

機関番号：33918
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21700556
 研究課題名（和文） 廃用性萎縮筋に対する熱刺激を用いた新たな筋傷害の予防方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 prevention to the muscle injury for muscle atrophy by using the heat stimulation.
 研究代表者
 坂野 裕洋（BANNO YASUHIRO）
 日本福祉大学・健康科学部・助教
 研究者番号：00351205

研究成果の概要（和文）：ギプス固定後の再荷重で引き起こされる下腿三頭筋の筋傷害に対して、再荷重 2 日前よりプレコンディショニングとして熱刺激を 48 時間毎に繰り返し行うことがその発生に与える影響について検討した。その結果、ギプス固定後に 48 時間毎に繰り返し行う熱刺激では、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対する、長期的な筋傷害の予防効果は得られない可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：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, 3 and 5 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
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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，筋障害，熱刺激，ギプス固定，Heat shock protein

1. 研究開始当初の背景

総務省統計局の試算では、日本の高齢者

人口 (65 歳以上) は, 2015 年には総人口の 26.0% (3,277 万人) と, およそ 4 人に 1 人が 65 歳以上になると見込まれており, 21 世紀の日本は, 人類が未だかつて経験したことのない, 超高齢化社会を迎えることになる。それに伴い, 医療費や介護保険などによる経済的負担率も高騰することが予測されるため, 高齢者の疾病や障害を効率的に予防または軽減し, 介護に伴う社会的負担を減少させることは重要となる。

高齢者の疾病構造の特徴として, 疾病自体から起こる一次障害に加え, 臥床や身体活動の減少により二次的な廃用症候群を来し, 障害が重度化することが挙げられる。そのため, リハビリテーション医療では, 廃用症候群を如何にして予防・治療していくかが, 対象者の障害度を大きく左右する。そして, 廃用症候群の典型的な症状として挙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。そのため, 理学療法では患部の状態を考慮しつつ, 早期から積極的な身体活動を伴う運動療法を実施し, 二次的障害を予防する必要がある。ただ, 訓練後に熱感や腫脹, 痛みなどの急性炎症症状を呈する症例も認められ, これらの症状が積極的な運動療法の継続を困難にし, 回復を遅延させる場合がある。

動物実験の知見では, 10 日間の後肢懸垂によってラットヒラメ筋に廃用性筋萎縮を惹起させた後に, 再荷重を行うだけで筋傷害が発生するとした報告があり (St. Pierre BA, et al.: J Appl Physiol 77: 290-297, 1994.), 自身が行った実験でもラット後肢の 4 週間のギプス固定後に再荷重を行うと, ヒラメ筋に筋線維壊死や筋線維浮腫, 間質の拡大と間質における単核細胞の増加など, 筋傷害による炎症所見を疑わせる結果を得ている (坂野裕洋・他: 理学療法学 34: 238, 2007.)。このことから, 廃用性筋萎縮を呈した骨格筋は極めて脆弱であり, 前述したような訓練後に急性炎症症状を呈する症例では, 骨格筋の一部に筋傷害が発生している可能性が高いと考えられる。つまり, このような筋傷害を予防することは, 廃用性筋萎縮に対する運動療法を効率的に行う上で重要と考える。しかし, その効果的な予防方法については確立されていない。

一方, 近年の先行研究を概観すると, プレゴンディショニングとして骨格筋に熱刺激を行い, 筋細胞内に熱ショックタンパク質 (Heat shock protein; 以下, HSP) 70 を誘導しておくことで, 下り坂走行による筋傷害を抑えられたとした報告 (三上俊夫・他: DESCENTE SPORTS SCIENCE 24: 145-152, 2003.) や, Hsp のファミリーで低分子の Hsp25 や α B クリスタリンといった 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。

したがって, これらの知見を参考にすると, 廃用性筋萎縮を呈した骨格筋においてもプレゴンディショニングとして熱刺激を行うと, その後に起こる筋傷害の発生を軽減できる可能性が推察される。そこで我々は, 4 週間のラット後肢のギプス固定モデルを用いて, 再荷重前の熱刺激によって再荷重後の筋傷害を軽減できるかを検討した。その結果, ギプス固定後の再荷重で起こる筋傷害は, 再荷重から 3 日目に最も顕著となり, その後の経過は回復する傾向にあった。一方, 再荷重開始の 2 日前に熱刺激を行うと, 再荷重開始時のラットヒラメ筋内に HSP70 が発現し, 再荷重から 3 日目の筋傷害が軽減されることを確認した (Banno Y, et al.: 15th Int' l Congress of the World Confederation for Physical Therapy Programme, 112, 2007.)。しかし, その後の経過をみると, 再荷重から 5 日目や 7 日目に, 新たな筋障害の発生が認められた (坂野裕洋・他: 理学療法学 35 (2): 539, 2008.)。このことから, ギプス固定後の再荷重前に行う, 1 度の熱刺激だけでは, 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対する, 長期的な筋傷害の予防効果は得られない可能性が考えられた。そこで, 今後の臨床応用に向けて, 定期的に複数回の熱刺激を行った場合の筋傷害に与える影響について検討し, 筋傷害の予防効果を長期的に得られる熱刺激の実施頻度について明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

廃用性筋萎縮の治療では, 運動負荷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望ましい。本研究課題では, 熱刺激によって骨格筋内に発現するストレスタンパク質である HSP70 に着目し, 廃用性筋萎縮に対する安全かつ効果的な筋萎縮治療方法と新たな筋傷害の予防方法の開発を目的に, ギプス固定後の再荷重で引き起こされる下腿三頭筋の筋傷害に対して, 再荷重 2 日前よりプレゴンディショニングとして熱刺激を 48 時間置毎に繰り返し行うことがその発生に与える影響について検討した。

3. 研究の方法

実験 1. 熱刺激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熱刺激が直腸温と筋温に与える影響を確認する目的で以下の実験を行った。

(1) 実験動物と熱刺激方法

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を投与し、麻酔を行った。そして、Naitoら(Naito H, et al.: J Appl Physiol 88: 359-363, 2000.)の報告を参考に約41°Cに設定した恒温槽内に60分間各ラットを挿入し、全身への熱刺激を行った。

(2) 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、熱刺激開始前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. 繰り返しの熱刺激によるHSP70の積載効果に関する検討

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より、骨格筋内にHSP70を発現させ、再荷重期間中の骨格筋内にHSP70を発現させ続ける方が、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、ラットヒラメ筋において、最もHSP70が誘導され続ける熱刺激の実施頻度を確認し、熱刺激間隔を決定することを目的に以下の実験を行った。

(1) 実験動物

実験動物はWistar系雄性ラット15匹(平均体重;272.4±14.9g)で、これらを実験群に無作為に無処置の対照群と前述の方法で熱刺激を行う実験群に振り分け、実験群はさらに24時間毎に4回の熱刺激を行う24時間群と48時間毎に4回の熱刺激を行う48時間群、72時間毎に4回の熱刺激を行う72時間群に分けた。

(2) 熱刺激方法

熱刺激は、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、全身加温を行った。熱刺激後は2日間の常飼育を行った。

(3) 試料採取

検索時期は、4回目の熱刺激から2日後(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。

(4) 生化学的検索

細切りした両側ヒラメ筋は適量のTris buffer(10mM Tris, 10mM NaCl, 0.1mM 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(10mM Tris, 10mM NaCl, 0.1mM EDTA, 15mM 2-mercaptoethanol, pH 7.6)を適量加えタンパク質濃度を2µg/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20µl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。

(5) 統計処理

統計処理には、各群間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. 繰り返しの熱刺激が再荷重によって起こる筋傷害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2日前より48時間毎に繰り返される熱刺激が再荷重後の筋傷害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。

(1) 実験動物

実験動物は8週齢のWistar系雄性ラット60匹(平均体重;267.6±14.6g)で、これらを実験群に無作為に通常飼育の対照群15匹と通常飼育にて熱刺激のみを行う熱刺激群15匹、両側足関節を4週間ギプス固定する実験群30匹に振り分け、実験群はさらにギプス固定終了の2日前より48時間毎に熱刺激を行う再

荷重+熱刺激群と熱刺激は行わず同様に再荷重を開始する再荷重群に無作為に分けた。

(2) 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 (50mg/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で前足部から膝関節上部までギプス包帯にて固定し、ヒラメ筋を弛緩位で不動化した。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。

(3) 熱刺激方法

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。また、実験3の結果より、熱刺激の間隔 48 時間とすることで、恒常的に骨格筋内に HSP70 を発現出来ることを確認している。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 時間前より熱刺激を行い、48 時間毎に繰り返し実施することとした。

熱刺激は、熱刺激群および再荷重+熱刺激群の各ラットに対して行った。熱刺激群は、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、再荷重+熱刺激群は、4週間のギプス固定期間終了の 48 時間前より、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+熱刺激群の各ラットは、両側足関節のギプスを除去した状態で行った。そして、熱刺激後は、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+熱刺激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。

(4) 試料採取

索時期は、4週間のギプス固定終了直後の再荷重 0, 3, 5 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。

(5) 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。

(6) 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 µm 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。取り込んだ画像より、筋傷害の指標として、壊死線維数を計測した。なお、今回検索対象とした壊死線維は、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。

(7) 統計処理

HSP70 含有量の統計処理には、各検索時期で対照群、熱刺激群、再荷重群、再荷重+熱

刺激群の4群間及び、各群内で再荷重0, 3, 5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. 熱刺激による直腸温と筋温の変化に関する検討

熱刺激前の直腸温は平均で36.6°C, 筋温は35.3°Cであったが, 熱刺激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。熱刺激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1)。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熱刺激方法は骨格筋におけるHSP70の誘導が期待できると考える。

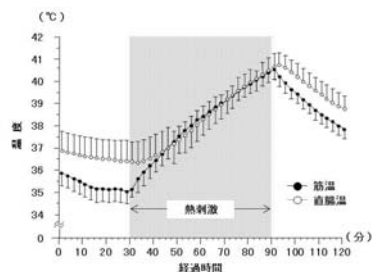


図1. 直腸温, ならびに下腿三頭筋の筋温の変化
約41°Cに設定した恒温槽内:00分間挿入し, 全身温熱負荷を行った時の直腸温, ならびに下腿三頭筋の筋温の経時的変化を示す。温熱負荷を開始すると両温度とも上昇し, 50分以降には40.0°C以上となり, 60分後には直腸温が40.7°C, 筋温が40.5°Cまで達した。温熱負荷終了後は両温度とも緩やかに下降したが, 直腸温は約12分間, 筋温は約2分間, 40.0°C以上の温度を維持していた。

実験2. 繰り返しの熱刺激によるHSP70の積載効果に関する検討

熱刺激後のラットヒラメ筋におけるHSP70含有量は, 24時間群104.5±15.7%, 48時間群150.0±18.8%, 72時間群142.1±13.0%であり, 24時間群と比較し48時間群と72時間群が有意に高値を示した。また, 対照群との比較では, 48時間群と72時間群が有意に高値を認めた(図2)。

このことから, 骨格筋に対して24時間毎に繰り返しの熱刺激を加えても骨格筋内にHSP70が発現されないため, 48時間以上の間

隔を空けて熱刺激を加える必要があることが推察された。

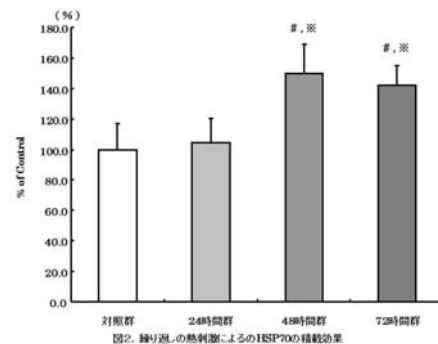


図2. 繰り返しの熱刺激によるHSP70の積載効果
対照群の平均値を100%とし, それに対する各検索時期の相対値(%)を棒グラフに示す。なお, それぞれの群間の有意差(p=0.05)は以下の通りである。#:24時間群との有意差, ※:対照群との有意差

実験3. 繰り返しの熱刺激が再荷重によって起こる筋傷害に与える予防効果に関する検討

(1) 病理所見

対照群と熱刺激群では, 全ての検索時期で同様の所見であった。一方, 再荷重群と再荷重+熱刺激群では, 再荷重0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, 再荷重+熱刺激群は0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日目になると再荷重+熱刺激群においても, 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。

表1. 壊死線維数の比較

群	再荷重0日目	再荷重3日目	再荷重5日目
対照群	10 / 17636 (0.06%) n = 5	15 / 18670 (0.08%) n = 5	12 / 19439 (0.06%) n = 5
熱刺激群	11 / 16662 (0.06%) n = 5	12 / 18124 (0.07%) n = 5	14 / 19369 (0.07%) n = 5
再荷重群	27 / 12737 * , † , ‡ , § , ¶ (0.21%) n = 5	308 / 13497 * , † , ‡ , § , ¶ (2.28%) n = 5	101 / 14282 * , † , ‡ , § , ¶ (0.71%) n = 5
再荷重+熱刺激群	25 / 12769 * , † , ‡ , § , ¶ (0.20%) n = 5	134 / 12888 * , † , ‡ , § , ¶ (1.04%) n = 5	269 / 13505 * , † , ‡ , § , ¶ (1.99%) n = 5

(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, †: 熱刺激群との有意差, ‡: 再荷重群との有意差, †: 0日目との有意差, ‡: 3日目との有意差, §: 5日目との有意差

(2) 壊死線維の発生頻度(表1)

次に, 壊死線維の発生頻度を比較すると, 対照群と熱刺激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, 再荷重群と再荷重+熱刺激群では, 全ての検索時期において対照群および熱刺激群と比べ有意に高値であった。再荷重群と再荷重+熱刺激群を比較すると再荷重0日目には有意差を認め

なかったが、再荷重3日目は再荷重群が再荷重+熱刺激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再荷重+熱刺激群の結果が逆転し、再荷重+熱刺激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、対照群と熱刺激群は全ての検索時期で有意差を認めなかったが、再荷重群では再荷重3日目が0日目、5日目より有意に高値を示し、再荷重+熱刺激群では再荷重5日目が0日目、3日目より有意に高値を示した。

(3) HSP70 含有量 (図3)

再荷重0日目においては、熱刺激群が150.2±30.2%，再荷重群が64.6±11.0%，再荷重+熱刺激群が122.4±30.2%であり、熱刺激群と再荷重+熱刺激群は、対照群および再荷重群より有意に高値を示した。再荷重3日目、および5日目においても同様に、熱刺激群と再荷重+熱刺激群は、対照群および再荷重群より有意に高値を示した。(再荷重3日目；熱刺激群 135.8±15.5%，再荷重群 96.4±13.4%，再荷重+熱刺激群 123.6±24.4%，再荷重5日目；熱刺激群 147.2±26.5%，再荷重群 98.1±13.1%，再荷重+熱刺激群 121.3±21.3%)。

以上の結果をまとめると、ギプス固定後の再荷重で起こる筋傷害は、再荷重から3日目に最も顕著となり、その後の経過は回復する傾向にあった。一方、再荷重開始の2日前より48時間毎に繰り返し熱刺激を行うと、再荷重後のラットヒラメ筋内にHSP70が恒常的に発現し、再荷重から3日目の筋傷害が軽減されることを確認した。しかし、その後の経過をみると、再荷重から5日目に新たな筋傷害の発生が認められた。

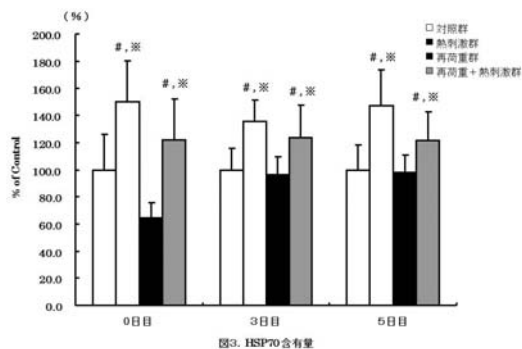


図3. HSP70含有量
対照群の平均値を100%とし、それに対する各検索時期の相対値(%)を棒グラフに示す。なお、それぞれの群間の有意差(p<0.05)は以下の通りである。#：対照群との有意差、※：再荷重群との有意差

このことから、ギプス固定後に48時間毎に繰り返し行う熱刺激では、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対する、長期的な筋傷害の予防効果は得られない可能性が考えられた。

また、再荷重前の熱刺激による筋傷害の予防効果は、HSP70による細胞防御作用以外の要因が影響している可能性も示唆された。

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3件)

- ① 鈴木重行, 井上貴行, 坂野裕洋, 岩田全広, 松原貴子: セラピューティック・ストレッチの適応となる筋の病態生理学. 理学療法, 査読無, 27 (8), 2010, 955-966
- ② 坂野裕洋, 沖田実, 鈴木重行, 井上貴行, 吉田奈央, 小林由依, 高浪美香, 林綾子: ギ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, 査読有, 27 (2), 2009, 33-40
- ③ Inoue T, Suzuki S, Hagiwara R, Iwata I, Banno Y, Okita M: Effects of passive stretching on muscle injury and HSP expression during recovery after immobilization in rats. Pathobiology, 査読有, 76, 2009, 253-259

[学会発表] (計3件)

- ① 坂野裕洋, 松原貴子, 岩田全広, 浅井友詞, 鈴木重行: 下腿三頭筋の遅発性筋痛が歩行能力に与える影響. 第15回理学療法の医学的基礎研究会学術集会, 2010年5月26日(愛知).
- ② 坂野裕洋, 沖田実, 鈴木重行, 井上貴行: 熱刺激によるプレコンディショニングがギプス固定後の再荷重による筋傷害に与える影響. 第64回日本体力医学会, 2009年9月19日(新潟).
- ③ Banno Y, Okita M, Suzuki S, Inoue T: Effects of heat stress on muscle fibers damage in reloading after immobilized rat soleus muscle. 36th International congress of physiological sciences, 29 July, 2009 (Kyoto Japan).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂野 裕洋 (BANNO YASUHIRO)
日本福祉大学・健康科学部・助教
研究者番号: 00351205