

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300191

研究課題名(和文)筋損傷の早期回復に対する理学療法効果の多角的解析と包括的治療戦略

研究課題名(英文)Physical therapy to promote the recovery from muscle injury in rat

研究代表者

河上 敬介(Kawaakami, Keisuke)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60195047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋損傷に対する理学療法による回復促進効果を、あらかじめ組織学的な筋損傷量が明らかにされているモデルラットを用いて検証した。評価は筋線維の横断面積や足関節のトルクを指標に行った。その結果、筋損傷後早期に超音波刺激または伸長刺激をそれぞれ与えると、筋損傷からの回復促進効果が認められることが判明した。このメカニズムの一端を調べるために、筋衛星細胞の活性の指標であるMyoD量とmyogenin量を超音波刺激と伸長刺激後に調べた。その結果、損傷後早期に与える超音波刺激や伸長刺激は、筋損傷後数日以内に起こる筋衛星細胞の活性化を促進させ、その結果として損傷からの回復を促進させている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the effect of ultrasound and stretching on recovery from muscle injury, changes in muscle force production and myogenic gene expressions were investigated in an LC-induced muscle injury mode of rat. We established the LC-induced muscle injury model, whose injury was histologically confirmed to be equivalent. The results show that ultrasonic stimulation and stretching added once after muscle injury on the TA effectively promotes recovery from muscle injury according to histological and physiological evaluation. Additionally, during recovery from muscle injury the activation of muscle satellite cells early after muscle injury is suggested to be involved.

研究分野：理学療法学

キーワード：骨格筋 筋損傷 機械刺激 超音波 ラット リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

日常生活やスポーツにおける過度な負荷により、筋損傷が生じる。理学療法にとって、筋損傷からの回復を促進させることは、日常生活やスポーツ活動への早期復帰に重要なことである。一般的にスポーツにおける筋損傷は、伸張性筋収縮により生じやすいと言われている。伸張性筋収縮による筋損傷は、運動による筋線維への過度な機械刺激が原因で発生する。これまで、筋損傷後早期の治療として、RICE (R: Rest 安静, I: Ice 冷却, C: Compression 圧迫, E: Elevation 挙上) 処置が中心に行われてきている。例えばこれまでに、筋損傷後の筋を安静にすることで血腫や結合組織痕のサイズを小さくさせるという報告や、損傷筋の冷却により筋力、筋線維横断面積、筋タンパク合成が向上したという報告がある。一方、筋損傷からの回復促進効果を期待して、RICE 処置以外に軽度の運動療法や超音波治療が選択されていることもある。しかし、これまでの報告を確認してみると、運動療法や超音波治療を肯定的な報告しているものと、否定的に報告しているものがあり、決着がついているわけではないと考えられる。その理由の一つには、これまでの報告で使用されている筋損傷モデルの筋損傷の割合が不明であり、再現性のある筋損傷モデルが用いられていない可能性がある。また、筋損傷という組織学的な現象を筋力と言う生理学的評価で検証している報告が多く、定量的評価が組織学的に行なわれていないことがあげられる。さらに、最新の筋再生科学に裏付けられた回復の総合的評価が行われていないことがあげられる。

2. 研究の目的

そこで、本研究では筋損傷に対する軽度の運動療法や超音波治療の効果が判明していない理由を解決するために(1)組織学的に再現性の確認された筋損傷モデルを用い、(2)筋損傷からの回復過程を組織学的に検証し、(3)筋損傷からの再生を生化学的検証する。そして、臨床的に重要な筋力(生理学的現象)の回復を指標に加えることにより、筋損傷に対する理学療法の効果を検証するとともに、効果的・効率的な治療戦略を確立する。

3. 研究の方法

(1) EC (Eccentric Contraction)による筋損傷モデルを作製と EC の条件と筋損傷との関係

小動物用足関節運動装置と電気刺激装置を用いて、角速度 50, 100, 200, 400 deg/sec の条件の EC を 8 週齢 Wistar 系雄性ラットの前脛骨筋に加え、筋力、筋損傷量を評価した。筋力は、EC 前と 2 日後に電気刺激による最大等尺性足関節背屈トルクの測定により評価した。筋損傷量は、EC 1 日後に Evans Blue Dye (EBD) を投与し、EC 2 日後に前脛骨筋を採取し、筋腹横断面中に存在する EBD 陽性筋線維数の測定により評価した。

(2)超音波刺激の方法

超音波刺激は、超音波治療器 (US-700, 伊藤超短波) を使用し、ラット下腿前面から前脛骨筋に与えた。ラットはイソフルランガス吸入麻酔下にて下腿前面を剃毛後、腹臥位とし腹部を左右より固定した。次に、超音波プローブのヘッドにゲルを塗布し、超音波プローブのヘッドと平行になるように、足関節中間位、鉛直方向に対して足底軸 45° で足部を固定した。ゲルを塗布する際、ゲル内に気泡が入らないように行った。超音波刺激条件は、固定法で周波数 3.0 MHz, 強度 0.5 W/cm², 照射時間率 50%, 照射様式はパルス波とした。また、頻度は、筋損傷モデルラットに 2 時間後 1 回のみ (LC 2h+US 1 回群) と 24 時間後に 1 回のみ (LC 24h+US 1 回群) と、筋損傷 24 時間後に最初の 1 回を行い、それ以降 2 日に 1 回の頻度で筋損傷 21 日後までの間に超音波刺激を 10 回行った (LC 24h+US 10 回群)。なお、各 1 回に実施する超音波刺激時間は 10 分間とした。この条件で 10 分間の超音波刺激を行っても、組織温 (筋温、骨温) の上昇がみられないことを確認した。

(3)伸張刺激の与え方

伸張刺激は、イソフルランガス吸入麻酔下にてラット足関節に定量的なトルクを加えることのできる小動物用足関節運動装置を用いて、足関節を底屈させることにより与えた。EC 1 日後に、15 分間の繰り返し伸張刺激 (足関節底屈位・中間位を 5 秒毎に繰り返す、足関節底屈時のトルクは 3 mN・m を保持) を加えた。

(4)評価方法

筋力の評価

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 cm² 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、トルクセンサーにて測定した。測定は筋損傷の直前と、筋損傷 2, 7, 14, 18, 21 日後に行った。

組織の評価

EC 21 日後に筋を採取し、筋細胞膜に特異的に局在する Dystrophin の免疫染色を行い、筋線維横断面積の測定を行った。

生化学的評価

EC 後の前脛骨筋を筋採取し、電気泳動法及び Western blot 法を用いて筋分化調節因子である MyoD および myogenin の量の経時的変化を調べた。

4. 研究成果

(1) EC による筋損傷モデルを作製と EC の条件と筋損傷との関係

角速度依存的に、筋損傷量が増加するとともに、筋力が低下することが判明した。

EC の条件の中で、200 deg/sec で作製したモデルが、最も筋損傷量と筋力低下の再現性

が高かった(損傷筋線維数 1677.2 ± 133.2 cells, 足関節トルク 45.9 ± 3.2 mNm). この条件を用いて伸張刺激による筋損傷からの回復促進効果を検討することとした.

(2) 超音波刺激による筋損傷からの回復促進効果

筋損傷 14, 18, 21 日後の超音波刺激群の足関節背屈トルクは, 非刺激群に比べて有意に大きかった(筋損傷 21 日後の超音波刺激群: $123.1 \pm 8.3\%$ 非刺激群: $105.8 \pm 2.5\%$). また, 足関節背屈トルクの回復が最も促進した損傷 2 時間後に超音波刺激を与えた群の筋線維横断面積を測定した. その結果, 非刺激群の筋線維横断面積は con 群と比較して有意に小さかったのに対し, 超音波刺激群の筋線維横断面積は con 群と有意差がなく, ほぼ同じ大きさであった(超音波刺激群: $3043.1 \pm 268.7 \mu\text{m}^2$, 非刺激群: $2478.5 \pm 293.3 \mu\text{m}^2$, con 群: $3209.9 \pm 628.3 \mu\text{m}^2$). この筋損傷からの回復のメカニズムに関与していると考えられている筋原性調節因子である MyoD および myogenin の発現量の経時的变化(筋損傷 12, 24, 48, 72, 96, 120 時間後)を, ウェスタン・ブロット法により測定した. その結果, 非刺激群と比べた超音波刺激群の MyoD 量と myogenin 量はすべての時期で多くなり, MyoD 量は筋損傷 12, 24 時間後で有意に多くなり, myogenin 量は筋損傷 12 時間後で有意に多くなった.

(3) 伸長刺激による筋損傷からの回復促進効果

前脛骨筋に対する EC 1 日後に 1 回のみ $3 \text{ mN} \cdot \text{m}$ のトルクで 15 分間の伸張刺激を加えると, EC 21 日後の筋力は, 伸張刺激を加えない Control 群に比べ有意に大きく, EC も伸張刺激も加えない Sham 群と同程度まで回復した. また, 伸張刺激群の EC 21 日後の筋線維横断面積は, Control 群に比べ有意に大きく, Sham 群との間に有意な違いはなかった. すなわち, EC 1 日後に 1 回のみ行う 15 分間の伸張刺激が, 機能的, 組織学的に損傷からの回復を促進することを明らかにした. MyoD および myogenin の発現量の経時的变化(筋損傷 30, 36, 48, 72 時間後)を, ウェスタン・ブロット法により測定した. その結果, 非刺激群と比べた伸長刺激群の MyoD 量に関しては有意な違いは認められなかった. myogenin 量は筋損傷 36 時間後で有意に多くなった.

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 1 件)

Mori T., Agata N., Itoh Y., Inoue-Miyazu M., Sokabe M., Taguchi T., Kawakami K., Stretch speed-dependent myofibre damage and functional deficits in rat skeletal muscle,

Physiological Reports, 査読有 Vol.2 no. e12213. 2014, DOI:10.14814/phy2.12213

[学会発表](計 13 件)

河上敬介, 第 1 回日本基礎理学療法学会学術集会・日本基礎理学療法学会第 4 回学術大会 合同学会 開催にあたって, 第 1 回日本基礎理学療法学会学術集会・日本基礎理学療法学会第 4 回学術大会 合同学会, 2014/11/15, 名古屋学院大学(名古屋キャンパス白鳥学舎)(愛知県・名古屋市)

柴田篤志, 森友洋, 縣信秀, 宮本靖義, 宮津真寿美, 河上敬介, 筋損傷後早期の超音波刺激は筋衛星細胞の活性と損傷からの回復を促進させる, 第 1 回日本基礎理学療法学会学術集会・日本基礎理学療法学会第 4 回学術大会 合同学会, 2014/11/15, 名古屋学院大学(名古屋キャンパス白鳥学舎)(愛知県・名古屋市) 吉岡潔志, 黒木優子, 笹井宣昌, 早川公英, 村上太郎, 宮津真寿美, 河上敬介, 短時間の筋収縮停止はタンパク質分解とともに筋収縮構成タンパク質の合成を亢進させる ニワトリ胚由来の培養系筋萎縮モデルを用いて, 第 49 回日本理学療法学術大会, 2014/5/31, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Yoshioka K., Kurogi Y., Sasai N., Hayakawa K., Murakami T., Kawakami K., Short time of unloading promotes protein synthesis before increasing atrogen-1 expression in unloading-induced muscle atrophy model in culture, The International Symposium on Mechanobiology 2014, 2014/5/23, Junko Fukutake Hall(岡山県・岡山市)

河上敬介, 骨格筋に対する効果的な伸長刺激の与え方, 公益社団法人鹿児島県理学療法士協会第 27 回学会(招待講演), 2014/2/16, 鹿児島市民文化ホール(鹿児島県・鹿児島市)

河上敬介, 理学療法の基礎研究の現状と近未来への提言, 第 32 回関東甲信越ブロック理学療法士学会(招待講演), 2013/11/2, 幕張メッセ国際会議場(東京都)

河上敬介, 筋損傷の予防, 治療, 復帰, 一般社団法人日本整形外科スポーツ医学会第 39 回学術集会(招待講演), 2013/11/2, ウィンク愛知(愛知県・名古屋市)

Mori T., Shibata A., Agata N., Miyamoto Y., Inoue-Miyazu M., Kawakami K., The recovery facilitatory effect for muscle injury by stretch stimulation, The 6th WCPT-AWP & 12th ACPT Congress 2013, 2013/9/8, Nan Shan Education & Training Center(Taichung・Taiwan)

Shibata A., Mori T., Agata N., Miyamoto Y., Inoue-Miyazu M., Kawakami K., Ultrasonic stimulation to promote recovery from muscle injury., The 6th WCPT-AWP & 12th ACPT Congress 2013, 2013/9/8, Nan Shan Education & Training Center (Taichung・Taiwan)
柴田篤志、森友洋、縣信秀、宮本靖義、宮津真寿美、河上敬介、超音波刺激が筋損傷の回復過程に与える影響、第 48 回日本理学療法学会大会、2013/5/25、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
森友洋、柴田篤志、縣信秀、伊東佑太、宮本靖義、宮津真寿美、河上敬介、伸張刺激による筋損傷からの機能的及び組織学的回復促進効果、第 48 回日本理学療法学会大会、2013/5/25、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
森友洋、柴田篤志、縣信秀、宮津真寿美、宮本靖義、河上敬介、伸張刺激による筋損傷からの機能的回復促進効果、第 11 回コ・メディカル形態機能学会学術集会、2012/9/22、首都大学東京(荒川キャンパス)(東京都)
森友洋、縣信秀、柴田篤志、宮津真寿美、河上敬介、再現遠心性収縮による筋損傷モデルの組織学的・機能的回復、第 47 回日本理学療法学会大会、2012/5/27、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

河上敬介、宮津真寿美、ほか 16 名、ナップ、筋機能改善の理学療法とそのメカニズム(第 3 版)分担部分:第 11 章 機械刺激に対する骨格筋の応答、2014、21 頁(226-246)

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.kmnu.matrix.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河上 敬介(KAWAKAMI, Keisuke)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 60195047

(2) 研究分担者

曾我部 正博(SOKABE, Masahiro)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 10093428