

平成 21年 6月30日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700452

研究課題名（和文）：

熱刺激と身体運動を併用した新たな筋萎縮の治療法の開発に関する実験的研究

研究課題名（英文）：

An experimental study on the development of new therapy for treatment of muscle atrophy by using the combination of exercise and Heat stress.

研究代表者：坂野 裕洋（BANNO YASUHIRO） 星城大学リハビリテーション学部・助教

研究者番号：00351205

研究成果の概要（和文）：後肢ギプス固定モデルラットを用いて、再荷重前の熱刺激が再荷重による筋傷害に与える影響について検討した。ラットを対照群と実験群に分け、実験群は4週間ギプス固定し再荷重する再荷重群と、同様にギプス固定し熱刺激を行った後に再荷重する熱刺激群を設定した。検索時期は再荷重から0, 1, 3, 5日目とし、ヒラメ筋を採取してHeat Shock Protein (HSP) 70含有量と壊死線維数を計測した。HSP70含有量は0日目のみ熱刺激群が再荷重群より有意に高値を示した。壊死線維数は、全ての検索時期で対照群に比べ再荷重群と熱刺激群は有意に高値を示した。さらに、再荷重群と熱刺激群を比べると、3日目では熱刺激群が再荷重群より有意に低値を示し、5日目では熱刺激群が再荷重群より有意に高値を示した。再荷重前の熱刺激によって、再荷重時の骨格筋にHSP70が誘導され、再荷重から3日目の筋傷害が抑えられた。しかし、1度の熱刺激だけでは、長期的な筋傷害の予防効果は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to determine whether heat stress is preventive for muscle fiber injury induced by reloading after immobilization in rat soleus muscle. Forty-five male 8-week-old Wistar rats were used. Rats were divided randomly into control (C, n=15), immobilized followed by normal recovery (IR, n=15), and immobilized followed by heat stress before reloading (IH, n=15) groups. Bilateral ankles of each rat in the IR and IH groups were fixed in full planter flexion with a plaster cast for 4 weeks. Immediately after 4 weeks of immobilization, reloading was permitted in the IR group. Rats in the IH group were first exposed to heat stress (41 °C for 60 min) in an incubator under anesthesia 2 days before reloading. At 0, 1 and 3 days after reloading, both soleus muscles in all groups were excised for histopathological and biochemical analyses. Immediately after remobilization, Hsp70 levels were significantly increased in IH groups compared with IR groups. In 3 days after reloading, the number of necrotic muscle fibers was significantly increased in IR compared with IH groups. The present findings suggest that heat stress prior to reloading induces expression of Hsp70 and leads to protective effect against soleus muscle injury induced by reloading after immobilization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	360,000	2,660,000

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：物理療法学，筋萎縮，筋傷害，熱刺激

1. 研究開始当初の背景

近年の急速な高齢化社会の進展に伴い、リハビリテーション医療領域の対象疾患の多くも高齢化しており、疾病から起こる一次障害に加え、臥床や身体活動の減少に伴う二次的な廃用症候群、また老化に伴う退行性変化として起こる加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）をいかにして予防・治療していくかが、介助量の軽減や自宅復帰など、対象者の自立生活を大きく左右する。

そして、廃用症候群やサルコペニアの典型的な症状としてあげられるのが筋萎縮であり、これはすべての対象者に認められるといっても過言ではない。周知のごとく、筋萎縮は、臥床や骨折などによるギプス固定、あるいは微少重力環境の暴露、老化に伴う退行性変化などによって引き起こされ、その発生メカニズムは筋細胞構成タンパク質の合成抑制と分解亢進である。

つまり、筋萎縮を予防するためには骨格筋に対する負荷量や活動量を増加させ、タンパク質の合成を促すことにより、筋組織を構成する個々の筋線維の肥大と新たな筋線維の形成による筋肥大が必要であり、臨床場面において最も効果的な方法は重力環境下での

身体運動といわれている。

しかし、リハビリテーション医療領域の対象者には疾病の急性期やギプス固定中、心循環器系の疾患を合併しているなどの理由で重力環境下において積極的な身体運動が行えない場合も少なくなく、他の方法論の開発が早急に求められていた。

沖田らは、タンパク質の材料であるアミノ酸のポリペプチド鎖の伸張と正しい折り畳み、あるいは損傷したタンパク質の凝集抑制や変性したタンパク質を修復する機能を有する熱ショックタンパク質（Heat shock protein；以下、HSP）70に着目し、以下の実験結果を報告している。すなわち、ラット後肢を1週間懸垂し、ヒラメ筋に廃用性筋萎縮を惹起した結果、HSP70は正常に比べ顕著に減少するが、この後肢懸垂の過程で約42℃の温水浴や温熱プレートによる熱刺激をヒラメ筋に暴露するとHSP70は後肢懸垂のみを行った群より増加し、廃用性筋萎縮の進行も抑制できたとしている（沖田実・他：理学療法学 31：63-69, 2004. 片岡英樹，沖田実・他：理学療法学 31：331-336, 2004.）。

このように、動物実験の結果ではあるが、「熱」といった物理的刺激のみでも廃用性筋

萎縮を予防することが可能で、本法は上記に示した対象者にも十分適用できる手段と考えられる。

一方、一旦進行した筋萎縮を治療していくには、多くの時間と期間を費やさなければ効果が認められないのは事実である。ただ、現状の医療情勢では入院期間の短縮や医療費削減などの問題もあり、対象者に十分な治療時間・期間を提供できない。そのため、短期間で筋萎縮を回復させ得る方法論を検討する必要がある、本研究課題で着目しているものが上記に示した「熱」刺激で、これと身体運動を併用した手段を用いれば筋萎縮の早期回復が可能ではないかと考えている。

そして、この点に関して Goto らはラット後肢を5日間懸垂し、ヒラメ筋に廃用性筋萎縮を惹起した後に1時間、41°Cの全身温熱暴露を行ってから再荷重させた群は、単に再荷重のみを行った群よりヒラメ筋の重量やタンパク質量の回復は早く、10日後には正常な群と同程度まで回復したと報告している (J J Physiol 54: 285-293, 2004.)。しかし、後肢懸垂後の再荷重によってラットヒラメ筋には筋線維壊死や筋線維浮腫、マクロファージを主体とした単核細胞の浸潤といった筋傷害による炎症所見を疑わせる結果を得ている (図1)。

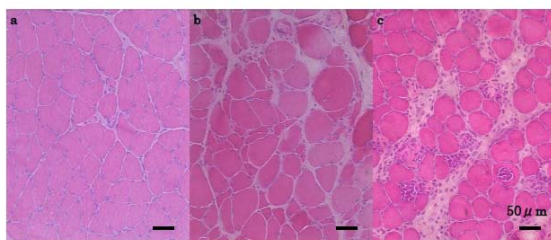


図1. 後肢懸垂、ギプス固定後の再荷重によるラットヒラメ筋の病理変化
a: 2週間の後肢懸垂直後, b: 2週間の後肢懸垂後の再荷重, c: 2週間のギプス固定後の再荷重

ただ、熱刺激によって筋細胞内に HSP70 を誘導しておけば骨格筋の虚血-再灌流によるミトコンドリア損傷を防いで細胞の壊死に対して有効であるとした報告や (Garramone RR Jr, et al., : Plast Reconstr Surg 93: 1242-1247, 1994.), HSP のファミリーで低分子の HSP25 や α B クリスタリン (α BC) といった small HSP を一旦運動によって高めておけば、遠心性収縮によって惹起される筋傷害を予防できるとした報告 (Koh TJ: Exerc Sport Sci Rev 30: 117-121, 2002.) もなされている。

つまり、廃用性筋萎縮の治療においては、過度な身体運動によって起こる筋傷害を予防しつつ、萎縮の早期回復を図ることが求められており、その意味でも「熱」刺激と身体運動を併用した方法が有効である可能性が高い。

2. 研究の目的

先にも述べたが、筋萎縮の治療においては、過度な身体運動によって起こる筋傷害を予防しつつ、萎縮の早期回復を図ることが求められる。しかし、現在、臨床で広く行われている筋力トレーニングの方法では負荷量や実施回数を過度に設定すると筋肉痛を惹起し、トレーニング自体が円滑に行えなかったり、逆に負荷量や実施回数の設定が少なすぎると筋力向上につながらなかったりする。

そこで、本研究課題では熱刺激に対する筋細胞応答に着目し、歩行運動を主体とした軽運動に熱刺激を併用した方法が筋萎縮の治療において安全、かつ有効に作用するのではないかとした仮説を動物実験モデルを用いて検証することが目的である。

3. 研究の方法

本研究課題に関連した実験 1 ~ 3 につい

では、星城大学研究倫理委員会に実験計画書を提出し、承認を受けた後（承認番号：2007D0001）に星城大学が定める動物実験指針に準じて実施した。

実験1. 温熱負荷による直腸温と筋温の変化に関する検討

今回の実験で用いる温熱負荷方法が直腸温と筋温に与える影響を確認する目的で実験1を行った。

A. 実験動物と温熱負荷方法

実験動物には8週齢の Wistar 系雄性ラット5匹（平均体重；260.8±4.9g）を用い、各ラットには腹腔内にペントバルビタールナトリウム（50mg/ml）を投与し、麻酔を行った。そして、Naitoら¹²⁾の報告を参考に約41°Cに設定した恒温槽内（ヤマト科学株式会社，Incubator IS600）に60分間各ラットを挿入し、全身温熱負荷を行った。

B. 直腸温と筋温の測定方法

直腸温プローブを各ラットの肛門より約3cm挿入し留置した。また、ニードルプローブを下腿後面の中央部に挿入し、脛骨の直上で留置した。そして、温熱負荷の開始前30分間と負荷中の60分間、ならびに終了後30分間の直腸温と下腿三頭筋の筋温を高精度熱電対温度計（UNIQUE MEDICAL 社，PTW-301）を用いて、2分30秒間隔で測定した。

実験2. 温熱負荷による Hsp70 の発現時期に関する検討

今回の実験では、ギプス固定が終了し再荷重を開始する時点において後肢骨格筋内に Hsp70 を強く発現させておいた方が、再荷重後の筋線維損傷の発生を軽減できるのではないかと考えた。そこで、温熱負荷後のラッ

トヒラメ筋において、最も Hsp70 が誘導される時期を確認し、温熱負荷時期を決定することを目的に実験2を行った。

A. 実験動物

実験動物には8週齢の Wistar 系雄性ラット55匹（平均体重；271.9±23.6g）を無処置の対照群5匹と実験群50匹に振り分けた。実験群の各ラットは後述する方法で温熱負荷を行った。

C. 温熱負荷方法

温熱負荷は、実験1と同様の方法で行った。すなわち、実験群の各ラットに対して、ペントバルビタールナトリウム（50mg/ml）の腹腔内投与を行い、麻酔下にて約41°Cに設定した恒温槽内に60分間ラットを挿入し、全身温熱負荷を行った。温熱負荷後は各検索時期まで通常飼育を行った。

D. 試料採取

検索時期は、温熱負荷終了直後の0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72時間後（各群5匹）とした。そして、各検索時期にはラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム（50mg/ml）を投与し、麻酔下にて両側ヒラメ筋を採取し、以下の検索に供した。

E. 生化学的検索

細切りした左側ヒラメ筋は適量の Tris buffer（10 mM Tris, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.6）を加えホモジュネートし、4°Cに設定した冷却遠心分離機を用い、遠心加速度12,000gの条件で15分間遠心分離を行い、上清を回収し、筋抽出液とした。そして、BCA Protein Assay Kit（PIERCE 社）を用いて筋抽出液内のタンパク質濃度を測定した後、各筋抽出液に2-mercaptoethanol 含有 Tris

buffer (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 15 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.6) を適量加えタンパク質濃度を $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整し、これを Western blot 法の試料とした。次に、試料と等量の SDS sample buffer を加え、 80°C で5分間熱処理した後、12.5%濃度の SDS ポリアクリルアミドゲルの各レーンに $20\mu\text{l}$ の試料および分子量マーカーをロードし、120Vの定電圧で2時間、電気泳動を行った。電気泳動後は、ニトロセルロース膜へ40Vの定電圧で70分間、転写を行い、転写後のニトロセルロース膜は5%スキムミルクによる非特異反応のブロッキングを室温で1時間行った。そして、一次抗体に抗マウス Hsp70 モノクロナール抗体 (Stressgen 社) を用い、 4°C の冷蔵庫内で一晩反応させ、洗滌後は二次抗体にペルオキシターゼ標識抗マウス IgG を用い、室温で2時間反応させ、洗滌した。その後は、ECL system (Amersham Bioscience 社) を用い、化学発光させ、X線フィルムに感光、現像し、Hsp70 のバンド画像を得た。

定量解析として、Hsp70 のバンド画像はスキャナーにてコンピューターに取り込み、画像解析ソフトウェア (Scion Image) を用い、その濃度を計測した。そして、対照群の平均値を100%とし、それに対する相対値 (%) を求めた。

F. 統計処理

統計処理には、対照群と各検索時期および各検索時期において有意差が存在するかどうかを一元配置分散分析 (以下、ANOVA) によって判定し、有意差を認めた場合は多重比較検定に Fisher の PLSD 法を適用し、各検索時期の有意差を判定した。なお、全ての統計手法とも有意水準は5%未満とした。

実験3. 事前の温熱負荷が再荷重によって起

こる筋線維損傷に与える予防効果に関する検討

4週間のラット後肢のギプス固定モデルを用いて、再荷重前の温熱負荷が再荷重後の筋線維損傷の発生を軽減できるかを検討する目的で以下の実験を行った。

A. 実験動物

実験動物は8週齢の Wistar 系雄性ラット76匹 (平均体重; $261.2\pm 16.3\text{g}$) で、これらを一無作為に無処置の対照群20匹と実験群56匹に振り分けた。実験群のラットは、通常飼育中に温熱負荷を行う群 (以下、温熱群; $n=19$) と後述する方法で両側足関節を最大底屈位で4週間ギプス固定し、ヒラメ筋を弛緩位の状態に不動化する群に無作為に振り分けた。さらに、ギプス固定にて不動化した群は、4週間のギプス固定終了後にギプスを除去し、再荷重を開始する群 (以下、再荷重群; $n=19$) と同期間ギプス固定を行い、ギプス固定が終了し再荷重を開始する前に温熱負荷を行う群 (以下、再荷重+温熱群; $n=18$) に無作為に振り分けた。

B. 足関節のギプス固定方法

実験群の各ラットは、ペントバルビタールナトリウム ($50\text{mg}/\text{ml}$) の腹腔内投与によって麻酔を行い、両側足関節を最大底屈位の状態に前足部から膝関節上部までギプス包帯にて固定し、ヒラメ筋を弛緩位に不動化した。その際、足指は浮腫の発生を確認するために露出させ、ギプスの緩みや浮腫の発生を確認した際には適宜巻き換えを行い、4週間継続してギプス固定を行った。なお、ギプス固定後もラットは前肢にて飼育ケージ内の移動は可能で、水と餌は自由に摂取させた。

C. 温熱負荷方法

本研究では、ギプス固定が終了し再荷重を開始する時点において後肢骨格筋内に HSP70 を強く発現させておいた方が、再荷重後の筋線維損傷の発生を軽減できるのではないかと考えた。そして、この点に関して実験 2 の結果より、ラットヒラメ筋内の HSP70 含有量は温熱負荷後 48 時間が最も高値であることを確認した。そこで、本研究ではこの結果を参考とし、4 週間のギプス固定期間終了の 48 時間前に温熱負荷を行うこととした。

温熱負荷は、温熱群および再荷重+温熱群の各ラットに対して行った。温熱群は、4 週間のギプス固定期間終了の 48 時間前にあたる実験開始から 26 日目に、再荷重+温熱群は、4 週間のギプス固定期間終了の 48 時間前にペントバルビタールナトリウム (50mg/ml) の腹腔内投与によって麻酔を行い、実験 1 と同様の方法で約 41°C に設定した恒温槽内に 60 分間ラットを挿入し、全身温熱負荷を行った。なお、再荷重+温熱群の各ラットは、両側足関節のギプスを除去した状態で行った。そして、温熱負荷後は、前述した方法で再度両側足関節のギプス固定を行い、飼育した。一方、麻酔による成長不良などの影響を考慮し、対照群、再荷重群にも同様に麻酔を行い、再荷重群は再荷重+温熱群と同時間ギプスを除去し、その後は再度ギプス固定を行った。

D 試料採取

検索時期は、4 週間のギプス固定終了直後の再荷重 0, 1, 3, 5, 7 日目 (各群 5 匹) とした。そして、各検索時期においてはラット腹腔内へのペントバルビタールナトリウム (50mg/ml) の投与によって麻酔を行い、両側ヒラメ筋を採取し、以下の検索に供した。

E. 生化学的検索

細切りした左側ヒラメ筋は適量の Tris buffer (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.6) を加えホモジュネートし、4°C に設定した冷却遠心分離機を用い、遠心加速度 12,000g の条件で 15 分間遠心分離を行い、上清を回収し、筋抽出液とした。そして、BCA Protein Assay Kit (PIERCE 社) を用いて筋抽出液内のタンパク質濃度を測定した後、各筋抽出液に 2-mercaptoethanol 含有 Tris buffer (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 15 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.6) を適量加えタンパク質濃度を 2 µg / µl に調整し、これを Western blot 法の試料とした。次に、試料と等量の SDS sample buffer を加え、80°C で 5 分間熱処理した後、12.5%濃度の SDS ポリアクリルアミドゲルの各レーンに 20 µl の試料および分子量マーカーをロードし、120V の定電圧で 2 時間、電気泳動を行った。電気泳動後は、ニトロセルロース膜へ 40V の定電圧で 70 分間、転写を行い、転写後のニトロセルロース膜は 5%スキムミルクによる非特異反応のブロッキングを室温で 1 時間行った。そして、一次抗体に抗マウス Hsp70 モノクローナル抗体 (Stressgen 社) を用い、4°C の冷蔵庫内で一晩反応させ、洗滌後は二次抗体にペルオキシターゼ標識抗マウス IgG を用い、室温で 2 時間反応させ、洗滌した。その後は、ECL system (Amersham Bioscience 社) を用い、化学発光させ、X 線フィルムに感光、現像し、Hsp70 のバンド画像を得た。

定量解析として、Hsp70 のバンド画像はスキャナーにてコンピューターに取り込み、画像解析ソフトウェア (Scion Image) を用い、その濃度を計測した。そして、各検索時期の対照群の平均値を 100% とし、それに対する相対値 (%) を求めた。

F. 組織病理学的検索

右側ヒラメ筋はその中央部で二分割し、トラガントガムに包埋後、ドライアイスで冷却したイソペンタン液内で急速凍結した。そして、クリオスタットを用いて8 μ m 厚の横断切片を作成し、組織病理学的観察のため Hematoxylin-eosin (以下、H&E) 染色を施し、光学顕微鏡で検鏡した。また、以下の定量解析を行うため H&E 染色像は、顕微鏡用デジタルカメラ (OLYMPUS 社, CAMEDIA C-5060 Wide Zoom) にて 20 倍の拡大像で全視野に至るまで撮影を行い、その撮影画像をパソコン (Sony 社, VAIO VGN-TX90PS) に取り込んだ。

1) 壊死線維数の計測方法

今回検索対象とした壊死線維は図1のごとくで、一試料内の全視野において確認できる全ての筋線維の総数と壊死線維の数を計測し、筋線維の総数に対する壊死線維の割合を求め、これを壊死線維の発生頻度とした。

2) 筋線維横断面積の計測方法

一試料あたり数枚の画像 (画像面積: 1.8mm²; 1.5×1.2mm) を無作為に選び、それらに含まれる全ての筋線維の横断面積を画像解析ソフトウェア (Scion Image) にて計測し、その分布状況を各群で比較した。なお、計測した筋線維は一試料あたり 200 本以上である。

G. 統計処理

HSP70 含有量の統計処理には、各検索時期で対照群、温熱群、再荷重群、温熱+再荷重群の4群間及び、各群内で再荷重0, 1, 3, 5, 7日目の各検索時期において有意差が存在するかどうかを一元配置分散分析 (以下、ANOVA) によって判定し、有意差を認めた場合は多重比較検定に Fisher の PLSD 法を適用し、各群間及び各検索時期の有意差を判定した。また、壊死線維の発生頻度については各

検索時期における各群間及び、各群内における各検索時期に有意差が存在するかどうかを χ^2 検定で判定した。なお、全ての統計手法とも有意水準は5%未満とした。

4. 研究成果

実験1. 温熱負荷による直腸温と筋温の変化に関する検討

温熱負荷前の直腸温は平均で 36.6°C、筋温は 35.3°Cであったが、温熱負荷を開始すると両温度とも上昇し、50分以降には 40.0°C以上となり、60分後には直腸温が 40.7°C、筋温が 40.5°Cまで達した。温熱負荷終了後は両温度とも緩やかに下降したが、直腸温は約12分間、筋温は約2分間、40.0°C以上の温度を維持していた (図2)。筋細胞内に HSP70 が発現するには通常 40°C以上になることが必要とされるが、本法においても HSP70 を誘導するに足る筋細胞内の加温が得られるものと考えられる。以上のことから、今回の実験に用いる温熱負荷方法は骨格筋における Hsp70 の誘導が期待できるといえよう。

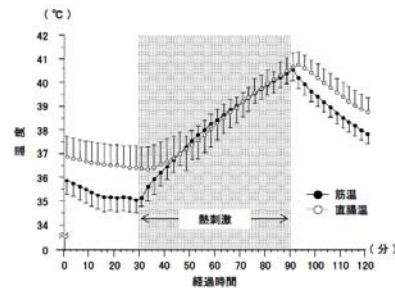


図2. 直腸温、ならびに下腿三頭筋の筋温の変化

約41°Cに設定した恒温槽内に60分間挿入し、全身温熱負荷を行った時の直腸温、ならびに下腿三頭筋の筋温の経時的変化を示す。温熱負荷を開始すると両温度とも上昇し、50分以降には40.0°C以上となり、60分後には直腸温が40.7°C、筋温が40.5°Cまで達した。温熱負荷終了後は両温度とも緩やかに下降したが、直腸温は約12分間、筋温は約2分間、40.0°C以上の温度を維持していた。

実験2. 温熱負荷による Hsp70 の発現時期に関する検討

温熱負荷後のラットヒラメ筋における HSP70 含有量は、0時間後 101.1±12.3%、2時間後 110.0±33.2%、4時間後 98.9±32.4%、8時間後 99.8±47.4%、12時間後 87.2±19.7%、

24 時間後 93.4±25.2% , 36 時間後 85.4±29.5% , 48 時間後 144.6±35.8% , 60 時間後 114.9±11.3% , 72 時間後 126.8±29.5% であり, 48 時間後で 0, 4, 8, 12, 24, 36 時間後に比べ有意に高値を示した。また, 対照群との比較では 48 時間後のみに有意差を認めた (図3)。

以上のことから, 今回の実験に用いる温熱負荷方法では, 温熱負荷後 48 時間で最も Hsp70 が発現することが確認され, 実験3における温熱負荷は再荷重を開始する 48 時間前に実施するよう決定した。

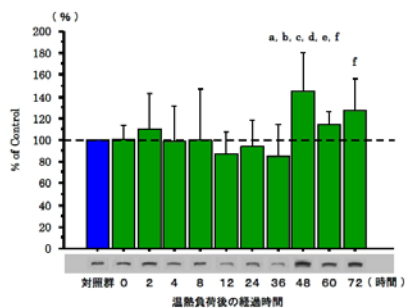


図3. 温熱負荷後のラットヒラメ筋におけるHsp70含有量の経時的変化
対照群の平均値を100%とし, それに対する各検査期間の相対値(%)を棒グラフに, Western blot法によって得られたHsp70のバンド像をグラフ下に示す。なお, それぞれの群間の有意差 (p < 0.05) は以下の通りである。
a: 0 時間後との有意差, b: 4 時間後との有意差, c: 8 時間後との有意差, d: 12 時間後との有意差, e: 24 時間後との有意差, f: 36 時間後との有意差, *: 対照群との有意差

実験3. 事前の温熱負荷が再荷重によって起こる筋線維損傷に与える予防効果に関する検討

1) 病理所見

対照群と温熱群では, 全ての検索時期で同様の所見であった。一方, 再荷重群と温熱+再荷重群では, 再荷重0日目と1日目において, 筋細胞の小径化を認め, 細胞浸潤を認める壊死線維が散見され, 両群ともほぼ同様の所見であった。また, 再荷重3日目では, 再荷重群に筋細胞の円形化が顕著に認められ, 壊死線維の出現も多く, 間質の拡大や間質における単核細胞の増加も認められた。これに対し, 温熱+再荷重群は0日目, 1日目の所見と変化は認められず, 再荷重群とは明らかに異なっていた。しかし, 再荷重5日目にな

ると温熱+再荷重群においても, 筋細胞の円形化や壊死線維の出現が著明となり, 間質の拡大や間質における単核細胞の増加も認められた (図3)。

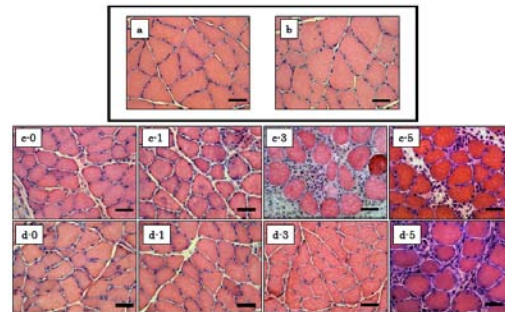


図4. H&E染色像
各群の代表的なH&E染色像で, スケールは50 μmを示す。
a: 対照群, b: 温熱群, c-0: 再荷重0日目の再荷重群, c-1: 再荷重1日目の再荷重群, c-3: 再荷重3日目の再荷重群, c-5: 再荷重5日目の再荷重群, d-0: 再荷重0日目の温熱+再荷重群, d-1: 再荷重1日目の温熱+再荷重群, d-3: 再荷重3日目の温熱+再荷重群, d-5: 再荷重5日目の温熱+再荷重群

次に, 壊死線維の発生頻度を比較すると, 対照群と温熱群では全ての検索時期で同程度の低い発生頻度であったが, 再荷重群と温熱+再荷重群では, 全ての検索時期において対照群および温熱群と比べ有意に高値であった。再荷重群と温熱+再荷重群を比較すると再荷重0日目と1日目には有意差を認めなかったが, 再荷重3日目は再荷重群が温熱+再荷重群よりも有意に高値を示した。しかし, 再荷重5日目では再荷重群と温熱+再荷重群の結果が逆転し, 温熱+再荷重群が再荷重群よりも有意に高値を示した。また, 各検索時期での比較では, 対照群と温熱群は全ての検索時期で有意差を認めなかったが, 再荷重群と温熱+再荷重群では再荷重3日目が0日目, 1日目, 5日目より有意に高値を示した (表1)。

表1. 壊死線維数の比較

群	再荷重0日目	再荷重1日目	再荷重3日目	再荷重5日目
対照群	34 / 14051 (0.25%) n=5	31 / 14780 (0.21%) n=5	26 / 12416 (0.21%) n=5	25 / 15069 (0.16%) n=5
温熱群	52 / 12780 (0.41%) n=5	16 / 12582 (0.13%) n=5	24 / 12602 (0.19%) n=5	18 / 15460 (0.12%) n=4
再荷重群	* , § 59 / 7885 (0.75%) n=4	* , § 131 / 17709 (0.74%) n=5	* , § , a , b 486 / 13882 (3.50%) n=5	* , § , a , b , c 73 / 16864 (0.43%) n=5
再荷重+温熱群	* , § 57 / 8104 (0.70%) n=4	* , § 87 / 14294 (0.61%) n=5	* , § , f , a , b 122 / 12393 (0.98%) n=5	* , § , f , e 84 / 11059 (0.72%) n=4

(壊死線維総数 / 筋線維総数)

各群の壊死線維総数, 筋線維総数と筋線維総数に対する壊死線維総数の割合(%)を示す。なお, それぞれの群内および群間の有意差 (p < 0.05) は以下の通りである。
*: 対照群との有意差, §: 温熱群との有意差, f: 再荷重群との有意差, a: 0日目の有意差, b: 1日目の有意差, c: 3日目の有意差

2) 筋線維横断面積の分布状況 (図5)

筋線維横断面積の分布状況をみると、対照群と温熱群は全ての検索時期で $4000 \mu^2$ 付近に頂点を持つ、一峰性の分布を示した。再荷重群と温熱+再荷重群は、再荷重0日目、1日目、5日目において、対照群や温熱群に比べ左方 ($1500 \sim 4000 \mu^2$) に分布が偏移しており、両群ともに筋線維横断面積の縮小は明らかであった。

一方、再荷重3日目においては、温熱+再荷重群が最も左方に位置し、再荷重群は対照群および温熱群と温熱+再荷重群の間に位置し、特に $4000 \sim 6000 \mu^2$ 付近の分布が多く認められた。そして、再荷重群以外の3群は一峰性の分布を示しているのに対し、再荷重群は $2500 \mu^2$ 付近と $4500 \mu^2$ 付近にピークを持つ二峰性の分布を示した。

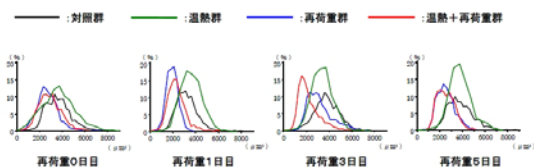


図5. 筋線維横断面積の分布状況

筋線維横断面積の分布を再荷重群と温熱+再荷重群と比較すると、0, 1, 5日目は大差なく、両群とも $1500 \sim 4000 \mu^2$ に分布し、温熱群の3日目も同様であった。しかし、再荷重群の3日目は $2500 \mu^2$ 付近と $4500 \mu^2$ 付近を頂点とする二峰性の分布で、特に $4000 \sim 6000 \mu^2$ 付近の分布が増加していた。

3) HSP70 含有量 (図6)

再荷重0日目においては、温熱群が $168.6 \pm 49.4\%$ 、再荷重群が $59.2 \pm 10.1\%$ 、温熱+再荷重群が $136.5 \pm 50.8\%$ であり、温熱群は対照群および再荷重群より有意に高値を示した。また、温熱+再荷重群は再荷重群より有意に高値を示した。一方、再荷重1日目は温熱群が $102.2 \pm 17.2\%$ 、再荷重群が $101.9 \pm 37.1\%$ 、温熱+再荷重群が $109.4 \pm 37.9\%$ であり、有意差を認めなかった。同様に再荷重3日目、5日目においても、4群間に有意差を認めなかった。(再荷重3日目；温熱群 $99.4 \pm 25.0\%$ 、再荷重群

$104.8 \pm 24.4\%$ 、温熱+再荷重群 $88.0 \pm 49.0\%$ 、再荷重5日目；温熱群 $94.4 \pm 43.2\%$ 、再荷重群 $82.5 \pm 74.0\%$ 、温熱+再荷重群 $129.8 \pm 67.8\%$).

また、再荷重群および温熱+再荷重群では、各検索時期で有意差を認めなかったが、温熱群において、再荷重0日目は1, 3, 5日目より有意に高値を示した。

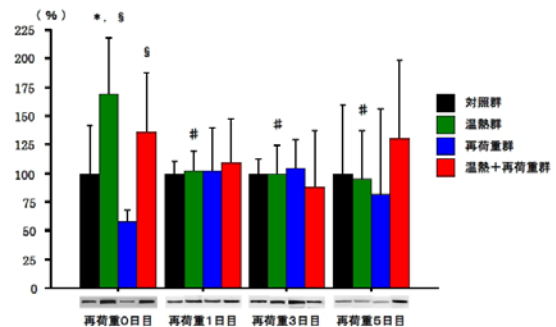


図6. HSP70含有量

各検索時期の対照群の平均値を100%とし、それに対する各群の相対値(%)を棒グラフに、Western blot法によって得られたHsp70のバンド像をグラフ下に示す。なお、それぞれの群内および群間の有意差 ($p < 0.05$) は以下の通りである。

*:対照群との有意差, #:再荷重群との有意差, #:0日目との有意差

以上の結果をまとめると、本研究では、4週間のラット後肢のギプス固定モデルを用いて、再荷重前の温熱負荷を行うことで、再荷重後の筋線維損傷の発生を軽減できるかについて検討した。

その結果、約 41°C の恒温槽を用いて60分間の全身温熱負荷を行うことで、ラットヒラメ筋において温熱負荷から48時間後に最も強いHSP70の発現を認めた。また、4週間のギプス固定によって、ラットヒラメ筋に廃用性筋萎縮が惹起されること、その後の再荷重によって筋線維損傷が発生し、再荷重開始から3日目に最も筋線維損傷の程度が強いことを確認した。一方、再荷重開始から48時間前に温熱負荷を行ったラットヒラメ筋では、再荷重開始時にHSP70の発現を認めるとともに、再荷重から3日目の筋線維損傷の発生が軽減していた。このことから、再荷重時に誘導されたHSP70による細胞防御作用によ

って、再荷重による筋線維損傷の発生が軽減した可能性が推察された。しかし、再荷重から5日目では、温熱負荷を行ったラットヒラメ筋において、新たな筋線維損傷の発生が疑われる所見が得られたため、再荷重前に行う1度の温熱負荷だけでは、再荷重後に繰り返し与えられる伸張負荷などのストレスによる筋線維損傷に対して、抑止効果が得られない可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計2件)

- ① I. HIBINO, M. OKITA, T. INOUE, Y. BANNO, M. HOSO. Effect of immobilization on insoluble collagen concentration and type I and type III collagen isoforms of rat soleus muscle. Journal of The Japanese Physical Therapy Association No 11 (1), 2008, 1-6, 査読有
- ② 坂野裕洋, 沖田 実, 井上貴行, 鈴木重行, 小林由依, 高浪美香, 林綾子, 吉田奈央. キープス固定後の再荷重によるラットヒラメ筋の筋線維損傷に対する温熱負荷の影響. 理学療法学, 第36巻2号, 2009, 33-40, 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① Y. BANNO, M. OKITA, T. INOUE, S. SUZUKI. Effects of heat stress on muscle fibers damage in reloading after immobilized rat soleus muscle. 15th Int' l Congress of the World Confederation for Physical Therapy (July, 2007, Vancouver Canada).
- ② 坂野裕洋, 沖田 実, 井上貴行, 鈴木重

行, 小林由依, 高浪美香, 林綾子, 吉田奈央. 事前の熱刺激が再荷重によって起こる筋線維損傷に与える予防効果—後肢キープス固定モデルラットを用いての検討—. 第42回日本理学療法学会 (2007年, 4月, 新潟)

- ③ 坂野裕洋, 沖田 実, 井上貴行, 鈴木重行, 小林由依, 高浪美香, 林綾子, 吉田奈央. プレコンディショニングとしての温熱負荷がキープス固定後のラットヒラメ筋の筋線維損傷におよぼす影響. 第43回日本理学療法学会 (2008年5月, 福岡)
- ④ 坂野裕洋, 沖田 実, 井上貴行, 鈴木重行. 再荷重によって起こる筋線維損傷に対するプレコンディショニングとしての温熱負荷の効果—後肢キープス固定モデルラットを用いての検討—. 第4回日本ペインリリス研究会学術集会 (2008年, 6月, 愛知)
- ⑤ Y. BANNO, M. OKITA, S. SUZUKI, T. INOUE, N. YOSHIDA. Effects of heat stress on muscle fibers damage in reloading after immobilized rat soleus muscle. International Congress of Physiological Sciences (Kyoto, Japan, July, 2009)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂野 裕洋 (BANNO YASUHIRO)

星城大学リハビリテーション学部・助教

研究者番号：00351205

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：