

2009 年度 修士論文

廃用性萎縮に対する低周波鍼通電療法の  
影響について

-分子生物学的手法を用いて-

Effect of Electro-acupuncture  
on skeletal muscle atrophy in mice  
with molecular biological method

早稲田大学 大学院スポーツ科学研究科  
スポーツ科学専攻 スポーツ医科学研究領域

5008A016-1

遠 田 明 子  
Onda, Akiko

研究指導教員： 福林 徹 教授

## 目次

|       |                |       |    |
|-------|----------------|-------|----|
| 第 1 章 | 緒言             | ----- | 1  |
| 第 2 章 | 文献研究           | ----- | 3  |
| 2-1   | 骨格筋とは          | ----- | 3  |
| 2-1-1 | 骨格筋の機能と構造      |       |    |
| 2-1-2 | 骨格筋の収縮特性       |       |    |
| 2-1-3 | 骨格筋の可塑性        |       |    |
| 2-2   | 筋萎縮とは          | ----- | 4  |
| 2-2-1 | 筋萎縮            |       |    |
| 2-2-2 | タンパク質の合成と分解    |       |    |
| 2-2-3 | タンパク質分解経路      |       |    |
| 2-3   | 鍼治療とは          | ----- | 8  |
| 2-3-1 | 鍼治療の歴史         |       |    |
| 2-3-2 | 鍼治療効果発現のメカニズム  |       |    |
| 2-3-3 | 筋萎縮への鍼治療       |       |    |
| 第 3 章 | 研究目的           | ----- | 10 |
| 第 4 章 | 材料と方法          | ----- | 11 |
| 4-1   | 試薬一覧           | ----- | 11 |
| 4-2   | 実験動物           | ----- | 12 |
| 4-3   | 実験モデル          | ----- | 12 |
| 4-4   | 実験 デザイン        | ----- | 14 |
| 4-5   | 刺鍼および鍼通電条件     | ----- | 14 |
| 4-6   | サンプル採取         | ----- | 17 |
| 4-6-1 | 筋サンプル採取および筋湿重量 |       |    |
| 4-6-2 | Real-time PCR  |       |    |
| 4-6-3 | 筋線維断面積         |       |    |
| 4-7   | 統計処理           | ----- | 20 |

|       |                       |       |    |
|-------|-----------------------|-------|----|
| 第 5 章 | 結果                    | ----- | 21 |
| 5-1   | 体重変化表                 | ----- | 21 |
| 5-2   | 摂食量                   | ----- | 23 |
| 5-3   | ヒラメ筋                  | ----- | 24 |
| 5-3-1 | 筋湿重量                  |       |    |
| 5-3-2 | 筋線維断面積                |       |    |
| 5-3-3 | Atrogin-1, MuRF1 の発現量 |       |    |
| 5-3-4 | 小括                    |       |    |
| 5-4   | 足底筋                   | ----- | 29 |
| 5-4-1 | 筋湿重量                  |       |    |
| 5-4-2 | 筋線維断面積                |       |    |
| 5-4-3 | Atrogin-1, MuRF1 の発現量 |       |    |
| 5-4-4 | 小括                    |       |    |
| 第 6 章 | 考察                    | ----- | 35 |
| 6-1   | 筋湿重量／筋線維断面積の変化        |       |    |
| 6-2   | 萎縮関連遺伝子の発現変化          |       |    |
| 6-3   | 筋萎縮に対する鍼刺激効果発現のメカニズム  |       |    |
| 6-4   | 今後の研究計画               |       |    |
| 第 7 章 | 結語                    | ----- | 39 |
|       | 謝辞                    | ----- | 40 |
|       | 参考文献                  | ----- | 41 |

## 第 1 章 緒言

快適な日常生活を営むために、日々の健康状態に留意することは大切である。成人以降、年齢を経るに従い必然的に身体機能は衰えてゆくが、骨格筋は可塑性に富むゆえに、運動などによる鍛錬の結果、加齢による機能低下に歯止めをかける事が可能である。

骨格筋の萎縮は様々な要因で引き起こされる。すなわち筋萎縮はデュシェンヌ型筋ジストロフィーなどの遺伝的な要因のみでなく、後天的な要因によっても引き起こされる。飢餓、不活動、重力免荷、糖尿病、クッシング症候群、グルココルチコイド治療などがその例であり、また高齢化による筋量の低下は、加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）と呼ばれている。

超高齢社会を迎えた昨今、長期臥床や傷害に伴うギプス固定、不活動などにより、廃用性の筋萎縮が引き起こされた症例は枚挙に暇がない。また、廃用性萎縮はその後のリハビリテーションによる回復過程にも重要な影響を与える。QOL の確保のためにも、骨格筋の萎縮に適切な対処を行う必要がある。今日、廃用性萎縮に対しては様々な治療方法が行われており、鍼治療もまた、廃用性萎縮に対する治療の選択肢の一つである。

東洋医学を代表する治療法の一つである鍼治療は、臨床的にも多く用いられているが、その治効メカニズムの解明は端緒の緒についたばかりである。現在までの鍼治療効果の科学的エビデンスとして現象の報告は多いが、そのメカニズムの生理学、分子生物学的な説明はほとんどなされていない。

近年、筋萎縮を引き起こす遺伝子として、筋特異的ユビキチンリガーゼである Atrogin-1, MuRF1 が同定された。骨格筋萎縮の原因は多岐にわたるが、ほとんど全ての骨格筋萎縮においてこれら 2 遺伝子の発現が亢進し、骨格筋構造タンパク分解を促進することから、Atrogin-1, MuRF1 は筋萎縮の原因遺伝子と考えられている。

本研究では、廃用性萎縮に対する鍼の治功メカニズム解明のため、実験動物を用いて、鍼通電療法による筋萎縮関連遺伝子の発現変化を検討した。また、

鍼通電療法のみではなく，古くから用いられている置鍼も比較検討の対象とした．

## 第2章 文献研究

### 2-1 骨格筋とは

#### 2-1-1 骨格筋の機能と構造

動物が環境に適応して活動を営む上で、筋肉の果たす役割は重要である。人体を構成する筋は3種類に大別される。すなわち、消化器官の内臓壁を構成する平滑筋、収縮に適した固有心筋と興奮の伝導に適した特殊心筋から構成される心筋、そして手足を動かし移動を行う骨格筋である。骨格筋は、その名の通り、骨格を構成する骨に付着している筋で、姿勢を維持するとともに筋収縮により四肢を動かすという機能を有している。

骨格筋は筋細胞（筋線維）と呼ばれる細長い細胞が束状になって構成されており、この両端は一般に腱を介して骨格に付着する。心筋と平滑筋は単核であるが、骨格筋は核が表層に多数存在する、独特の多核構造を有する。筋細胞は筋原線維によって構成されるが、骨格筋が有する横紋構造は、サルコメアと呼ばれる特徴的な筋原線維の形態によって形成されている。その構成はアクチンフィラメントとミオシンフィラメントによる縞模様であり、光学顕微鏡で観察した際に、明るく見える部分をI帯、暗く見える部分をA帯と呼ぶ。I帯はアクチンフィラメントのみで構成される部分であり、A帯はミオシンフィラメントとアクチンフィラメントが重なる部分である。I帯の中央にはZ盤（帯）と呼ばれる筋原線維の区切りが存在する。

#### 2-1-2 骨格筋の収縮特性

骨格筋収縮の分子メカニズムには諸説あるが、細いアクチンフィラメントが太いミオシンフィラメントの間に滑り込むという滑走説が有力である(1)。筋の収縮システムは興奮収縮連関と呼ばれ、筋の活動電位が発生した後、神経筋接合部を介して、筋原線維を取り巻く筋小胞体から $\text{Ca}^{2+}$ が放出される。ミオシンフィラメントの頭部は、 $\text{Ca}^{2+}$ の存在下でトロポミオシンによるアクチンフィラメントへの抑制が外れ、ATP依存的にアクチンフィラメントに接合できるよ

うになり，その結果筋収縮が生じる．

自律神経の支配を受ける心筋と平滑筋は不随意筋であるが，骨格筋は体性運動神経の支配を受け，自分の意思で動かすことが可能な随意筋である．骨格筋は求心性神経である感覚神経と，遠心性神経である運動神経による支配を受けており，運動ニューロンの軸索は，筋線維に分布する過程で分岐する．1 個の運動ニューロンは数本から数百本の筋線維を支配しているが，この 1 個の運動ニューロンによって支配される筋線維の単位を運動単位という．また，1 個の細胞が支配する筋線維の割合を神経支配比と呼び，支配する本数の少ない方が細かい作業が可能である．

骨格筋の筋線維タイプは，発現する Myosin Heavy Chain (MyHC) のアイソフォームにより通常，3 タイプに分けられる(2)．主に赤筋（遅筋）を構成する I 型，そして，主に白筋（速筋）を支配する II b 型，その中間的性質を有する II a 型である．これらの中でも I 型の赤筋は，ミオグロビンや毛細血管が豊富なことから赤色に見え，持久的な運動に適した筋である．

### 2-1-3 骨格筋の可塑性

骨格筋は損傷と再生を繰り返すことが知られている．骨格筋の再生を担うのは，主として正常筋線維の形質膜と基底膜の間に局在する筋衛生細胞であると考えられている．筋線維を損傷するような刺激が加わると筋衛生細胞が活性化され増殖し，筋芽細胞，筋管，筋線維へと分化する．

骨格筋の可塑性は、大きく機能的可塑性と構造的可塑性に分類できる．機能的変化の例としては，筋線維タイプの変化が知られている(3)．構造的な変化としては，筋に対する機械的負荷や環境に応じた体積の変化，すなわち筋肥大，筋萎縮がある(4)．

## 2-2 筋萎縮とは

### 2-2-1 筋萎縮

骨格筋萎縮とは，筋細胞内のタンパク質合成に対しタンパク質分解の割合が

相対的に増加した結果，引き起こされる現象である．骨格筋萎縮では，筋線維断面積および線維数が減少し，筋量全体が減少する．筋萎縮を引き起こす原因には，飢餓，不活動，重力免荷，糖尿病，クッシング症候群，グルココルチコイド治療などが知られている．また高齢化による筋重量の減少は，加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）と呼ばれている(5)．これらの筋萎縮の中でも，長期臥床や，ギプス固定などの不活動などによって引き起こされる一連の萎縮は，廃用性萎縮と呼ばれており，高齢者の寝たきりなど重大な今日的医療課題とも関連が深い．

#### 2-2-2 タンパク質合成経路

骨格筋構造タンパク質の合成で解明が進んでいるのは，インスリン様増殖因子（IGF-1），ホスファチジルイノシトール 3 リン酸キナーゼ（PI3K），プロテインキナーゼ B（Akt）の経路である(6)．IGF-1 はソマトメジン C とも呼ばれる増殖因子であり，成長ホルモンによって肝臓で合成され，末梢血管に分泌される．この IGF-1 が，骨格筋細胞膜表面にある IGF-1 受容体に結合すると，活性化された IGF-1 受容体のリン酸化チロシンに，さらに PI3K などの酵素が結合し，Akt を活性化させる．Akt の下流では，哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mTOR）を介してリボソーム S6 キナーゼ（p70S6K）がリン酸化され，タンパク質合成を促進し，筋肥大を導くことが知られている(7, 8)．

#### 2-2-3 タンパク質分解経路

細胞質内タンパク質の分解経路は，オートファジー系，カルパイン系とユビキチン-プロテアソーム系が存在する(9, 10)．オートファジー系は，リソソーム-液胞で分解を行う系である．カルパインは， $\text{Ca}^{2+}$ により活性化される細胞内 Cys プロテアーゼである．カルパイン系によるタンパク分解は，タンパク質を特異的部位で限定的に切断することによって，タンパク質の機能を不可逆的に変換するという点に特徴がある．

一方，タンパク質を認識して特異的に分解するのは，ユビキチン-プロテアソ

ーム系である．翻訳後修飾分子であるユビキチンは、76 個のアミノ酸からなる小さなタンパク質であり、ユビキチン同士の間で共有結合を繰り返すことによりポリユビキチン鎖を構成する(11, 12)．このポリユビキチン鎖が目印となり、プロテアソームによって補足、分解される．選択的なタンパク質分解に決定的な役割を果たす分子は、E1（活性化酵素）、E2（結合酵素）、E3（ユビキチンリガーゼ／連結酵素）と呼ばれる一連の酵素群であり、標的とするタンパク質に共有結合する．

萎縮関連遺伝子 muscle-specific ubiquitin E3-ligases atrophy gene-1/muscle atrophy F-box (Atrogin-1/MAFbx) と muscle ring-finger protein 1 (MuRF1) は、E3 ユビキチンリガーゼである．E3 は、基質と E2 の両方に結合する(13, 14)．図 1 に、骨格筋肥大／萎縮メカニズムの概略を示す．

骨格筋構造タンパク質の分解で解明が進んでいるのは、フォークヘッド型 DNA 結合ドメインを持つ転写因子 FoxO (Forkhead transcription factor) である．FoxO は Akt の存在下でリン酸化され、核外の細胞質に留まっている．しかし、Akt の影響が弱まると、FoxO のリン酸基が外れ、脱リン酸化型 FoxO が核移行し、Atrogin-1, MuRF1 の転写が開始され、筋萎縮が引き起こされる(15)．これらの先行研究によって、Atrogin-1, MuRF1 の発現メカニズムのシグナル伝達系は明らかになりつつあるが、まだ不明な点が多い(16, 17)．

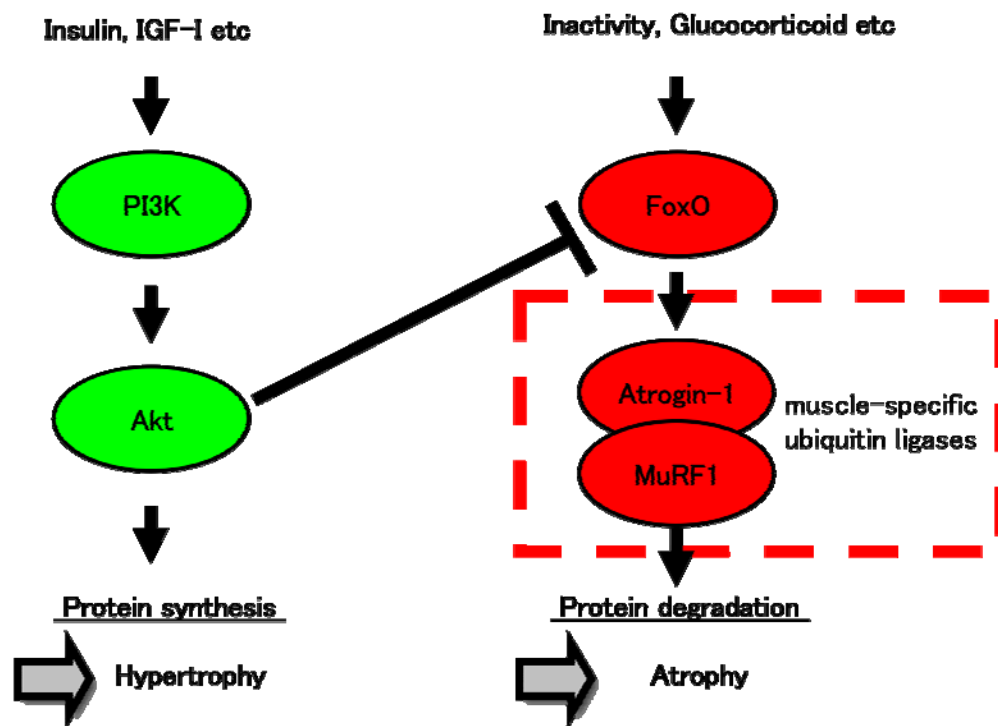


図1: 骨格筋肥大／萎縮の経路

左列は肥大の経路であり、Insulin, IGF-1などによって、PI3Kが活性化され、タンパク質リン酸化酵素Aktが活性化することによって筋肥大を導く。右列は萎縮の経路であり、不活動やグルココルチコイド投与によって、転写因子FoxOの核移行が起こり、萎縮関連遺伝子Atrogen-1, MuRF1の転写が開始されることによって、筋萎縮が引き起こされる。またFoxOはAktによりリン酸化されることで核移行が抑制される。  
(東京大学医学系大学院 和田正吾氏作)

## 2-3 鍼治療

### 2-3-1 鍼治療の歴史

鍼灸の古典では、筋にかかわる治療は素問／靈樞（靈樞 第十三 經筋篇）に遡る(18)．しかし、ここで述べられている“筋”は筋肉とは少し異なり、“スジ”の意味が強いようである．筋に対する経穴は、陽陵泉が有名であり、肉離れなどの治療には、回復期の初期に損傷筋に対する 1 Hz 程度の低周波鍼通電療法などが勧められている(19)．

鍼灸治療は骨格筋に対し直接刺鍼を行う方法であり、鍼の扱い方には置鍼、雀啄など様々な方法がある(20)．鍼通電療法は近年針麻酔で有名になった治療法であるが、日本ではその鎮痛効果から、麻酔科の医師による研究もなされてきた(21)．現在では鍼灸治療の鎮痛作用に対する理解も広がり、大学病院などでも日常的に鍼治療が行われるようになってきている．

### 2-3-2 鍼治療効果発現のメカニズム

鍼通電療法は現在、臨床的に多くの場面で用いられており、鍼刺激が引き起こす現象に関しては多くの報告がなされている．特に、自律神経にかかわる鍼刺激の効果に対する報告は数多く、刺鍼によって心拍数が減少するという現象が報告されている(22)．しかしながら鍼治療効果発現のメカニズムについては不明な点が多い．

鍼灸治療の治効メカニズムに関して、受容体、介在神経、鎮痛機構などについていくつかの仮説が立てられている．受容体に対する仮説は、鍼刺激の受容体をポリモーダル受容器とした説がある(23)．皮膚に痛みを引き起こす強さの刺激が加えられると、皮膚の自由神経終末に存在する侵害受容器が興奮し、一次性感覚神経を興奮させる．ポリモーダル受容器は、末梢侵害受容器の一つであり、鍼刺激はこの受容器を介するのではないかと考えられている(20)．

介在神経に関しては、Melzack と Wall によって 1965 年に提唱されたゲートコントロール説がある．彼らは、触／圧覚を伝える神経線維が、痛みを伝える神経繊維からの入力を抑制するゲートのような構造が脊髄にあるのではないかと、また、

その部位は脊髄後角Ⅱ層の膠様質にある SG 細胞ではないかという仮説を立てた．侵害性の刺激は非侵害性の刺激によって抑制されるという仮説である．その後修正も加えられ，鍼刺激による鎮痛効果の仮説の一つとなっている(24)．

鍼鎮痛作用機序の解明には，内因性モルヒネ様物質（オピオイド）の関与が示唆されている(25)．鍼による鎮痛効果はナロキソンなどのモルヒネの拮抗薬によって抑制されるため，鍼の鎮痛作用発現にオピオイドが関わっている可能性があると考えられている(26)．

### 2-3-3 筋萎縮に対する鍼治療

筋萎縮に対する鍼治療法の効果に関して，高岡ら(27)は鍼通電療法がミオスタチンの発現を抑制するという報告をしており，鍼治療が筋萎縮を抑制する可能性が示されている．

また，Wang らは，ラットの脳虚血モデルに対する鍼通電療法で，リン酸化 Akt 量が亢進したという報告を行っている(28, 29)．Akt はタンパク質合成に深く関わっており，リン酸化 Akt の増加は，萎縮関連遺伝子の発現を引き起こす転写因子 FoxO の抑制に働く可能性がある．

しかし，現在までに萎縮を引き起こす原因とされている萎縮関連遺伝子 Atrogin-1, MuRF1 に対する鍼治療の影響はまったく検討されていない．

### 第 3 章 研究目的

本研究では，廃用性萎縮に対する鍼通電療法の効果発現メカニズムを解明するため，後肢懸垂によって廃用性萎縮を惹起したマウスに対して，鍼刺激を行い，筋萎縮関連遺伝子 Atrogin-1, MuRF1 の発現変化を検討した．また，伝統的な鍼治療といえる置鍼および 1 Hz, 10 Hz という異なる周波数における鍼通電療法の廃用性萎縮抑制効果についても比較検討した．

## 第 4 章 材料と方法

### 4-1 試薬一覧

下表は本実験で行った RNA 抽出，逆転写反応，Real-time PCR，免疫染色に使用した試薬である．

|               |                        |             |                                                   |
|---------------|------------------------|-------------|---------------------------------------------------|
| RNA抽出         | ISOGEN                 | 1 ml        | NIPPON GENE CO., LTD., Tokyo, JAPAN               |
|               | Chloroform             | 0.2 ml      | SHIGMA-ALDRICH CO., Saint Louis, Missouri, USA    |
|               | Isopropanol            | 0.5 ml      | WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., Osaka, JAPAN |
|               | Ethanol                | 1 ml        | WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., Osaka, JAPAN |
|               | DOW                    | 20 $\mu$ l  | WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., Osaka, JAPAN |
| 逆転写反応         | Oligo dT18             | 1 $\mu$ l   | INVITROGEN, Grand Island, NY                      |
|               | dNTP Mixture           | 4 $\mu$ l   | TAKARA BIO INC., Shiga, JAPAN                     |
|               | 5x First Strand buffer | 4 $\mu$ l   | INVITROGEN, Grand Island, NY                      |
|               | 0.1 M DTT              | 1 $\mu$ l   | INVITROGEN, Grand Island, NY                      |
|               | RNAse Inhibitor        | 1 $\mu$ l   | TOYOBO OC., Ltd., Osaka, JAPAN                    |
|               | SuperScript III        | 1 $\mu$ l   | INVITROGEN, Grand Island, NY                      |
| Real-time PCR | SYBR Premix Ex Taq     | 5 $\mu$ l   | TAKARA BIO INC., Shiga, JAPAN                     |
|               | Rox Dye                | 0.2 $\mu$ l | TAKARA BIO INC., Shiga, JAPAN                     |
|               | ddH <sub>2</sub> O     | 3.4 $\mu$ l | NIPPON GENE CO., LTD., Tokyo, JAPAN               |
| 免疫染色          | 4%Paraformaldehyde     |             | WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., Osaka, JAPAN |
|               | Triton-X               |             | SHIGMA-ALDRICH CO., Saint Louis, Missouri, USA    |
|               | Normal Goat serum      |             | JACKSON IMMUNO RESEARCH, Pennsylvania, USA        |
|               | 抗ジストロフィン抗体             |             | SHIGMA-ALDRICH CO., Saint Louis, Missouri, USA    |
|               | FITC標識抗マウスIgG          |             | JACKSON IMMUNO RESEARCH, Pennsylvania, USA        |

表1: 試薬一覧

#### 4-2 実験動物

実験には 8-9 週齢の近交系雄マウス (C57 B1/6) を用いた。実験動物は実験開始 1 週間前に繁殖飼育室から実験用飼育室へと移し、環境に適応させた。各群とも室温 22℃の恒温室内にて飼育し、照明は午前 10 時から午後 10 時まで点灯、午後 10 時から翌朝午前 10 時までを消灯とし、食餌と水は自由摂取とした。実験期間中マウスは個別飼育とし、実験用飼育ケースは縦 13 cm、横 22 cm、深さ 14 cm の昆虫飼育ケース (大創, 東広島) を用いた。飼育ケースには給水器 (スドー, 名古屋) を貼付し、マウスが給水出来る状況にあることを確認した。飼料はラボ MR ストック (農産工業株, 横浜市) を用い、マウスが摂食可能な位置の床に散布した。一日の散布量は 10 g を目安とした。

なお、本研究は東京大学大学院医学系研究科、動物実験委員会の承認を得て行われた (医-P07-40)。

#### 4-3 実験モデル

廃用性萎縮モデルには、Morey 変法に則り (30)、2 週間の後肢懸垂を行った。キネシオロジーテープ (NICHIBAN, 東京) を 3 cm X 3 cm にカットし、マウスの尾部に巻き付けた。貼付位置は尾部開始より 1 cm 遠位とした。キネシオテープの上から、吊り下げ用 T 字金具 (WAKI sangyo co., LTD. 大阪) を、サージカルテープで尾部に留めた。飼育ケースの天井に針金で梁を作成し、オーリングにてケージの上部より懸垂した。マウスと床との距離は、マウスの両上肢が接地していることを確認して決定した。



**図2: 後肢懸垂**

8-9週齢のC57 BL/6マウスを用い, 2週間の後肢懸垂を行った.

#### 4-4 実験デザイン

|   | 実験群         | 後肢懸垂 | 鍼刺激   |
|---|-------------|------|-------|
| A | 通常飼育群       | —    | —     |
| B | 後肢懸垂群       | +    | —     |
| C | 後肢懸垂＋置鍼群    | +    | 置鍼    |
| D | 後肢懸垂＋1 Hz群  | +    | 1 Hz  |
| E | 後肢懸垂＋10 Hz群 | +    | 10 Hz |

**表2: 群分け**

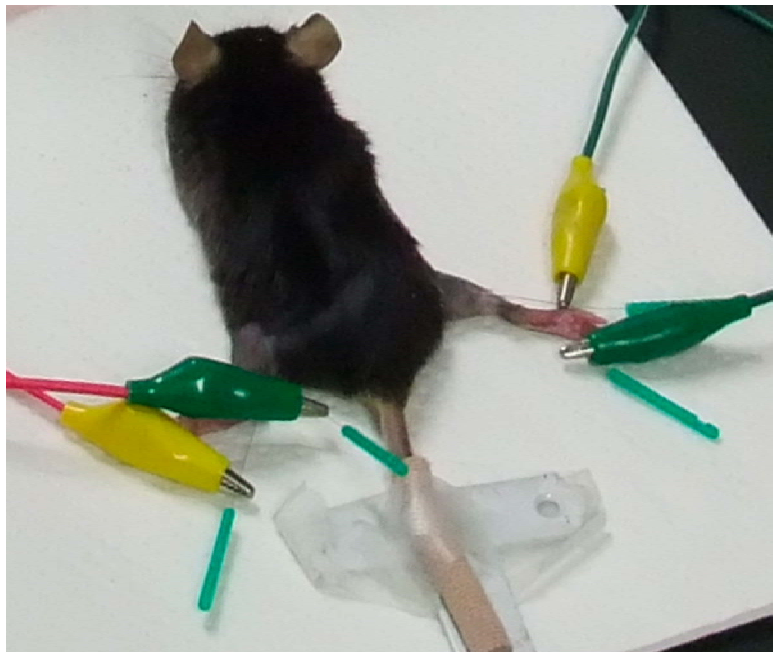
A)通常飼育群, B)後肢懸垂群, C)後肢懸垂＋置鍼群, D)後肢懸垂＋鍼通電 1 Hz群, E)後肢懸垂＋鍼通電 10 Hz群の5群を設け, 2週間の後肢懸垂中に鍼通電を行った, 鍼通電は6.5 mAの強度で毎日30分とした.

群分けは上記の通り A) 通常飼育群, B) 後肢懸垂群, C) 後肢懸垂＋置鍼群, D) 後肢懸垂＋鍼通電 1 Hz 群, E) 後肢懸垂＋鍼通電 10 Hz 群とした. 各群は  $n = 7$  とした. 通常飼育群においては, 後肢懸垂群と同期間, 同じ飼育室の通常的环境下で飼育を行った.

#### 4-5 刺鍼および鍼通電条件

ペントバルビタール（共立製薬，東京）による深麻酔下にて，直径 0.12 mm のステンレスディスプレイザブル鍼（セイリン，静岡）を用いて，腓腹筋下部に 2 カ所刺鍼を行った. 麻酔投与は注射器（日本ベクトン ディッキンソン，福島）を用いて，腹腔内投与とした. 通常飼育群を含め，すべての群に麻酔投与を行った. ヒラメ筋，足底筋の刺鍼による損傷を回避するため，腓腹筋に地面と水

平に尾部から頭部方向に向かって 5 mm の深さで刺鍼した。麻酔投与量は、10% ペントバルビタール約 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  (体重の約 0.1%) を目安とした。鍼による刺激は、後肢懸垂開始の翌日から行った。低周波鍼通電はオームパルサー (LFP4000, 6.5 mA, イーデンキ, 京都) を用いて毎日 30 分, 2 週間続けて行った。実験時間は可能な限り, 午後 2 時を麻酔投与開始時間, 引き続き鍼通電開始とした。



**図3: 鍼通電**

刺鍼方法は、腓腹筋の下部より頭頂に向けて刺入した。鍼の深さは 5 mmとした。鍼通電は、6.5 mAの強さで、後肢懸垂開始翌日から、毎日30分間、2週間続けて行った。



**図4: 置鍼**

刺鍼方法は、腓腹筋の下部より頭頂に向けて刺入した。鍼の深さは5 mmとした。置鍼は、後肢懸垂開始翌日から、毎日30分間、2週間続けて行った。

#### 4-6 サンプル採取

##### 4-6-1 筋サンプル採取および筋湿重量

2 週間の後肢懸垂後，両肢のヒラメ筋，足底筋を摘出し，筋湿重量を測定した．左後肢のヒラメ筋，足底筋は RNA 抽出に用いるため，ISOGEN（ニッポンジーン，東京）中にて粉碎した．右後肢は，凍結切片作成後，蛍光免疫染色による筋線維断面積測定のため，クリオモルド 1 号（サクラファインテックジャパン，東京）に満たした OCT コンパウンド（サクラファインテックジャパン）に包埋し，液体窒素で冷却した 2 メチルブタン（和光純薬，大阪）中で急速凍結した．サンプルはクライオスタット（ライカマイクロシステムズ，東京）による凍結切片作製まで， $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した．

##### 4-6-2 Real-time PCR

RNA 抽出：摘出した骨格筋組織は電動ホモジナイザー（IKA Werke GmbH & Co. KG Deutschland, GERMANY）を用いて，RNA 抽出試薬 ISOGEN（ニッポンジーン）1 ml 中で破碎した．破碎した組織は 5 分間室温にて放置した後，クロロホルム（シグマアルドリッチジャパン，東京）0.2 ml を添加し，15 秒撹拌した．2〜3 分室温にて放置した後，12,000 回転で 15 分間， $4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離（トミー工業，東京）した．分離した上層を別チューブに移し，イソプロパノール（シグマアルドリッチジャパン）を 0.5 ml 添加し，室温にて 10 分放置した後，12,000 回転で 10 分間， $4^{\circ}\text{C}$ にて遠心分離した．分離した上層を別チューブに移し，冷蔵保存した 80%エタノール（和光純薬）を 1 ml 添加し，30 秒撹拌した．その後，7,500 回転で 5 分間， $4^{\circ}\text{C}$ にて遠心分離を行った．チューブの底部にペレットが存在することを確認した後，80%エタノールを除き，軽く乾燥させてから，蒸留水（ニッポンジーン）を 20  $\mu\text{l}$  添加し溶解した．

逆転写反応：完全に溶解した総 RNA は、NanoDrop（LMS，東京）によって濃度を測定し，蒸留水で希釈し濃度を 62.5 ng/ $\mu\text{l}$  に統一した．さらに電気泳動像により RNase による分解がないことを確かめた上で，SuperScript III（Invitrogen, Grand Island, NY）を用いて逆転写反応を行い，mRNA に対する相補的 DNA (cDNA)

を合成した. 1st Mixture は 1 サンプルにつき, Oligo dT18 (Invitrogen) 1  $\mu$ l, dNTPs (Takara, 滋賀) 4  $\mu$ l とし, total RNA は 8  $\mu$ l 用いた. 2nd Mixture には 5 x First Strand buffer (Invitrogen) 4  $\mu$ l, 0.1 M DTT (Invitrogen) 1  $\mu$ l, RNase Inhibiter (TOYOBO, 大阪) 1  $\mu$ l, SuperScript III 1  $\mu$ l ずつ用いた. SuperScript III に用いた反応温度は, 65°C 5 分, 4°C 10 分 (この間に 2nd Mixture を投入), 50°C 60 分, 70°C 15 分, 4°C で安定させた.

Real-time PCR: 逆転写反応終了後, 7500 fast Real-time PCR system (Applied Biosystems, California) により, Atorgin-1, MuRF1 および内部標準としては  $\beta$ -actin を用いて, それぞれの発現量を計測した. 希釈列は, 4 段階 10 倍希釈列のスタンダードを用いて, 絶対定量を行った. 試薬は 1 サンプルにつき, SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (Takara) 5  $\mu$ l と Rox Dye (Takara) 0.2  $\mu$ l および PCR 用 Primer (表 3) を Forward, Reverse 各 0.2  $\mu$ l, 蒸留水 (ニッポンジーン) 3.4  $\mu$ l を用いて, mRNA 発現量の絶対定量を行った. 作業はすべて氷上にて行った. Real-time PCR に用いる総 RNA template 量は 1  $\mu$ g とした. Real-time PCR の反応温度は, 第 1 ステージとして 95°C 1 分の後, 第 2 ステージとして 95°C 15 秒, 60°C 1 分を 40 回繰り返した. (SYBR Premix Ex Taq による蛍光発現量は, この 60°C 時の発現量を測定した). また PCR 産物は乖離曲線を求めることで非特異的な増幅がないことを確認した. データ解析には, 7500 Fast system software (Applied Biosystems) を用いた.

| 標的遺伝子          | PCR products | 5'→3'   | プライマー配列                | 配列の決定方法             |
|----------------|--------------|---------|------------------------|---------------------|
| Atrogin-1      | 166          | Forward | CTCTGTACCATGCCGTTCT    | Sultan et al., 2006 |
|                |              | Reverse | GGCTGCTGAACAGATTCTCC   |                     |
| MuRF1          | 206          | Forward | ACCGAGTGCAGACGATCATCTC | Prime Express       |
|                |              | Reverse | AAAGTCAATGGCCCTCAAGGC  |                     |
| $\beta$ -actin | 131          | Forward | TGACAGGATGCAGAAGGAGA   | Primer3             |
|                |              | Reverse | GCTGGAAGGTGGACAGTGAG   |                     |

**表3: Real-time PCRに用いたprimer配列**

#### 4-6-3 筋線維断面積

凍結切片作製：-80℃冷凍保存した凍結組織は、クライオスタットにて、凍結切片作製した。クライオスタット内の温度は-20℃保持を目安とした。凍結切片の厚さは、5  $\mu$ mを基準とし、切片作成後、速やかにスライドガラス（松波硝子工業、大阪）に貼付した。凍結切片は、免疫染色を行うまで、-80℃にて凍結保存した。

免疫染色：凍結切片は顕微鏡によって、組織がスライドガラスに貼付されていることを確認してから、免疫染色を行った。氷冷 4%paraformaldehyde/PBS（和光純薬）の中で組織を固定した。その後組織をPBSで5分間洗浄した。洗浄液を廃棄後、0.3%Triton/PBS（Sigma）に5分間浸し、細胞の透過化処理を行った。PBSによる5分間の洗浄を2回繰り返した後、スライドガラスのPBSの水滴を丁寧にのぞいてから、一次抗体で反応させるために、撥水ペン（Daido Sangyo Co., Ltd. 東京）でスライドガラス上の組織の周囲を丸く囲んだ。円の内部に約 100  $\mu$ lの水溶液が留まる大きさの円とした。5% Normal Goat serum/PBS

(Jackson Immuno Research, Pennsylvania) によって、室温にて 30 分間ブロッキングを行った後、水滴を除いてから、一次抗体を反応させた。一次抗体として抗ジストロフィン抗体(Sigma)を 1:100 に希釈し、5%Normal Goat serum/PBS に溶解した。この反応は 4℃で暗室において一晩行った。翌日、PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行い、二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG1 抗体 (Jackson Immuno Research) を 1 : 25 で同様に希釈し、筋線維膜を蛍光染色した。反応時間は室温にて遮光条件下で 2 時間行った。反応終了後、PBS による 5 分間の洗浄を 3 回行い、Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) によって組織を封入した。

顕微鏡観察並びに画像解析：蛍光顕微鏡 IX-71 (Olympus, 東京) および 3-CCD カメラ C7780 (浜松ホトニクス, 静岡) を用いて、蛍光染色した組織切片の蛍光画像を取得した。ヒラメ筋、足底筋ともに 20 倍対物レンズで画像取得した。蛍光画像は ImageJ (NIH, Maryland) にてキャリブレーションならびにバイナリ処理後、粒子解析によって筋線維断面積を測定した。筋線維の数は 100 本以上を基準として計測した。

#### 4-7 統計処理

すべての統計量は平均±標準誤差で表した。体重変化量、摂食量、筋線維断面積、mRNA の平均の差の検定には、SPSS による一元配置分散分析を用い、有意差のあるものは、post-hoc test として、Tukey-kramer 法を用いた。

## 第5章 結果

### 5-1 体重変化

2週間の後肢懸垂により，平均約1割の体重減少がみられた．2週間後の体重減少率は，通常飼育群と比較して，各群間全ての間で有意差があった．

体重減少量は，通常飼育群  $-0.48\text{ g}$  (2.12%)，後肢懸群  $-1.99\text{ g}$  (9.00%)，後肢懸垂+置鍼群  $-2.80\text{ g}$  (12.04%)，後肢懸垂+1 Hz 群  $-2.95\text{ g}$  (12.51%)，後肢懸垂+10 Hz 群  $-2.26\text{ g}$  (9.73%) であった．

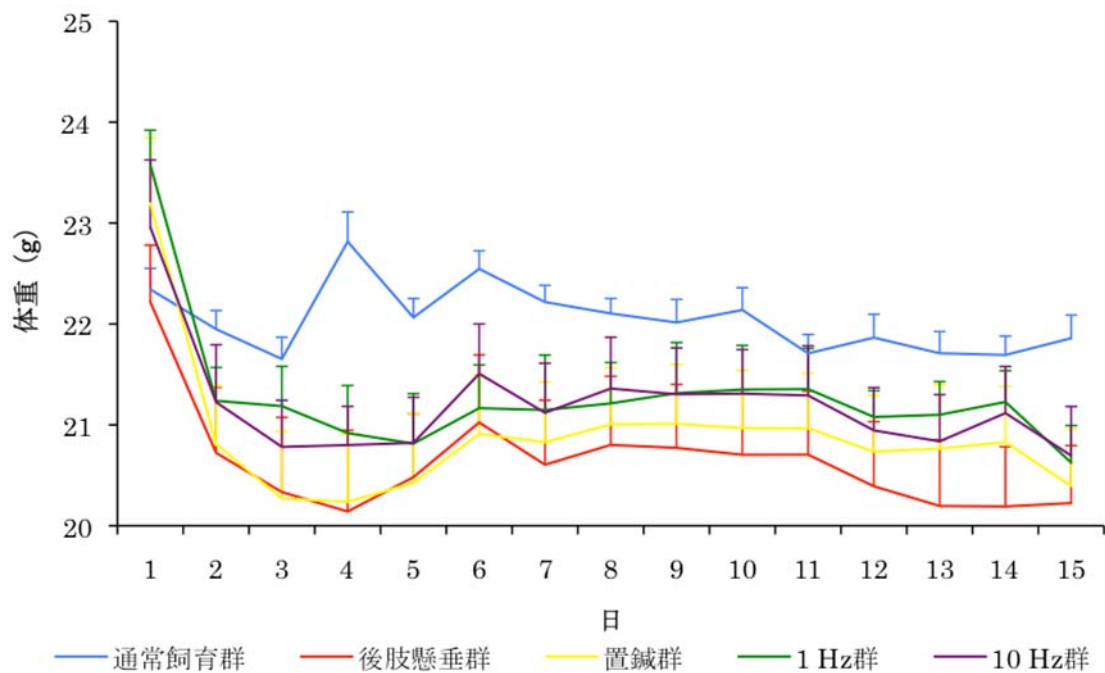
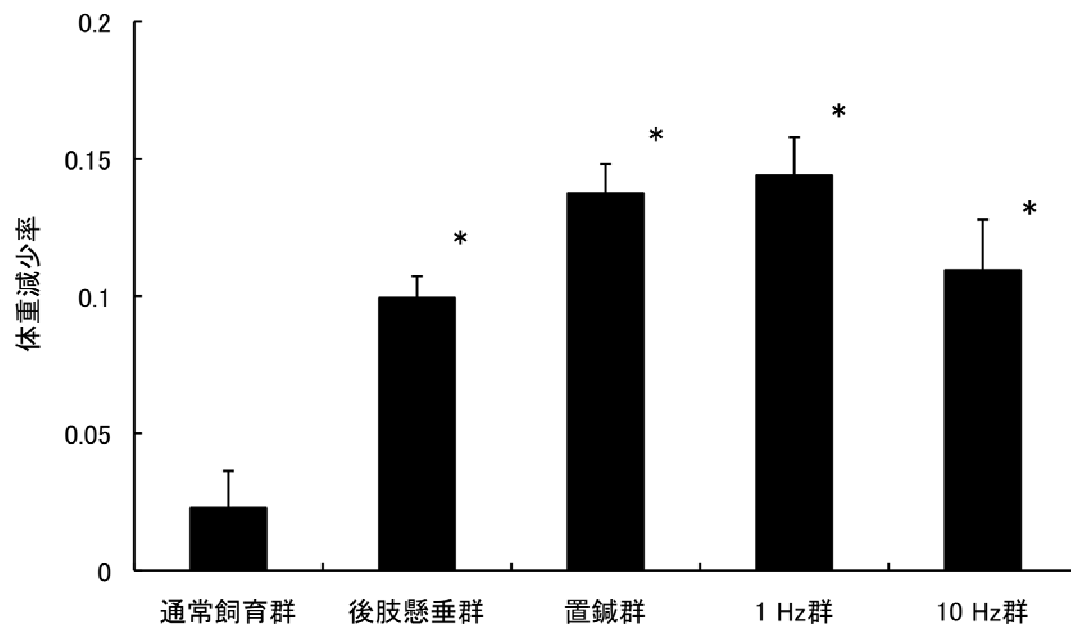


図5: 体重変化

実験開始より3日間は急激な体重の減少が認められた．7日目以降には，ほぼ安定した．  
n=7, 平均値+標準誤差．



**図6: 体重減少率**

2週間の後肢懸垂により、通常飼育群は2%、後肢懸垂群は10%、置鍼群は14%、1 Hz群は14%、10 Hz群は11%の減少した。通常飼育群と比較して、後肢懸垂群、置鍼群、1 Hz群、10 Hz群間に有意差が見られた。\*  $p < 0.05$ ,  $n=7$ , 平均値 $\pm$ 標準誤差。

## 5-2 摂食量

摂食量は通常飼育群で最も多かった。これは、他の群が後肢懸垂により摂食がしにくかったためと考えられる。鍼治療群では、10 Hz 群が最も多く、置鍼群が最も少なかったが、1 Hz 群は置鍼群とほぼ同量であった。

2週間の平均摂食量は、通常飼育群 平均  $3.83 \pm 0.18$  g, 後肢懸垂群  $3.64 \pm 0.20$  g, 後肢懸垂+置鍼群  $3.37 \pm 0.21$  g, 後肢懸垂+1 Hz 群  $3.41 \pm 0.18$  g, 後肢懸垂+10 Hz 群  $3.72 \pm 0.2$  g であった。摂食量の平均値に有意差はなかった。

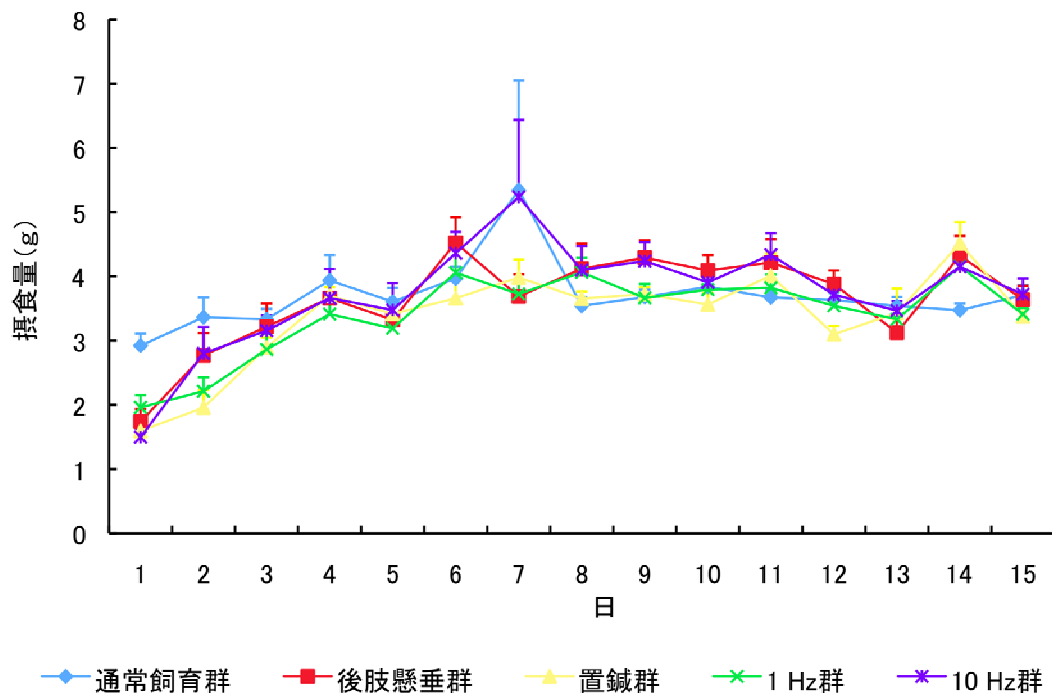


図7: 摂食量

実験開始より5日以前は、後肢懸垂群の摂食量が少なかったが、6日目以降は各群で同程度となった。2週間の実験期間中の摂食量に有意差はなかった。

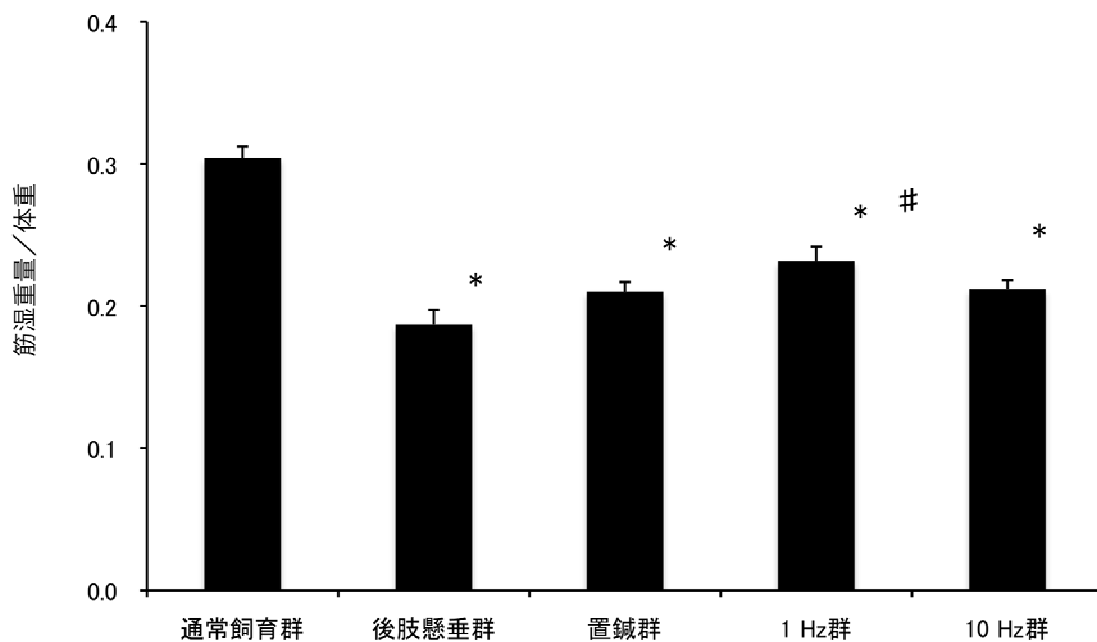
n=7, 平均値+標準誤差。

### 5-3 ヒラメ筋

#### 5-3-1 筋湿重量

ヒラメ筋の筋湿重量は，通常飼育群 平均  $0.30 \pm 0.01$  g，後肢懸垂群  $0.19 \pm 0.01$  g，後肢懸垂+置鍼群  $0.21 \pm 0.01$  g，後肢懸垂+1 Hz 群  $0.23 \pm 0.01$  g，後肢懸垂+10 Hz 群  $0.21 \pm 0.01$  g であった．

後肢懸垂によって引き起こされた骨格筋の萎縮は，1 Hz の鍼通電療法において有意に抑制された．後肢懸垂によって，ヒラメ筋の骨格筋の湿重量は30%以上減少したが，置鍼群ならびに10 Hz 群においては鍼通電療法によって減少の程度が抑制される傾向にあった．



**図8: ヒラメ筋湿重量の変化**

後肢懸垂により，ヒラメ筋の筋湿重量は減少した．通常飼育群と比較して，後肢懸垂群は38%，置鍼群は31%，1 Hz群は24%，10 Hz群は30%減少した．

1 Hzの鍼刺激によって，骨格筋の湿重量の低下は後肢懸垂群よりも抑制された．\* :  $p < 0.05$ ，# :  $p < 0.05$ ， $n=7$ ，平均値±標準誤差．

### 5-3-2 筋線維断面図

ヒラメ筋の筋線維断面積は、通常飼育群 平均  $1149.01 \pm 25.45 \mu\text{m}^2$ 、後肢懸垂群  $817.93 \pm 18.59 \mu\text{m}^2$ 、後肢懸垂+置鍼群  $898.54 \pm 32.11 \mu\text{m}^2$ 、後肢懸垂+1 Hz 群  $1011.88 \pm 33.45 \mu\text{m}^2$ 、後肢懸垂+10 Hz 群  $1081.98 \pm 46.00 \mu\text{m}^2$  であった。

ヒラメ筋の筋線維断面積はほぼ筋湿重量と同様の傾向を示し、後肢懸垂群と1 Hz、10 Hz 群で有意差が認められた。

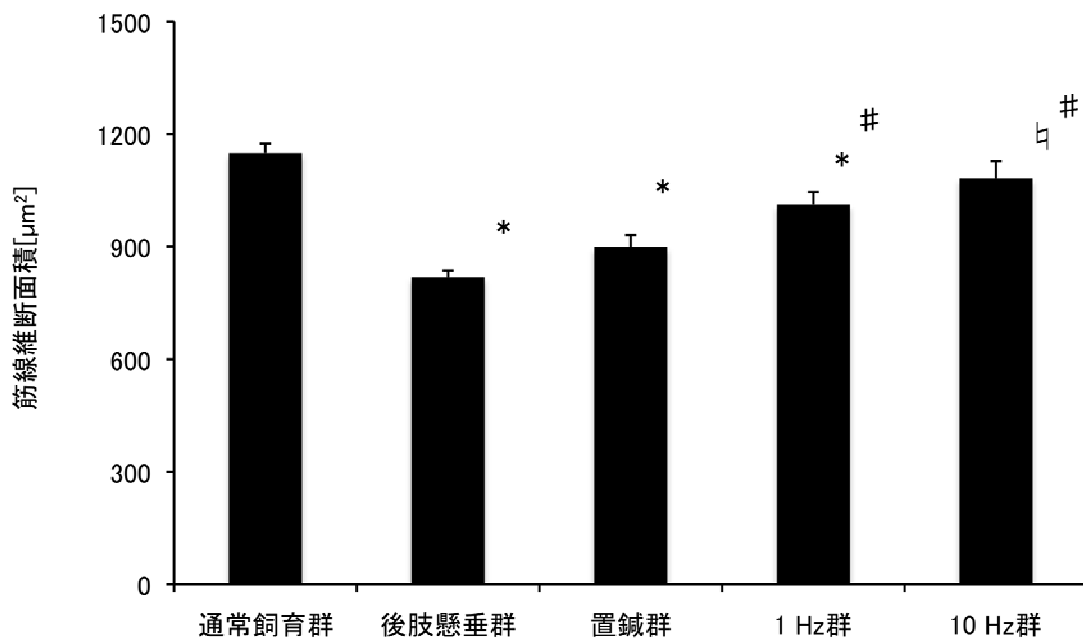
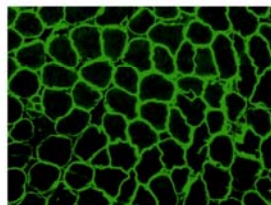


図9: ヒラメ筋の筋線維断面積の変化

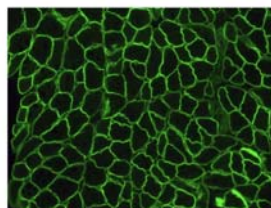
後肢懸垂により、ヒラメ筋の筋線維断面積は減少した。通常飼育群と比較して、後肢懸垂は29%、置鍼群は22%、1 Hz群は12%、10 Hz群間は6%の減少した。

1 Hz、10 Hzの鍼刺激によって、骨格筋の筋断面積の低下は後肢懸垂群よりも抑制された。\* :  $p < 0.05$ , # :  $p < 0.05$ , b :  $p < 0.05$ ,  $n=7$ , 平均値 $\pm$ 標準誤差。

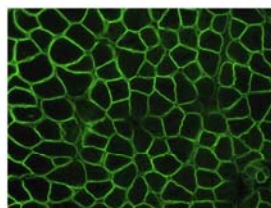
通常飼育群



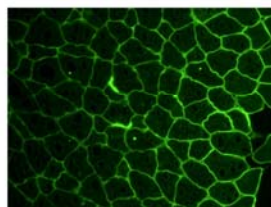
後肢懸垂群



後肢懸垂＋  
鉦通電 0 Hz群



後肢懸垂＋  
鉦通電 1 Hz群



後肢懸垂＋  
鉦通電 10 Hz群

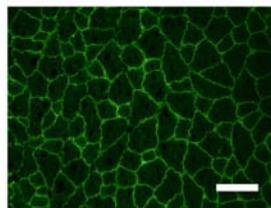


図10: ヒラメ筋線維断面面積  
抗ジストロフィン抗体(Sigma)を用い、骨格筋線維膜を染色した。  
蛍光顕微鏡により画像を取得し、線維断面面積を計測した。bar ; 200  $\mu$ m.

### 5-3-3 Atrogin-1, MurF1 の発現量

ヒラメ筋の Atrogin-1 の mRNA の発現量は、通常飼育群に対する相対値で、後肢懸垂群 平均  $3.12 \pm 1.12$ , 後肢懸垂 + 置鍼群  $2.29 \pm 0.20$ , 後肢懸垂 + 1 Hz 群  $1.43 \pm 0.37$ , 後肢懸垂 + 10 Hz 群  $1.29 \pm 0.68$  であった。

ヒラメ筋では、筋萎縮関連遺伝子である Atrogin-1 の mRNA 発現量は筋湿重量とほぼ反比例する傾向にあったが、サンプル数が少なかったため、統計学的な有意差は認められなかった。

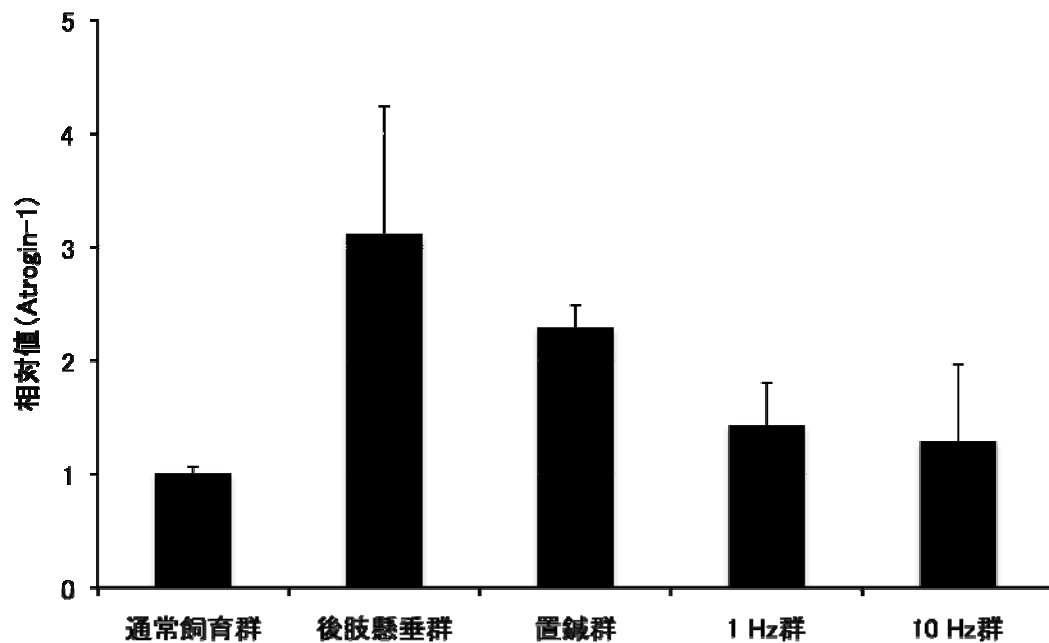
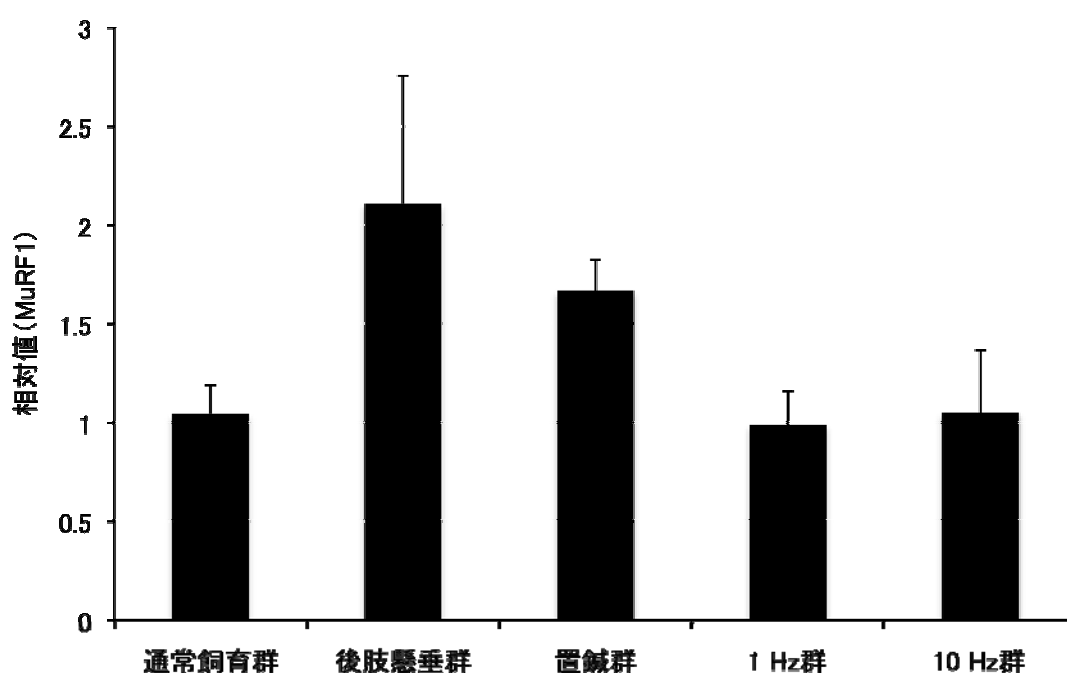


図11: ヒラメ筋のAtrogin-1 mRNAの発現量

Atrogin-1をReal-time PCRによって定量した。Atrogin-1発現は、後肢懸垂群で増加し、鍼刺激によって抑制される傾向にあった。通常飼育群を基準とすると、Atrogin-1の発現量は後肢懸垂群で3.1倍、置鍼群で2.3倍、1 Hz群で1.4倍、10 Hz群で1.3倍であった。内部標準には $\beta$ -actinを用いた。n=4, 平均値 $\pm$ 標準誤差。

ヒラメ筋の MuRF1 の mRNA の発現量は、通常飼育群に対する相対値で、後肢懸垂群 平均  $2.11 \pm 0.65$ , 後肢懸垂 + 置鍼群  $1.67 \pm 0.16$ , 後肢懸垂 + 1 Hz 群  $0.99 \pm 0.17$ , 後肢懸垂 + 10 Hz 群  $1.05 \pm 0.31$  であった。

ヒラメ筋では、筋萎縮関連遺伝子である MuRF1 の mRNA 発現量は筋湿重量とほぼ反比例する傾向にあったが、Atrogin-1 と同様にサンプル数が少なかったため、統計学的な有意差は認められなかった。



**図12: ヒラメ筋のMuRF1 mRNAの発現量**

MuRF1をReal-time PCRによって定量した。MuRF1発現は、後肢懸垂群で増加し、鍼刺激によって抑制される傾向にあった。通常飼育群を基準とすると、MuRF1の発現量は後肢懸垂群で2.1倍、置鍼群で1.7倍、1 Hz群で1.0倍、10 Hz群で1.1倍であった。内部標準には $\beta$ -actinを用いた。n=4, 平均値 $\pm$ 標準誤差。

#### 5-3-4 小括（ヒラメ筋）

遅筋であるヒラメ筋は、後肢懸垂によって顕著な萎縮が認められた。1 Hz の鍼通電において、後肢懸垂による筋湿重量の低下が有意に抑制された。鍼通電によって筋断面積の減少も同様に有意に抑制された。

#### 5-4 足底筋

#### 5-4-1 筋湿重量

足底筋の筋湿重量は、通常飼育群 平均  $0.64 \pm 0.03$  g, 後肢懸垂群  $0.53 \pm 0.01$  g, 後肢懸垂+置鍼群  $0.61 \pm 0.03$  g, 後肢懸垂+1 Hz 群  $0.58 \pm 0.01$  g, 後肢懸垂+10 Hz 群  $0.59 \pm 0.01$  g であった.

足底筋では、通常飼育群と比較して、後肢懸垂のみで有意差が認められた.

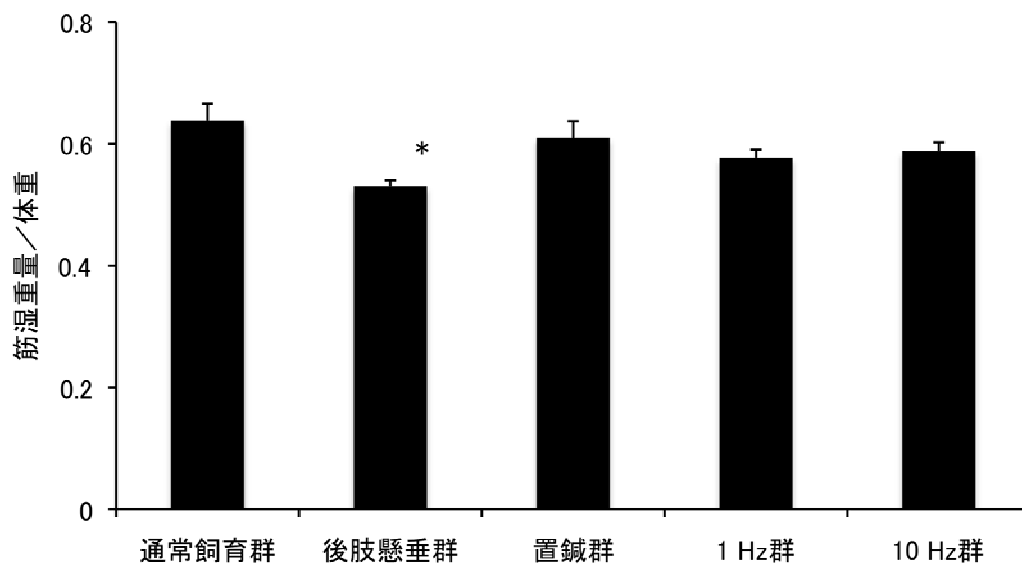


図13: 足底筋湿重量の変化

後肢懸垂により、足底筋の筋湿重量は減少した。通常飼育群と比較して、後肢懸垂は17%、置鍼群は4%、1 Hz群は10%、10 Hz群は8%減少した。

\*:  $p < 0.05$ ,  $n=7$ , 平均値±標準誤差。

#### 5-4-2 筋線維断面積

足底筋の筋線維断面積は，通常飼育群 平均  $1442.17 \pm 58.06 \mu\text{m}^2$ ，後肢懸垂群  $1040.35 \pm 32.59 \mu\text{m}^2$ ，後肢懸垂＋置鍼群  $1245.12 \pm 37.63 \mu\text{m}^2$ ，後肢懸垂＋1 Hz 群  $1382.02 \pm 51.69 \mu\text{m}^2$ ，後肢懸垂＋10 Hz 群  $1224.28 \pm 41.99 \mu\text{m}^2$  であった．

足底筋は，通常飼育群と比較して，後肢懸垂群，置鍼群，10 Hz 群で有意差が見られた．後肢懸垂群と比較して，置鍼群，1 Hz 群，10 Hz 群でそれぞれ有意に回復した．

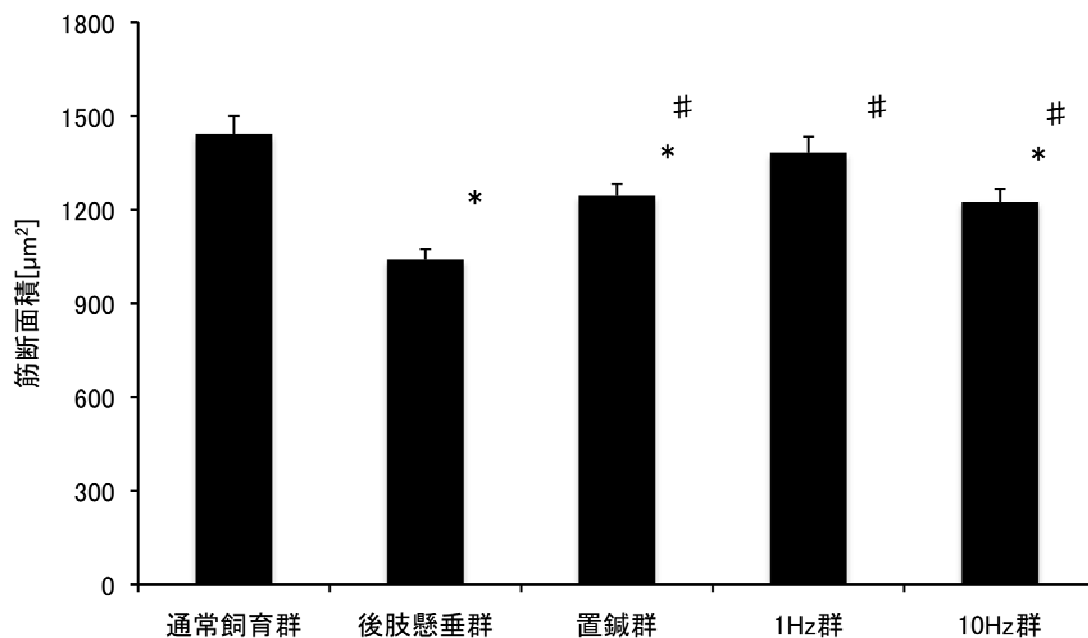
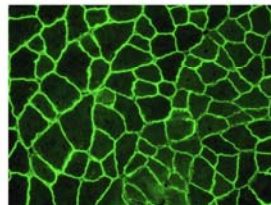


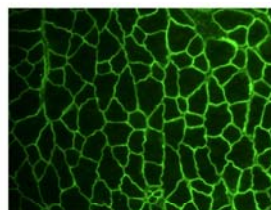
図14: 足底筋の筋線維断面積の変化

後肢懸垂により，足底筋の筋線維断面積は減少した．通常飼育群と比較して，後肢懸垂は28%，置鍼群は14%，10 Hz群は15%の減少率で有意差が認められた．1 Hz 群間は，4%の減少率であった．鍼刺激によって，骨格筋の湿重量の低下は抑制された．筋線維断面積は後肢懸垂群に比べ，置鍼群，1 Hz，10 Hz群間では有意に増加した．\* :  $p < 0.05$ ，# :  $p < 0.05$ ， $n=7$ ，平均値±標準誤差．

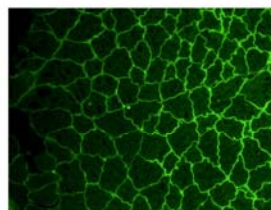
通常飼育群



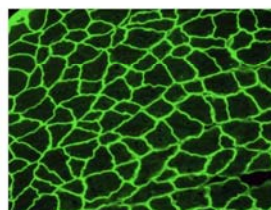
後肢懸垂群



後肢懸垂＋  
鍼通電 0 Hz群



後肢懸垂＋  
鍼通電 1 Hz群



後肢懸垂＋  
鍼通電 10 Hz群

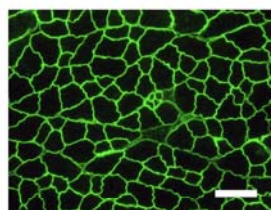


図15: 足底筋線維断面積  
抗ジストロフィン抗体(Sigma)を用い、骨格筋線維膜を染色した、  
蛍光顕微鏡により画像を取得し、線維断面積を計測した.bar ; 200  $\mu$ m.

#### 5-4-3 Atrogin-1, MuRF1 の発現量

足底筋の Atrogin-1 の mRNA の発現量は、通常飼育群に対する相対値で、後肢懸垂群 平均  $4.40 \pm 1.84$ ，後肢懸垂+置鍼群  $1.71 \pm 0.54$ ，後肢懸垂+1 Hz 群  $1.25 \pm 0.16$ ，後肢懸垂+10 Hz 群  $1.45 \pm 0.35$  であった。

足底筋の mRNA 発現にはサンプル数が少なかったため、有意差は見られなかったが、後肢懸垂によって顕著に増加し、置鍼群を含め、1 Hz、10 Hz 群の鍼刺激群で抑制される傾向にあった。

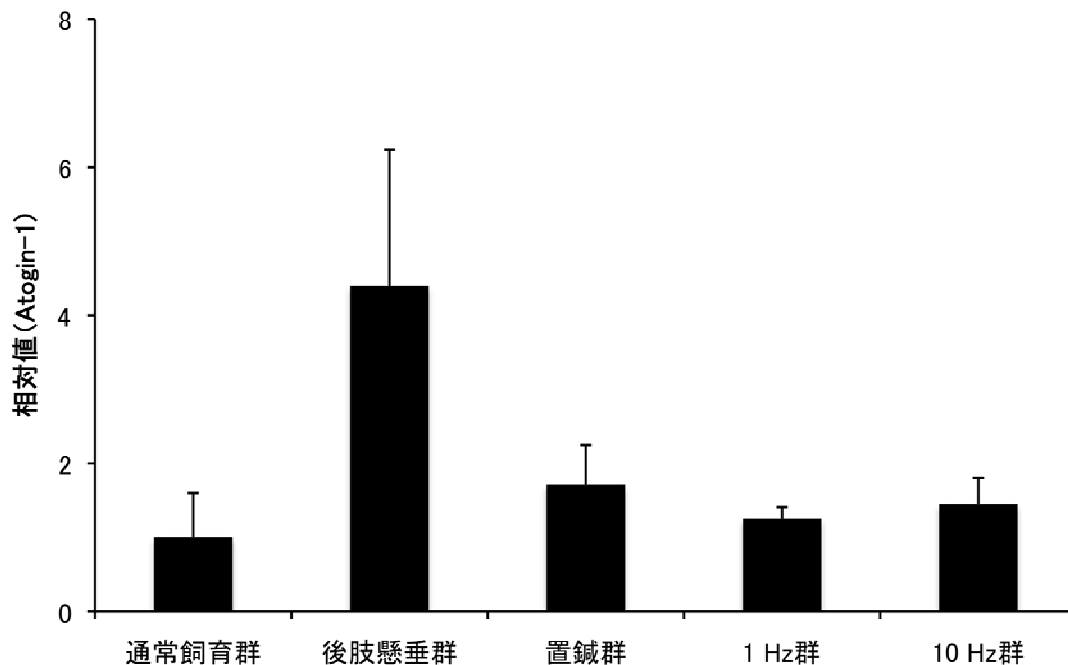
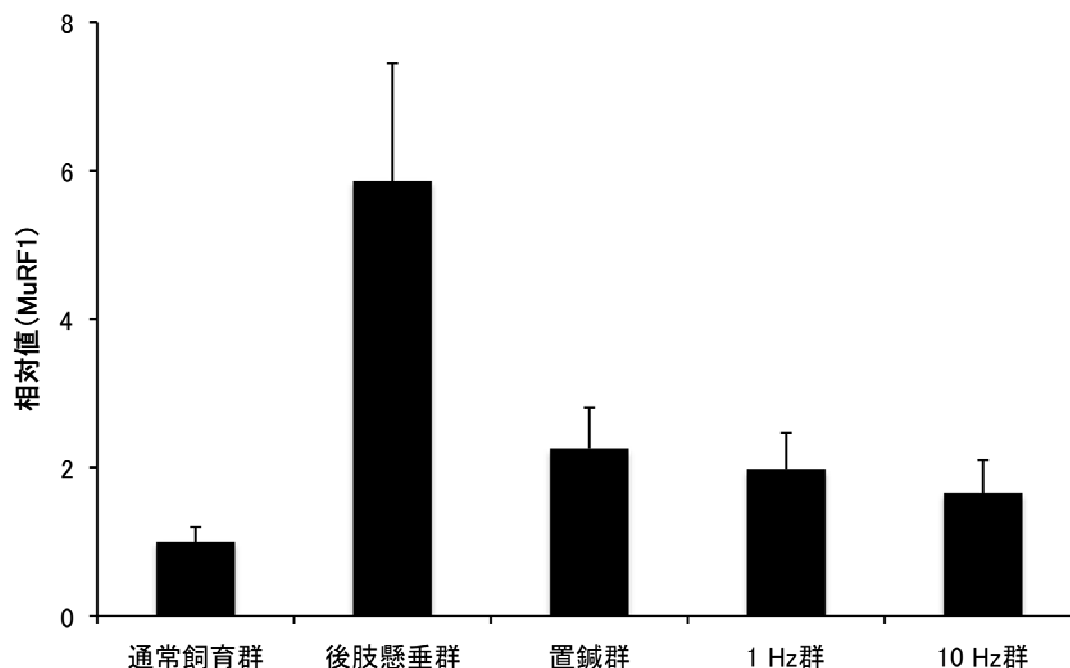


図16: 足底筋のAtrogin-1 mRNAの発現量

Atrogin-1をReal-time PCRによって定量した。Atrogin-1発現は、後肢懸垂群で増加し、鍼刺激によって抑制される傾向にあった。通常飼育群を基準とすると、後肢懸垂群で4.4倍、置鍼群で1.7倍、1 Hz群で1.3倍、10 Hz群で1.5倍であった。内部標準には $\beta$ -actinを用いた。n=4, 平均値 $\pm$ 標準誤差。

足底筋の MuRF1 の mRNA の発現量は、通常飼育群に対する相対値で、後肢懸垂群 平均  $5.87 \pm 1.58$ , 後肢懸垂 + 置鍼群  $2.25 \pm 0.55$ , 後肢懸垂 + 1 Hz 群  $1.97 \pm 0.50$ , 後肢懸垂 + 10 Hz 群  $1.66 \pm 0.45$  であった.

足底筋の mRNA 発現は、Atrogin-1 と同様に有意差は見られなかったが、後肢懸垂によって顕著に増加し、置鍼群を含め、1 Hz, 10 Hz 群の鍼刺激群で抑制される傾向にあった.



**図17: 足底筋のMuRF1 mRNAの発現量**

MuRF1をReal-time PCRによって定量した. MuRF1発現は、後肢懸垂群で増加し、鍼刺激によって抑制される傾向にあった. 通常飼育群を基準とすると、MuRF1の発現量は後肢懸垂群で5.9倍、置鍼群で2.6倍、1 Hz群で2.0倍、10 Hz群で1.7倍であった. 内部標準には  $\beta$ -actinを用いた.  $n=4$ , 平均値  $\pm$  標準誤差.

#### 5-4-4 小括

足底筋の後肢懸垂による筋萎縮の程度は、筋湿重量では遅筋に比べ穏やかであった。後肢懸垂によって筋湿重量は低下したが、鍼刺激を行った群ではこの低下を認めなかった。一方、筋線維断面積では、後肢懸垂群と比較して置鍼群、1 Hz、10 Hz の鍼刺激群でその低下は抑制された。

## 第 6 章 考察

### 6-1 筋湿重量／筋線維断面積の変化

本研究により, 鍼通電療法並びに置鍼において, 廃用性萎縮による筋湿重量, 並びに筋線維断面積低下の抑制が認められた.

廃用性萎縮のモデルについて, ヒラメ筋と足底筋では筋萎縮の程度が異なっていた. ヒラメ筋では通常飼育群と後肢懸垂群間に 1/3 以上の筋湿重量の減少が見られ, 同様に筋線維断面積も有意に減少傾向にあった. しかし, 足底筋の筋湿重量の減少率は, 通常飼育群と後肢懸垂群間で有意差が認められたものの, 17%に留まっていた. ヒラメ筋は遅筋であり, かつ抗重力筋である. 後肢懸垂によって後肢にかかる重力の欠如した状況で, ヒラメ筋が顕著に萎縮を引き起こす事は, 先行研究(4, 31)と一致する結果であった.

鍼通電による刺激については, 骨格筋の筋線維タイプにより, 回復の程度が異なる可能性が考えられる. 骨格筋の構成において, Type I および Type IIa 線維で構成されるヒラメ筋は, 羽状筋であり, 主に Type II b で構成される足底筋は紡錘状筋である. 羽状筋であるヒラメ筋は筋束長が短い故に, トレーニングなどによって肥大する傾向がある事が指摘されている(13). 鍼通電による骨格筋の収縮は, 筋の収縮を引き起こすという点からはトレーニングと類似の効果が考えられる. それ故に, 鍼通電の刺激は, 廃用性萎縮によるヒラメ筋の湿重量低下抑制メカニズムに関与している可能性が考えられる.

また, 鍼が骨格筋の萎縮を抑制するメカニズムに HSP (Heat shock protein) の発現が関わるという報告がなされている. 馮ら(32)は, 後肢懸垂による廃用性萎縮に対する鍼刺激によって, HSP72 の発現が上昇した事を報告している. HSP の発現は, 熱ショックによるタンパク質変性に対する生体のストレス応答である. HSP は分子シャペロンとしても知られており, 新生ポリペプチドのフォールディングなど, タンパク質の形成過程に深く関わっている. また, Li ら(33)によれば, 置鍼によって脾臓の HSP70 の発現量が上昇したことが報告されている. この研究では, 骨格筋の HSP70 の発現量は測定していないが, また,

Senf らによって筋萎縮を引き起こす転写因子 FoxO は、HSP70 の発現によって抑制されることが報告されている(34)。以上の先行研究により、鍼の骨格筋萎縮に対する抑制のメカニズムとして、HSP が関わっている可能性がある。本研究では HSP の検討は行っていないが、鍼の骨格筋萎縮に対する抑制のメカニズムの解明のためには、HSP を含めたさらなる検討が必要である。

## 6-2 萎縮関連遺伝子の mRNA の発現の変化

ヒラメ筋では、後肢懸垂によって増加した萎縮関連遺伝子 Atrogin-1, MuRF1 の mRNA 発現量は、鍼刺激によって抑制される傾向が認められた。しかし、足底筋では、後肢懸垂群の mRNA の発現量が顕著に亢進し、鍼刺激群によって高度に抑制されるにもかかわらず、筋湿重量においては後肢懸垂群と鍼刺激群間での違いがほとんどみられなかった。鍼刺激による mRNA の発現抑制の影響が、足底筋の筋湿重量の結果に反映しなかったのは何故か、という問いが存在するが、骨格筋は筋線維タイプにより、鍼刺激による筋湿重量や筋線維断面積において、回復の程度が異なる可能性があることは既に述べた。

今回の実験では、サンプル採取前の最後の鍼刺激から、翌日のサンプル採取までに約 24 時間のインターバルがあるにも関わらず、顕著な筋萎縮関連遺伝子の mRNA 発現量が認められた。今回の実験では、骨格筋は実験 2 週間後に一様に採取したため、萎縮関連遺伝子の発現動態は不明であるが、鍼刺激による遺伝子発現量の変化が鍼刺激の直後にピークに達するのであれば、鍼刺激直後の mRNA 発現抑制効果は今回得た結果よりも高い可能性がある。鍼刺激の影響は、2 週間毎日 30 分ずつ継続しても緩解せず、萎縮関連遺伝子の mRNA の発現を抑制する傾向にあった。あるいは、鍼刺激による萎縮関連遺伝子 mRNA の発現量の抑制効果は加重されて増強している可能性もあるため、刺鍼後の mRNA の発現動態を時間経過に伴って検討する必要がある。

除神経によって廃用性萎縮を惹起するモデルを用いて表面電極による電気刺激を行った結果、Atrogin-1 の発現量が減少するという報告もある(35, 36)。今回の実験の鍼通電群は、これらの研究と同様に電気刺激自体によって筋萎縮

関連遺伝子の mRNA 発現が抑制された可能性があるが、置鍼によってもこれらの mRNA 発現は抑制されたため、電気刺激のみでは筋萎縮関連遺伝子の mRNA 発現抑制を説明できない。

#### 6-3 筋萎縮に対する鍼刺激効果発現のメカニズム

本実験では置鍼による骨格筋の萎縮の抑制傾向が、筋湿重量並びに筋線維断面積の低下抑制、萎縮関連遺伝子の mRNA の発現量の抑制傾向という形で明らかとなったが、その治効メカニズムは依然不明である。鍼刺激による受容体は、ポリモーダル受容器である可能性がある事は前述した。ポリモーダル受容器の名前の由来は“多くの感覚形式”を意味している。この受容器は末梢の C 線維侵害性受容器である事から、傳田はポリモーダル受容器が、TRP チャネルであることを指摘している(37)。TRP チャネル受容体は、カルシウムイオン透過性の高いカチオンチャネルであり、プロトンや熱刺激によって活性化する侵害受容器である(38-40)。この TRP チャネル受容体が鍼による刺激の受容体であるかどうかは不明であるが、神経成長因子 (NGF) 投与によって引き起こされた痛覚過敏が、鍼通電によって抑制され、TRPV1 の発現量が通常レベルに戻る事も報告されている(41)。

#### 6-4 今後の研究計画

本研究では、実験動物を用いて、廃用性萎縮に対する鍼刺激の萎縮抑制効果を確認し、Atrogin-1, MuRF1 など萎縮関連遺伝子の mRNA 発現との関連性を検討した。萎縮関連遺伝子発現は、2 週間の鍼刺激によって抑制される傾向にあったが、サンプル数が少ないこともあり統計学的な差は認められなかった。

今後は、更にサンプル数を増やして、萎縮関連遺伝子発現への鍼刺激の影響を確認する必要がある。同時に、鍼刺激によって萎縮関連遺伝子発現が抑制されるならば、これらの遺伝子の制御に関わる転写因子 FoxO3, およびその上流のシグナルの検討を行う必要があると考えられる。また、鍼通電後および刺鍼後のタイムコース（3 時間後、6 時間後、1 日後など）の設定によって、時系列

に添った mRNA の発現動態の解明が必要である．

## 第 7 章 結語

廃用性萎縮によって引き起こされた骨格筋の筋湿重量と筋線維断面積の減少は 1 Hz および 10 Hz の鍼通電によって抑制された．一方，萎縮関連遺伝子の mRNA の発現量は鍼通電によって減少傾向にあった．また，置鍼によっても骨格筋の萎縮は抑制され，mRNA 発現量は減少する傾向にあった．

## 謝辞

本研究を行うにあたり，このような貴重な機会を与えて頂き，ご指導とご校閲を賜りました早稲田大学スポーツ科学研究科福林徹教授，赤間高雄教授，鳥居俊准教授，東京大学大学院医学系研究科牛田多加志教授ならびに秋本崇之講師に，心から感謝いたします．

鍼灸治療のご指導をしてくださいました筑波大学の宮本俊和准教授，並びに後肢懸垂法をご指導くださいました筑波技術大学の池宗佐知子准教授，本当にありがとうございました．西條一止先生，白石洋介先生，中野朋儀先生，足立清先生を始めお世話になりました諸先生と更科愛子さん，日本伝統医療科学大学院大学の塚田信吾先生，あいりんさんと高橋知子さん，森ノ宮医療大学の山下仁先生に感謝いたします．また，公立昭和病院の村松俊樹先生並びに清水誠一郎先生，東海大学岡本武志先生に，ご高配を賜りましたことを御礼申し上げます．

入学してからずっと暖かく見守ってくださった福林研究室の皆さん並びに 4 年生の奥平可奈子さん，富士晴華さん，鳥居研究室の皆さん，統計処理を教えてくださいました戸島美智生さん，本当にありがとうございました．

最後になりましたが，本研究を実施するにあたり，貴重なお時間をさき，懇切丁寧なご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科牛田研究室の和田正吾さん，横井雅子さん，塚本哲さん，相澤勝治さん，刈谷佑美さん，満岡友祐さん，松田拓也さん，堀内理絵さん，渡辺太郎さんに心から感謝いたします．本当にありがとうございました．

なお，この研究は、早稲田大学人間総合研究センター・井深基金「東洋医学に関する学際的研究プロジェクト」“アスリート傷害の治療とパフォーマンスの向上を目的とした鍼治療の有用性”ならびに，早稲田大学スポーツ科学研究科グローバル COE プログラム「アクティヴ・ライフを創出するスポーツ科学」（09－Ⅱ－04）の研究事業の一環として助成され行いました．

## 参考文献

1. Rayment I, Holden HM, Whittaker M, et al. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 1993;261:58-65
2. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 2000;50:500-509
3. Oishi Y. Relationship between myosin heavy chain II<sub>d</sub> isoform and fibre types in soleus muscle of the rat after hindlimb suspension. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1993;66:451-454
4. Stelzer JE, Widrick JJ. Effect of hindlimb suspension on the functional properties of slow and fast soleus fibers from three strains of mice. *J Appl Physiol* 2003;95:2425-2433
5. 後藤勝正, 大平充宣. 宇宙環境暴露および老化による骨格筋の萎縮. *宇宙航空環境医学*. 2007;44(2):49-58
6. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1974-1984
7. Bodine SC. mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2006;38:1950-1957
8. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 2001;3:1014-1019
9. Taillandier D, Aurousseau E, Meynial-Denis D, et al. Coordinate activation of lysosomal, Ca<sup>2+</sup>-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem J* 1996;316 ( Pt 1):65-72
10. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)* 2008;23:160-170

11. Ogawa T, Furochi H, Mameoka M, et al. Ubiquitin ligase gene expression in healthy volunteers with 20-day bedrest. *Muscle Nerve* 2006;34:463-469
12. 田中啓二. ユビキチンとは. ユビキチンがわかる. 羊土社. 東京  
2006:26-33
13. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704-1708
14. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14440-14445
15. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004;117:399-412
16. Clarke BA, Drujan D, Willis MS, et al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* 2007;6:376-385
17. Centner T, Yano J, Kimura E, et al. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol* 2001;306:717-726
18. 柴崎保三. 第十三 系黄帝内経霊枢. 雄渾社. 京都. 1979:1233-1319
19. 福林徹, 宮本俊和. 肉離れ スポーツ鍼灸の実際. 医道の日本社. 神奈川.  
2008:166-173
20. 東洋療法学校協会. 鍼灸刺激とポリモーダル受容器. はりきゅう理論. 医道の日本社. 神奈川. 2005:82-83
21. 兵藤正義. 症例の検討. 低周波置針療法. 医歯薬出版. 東京. 1980:94-111
22. 西條一止. 刺鍼反応. 臨床鍼灸学を拓く. 医歯薬出版. 東京. 2003:6-43
23. 西條一止, 川喜田健司. 侵害刺激としての鍼灸刺激ーポリモーダル受容器

- 仮説. 鍼灸臨床の科学. 医歯薬出版. 東京. 2000:395-408
24. Melzack. Gate control theory. PAINFORUM 1996
  25. 鎮痛薬・オピオイド研究会. 痛みとその制御. 科学増刊 120. オピオイド. 化学同人. 京都. 1991:55-61
  26. Min-Su KIM K-MS. Effects of Atipamezole and Naloxone on Electroencephalographic Spectral Edge Frequency 95 in Dogs Sedated by Acupuncture at GV20 and Yintang Point. JVetMedSci 2007;69(5):577-579
  27. Takaoka Y, Ohta M, Ito A, et al. Electroacupuncture suppresses myostatin gene expression: cell proliferative reaction in mouse skeletal muscle. Physiol Genomics 2007;30:102-110
  28. Wang SJ, Omori N, Li F, et al. Enhanced expression of phospho-Akt by electro-acupuncture in normal rat brain. Neurol Res 2002;24:719-724
  29. Wang SJ, Omori N, Li F, et al. Potentiation of Akt and suppression of caspase-9 activations by electroacupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats. Neurosci Lett 2002;331:115-118
  30. Morey ER. Spaceflight and bone turnover-correlation with a new rat model of weightlessness. Bioscience 1979 29 168-172
  31. Dapp C, Schmutz S, Hoppeler H, et al. Transcriptional reprogramming and ultrastructure during atrophy and recovery of mouse soleus muscle. Physiol Genomics 2004;20:97-107
  32. 馮起国. ラット廃用性萎縮筋の HSP72 発現に及ぼす針灸刺激と四君子湯の影響. 順天堂医学. 2008;54(4):538-539
  33. Li XH, Wang HB, Xu LL, et al. [Effect of preventive acupuncture and moxibustion at "Guanyuan" (CV 4) on the expression of HSP 70 and HSP 70 mRNA in spleen and the contents of serum IL-2, TNF-alpha in menopausal rats]. Zhen Ci Yan Jiu 2009;34:83-88
  34. Senf SM DS, Judge AR. Foxo Signaling is required for disuse muscle

- atrophy and is directly regulated by HSP 70. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;c38-c45
35. Russo TL, Peviani SM, Freria CM, et al. Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogen-1 and myoD gene expressions in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 2007;35:87-97
  36. Lima SC, Caierao QM, Peviani SM, et al. Muscle and nerve responses after different intervals of electrical stimulation sessions on denervated rat muscle. *Am J Phys Med Rehabil* 2009;88:126-135
  37. 傳田光洋. 感覚器としての皮膚. 第3の脳. 朝日出版社. 東京. 2007: 23-29
  38. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816-824
  39. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998;21:531-543
  40. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000;288:306-313
  41. Aloe L, Manni L. Low-frequency electro-acupuncture reduces the nociceptive response and the pain mediator enhancement induced by nerve growth factor. *Neurosci Lett* 2009;449:173-177