

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：33111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500611

研究課題名（和文）メカノトランスダクション機構を介した筋-骨組織への磁場及び運動刺激効果

研究課題名（英文）Effects of exercise training and pulsed electromagnetic stimulation on inhibition of muscle and bone loss.

研究代表者

田巻 弘之（TAMAKI HIROYUKI）

新潟医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：40253926

研究成果の概要（和文）：メカニカルストレス、運動刺激およびパルス磁場刺激の効果を、若齢期及び高齢期の骨格筋・骨組織で検証することを目的とした。反復磁気刺激 24 時間後の BMP 及び TGF- $\beta$  mRNA の発現量は、若齢期においてのみ up-regulate した。高齢期ではいずれも変化はなく、刺激効果は年齢や刺激強度によって異なることが示唆された。高齢期の運動によるメカニカルストレスの筋骨格系への影響は、ストレス領域や強度依存性を呈した。

研究成果の概要（英文）：We examined the in vivo effects of repetitive pulsed magnetic stimulation (rPMS) and exercise training with mechanical stress on muscle and bone formation in young and aged rat. The rPMS stimulated mRNA levels of BMP-2 and TGF- $\beta$ 2 after 24 h of treatment compared to the contralateral hindlimb in young rats. In old rats, rPMS at higher intensity did not up-regulate mRNA expression levels of osteoblast marker genes. The beneficial effects of rPMS on gene expression levels related to bone formation may thus be associated with age and/or stimulation intensity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：骨、運動、磁場、メカニカルストレス

### 1. 研究開始当初の背景

運動刺激によってもたらされる骨組織への影響の調節因子は、メカニカルストレスによる「力学的因子」、ホルモンや循環による「液性因子」、さらに近年注目されている交感神経系を介する「神経性因子」がある。高齢に至ると、もしくは運動量の低下は筋骨格系の萎縮を惹起するため、薬物療法以外では

特に運動処方による効果を期待して、そのプログラム開発に注目が集まっている。しかしながら自立歩行などの日常的な軽微な運動実践も困難な低体力者等においては、メカニカルストレス類似効果が期待できるような方法が望まれている。運動刺激による骨形成作用の力学的因子では、メカニカルストレスによる骨内流動電位の発生が骨芽細胞の機

能活性を高めるというメカノトランスダクション機構があり、静的磁場環境暴露によって骨形成パラメータの増加が認められており (Kotani, *J Bone Miner Res* 2002)、磁場刺激はメカニカルストレスと同様、応用可能性が期待される手法である。

## 2. 研究の目的

本研究では運動刺激・パルス磁場刺激の効果を、若齢期及び高齢期の骨格筋・骨組織で検証することを目的として、1) パルス磁気刺激による骨組織内磁場強度分布の同定を行い、2) 若齢期および高齢期ラットを対象に反復磁気刺激を処方し、また 3) 高齢期ラットを対象に自発走運動を処方し、これらの効果を組織細胞、遺伝子発現レベルで検証した。

## 3. 研究の方法

1) パルス磁気刺激による骨組織内磁場強度分布の同定を行うため、刺激部位から距離やポジションなどを変えて 810 条件で実測した。刺激強度は 10-100% までの 10 種類で、刺激距離が 10-90mm までの 9 種類、並びに X-Y 平面上の 9 ポジションについて、全 810 条件での長軸方向の磁場強度 (PEMF strength) のピーク値をガウスメーターで計測した。PEMF 強度-刺激強度関係、PEMF 強度-距離関係について各ポジションで相関係数、回帰式を求め、それらの差の検定 (直線の差の検定、非線形回帰カーブフィット) を行った。計測の精度及び再現性は、反復計測の変動係数、再計測 (test-retest)、Bland-Altman プロット等から確認した。

2) 麻酔下で若齢 (6w) 及び高齢ラット (75-120w) の下肢に骨内磁気刺激強度 40-60mT で反復磁気刺激を 0.2-1Hz の頻度で、5-10 分間行った。24 時間後に脛骨骨髄を採取して real-time RT-PCR により BMP-2, BMP-4, TGF- $\beta$ 2, COL-I, OCN mRNA 発現量を調べ、非刺激骨 (Cont) と比較した。

3) 2.5 年齢の実験動物 (ラット) を用い、回転車輪式運動負荷装置による自発走を 8-10 週間実施した。その後ヒラメ筋、長趾伸筋、並びに脛骨を採取して、H-E, Azan, トルイジンブルー、シリウスレッド染色を施し、光学顕微鏡にて骨幹端の海綿骨並びに筋横断を観察撮影し、画像解析ソフトにて骨梁形態並びに筋組織内コラーゲン線維を解析した。

## 4. 研究成果

1) 強度依存性: どのポジションにおいても骨内 PEMF 強度と刺激強度の関係において有意に高い正相関を示し ( $r^2=0.999-1.0$ ,  $P<0.0001$ )、磁気刺激装置の強度設定により骨内 PEMF 強度が推定可能であろうと思われた。距離依存性: 刺激距離の増大に伴い指数

的減衰を示し、距離が 30mm 付近にその変曲点を有した。ポジション依存性: X-Y 水平面のポジションでは、3 領域に大別される PEMF 強度分布パターンを示した。距離が大きくなるほど Focality は小さくなった。センサー上に骨組織がない状態で計測した場合と比較して、いずれの条件においても PEMF 強度に有意な差はなかった。骨内 PEMF 強度は刺激強度、距離、ポジションにより異なり、本研究の 810 条件での実測データは、生体磁気刺激の応用目的において、組織内で生じている PEMF 強度を推定するための条件設定に有用となった。(図 1)

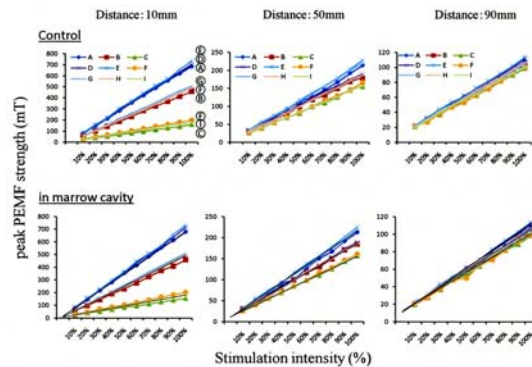


図 1. 骨内磁場強度と刺激距離、ポジションとの関係。

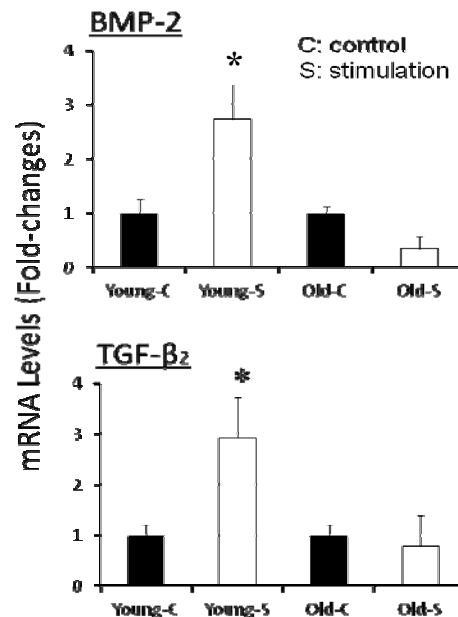


図 2. 反復磁気刺激後の脛骨骨髄における BMP-2 及び TGF- $\beta$  mRNA 発現の比較。

2) 反復磁気刺激 24 時間後の BMP-2, BMP-4 及び TGF- $\beta$  mRNA の発現量は Cont と比較して、若齢期においてのみ有意に up-regulate したが、COL-I, OCN mRNA 発現量は変化がなかった。高齢期ではいずれのパラメータについても変化はなく、刺激効果は加齢や刺激強度によって異なることが示唆された (図 2)。

骨量及び骨梁構造、筋細胞内膜系の超微細構造に対しても一過性の効果は認められなかった。また  $\mu$ CT 撮影による骨組織の3次元構造解析についても一過性の効果については認められなかった。本実験条件においての一過性効果は、若齢期の骨形成促進パラメータの遺伝子発現レベルにおいて認められた。

3) 高齢期ラットの骨量は若年及び中年期のものと比較して、著しく低く、脛骨骨幹端二次海綿骨の骨梁構造も粗であり、新たに骨芽細胞により形成された類骨幅、類骨面積は有意に小さいことが観察された。自発走運動を実施することにより、骨梁幅及び類骨幅は age-matched control と比べて大きくなり、海綿骨における骨基質の形成に対してポジティブな影響を及ぼすのではないかと考えられた(図3)。また下肢の骨格筋重量も自発走運動実施により、非運動群と比較して高いレベルを維持していた。しかしながら筋組織内のコラーゲン線維は、特に遅筋線維優位な筋組織において多く観察される傾向にあり、高齢期においては線維化を助長する可能性も示唆された。またヒトへのメカニカルストレスの影響を検証するため、下肢筋収縮の持続や軽運動の継続を行い、筋収縮強度レベルや様式についても検討した。大腿骨頸部など下肢の特定の領域については、骨密度が増大することが示されたが、その他の領域については有意な変化は観察されなかった。運動によるメカニカルストレスの筋骨格系への影響は、ストレス領域、強度依存性を呈することが理解され、運動処方における条件設定に有用な知見と考えられた。

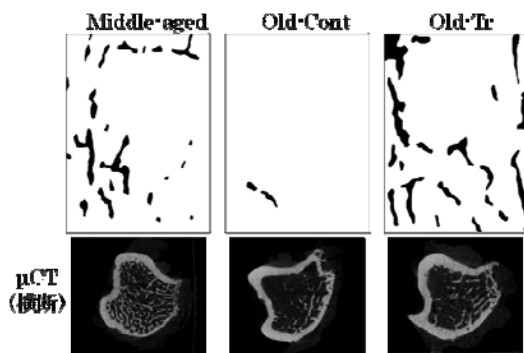


図 3. 高齢期における脛骨骨梁構造並びに骨量に及ぼす運動刺激の効果。

#### 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 13 件)

① Tamaki H, Yotani K, Ogita F, Takahashi H, Kirimoto H, Onishi H, Yamamoto N,

Changes over time in structural plasticity of trabecular bone in rat tibiae immobilized by reversible sciatic denervation. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 13, 2013. (査読有, in press)

② Yotani K, Tamaki H, Nakamoto H, Yuki A, Kirimoto H, Kitada K, Ogita F, Mori S, Visuo-motor related time analysis using electroencephalograms. *World Journal of Neuroscience*, 2013. (査読有, in press)

③ 田巻弘之, 運動刺激による骨組織の形成と吸収. *日本運動生理学雑誌*, 19(2), 53-57, 2012.(総説)

④ 幸 篤武, 與谷謙吾, 石道峰典, 田巻弘之, 春日規克, ジャンプトレーニング並びに持久走トレーニングによるラット下肢骨及び骨格筋の発達変化とその関連性. *日本運動生理学雑誌*, 19(2), 65-73, 2012.(査読有)

⑤ Suzuki M, Kirimoto H, Onishi H, Yamada S, Tamaki H, Maruyama A, Yamamoto J, Reciprocal changes in input-output curves of motor evoked potentials while learning motor skills. *Brain Res*, 1473:114-123, 2012.  
DOI: 10.1016/j.brainres.2012.07.043.

⑥ Nishiwaki M, Kawakami R, Saito K, Tamaki H, Takekura H, Ogita F, Vascular adaptations to hypobaric hypoxic training in postmenopausal women. *J Physiol Sci*, 61, 83-91, 2011. (査読有)  
DOI: 10.1007/s12576-010-0126-7.

⑦ Yotani K, Tamaki H, Yuki A, Kirimoto H, Kitada K, Ogita F, Takekura H, Response training shortens visuo-motor related time in athletes. *Int J Sports Med*, 32, 586-590, 2011. (査読有)  
DOI: 10.1055/s-0031-1275299.

⑧ Tamaki H, Kirimoto H, Yotani K, Takekura H, Frequent alternate muscle activity of plantar flexor synergists and muscle endurance during low-level static contractions as a function of ankle position. *J Physiol Sci*, 61, 411-419, 2011. (査読有)  
DOI: 10.1007/s12576-011-0157-8.

⑨ Tomori K, Ohta Y, Nishizawa T, Tamaki H, Takekura H, Low-intensity electrical stimulation ameliorates disruption of transverse tubules and neuromuscular junctional architecture in denervated rat skeletal muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil*, 31, 195-205, 2010. (査読有)  
DOI: 10.1007/s10974-010-9223-8.

⑩ Tamaki H, Yotani K, Yuki A, Kirimoto H, Sugawara K, Onishi H, Magnetic field strength properties in bone marrow during pulsed electromagnetic stimulation. *J.*

Biomedical Science and Engineering, 3, 1156-1160, 2010. (査読有)

DOI: 10.4236/jbise.2010.312150

- ⑪ Yuki A, Yotani K, Tamaki H, Kasuga N, Takekura H., Upregulation of osteogenic factors induced by high-impact jumping suppresses adipogenesis in marrow but not adipogenic transcription factors in rat tibiae. Eur J Appl Physiol, 109(4), 641-650, 2010. (査読有)  
DOI:10.1007/s00421-010-1383-0.
- ⑫ Miura K, Yamamoto M, Tamaki H, Zushi K., Determinants of the abilities to jump higher and shorten the contact time in a running 1-legged vertical jump in basketball. J Strength Cond Res, 24(1), 201-206, 2010. (査読有)  
DOI:10.1519/JSC.0b013e3181bd4c3e.
- ⑬ 赤嶺卓哉, 田巻弘之, 奥谷謙吾, 坂下一平, 藤井康成, 高田大, 添嶋裕嗣, 吉田剛一郎, 福永哲夫, 中高年女性の身体組成・骨密度に及ぼす体幹・下肢健康(貯筋)運動の影響. 九州・山口スポーツ医科学研究会誌, 22, 24-29, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

- ① Tamaki H, Tomori K, Yotani K, Ogita F, Takahashi H, Kirimoto H, Onishi H, Yamamoto N, Kasuga N, Electrical stimulation of denervated rat skeletal muscle slows trabecular bone loss in early stages of disuse atrophy. 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society, S56, 29 May, 2013. Kobe(査読有)
- ② 田巻弘之, 友利幸之介, 奥谷謙吾, 菅原和広, 高橋英明, 北田耕司, 桐本光, 大西秀明, 荻田太, 春日規克, 電気刺激による筋収縮張力が除神経後の骨萎縮防止に及ぼす影響. 体力科学, 61, 594, 2012.9.15. (査読有)
- ③ 高橋英明, 奥谷謙吾, 荻田太, 菅原和広, 桐本光, 大西秀明, 田巻弘之, 自然発症糖尿病ラットにおける脛骨骨梁構造の特徴. 体力科学, 61, 595, 2012.9.15. (査読有)
- ④ 田巻弘之, 奥谷謙吾, 幸篤武, 菅原和広, 椿 淳裕, 桐本光, 大西秀明, 荻田太, 山本智章, 春日規克, ラット坐骨神経の一過性の denervation 及び reinnervation による骨格筋及び脛骨骨梁構造の経時的変化. 日本基礎理学療法学雑誌, 16(1), 21, 2012.5.24.(査読有)
- ⑤ Tamaki H, Yotani K, Yuki A, Kirimoto H, Ogita F, Effects of voluntary wheel running on trabecular bone architecture in old rats. Adv Exerc Sports Physiol, 17, 73, 2011. 8.25. (査読有)

- ⑥ Ogita F, Yotani K, Kurobe K, Nishiwaki M, Tamaki H, Time course of blood pressure and arterial stiffness to intermittent hypobaric hypoxic exercise training. Adv Exerc Sports Physiol, 17(2), 46, 2011. 8.25.(査読有)
- ⑦ 田巻弘之, 山本智章, 一過性の denervation による萎縮及び回復過程におけるラット骨格筋及び脛骨骨梁構造の経時的変化. 第 29 回日本骨代謝学会, 273, 2011. 7.30.(査読有)
- ⑧ 田巻弘之, 幸 篤武, 運動負荷による骨組織の形成と吸収. 日本体育学会第 62 回大会 運動生理学シンポジウム「運動・スポーツと骨」, 27, 2011.9.25. (招待講演)
- ⑨ Tamaki H, Yuki A, Tomori K, Yotani K, Kirimoto H, Onishi H, Kasuga N, Effects of pulsed electromagnetic field stimulation on transient gene expression related to bone formation in old rats. 2011 Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, 146, 18, Sep, 2011. USA(査読有)
- ⑩ Tamaki H, Yotani K, Yuki A, Kirimoto H, Sugawara K, Jigami H, Tsubaki A, Onishi H, Ogita F, Characterization of magnetic field strength in long bone during pulsed electromagnetic stimulation. Adv Exerc Sports Physiol, 16(2), 78, 1, Aug, 2010.(査読有)
- ⑪ Kurobe K, Huang Z, Ozawa G, Tamaki H, Ogita F, Effects of resistance training in hypoxic condition on muscle hypertrophy and muscle strength. Eur Coll Sport Sci, 15, 357-358, 2010. 23-26, June, Turkey (査読有)
- ⑫ Tamaki H, Yotani K, Yuki A, Nishizawa T, Tomori K, Kirimoto H, Onishi H, Ogita F, Takekura H, Effects of pulsed electromagnetic fields stimulation on gene expression related to bone formation in spontaneously hypertensive rats. 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, 56, USA, 16 Oct. 2010. (査読有)

[図書] (計 2 件)

- ① 田巻弘之: 健康スポーツ学概論。「運動生理学 (筋骨格系, 神経系)」, 杏林書院, pp64-73, 2013.
- ② 田巻弘之, 運動生理学のニューエビデンス「運動と骨格. 骨の形成と吸収」, 真興交易医書出版部, pp154-161, 2010.

[その他]

ホームページ等

・新潟医療福祉大学運動機能医科学研究所

ホームページ : <http://www.ihms.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田巻 弘之 (TAMAKI HIROYUKI)  
新潟医療福祉大学・医療技術学部・教授  
研究者番号 : 4 0 2 5 3 9 2 6

### (2) 研究分担者

與谷 謙吾 (YOTANI KENGO)  
鹿屋体育大学・体育学部・助教  
研究者番号 : 1 0 5 8 1 1 4 2  
桐本 光 (KIRIMOTO HIKARI)  
新潟医療福祉大学・医療技術学部・准教授  
研究者番号 : 4 0 4 0 6 2 6 0  
大西 秀明 (ONISHI HIDEAKI)  
新潟医療福祉大学・医療技術学部・教授  
研究者番号 : 9 0 3 3 9 9 5 3

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :