

機関番号：33802

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21800071

研究課題名（和文）伸張刺激は筋損傷からの回復を促進できるか？

研究課題名（英文） Does the stretch promote recovery the muscle injury ?

研究代表者

縣 信秀 (AGATA NOBUHIDE)

浜松大学・保健医療学部・助教

研究者番号：00549313

研究成果の概要（和文）：

遠心性収縮による再現性の高い筋損傷モデルの作製を試みた。その結果、関節運動範囲 90°、収縮回数 10 回×5 セット、角速度 200 deg/sec で前脛骨筋の遠心性収縮を行わせ、48 時間後の最大足関節背屈トルクが 10 mNm 以下の筋のみを抽出すると、再現性の高い損傷モデルが作製できると考えられた。次に本モデルの筋損傷からの回復過程を検証した結果、損傷からの日数経過に伴う細い筋線維の出現とその筋線維の成長、D-MHC 陽性筋線維の割合、足関節の背屈トルクが互いに関連しあいながら回復していく様子が検出できた。

研究成果の概要（英文）：

Making of the muscle injury model with high reproducibility by the eccentric contraction was tried. TA muscle was subjected to 50 forced eccentric contractions in 5 bouts of 10 contraction (one contraction every 10 sec) interspaced with a 60 sec recovery period. Eccentric contractions was performed by dorsiflexion of the foot at the ankle joint (rotation from 60 to 150 deg) with a rotational velocity of 200 deg/sec. The data was used from dorsiflexion torque after 48 hours is less 10 or less. It was thought that the stripe damage model with high reproducibility was able to be made by using the above-mentioned condition. Next, the recovery process from the muscle injury of this model was verified. As a result, the incidence that recovered as appearance of small muscle fiber area, growth of the muscle fiber, ratio of D-MHC positivity muscle fiber, dorsiflexion torque relating each other was observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
22 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：理学療法学

科研費の分科・細目：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、骨格筋、伸張刺激、筋損傷、ラット

## 1. 研究開始当初の背景

筋損傷は、外傷や外科手術後、筋ジストロ

フィーを始めとする神経・筋疾患において観察されるだけでなく、高強度の運動や遠心性

収縮後に起こることがよく知られている。骨格筋は、再生能の高い組織で、損傷した筋線維は数週間て回復するが、筋損傷を受けた理学療法対象者が、早期に ADL 能力を獲得したり、スポーツ競技に復帰するためには、できるだけ早く筋損傷を回復させる必要がある。しかし現在のところ、痛みを指標に経験則で運動療法を実施しているにすぎず、早期回復を目指した理学療法は行われていない。よって、筋損傷を早期に回復させ、運動能力を高めることができる医学的根拠に基づいた理学療法を開発することは急務である。

一般的に、筋損傷の急性期では、損傷の初期に生じる炎症を抑えるために、患部の運動制限や外固定による安静保持が処方されてきた。ところが近年、筋損傷後に適度な運動負荷を加えると、筋損傷からの回復が促進されることが分かってきた。一方、研究代表者は、萎縮筋に対する伸張刺激が筋構成タンパク質の合成に関わるシグナル分子を活性化させ、筋萎縮を軽減させることを明らかにした。筋損傷からの回復の過程で、筋構成タンパク質の合成促進は不可欠であり、伸張刺激は筋損傷からの回復に効果的であると考えられる。

筋損傷に対する伸張刺激の効果を明らかにするためには、常に一定量の筋損傷を持つモデル動物を作製すること、損傷筋に定量的な伸張刺激を加えることが必要である。本研究では、日常生活で容易に生じ、臨床の場面で頻発する遠心性収縮による筋損傷のモデルラットを作製する。研究代表者は、ラットの足関節を他動的に動かす時のトルクを制御することで、下腿の骨格筋に定量的な伸張刺激を加えることができる他動的足関節運動装置を開発した。この装置は、電気刺激装置と組み合わせることで、電気刺激による筋収縮力を関節トルクとして計測することができ（作動検証済み）、筋損傷からの回復を機能的な筋力で評価することができる。さらに、電気刺激による筋収縮と足関節運動装置による足関節運動を同期させ、強制的に遠心性収縮を行わせることもできる。この装置を用いれば、再現性の高い遠心性収縮による筋損傷モデルラットを作製することができ、筋損傷からの回復を評価する筋力測定もでき、さらに定量的な伸張刺激を加えることができると考えている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、他動的足関節運動装置を用いて遠心性収縮による筋損傷モデルラットを作製し、定量的に制御した伸張刺激が筋損傷からの回復を促進させるかどうかを、組織学的・生理学的面から明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 筋損傷モデルラットの作製

筋損傷作製システムを用いて、それぞれ角速度 50, 100, 200, 400 deg/sec の条件でラットの前脛骨筋に遠心性収縮を行った。遠心性収縮 24 時間後に腹腔内へ EBD を投与し、48 時間後に前脛骨筋の採取を行い、組織標本を作製した。また、遠心性収縮の前と筋採取の直前には、足関節背屈トルクを測定した。そして、遠心性収縮の角速度と EBD 陽性領域面積や足関節背屈トルクとの関係を検討し、再現性の高い筋損傷モデルラットを作製するための遠心性収縮条件を決定した。対象は、8 週齢 Wistar 系雄性ラットとした。遠心性収縮時の角速度を、50 deg/sec、100 deg/sec、200 deg/sec、400 deg/sec とする 4 群を作製した。すべてのラットは、イソフルランガス吸入麻酔（濃度 1.5 %）下にて、側臥位で体幹と大腿部を固定用ベッドに固定した。外側からの観察で、腓骨外果から 3 mm 前方の点にトルクセンサーの軸を合わせ、足部を足底板に固定した。そして、1 cm<sup>2</sup> の表面電極を左下腿前外側面に貼り付け、電気刺激装置により電気刺激（electronic current 5 mA, stimulation frequency 100 Hz, duration 1 ms）を前脛骨筋に与えて収縮させた。Train duration は、角速度の遅いものから 2000、1100、650、430 ms とした。電気刺激開始から 0.2 sec 後にモーターが回転し、足関節を他動的に底屈方向へ運動させた。なお、運動開始時の足関節角度は、30 deg 背屈位とし、関節運動範囲は 90 deg（足関節 30 deg 背屈位から 60 deg 底屈位）とした。また、収縮回数は 10 回を 1 セットとして 5 セット行った。収縮と収縮の間は 10 sec 休憩し、セット間は 60 sec 休憩した。なお、その運動中の足関節に加わるトルクを、トルクセンサーで測定した。足関節背屈トルクの測定は、遠心性収縮を実施する前と、遠心性収縮 48 時間後の前脛骨筋の採取を行う直前に実施した。イソフルランガス吸入麻酔下のラットを、側臥位で体幹と大腿部を固定用ベッドに固定した。外側からの観察で、腓骨外果から 3mm 前方の点にトルクセンサーの軸を合わせ、足部を足底板に固定した。なお、測定肢位は、膝関節 90 deg（大腿骨と脛骨の成す角度が 90 deg）、足関節 0 deg（脛骨と第 5 中足骨の成す角度が 90 deg）とした。そして、1 cm<sup>2</sup> の表面電極を左下腿前外側面に貼り付け、前脛骨筋に電気刺激（electronic current 5 mA, stimulation frequency 100 Hz, duration 1 ms, train duration 650 ms）を与えて等尺性収縮させた。この時の足関節背屈トルクを、トルクセンサーで測定した。遠心性収縮 24 時間後に 1 % EBD を腹腔内投与し、48 時間後にイソフルランガス吸入麻酔下で前脛骨筋の採取

を行った。採取した筋を長軸に対し垂直方向に3等分に切断し、中間部をコルクに載せて固定し、液体窒素にて冷却したイソペンタン内で急速凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ 下で保存した。凍結した各試料は、クライオスタットを用いて $5\ \mu\text{m}$ 厚の横断切片を作製した。そして、この横断切片に対して、Lamininの蛍光免疫染色と核染色を施した。蛍光免疫染色を施した筋横断切片全体をバーチャルスライドスキャナ(Nano Zoomer RS 2.0)で観察、撮影した。画像解析ソフト(Image-J)を用いて、EBD陽性領域とEBD陰性領域に二値化した後、筋腹全体におけるEBD陽性領域面積を算出した。

(2) 損傷筋の組織学的、生理学的評価による経時的変化

筋損傷からの回復過程における組織学的・生理学的な変化を明らかにするために、角速度 $200\ \text{deg}/\text{sec}$ で、遠心性収縮を行い、遠心性収縮から3、5、7、10、14日後に前脛骨筋の採取を行った。そして、DystrophinとD-MHCの蛍光免疫染色を施し、回復過程における組織学的評価を行った。なお、すべてのラットは、筋採取を行うまでの間、遠心性収縮の前と、遠心性収縮の後2、3、5、7、10、14日目にそれぞれ足関節背屈トルクを測定した。対象は、8週齢Wistar系雄性ラット匹を用いた。(1)と同様の方法で、角速度 $200\ \text{deg}/\text{sec}$ 、運動範囲 $90^{\circ}$ 、収縮回数 $10\ \text{回}\times 5\ \text{セット}$ の遠心性収縮を行い、筋損傷モデルを作製した。なお、遠心性収縮2日後の足関節背屈トルクが $10\ \text{mN}\cdot\text{m}$ 以下のラットの筋のみをデータとして採用し、遠心性収縮3、5、7、10、14日後に筋を採取する5群に分けた。また、コントロールとして、遠心性収縮をしていない自然飼育下同種ラット8週齢、10週齢を用いた。遠心性収縮14日後の群では、遠心性収縮2、3、5、7、14日目に、(1)と同様の方法で、足関節背屈トルクを測定し、筋力の回復過程の指標とした。なお、その他の群も遠心性収縮14日後の群と条件を統一するために、筋採取までの間、同じ日程で足関節背屈トルク測定を行った。イソフルランガス吸入麻酔下で全てのラットから前脛骨筋を採取した。採取した筋を急速凍結させた後、クライオスタットを用いて $5\ \mu\text{m}$ 厚の横断切片を作製した。そして、これらの横断切片に対し、筋線維膜に局在するDystrophin、及び新生筋線維の指標となるD-MHCの蛍光免疫染色と核染色の三重染色を施した。組織標本作製後、蛍光免疫染色を施した筋横断切片全体を、バーチャルスライドスキャナ(Nano Zoomer RS 2.0、浜松ホトニクス)で観察、撮影した。Dystrophin蛍光免疫染色像で、Dystrophinが明瞭な輪として観察される筋線維をDys陽性筋線維とした。Dys陽性筋線維のうち、D-MHC陽性の

ものをD-MHC陽性筋線維とした。画像解析ソフトにて、筋腹横断面における前脛骨筋の浅層部、中間部、深層部から、一辺が $0.5\ \text{mm}$ の正方形の範囲を抽出した(計 $0.75\ \text{mm}^2$ )。抽出した正方形に含まれるDys陽性筋線維の横断面積、数、D-MHC陽性筋線維の横断面積、数を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 筋損傷モデルラットの作製

前脛骨筋の遠心性収縮48時間後の足関節背屈トルクと前脛骨筋横断切片中のEBD陽性領域面積の関係を、遠心性収縮を行わせた全てのラットを用いて調べた結果、EBD陽性領域面積が増えると足関節背屈トルクが減少し、強い負の相関( $y = -0.8x + 20.9$ ,  $r^2 = 0.8$ )を認めた。遠心性収縮の角速度の違いによる、遠心性収縮48時間後の足関節背屈トルクは、角速度が速い程足関節背屈トルクは有意に小さかった。しかし、 $400\ \text{deg}/\text{sec}$ における足関節背屈トルクは $200\ \text{deg}/\text{sec}$ との間に有意な差は認められなかった。遠心性収縮48時間後の前脛骨筋横断切片のEBD陽性領域面積は、すべてにおいて角速度の速い方のEBD陽性領域面積が、遅い方に比べ有意に大きい値を示した。また、生きた状態で、筋損傷の割合ができる限り一定量であるラットのみを抽出するために、遠心性収縮48時間後に測定した足関節背屈トルクの上限值を設定し、その範囲に含まれる筋のみを抽出した。その結果、角速度が $200\ \text{deg}/\text{sec}$ の変動係数は、全ての筋で $0.25$ となり、上限値 $12\ \text{mN}\cdot\text{m}$ では $0.19$ 、上限値 $10\ \text{mN}\cdot\text{m}$ では $0.13$ 、上限値 $8\ \text{mN}\cdot\text{m}$ では $0.09$ と徐々に小さくなった。また、角速度が $400\ \text{deg}/\text{sec}$ の変動係数は、全ての筋で $0.29$ となり、上限値 $12\ \text{mN}\cdot\text{m}$ では $0.23$ 、上限値 $10\ \text{mN}\cdot\text{m}$ では $0.24$ 、上限値 $8\ \text{mN}\cdot\text{m}$ では $0.15$ となり足関節背屈トルクが $10\ \text{mN}\cdot\text{m}$ 以下まで変わらず、 $8\ \text{mN}\cdot\text{m}$ 以下で低下した。角速度が $200\ \text{deg}/\text{sec}$ でも $400\ \text{deg}/\text{sec}$ でも足関節背屈トルクが上限値 $8\ \text{mN}\cdot\text{m}$ 以下で最も変動係数が下がった。しかし、個体数が19匹中2匹、7匹中3匹と極端に少なくなってしまう。そこで、筋損傷モデル作製に当たり、角速度 $200\ \text{deg}/\text{sec}$ で上限値 $10\ \text{mN}\cdot\text{m}$ 以下のみを採用すると、再現性の高い筋損傷モデルが作製できると考えた。

##### (2) 損傷筋の組織学的、生理学的評価による経時的変化

各群のDys陽性筋線維横断面積の平均値を比較すると、損傷10日後、14日後は、5日後に比べ有意に大きかった。さらに14日後は7日後に比べ有意に大きかった。また、すべての群のDys陽性筋線維横断面積を測定し、ヒストグラムを作成した。遠心性収縮5日後のDys陽性筋線維横断面積のヒスト

グラムは、600  $\mu\text{m}^2$  と 1400  $\mu\text{m}^2$  をピークとする二峰性の山となり、小径の Dys 陽性筋線維が多数観察された。そこで、筋損傷からの回復過程において、小径の Dys 陽性筋線維がどれくらい存在しているのかを確認するために、各群の 800  $\mu\text{m}^2$  以下の Dys 陽性筋線維の割合を算出した。その結果、遠心性収縮 3 日後で 7.0 %、5 日後で 25.0 %、7 日後で 19.8 %、10 日後で 9.5 %、14 日後で 7.8 % となり、小径の Dys 陽性筋線維は 7 日後から徐々に減少し、ヒストグラムが上方へ移動していった。一方、回復過程において、新生筋線維がどのくらい存在しているのかを確認するために、Dys 陽性筋線維のうち、D-MHC 陽性筋線維の割合を算出した。その結果、Dys 陽性筋線維のうち、D-MHC 陽性筋線維の割合は、3 日後で 0.8 %、5 日後で 21.9 %、7 日後で 5.7 % となり、10 日後と 14 日後では D-MHC 陽性筋線維はほとんど観察されなかった。5 日後では、Dystrophin 陽性筋線維横断面積が 800  $\mu\text{m}^2$  以下の 84.1 % が D-MHC 陽性筋線維であった。

遠心性収縮の前と、2、3、5、7、10、14 日後に足関節背屈トルク測定を行った。遠心性収縮を加える前の足関節背屈トルクは、Control 群と有意な差はなかった。一方、遠心性収縮 2 日後、3 日後、5 日後、7 日後、10 日後、14 日後は、遠心性収縮を加える前に比べて有意に小さかった。また、10 日後、14 日後の足関節背屈トルクは、2 日後、3 日後と比較して有意に大きかった。さらに 14 日後の足関節背屈トルクは 5 日後、7 日後と比較して有意に大きかった。ただ、遠心性収縮 14 日後の足関節背屈トルクは、同週齢のコントロール群に比べて有意に小さかった。

臨床的筋損傷に近いと考えられる遠心性収縮による損傷モデルを作製し、損傷のばらつきが少ない再現性の高い筋損傷モデルの作製を試みた。その結果、関節運動範囲 90°、収縮回数 10 回×5 セット (収縮間 10 sec、セット間 60 sec の休憩)、角速度 200 deg/sec で前脛骨筋の遠心性収縮を行わせ、48 時間後の最大足関節背屈トルクが 10 mNm 以下の筋のみを抽出すると、現実的な範疇で再現性の高い損傷モデルが作製できると考えられた。次に本モデルを用いて、筋損傷からの回復過程を検証した。その結果、損傷からの日数経過に伴う細い筋線維の出現とその筋線維の成長、D-MHC 陽性筋線維の割合、足関節の背屈トルクが互いに関連しながら回復していく様子が検出できた。一般的に理学療法による反応や変化は、薬物治療等に比べて小さく、その評価は難しいと考える。今回報告した尺度以外にも、筋損傷からの回復に必要なマクロファージや筋サテライト細胞の活性の尺度となりうる分子がたくさん明らか

になってきている。筋損傷からの回復過程におけるこれらの分子の変化を、総合的にとらえていくことにより、適切な理学療法刺激の種類や時期などの解明が可能になると考える。

#### 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. Nobuaki Sasai, Nobuhide Agata, Masumi Inoue-Miyazu, Keisuke Kawakami, Kunihiko Kobayashi, Masahiro Sokabe, Kimihide Hayakawa. Involvement of PI3K/Akt/TOR pathway in stretch-induced hypertrophy of myotubes. *Muscle and Nerve* 41 (1) 100-106, 2010. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 縣信秀, 笹井宣昌, 清島大資, 宮津真寿美, 早川公英, 河上敬介. 除神経による機械刺激の減少がコスタメア構造に及ぼす影響. 第 18 回日本物理療法学会学術大会. 平成 22 年 10 月. 東京
2. 鈴木惇也, 縣信秀, 宮津真寿美, 河上敬介. 伸張刺激の筋萎縮軽減効果は、伸張刺激の周波数によって異なる. 第 15 回理学療法の医学的基礎研究会学術集会. 平成 22 年 5 月. 愛知
3. 岡元信弥, 森友洋, 伊東佑太, 鈴木惇也, 縣信秀, 宮津真寿美, 河上敬介. 塩酸 Bupivacaine 溶液による損傷筋の筋力回復と組織学的変化. 第 45 回日本理学療法学術大会. 平成 22 年 5 月. 岐阜
4. Nobuhide Agata, Nobuaki Sasai, Masumi Inoue-Miyazu, Keisuke Kawakami, Kimihide Hayakawa, Kunihiko Kobayashi, Masahiro Sokabe. Repetitive Stretching Suppresses Muscle Atrophy of Denervated Soleus Muscle Via Akt/mTOR Pathways. 36th international congress of physiological sciences. 平成 21 年 7 月. Kyoto.
5. 岡元 信弥, 森 友洋, 伊東 佑太, 片岡 亮人, 縣 信秀, 宮津 真寿美, 河上 敬介. Bupivacaine による筋損傷モデルラットにおける筋力と非損傷部の横断面積との関係. 第 14 回理学療法の医学的基礎研究会学術集会. 平成 21 年 5 月. 東京
6. 森 友洋, 岡元 信弥, 伊東 佑太, 片岡 亮人, 縣 信秀, 宮津 真寿美, 河上 敬介. 筋損傷を H-E 染色にて評価できるか?. 第 14 回理学療法の医学的基礎研究会学術集会. 平成 21 年 5 月. 東

京.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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◇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

縣 信秀 (AGATA NOBUHIDE)

浜松大学・保健医療学部・助教

研究者番号：00549313

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：