANO JIRO）
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：20380834

研究成果の概要（和文）：今回、サルコペニアの予防対策として熱刺激が有用であるかどうかを明らかにする目的に、廃用性筋萎縮を起こした加齢ラット（60週齢）に下半身の温水浴を行った。その結果、熱刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果が得られ、熱刺激はサルコペニアの予防対策として有用である可能性が示唆された。ただ、温水浴だけでは十分な効果を得られにくく、運動を併用することが効果的であると思われた。

研究成果の概要（英文）：This study examined the effect of heat stress on the prevention of disuse muscle atrophy, sarcopenia, in rat muscles with 7 and 60 weeks of age. The effect of heat stress on prevention of disuse muscle atrophy was detected. Thus, heat stress could be effective for the prevention of sarcopenia. However, the effect is not enough only in heat stress. It seemed that it is effective to use heat stress and exercise together.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	540,000	3,340,000

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：理学療法学

1. 研究開始当初の背景

高齢者では健全な生活を営んでいる者でも体重が減り、筋力の衰え、体力の低下がある。このような加齢に伴う筋肉の喪失は近年、「サルコペニア（骨格筋減少症）」としてまとめられ、その概念と病態が整理されはじめている。サルコペニアは高齢者の自立生活に大きな影響を及ぼしており、その予防対策は

高齢社会となった本邦において重要な課題となっている。

一方、高齢者が疾病や外傷などにより安静臥床や不活動状態を強いられた時、急激な筋活動の低下に伴い廃用性筋萎縮が発生し、これはサルコペニアの進展を加速する因子と考えられる。この廃用性筋萎縮をいかに予防し、できるだけ早期に回復させ得るかがサル

コペニアの進展を抑える意味で重要であり、その予防・治療法としてはレジスタンストレーニングなどの運動負荷法が提唱されている。しかし、高齢障害者に対してこのような方法を早期から適用することが困難な場合も多く、廃用性筋萎縮の予防方法としては運動負荷以外の方法の開発が求められている。

2. 研究の目的

近年、運動負荷以外の廃用性筋萎縮の治療方法として注目されているのが熱刺激を用いた方法で、このメカニズムには、熱刺激によって筋細胞内に発現する Heat Shock Protein70 (HSP70) と呼ばれるストレスタンパク質の分子シャペロンとしての働きが関与しているといわれている。

これまで、我々も HSP70 の分子シャペロン作用に着目し、熱刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果を組織化学的、生化学的に検討してきた。具体的には、後肢懸垂法の進行過程において毎日 60 分間、約 42 度の温水に下肢全体を浸漬したラットは、後肢懸垂法のみを行ったラットと比較してヒラメ筋のタイプ I、タイプ II 線維の筋線維萎縮の進行が抑制され、同筋における HSP70 発現量の増加を認めたことを報告した。

一方、これまでの先行研究を参考にすると、熱刺激はサルコペニアの関連因子である廃用性筋萎縮の進行、酸化ストレス、炎症性サイトカインを抑制しうると推測され、特に高齢障害者のサルコペニア対策として利用できる可能性がある。しかし、これまでの報告は若齢ラットを対象とした実験や *in vitro* 実験がほとんどで、熱刺激の効果に対する加齢の影響に関する基礎データが示されておらず、サルコペニア対策としての熱刺激の有用性は明らかにされていない。

そこで本研究では、熱刺激による廃用性筋萎縮の進行、酸化ストレス、炎症性サイトカインの抑制効果、ならびにそれに対する加齢の影響を組織化学的・生化学的に明らかにし、サルコペニア対策としての熱刺激の有用性を示すことである。

3. 研究の方法

今回の実験は、長崎大学動物実験委員会に実験計画書を提出し承認を受けた後（承認番号：第 0406210365 号）、同委員会が定める動物実験指針に基づき長崎大学先導生命科学研究所支援センター・動物実験施設において実施した。

1) 実験 I：熱刺激が若齢ラットおよび老齢ラットの廃用性筋萎縮の進行および酸化ストレスに及ぼす影響

①実験動物ならびに実験プロトコル

実験動物には 7 週齢の Wistar 系雄性ラット

(若齢ラット) 18 匹と 60 週齢の Wistar 系雄性ラット (加齢ラット) 18 匹を用い、若齢・加齢ラットそれぞれを無処置のまま通常飼育する対照群 6 匹と実験群 12 匹に無作為に振り分けた。実験群の各ラットは、下肢骨格筋に廃用性筋萎縮を惹起させることを目的に両側足関節を最大底屈位の状態でギプス固定し、足関節底屈筋群を弛緩位で不動化した。実験群はさらに固定のみの群 (以下、固定群) 6 匹とギプス固定の過程で熱刺激を負荷する群 (固定+熱刺激群) 6 匹に振り分けた。ギプス固定は 2 週間継続して行い、ギプスの緩みや浮腫が発生した際には適宜ギプスを巻き替えた。なお、ギプス固定中のラットは前肢にて飼育ケージ内を移動でき、餌と水は自由摂取とした。

②熱刺激の方法

固定+熱刺激群のラットは、腹腔内にペントバルビタールナトリウム (40mg/kg) を投与することで麻酔を行い、約 42°C に設定した温水浴内に 60 分間、後肢全体を浸漬することで熱刺激を負荷した。その頻度は 3 日に 1 回とした。

③材料採取ならびに検索方法

実験期間終了後、全てのラットに前述した方法で麻酔を行った。その後、両側の腓腹筋内側頭 (以下、腓腹筋) ならびにヒラメ筋を採取し、筋湿重量を測定した後、以下の検索材料に供した。

a) 組織化学的検索

右側の試料は、トラガントガムに包埋後、液体窒素で冷却したイソペンタン液内で急速凍結し、クライオスタットを用いて 6μm 厚の連続横断切片を作製した。そして、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色、ミオシン ATPase 染色 (pH4.5) (pH10.5) を施し、腓腹筋をタイプ I・II A・II B 線維に、ヒラメ筋をタイプ I・II 線維に分別した。定量解析として、ミオシン ATPase 染色像は画像解析ソフトを用い、各タイプの筋線維直径を 1 筋につき各々 100 本以上計測した。

b) 生化学的検索

左側の筋試料は、その一部を細切りにしトリス緩衝液を加えてホモジェネートした。ホモジェネート後は、BCA Protein Assay キット (PIERCE) にて筋試料中のタンパク質濃度を 1mg/ml に調整した。そして Western Blot 法にて HSP70 と酸化ストレスマーカーとして CuZnSOD を検出した。検出したバンド像はスキャナーを用いてパーソナルコンピュータに取り込み、画像解析ソフト (Scion Image) にてその濃度を数値化し、若齢ラット、加齢ラットの対照群の各筋の平均値を 100% としてそれに対する各群の割合を算出した。

2) 実験 II：進行した廃用性筋萎縮に対する

熱刺激と荷重の影響

①実験動物ならびに実験プロトコル

実験動物は7週齢のWistar系雄ラット31匹で、これらを対照群5匹と実験群26匹に振り分けた。そして、実験群にはヒラメ筋に廃用性筋萎縮を惹起させる目的で後肢懸垂(HS)を2週間実施した、その時点でラットの一部は実験終了した(HSC群;n=5)。その後、実験群をさらに1) HSを継続して行う群、2) HSを継続して行う群(HS群;n=6)、3) HSを継続しつつ熱刺激のみを負荷する群(HS+H群;n=5)、4) HSを継続しつつ荷重刺激のみを負荷する群(HS+R群;n=5)、4) HSを継続しつつ熱刺激と荷重刺激の両者を負荷する群(HS+H+R群;n=5)に振り分けた。

②後肢懸垂(HS)法

尾部をテープで固定し、テープの背側にサルカンを付け、これをケージ上部に張った針金に取り付けた。そして、この実験処置によりラットの後肢を懸垂、無荷重状態とした。なお、実験期間中もラットは前肢にてケージ内を移動でき、水と餌は自由に摂取させた。

③熱刺激ならびに荷重刺激の方法

HS+H群、HS+H+R群の各ラットは、腹腔内にペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)を投与することで麻酔を行い、実験Iと同様な方法で熱刺激を負荷した。また、HS+R群、HS+H+R群の各ラットは、HSを解除した安静状態とすることで60分間、後肢に荷重刺激を加えた。熱刺激と荷重刺激の頻度はいずれも2日に1回とした。

④材料採取ならびに検索方法

実験期間終了後、全てのラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)を投与し、麻酔を行った後、両側ヒラメ筋を摘出した。そして、筋湿重量を測定し、右側ヒラメ筋は組織化学的分析に、左側ヒラメ筋は生化学的分析に供した。

a) 組織化学的分析

右側ヒラメ筋を筋のほぼ中央部で二分割し、実験Iと同様な方法でH&E染色、ミオシンATPase染色(pH 10.5)を施した。そして、定量解析として、筋線維直径を測定し、また壊死線維数と中心核数をカウントした。

b) 生化学的分析

実験Iと同様な方法でHSP70を検出し、定量解析した。

3) 実験III：低出力レーザーが廃用性筋萎縮の回復におよぼす影響

本研究を次ぎの展開に繋げる目的に、熱刺激と同じメカニズムにより筋萎縮の進行抑制効果が見込める低出力レーザーを用いて実験を行った。低出力レーザーは細胞内にHSP70を発現させるだけでなく、各成長因子の発現、毛細血管の新生、筋衛星細胞の活性化等を誘導することが可能と報告されてお

り、熱刺激と同じくサルコペニアに対する有用性が期待できる。

①実験動物ならびに実験プロトコル

7週齢のWistar系雄ラット10匹を1) 腓腹筋にレーザー照射する群(L群、n=5)、2) 2週間の後肢懸垂法により腓腹筋に廃用性筋萎縮を惹起させた後、通常飼育とし、同筋にレーザー照射する群(HS+L群、n=5)に振り分けた。レーザー照射は右側腓腹筋に対して行った(照射側)。

②レーザー照射の方法

レーザー照射は、細胞分裂の標識である5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU;40mg/kg)を腹腔内注射した1時間後、麻酔下で右側腓腹筋を覆う皮膚全体に1部位あたり3秒間、延べ3分間、Ga-Al-Asレーザー(MLD-2001、持田製薬)(波長830nm、出力60mW)を照射し、その実施期間は2週間、頻度は週5回とした。また、左側腓腹筋にはレーザー照射を行わず比較対照とした(非照射側)。なお、予備実験で今回のレーザー照射の透過性を調べた結果、皮膚下では約20mW、皮膚・腓腹筋下では約5mWのレーザー出力を感知した。

③材料採取ならびに検索方法

実験終了後、麻酔下で両側の腓腹筋内側頭を摘出し、凍結横断切片を作成した。そして、ATPase染色、alkaline phosphatase染色、BrdUに対する免疫組織化学的染色を施し、各タイプ筋線維直径、毛細血管数、筋細胞/筋衛星細胞のBrdU陽性核数を測定した。解析はタイプIIB線維のみで構成される浅層と、全筋線維タイプが混在する深層を区別して行った。また、筋試料の一部は浅層と深層に分割し、それぞれのHSP70の含有量をWestern Blot法により測定した。

4. 研究成果

1) 実験Iの結果

①腓腹筋の筋線維直径の比較

平均筋線維直径を比較すると、若齢ラット、加齢ラットともすべての筋線維タイプにおいて対照群に比べ固定群、固定+熱刺激群は有意に低値を示し、固定群と固定+熱刺激群を比較すると固定+熱刺激群が有意に高値を示した(図1) 図2)。

②ヒラメ筋の筋線維直径の比較

若齢ラットは各タイプとも対照群に比べ固定群ならびに固定+熱刺激群は有意に低値を示し、固定群と固定+熱刺激群を比較すると、固定+熱刺激群が有意に高値を示した(図3)。一方、加齢ラットは各タイプとも固定群と固定+熱刺激群は対照群に比べ有意に低値を示し、固定群と固定+熱刺激群の間には有意差は認められなかった(図4)。

③HSP70含有量の比較

若齢ラット、加齢ラットとも対照群と固

定群の間には有意差を認めないものの、固定+熱刺激群は他群に比べ有意に高値を示した。

2) 実験IIの結果

①ヒラメ筋の筋線維直径の比較

タイプI線維の各群を比較するとHS群、HS+H群、HS+R群、HS+H+R群はすべてHSC群より有意に低値を示した。また、HS+H+R群はHS群、HS+R群とHS+H群に比べ有意に大きく、HS+R群とHS+H群はHS群と有意差を認めなかった。また、タイプII線維の平均筋線維直径を比較するとHS群、HS+H

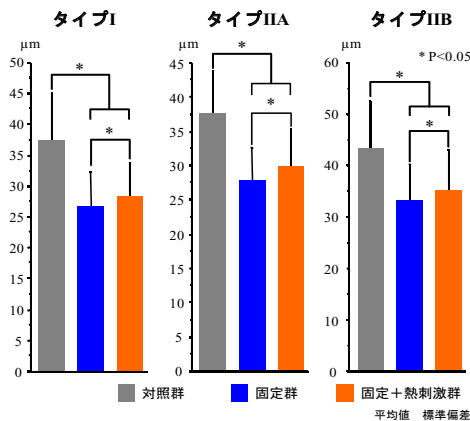


図1 腓腹筋の筋線維直径(若齢ラット)

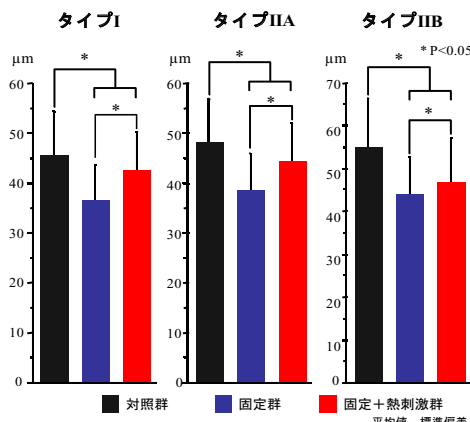


図2 腓腹筋の筋線維直径(加齢ラット)

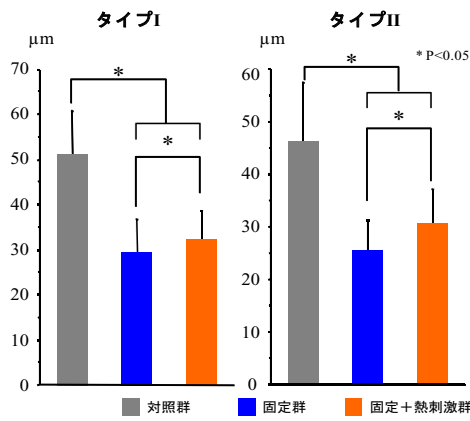
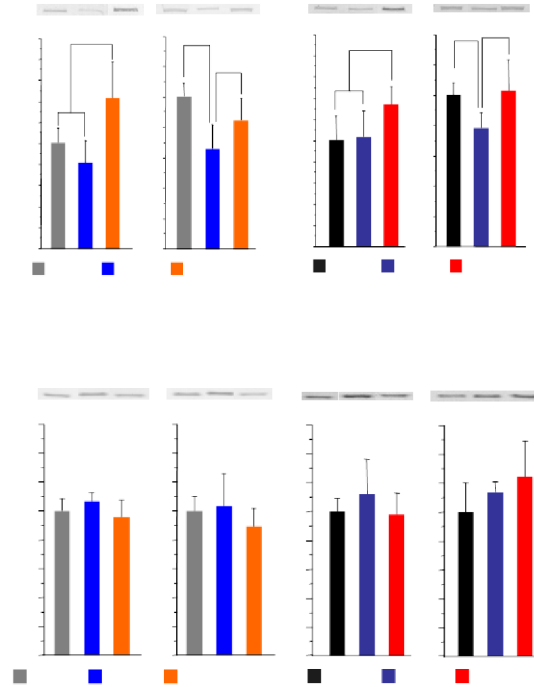


図3 ヒラメ筋の筋線維直径(若齢ラット)



群、HS+R群、HS+H+R群はすべてHSC群より有意に低値を示し、HS群よりHS+H+R群とHS+R群は有意に高値で、HS+H群はHS群と有意差を認めなかった(図6)。

②壊死線維と中心核線維の発生頻度

壊死線維の発生頻度は全ての群間に有意差は認められなかった。中心核線維の発生頻度はC群に比べHS+R群が有意に高値を示したが、HSC群、HS群、HS+H群、HS+H+R群はC群と有意差を認めなかった。

③Hsp70含有量

Hsp70の含有量は、対照群、HS群に比べHS+H+R群が有意に高値を示したが、HSC群、HS群、HS+H群、HS+R群は対照群と有意差を認めなかった(図7)。

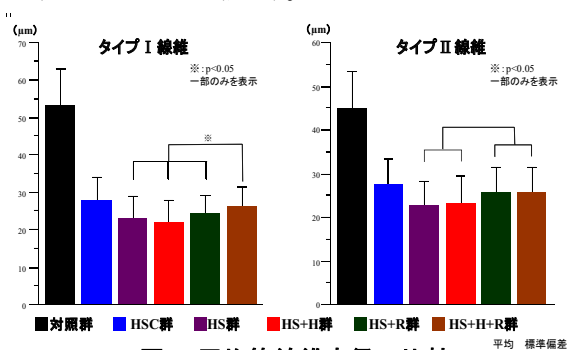
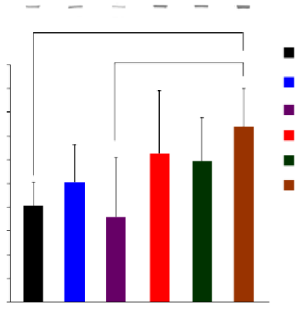


図6 平均筋線維直径の比較

3) 実験IIIの結果

①腓腹筋の筋線維直径の比較

L群の照射側と非照射側を比較すると、浅



層と深層の各筋線維タイプの平均筋線維直径には有意差はなかった。一方、HS+L 群の照射側と非照射側を比較すると、浅層と深層の各筋線維タイプの平均筋線維直径は照射側の方が有意に高値を示した (図 8)。

②腓腹筋の毛細血管の比較

L 群の照射側と非照射側を比較すると、浅層の毛細血管数は照射側の方が有意に高値を示したが、深層の毛細血管数には有意差はなかった。一方、HS+L 群の照射側と非照射側を比較すると、浅層のみで照射側の方が有意に高値を示した (図 9)。

③腓腹筋の BrdU 陽性核数の比較

L 群の照射側と非照射側を比較すると、浅層と深層の BrdU 陽性核数に有意差はなかった。HS+L 群の照射側と非照射側を比較すると、深層のみで照射側の方が有意に高値を示した (図 10)。

④HSP70 含有量

L 群、HS+L 群の照射側と非照射側を比較すると、HSP70 含有量は浅層、深層とも有意

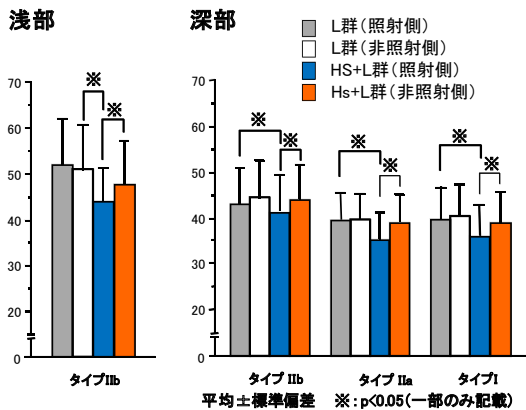


図8 平均筋線維直径の比較

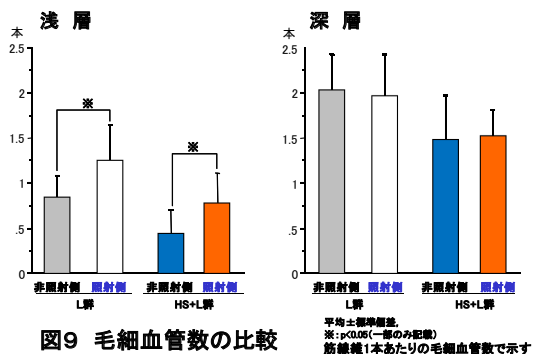


図9 毛細血管数の比較

差は認められなかった。

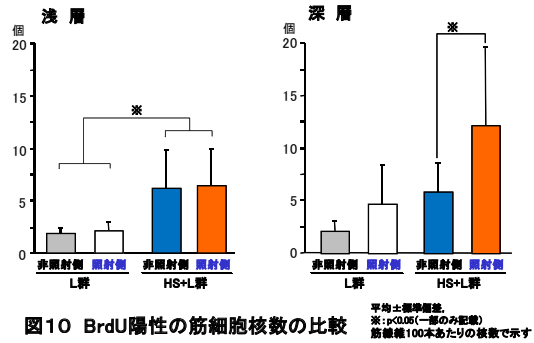


図10 BrdU陽性の筋細胞核数の比較

4) 考察

①実験 I の結果より

若齢ラットの結果から、熱刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果は、腓腹筋、ヒラメ筋ともに認められ、その背景には先行研究と同様に熱刺激により発現した HSP70 の作用がうかがわれた。一方、熱刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果は加齢ラットにおいても認められたものの、その効果の程度は筋の種類によって異なっていると推察された。この点に関しては、加齢に伴う筋線維タイプ構成比率の変化や筋線維直径の分布状況の変化が、腓腹筋とヒラメ筋で異なることが影響しているものと思われる。また、期待していた酸化ストレスに対する好影響は明らかには認められなかった。その原因としては、老齢モデルラットの加齢 (60 週齢) が不十分であったため、骨格筋において加齢 (サルコペニア) に伴う酸化ストレスが十分でなかったこと等が考えられる。したがって、100 週齢の加齢ラットを入手し、再度検討する課題が残された。

②実験 II の結果より

本実験は、あらかじめ廃用性筋萎縮を惹起させ、その状態で熱刺激、荷重を負荷し、廃用性筋萎縮の進行をくい止めることができるかどうかを探るために行った。つまり、実際の臨床では理学療法が開始された時点ですでに廃用性筋萎縮 (サルコペニア) は進行していることが予想され、その状況で熱刺激と荷重刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果をシミュレーションしたのである。また後肢懸垂により惹起された廃用性筋萎縮を疑似的な加齢骨格筋として捉えることもできると考えた。その結果、熱刺激、荷重刺激のみでは廃用性筋萎縮の進行を完全にくい止めることはできなかったが、熱刺激と荷重刺激を併用すれば、より効果的であることを明らかにした。また、今回行った熱刺激は、筋損傷といった悪影響を及ぼさないことを確認した。また、今回の廃用性筋萎縮を疑似的な加齢骨格筋と捉えると、実験の結果は熱刺激のみでは十分にサルコペニアを予防することができないことを示唆している。したがって、今後は低強度の運動刺激との併用効

果や、他の物理刺激で熱刺激より有用なものがないかどうかなどを検討する必要があると考えられた。

③実験Ⅲの結果より

本実験は、予備実験的に廃用性萎縮の回復過程におけるレーザー照射による介入効果を検討した。HS 解除後から通常飼育に移行した時、ラットが適度にケージ内を移動することにより骨格筋に運動刺激が負荷され、HSP70 の発現、筋衛星細胞、循環動態が活性化される。この状態でレーザー照射を行えば、筋衛星細胞の活動と循環動態がさらに促され、筋線維肥大効果が期待できると仮説したのである。その結果、仮説通り筋線維肥大の促進効果が得られたが、毛細血管の増加は浅層でのみ、筋衛星細胞の細胞分裂の促進は深部のみでしか認められず、HSP70 の発現・増加は確認されなかった。つまり、熱刺激の場合とメカニズムが異なると考えられる。今後、追加実験を行いサルコペニア対策としてのレーザー照射の有用性を追求する価値はあると判断された。

5) 結論

サルコペニア対策として熱刺激は有用である。しかし、その程度が十分でなく熱刺激のみでは実用性に欠けるため、荷重刺激、運動刺激との併用することにより有用性が高まるものと思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

- ①□Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, et al(3), Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rat. *Exp Physiol* 94: 1005-1015, 2009 (IF: 2.910)
- ②□Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Nakano J, et al(8), Immobilization-induced cartilage degeneration mediated through expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and chondromodulin-I, *Connect Tissue Res* 50: 37-45, 2009 (IF: 1.113)
- ③□Okita M, Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, et al(2), Effects of therapeutic ultrasound on joint mobility and collagen fibril arrangement in the endomysium of immobilized rat soleus muscle, *Ultrasound Med Biol* 35: 237-244, 2009 (IF: 2.395)
- ④□片岡英樹, 中野治郎, 坂本淳哉・他 5 名、温熱刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果について、*理学療法探求* 11: 15-21、2009
- ⑤□中野治郎, 沖田 実, 片岡英樹, 坂本淳哉, 温熱刺激による筋力増強, *理学療法* 24: 954-959, 2007

〔学会発表〕(計 20 件)

- ①□西川正悟, 片岡英樹, 坂本淳哉, 吉田奈央, 近藤康隆, 中野治郎・他 3 名、進行したラットヒラメ筋の廃用性筋萎縮に対して熱刺激と荷重を負荷すると、その後の進行を抑制できるか?、第 44 回日本理学療法学会大会、2009.5.28-30、東京
- ②□片岡英樹, 西川正悟, 中野治郎・他 6 名熱刺激によるラットヒラメ筋の廃用性筋萎縮の進行抑制効果 ミトコンドリアの酵素活性と Heat Shock Protein 60 の発現状況から、第 43 回日本理学療法学会大会、2008.5.15-17、福岡
- ③□西川正悟, 中野治郎・他 7 名、進行したラットヒラメ筋の廃用性筋萎縮に対する荷重と熱刺激の影響、理学療法の医学的基礎研究会第 13 回学術集会、2008.5.17、福岡
- ④□Nakano J, et al (5), Low-level laser irradiation promotes the recovery from disuse muscle atrophy in rats, 15th International Congress of the World Confederation for Physical Therapy, 2007.6.2-6, Vancouver Canada
- ⑤□中野治郎・他 4 名、廃用性筋萎縮に対する低出力レーザーの筋線維肥大効果—そのメカニズムについて生化学的解析から—第 42 回日本理学療法学会大会、2007.5.24-26、新潟

〔図書〕(計 3 件)

- ①□中野治郎、神陵文庫、物理療法の適応の多い病態の理解—炎症。In: 物理療法 第2版 (千住秀明 (監), 沖田 実 (編)), 2009、17
- ②□中野治郎、三輪書店、関節可動域制限 病態の理解と治療の考え方 (沖田 実編)、2008、44

〔その他〕

http://www.am.nagasaki-u.ac.jp/pt/basic_pt/index.html (研究室ホームページ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 治郎 (NAKANO JIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20380834

(2)研究協力者

片岡 秀樹 (KATAOKA HIDEKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・院生

坂本 淳哉 (SAKAMOTO JYUNYA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・院生

西川 正悟 (NISHIKAWA SHOGO)

長崎記念病院・理学療法士