

JOURNAL OF SPORT SCIENCES AND OSTEOPATHIC THERAPY

スポーツ 整復療法学研究

March 2016

平成28年3月

原著論文

- 竹内仁, 市ヶ谷武生.....[151]
整骨院受診者における膝関節 locking の原因疾患と徒手整復について
- 奥田修人, 滝瀬定文, 河上俊和, 古河準平, 佐川光一.....[155]
ラット筋挫傷後の寒冷刺激が筋修復過程に及ぼす影響
- 佐川光一, 滝瀬定文, 河上俊和, 古河準平, 奥田修人.....[163]
筋損傷後の温熱刺激が筋再生過程初期に及ぼす影響
- 金澤佑治, 大井優紀, 杉生真一, 重吉康史, 片岡幸雄, 武田功.....[171]
後肢非荷重後の再荷重がラットヒラメ筋毛細血管に与える筋線維タイプ特異的な影響

学会通信

- 第17回日本スポーツ整復療学会大会印象記
第18回日本スポーツ整復療学会大会のご案内(第一報)
理事会議事録
編集後記

日本スポーツ整復療学会

The Japanese Society of Sport Sciences and
Osteopathic Therapy (JSSPOT)

整骨院受診者における膝関節 locking の原因疾患と徒手整復について

竹内 仁¹⁾²⁾ 市ヶ谷武生¹⁾³⁾¹⁾帝京科学大学医療科学部柔道整復学科 ²⁾三鷹台整骨院 ³⁾多花整骨院

Causative disorder and manipulative reduction for patients with knee joint locking at osteopathic clinic

Masashi Takeuchi¹⁾²⁾, Takeo Ichigaya¹⁾³⁾¹⁾Judo therapy course, Faculty of medical sciences, Teikyo University of Science²⁾Mitakadai osteopathic clinic, ³⁾Ooka osteopathic clinic

【Abstract】

The study examined 15 cases with definitive diagnosis by orthopedic surgeon after conducted manipulative reduction for patients with knee joint locking at the osteopathic clinic. 8 cases (53.3%) could receive manipulative reduction, but 7 cases (46.6%) could not. 4 out of 7 untreatable reduction cases eventually had spontaneous reduction, but we could conduct neither manipulative reduction nor spontaneous reduction for locking by osteochondritis dissecans in all 3 cases. In the definitive diagnoses, the number of meniscus injuries was the largest as 9 cases. Of those 9 cases, 6 cases (66.6%) could receive manipulative reduction. Since the number of definitive diagnoses was 7 disorders, variety of causative disorders for knee joint locking was clarified. Careful and humane process will be required to avoid secondary damage in manipulative reduction. Furthermore, it would be better to receive definitive diagnosis by orthopedic surgeon regardless of reduction result. (J.Sport Sci. Osteo. Thera.17(3):151-154, March,2016)

Key words: Knee joint (膝関節)、locking(ロッキング)、Manipulative reduction (徒手整復)、Osteopathic clinic (整骨院)

【諸言】

膝関節の locking は整骨院で遭遇することが比較的多い障害である。原因となる構造体として半月板が一般的だが、その他の組織も原因となりえる。locking に対して柔道整復師は応急的に徒手整復を試みるが、2 次的損傷の防止に配慮し、無理な整復操作を行わないことが原則である。また、確定診断については専門医に委ねるべきである。今回われわれは、膝関節に locking を呈して整骨院を受診した症例に対して徒手整復を試みた。さらに、整復の結果にかかわらず、処置後に整形外科医による確定診断を得た結果、膝関節lockingの原因疾患の多様性と整復に関して若干の知見を得た。本研究の目的は、膝関節lockingを呈して整骨院を受診した患者に対する徒手整復の有効性と専門医より得られた確定診断をもとに、整骨院における膝関節 locking 患者に対する適切な対応について検討することである。

【方法および対象】

平成 21 年 1 月から平成 27 年 1 月までの期間、東京都と埼玉

県の 2 か所の整骨院にて膝関節の locking を呈して受診した 19 名(男 8 例、女 11 例、平均年齢 39.52 歳(±2.99))のうち、整復などの処置後に整形外科医による確定診断を得た 15 例(男 6 例:平均 37 歳(±3.03)、女 9 例:平均 39.55 歳(±5.49)、平均 38.5 歳(±3.43))である(表・1)。

また、整復は臨床経験 20 年以上の柔道整復師が行った。整復操作は、locking した膝関節の原位置から他動的に可能な限り屈曲したのち、下腿部に対して内旋または外旋の回旋操作を与えながら膝関節を徐々に伸展させる方法とし、整復操作は初検時に 3 回を限度として試みたが、著明な疼痛の発生や患者による拒否、整復操作が 2 次的損傷を発生させる可能性があるとして推測された例については整復を中止した。整復が困難な場合は経過観察とし、翌日以降にあらためて再評価した。初診時の処置として大腿上部 1/3 から足 MTP 関節までのシーネ固定をおこなった。翌日以降の再検時、全例に対して膝関節を専門とする整形外科医に診察を依頼した。

【結果】

整形外科医による確定診断は、本症例(n=15)において一関節に複数の診断名があるものを含め、半月板損傷 9 例(内側半月板 7 例、外側半月板 2 例)、離断性骨軟骨炎 3 例、半月板ガングリオン 2 例、変形性膝関節症 2 例、膝蓋内側滑膜ヒダ障害 1 例、色素性絨毛結節性滑膜炎 1 例、前十字靱帯断裂 1 例であった(表・2)。

表1.

対象者 n=15		
性別	男性 6 例	女性 9 例
年齢	37 歳(±3.03)	39.55 歳(±5.49)

表 2.

確定診断名	症例数
半月板損傷	9 (内側 7 例・外側 2 例)
離断性骨軟骨炎	3
半月板ガングリオン	2
変形性膝関節症	2
膝蓋内側滑膜ヒダ障害	1
色素絨毛性結節性滑膜炎	1
前十字靱帯断裂	1

*1 関節に重複診断名があるものを含む

そのうち、半月板損傷 8 例(内側半月板 7 例・外側半月板 1 例)、離断性骨軟骨炎 3 例、半月板ガングリオン、膝蓋内側滑膜ヒダ障害各 1 例において鏡視下手術などの観血的治療が実施された。そのほか治療拒否、経過観察が各 1 例であった(表・3)。

表 3.

診断後の経過 n=15			
確定診断名	手術	手術拒否	経過観察
半月板損傷 (内側 7 例・外側 2 例) *	8	1	
離断性骨軟骨炎	3		
半月板ガングリオン	1		1
膝蓋内側滑膜ヒダ障害	1		
計	13	1	1

*変形性膝関節症・前十字靱帯断裂の重複診断を含む

初検時の徒手整復によって locking が解除されたのは 8 例(53.3%)で、半月板損傷 6 例(内側 5 例、外側 1 例)、半月板ガングリオン、膝蓋内側滑膜ヒダ障害が各 1 例であった(表・4)。一方、整復が不可能であったのは 7 例(26.6%)で、離断性骨軟骨炎 3 例、半月板損傷 2 例(内側)、半月板ガングリオン、色素性絨毛結節性滑膜炎が各 1 例であった(表・5)。そのうち半月板損傷、半月板ガングリオン、色素性絨毛結節性滑膜炎の各例では数日以内に自然整復されていた。しかし、離断性骨軟骨炎は全例で自然整復も認められなかった。

表 4.

確定診断名	初検時の整復・可能例 n=9
半月板損傷 (内側 5, 外側 1)	6
半月板ガングリオン	1
膝蓋内側滑膜ヒダ障害	1

表 5.

初検時の整復・不可能例の経過 n=7		
確定診断名	初検時	結果
離断性骨軟骨炎	3	整復不可能
半月板損傷 (内側)	2	自然整復
半月板ガングリオン	1	自然整復
色素絨毛性結節性滑膜炎	1	自然整復

【考察】

膝関節 locking に対して柔道整復師は徒手整復を試みることは多いものと考えられる。しかし、原因疾患は多様であり、柔道整復師の臨床において原因疾患の特定は困難であるため、応急的に locking の解除を目的とした徒手整復が実施されているものと思われる。しかしながら、膝関節 locking の整復法について統一された方法は確立されていないのが現状である。柔道整復における整復法の実行は、骨や関節に対して受傷に至るまでの運動学的機序と逆順の運動学的操作を行うものであり、われわれは膝関節 locking の原因として半月板が最多¹⁾であると想定し、患者が痛みを訴える部位が内側関節部であれば内側半月板、外側関節部であれば外側半月板による locking と想定した徒手整復を試みている。整復法は内側関節部に圧痛や疼痛がある locking に対しては、膝関節最大屈曲ののち、下腿部に内旋操作

を与えながら膝関節を伸展させる。外側関節部に対しては、膝関節最大屈曲ののち、下腿部に外旋操作を与えながら膝関節を伸展させる。本研究の整復操作は最大3回として行ったが、初検時に整復が成功したのは8例(53.3%)であった。

専門医の確定診断では半月板損傷が最多であった。Howellはlockingの原因の多くが変性・断裂した半月板であるとし、明らかな外傷歴がなくとも半月板損傷が発生する可能性があるとしている²⁾。本研究においても半月板損傷が最多であったことから、膝関節lockingに対しては半月板損傷を念頭に置いた整復操作を優先的に試みてよいのではないかと考えられた。Shakespeareはlockingの既往歴がある半月板損傷患者189例中、診察時にlockingを呈していた41%の例について報告し、徒手整復が可能であった例と手術時までlockingが継続していた例がほぼ同数であったとしている²⁾。さらに内側半月板損傷の82%、外側半月板損傷の64%にlockingの現病歴や既往歴があったとしている。われわれの半月板損傷に対する徒手整復の成功率は6例(66.6%)とShakespeareの成績よりも若干高かったことから、柔道整復の原則に準拠した整復法の有効性が示唆された。しかしながら臨床においては、原因となる構造体の種類やlockingの程度、整復時における疼痛の有無など多様な要因によって徒手整復の成功率は変化するものと考えられる。

lockingに対する初期対応として、原因となっている構造体が不明である場合や徒手整復時に疼痛を伴うことが多いため、徒手整復による二次的損傷の発生に注意して愛護的に操作する必要がある。

本研究では離断性骨軟骨炎の全例において徒手整復・自然整復ともに不可能であったことから、本症によるlockingは徒手整復・自然整復のいずれも期待できないことが示唆された。離断性骨軟骨炎を中心とした関節内遊離体はlockingの原因となりやすく、さらに遊離体の大きさや形状、個数によっては強固なlockingを呈することがある。本研究においても、全例で徒手整復と自然整復も認められなかったのは離断性骨軟骨炎であったことから、徒手整復・自然整復ともに不可能な症例については、離断性骨軟骨炎の可能性を考慮すべきと考えられた。

そのほか福林は、前十字靱帯断裂によって半月板後節における異常な負荷の増大に伴い、経時的に半月板損傷が起こることを指摘している³⁾。本研究での前十字靱帯断裂後に内側半月板が損傷されlockingに至ったと推測される1例が存在したことから、

同損傷の既往歴の有無もlockingの原因を推測するための参考情報と考えられた。

半月板にはそのほか、円板状半月やガングリオンなどが発生する⁴⁾。小西はガングリオンの発生機序として化生・変性説が有力であるとし、自検例において半月板の変性断裂が認められたと報告している⁵⁾。本研究でも2例にガングリオンが認められ、そのうちの1例では整復が不可能であった。

本研究では1例に色素絨毛性結節性滑膜炎(PVS)が認められた。Leeは鏡視下において本症による病変滑膜組織が内側半月板上に侵入し、lockingを生じた例を報告している⁶⁾。本研究では整復が可能であったが、整復前に原因不明の膝関節びまん性腫脹、膝蓋骨周囲の圧痛、関節可動障害などについて評価しておくことも有用と考えられた。

その他の原因として、半月関節包靱帯や膝窩半月靱帯の断裂⁷⁾、半月板の骨化症⁸⁾、大腿骨内顆部と膝蓋骨で形成された骨棘⁹⁾、膝蓋内側滑膜ひだ¹⁰⁾、半月板に沈着した痛風結節¹¹⁾などが報告されている。以上から膝関節lockingに対しては、多様な原因疾患の存在を念頭に置き対処し、専門医による確定診断を得る必要性が考えられた。

【結論】

- 1) 膝関節lockingを呈して整骨院を受診した患者に対する徒手整復の成功率は53.3%であった。
- 2) 膝関節lockingの原因は半月板損傷によるものが最多であった。
- 3) 半月板損傷に対する徒手整復の成功率は66.6%であった。
- 4) 離断性骨軟骨炎による関節内遊離体のlockingは徒手整復、自然整復ともに不可能であった。
- 5) 膝関節lockingにおける原因疾患の多様性から整復の結果にかかわらず、専門医による確定診断を得ることが望ましい。

【文献】

- 1) Howell R, Kumar NS, Patel, Tom J: Degenerative meniscus: Pathogenesis, diagnosis and treatment options. World J Orthop. 18;5(5):597-602,2014
- 2) D.T Shakespeare, H.S Rigby: The bucket-handle tear of the meniscus, Bone and Joint Surgery, 65 -B.No.4. August, 383-387, 1983

- 3) 福林 徹: 膝半月板機能と解剖. 臨床スポーツ医学, 11(10), 1113-1117, 1994
- 4) 落合聡司, 荻野哲男, 若生政憲ほか: 膝半月板損傷を合併しない半月板ガングリオン症の2例. 東日本整災会誌, 19巻3号, 2007
- 5) 小西奈津雄, 千葉光穂, 奥山幸一郎ほか: 当科における膝半月板ガングリオン症例の検討. 東北整形災害外科学会プログラム巻: 96th, 60, 2001
- 6) Lee KH, Chang PC, Lie DT, Koh JS, Ong KL: An unusual case of knee locking. Singapore Med J. Aug; 51(8): e140-142, 2012
- 7) 太田 昌博, 井上雅之, 島本則道, 河村太介: 特殊な肢位にて外側半月板の locking と自己整復を繰り返した1例. 北海道整形災害外科学会, 122巻, 35, 2012
- 8) 斉藤雅彦, 佐粧孝久, 山口智志ほか: ロッキング症状を呈した外側半月板骨化症の一例. 東日本整災会誌, 22巻3号, 461, 2010
- 9) Siddiqui MA, Tan MH: Locked knee from superior dislocation of the patella-diagnosis and management of a rare injury. Knee Surg Traumatol Arthrosc, 19(4): 671-3, 2011
- 10) 藤沢裕幸, 立花 陽明, 坂口勝信, 織田弘美: ロッキング症状を呈した膝蓋内側滑膜ひだ障害の1例. 東日本整災会誌, 21巻3号, 333, 2009

- 11) Espejo-Baena: Knee locking due to a single gouty tophus. J Rheumatol, Jan 33(1): 193-5, 2006

【要旨】

膝関節 locking を呈して整骨院を受診した患者に対して徒手整復を行った後、整形外科医による確定診断を得た15例について検討した。徒手整復が可能だったのは8例(53.3%)で7例(46.6%)が不可能であった。

整復が不可能な7例のうち4例は最終的に自然整復されたが、離断性骨軟骨炎による locking は3例全てで徒手整復・自然整復ともに不可能であった。確定診断では半月板損傷が9例で最も多かった。そのうち徒手整復が可能だったのは6例(66.6%)であった。確定診断は7疾患であったことから膝関節 locking における原因疾患の多様性が明らかになった。徒手整復にあたっては二次的損傷を発生させないよう、注意深く愛護的な操作が必要である。また、整復の結果にかかわらず整形外科医による確定診断を得ることが望ましいと考えられた。

(受付 平成 27 年 12 月 10 日)

ラット筋挫傷後の寒冷刺激が筋修復過程に及ぼす影響

奥田修人、滝瀬定文、河上俊和、古河準平、佐川光一

大阪体育大学スポーツ医学研究室

Effects of cold stimulation after muscle contusion on muscle repair process in rats

Shuto OKUDA¹, Sadafumi TAKISE¹, Toshikazu KAWAKAMI¹, Junpei FURUKAWA¹ and Koichi SAGAWA¹¹Department of Sport Medicine, Osaka University of Health and Sport Sciences

Abstract

The effects of cold stimulation after muscle damage on muscle satellite and immunocompetent cells were histologically investigated using a rat muscle contusion model involving 5-week-old male Sprague-Dawley rats (n=30). The rats were divided into 5 groups : groups with and without cold stimulation 24 hours after muscle contusion (cold stimulation and non-cold stimulation groups, respectively, n=6 each). groups with and without cold stimulation 72 hours after muscle contusion (n=6 each), and a control group (n=6).

Paraffin-embedded serial sections of the hind limb muscle tissue were prepared and subjected to hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical staining of macrophages, Pax7, and vascular endothelial growth factor (VEGF) (labeled streptavidin biotinylated antibody method). In addition, the micromorphology was observed using a scanning electron microscope (SEM).

The findings were as follows :

- 1) When the range of macrophage infiltration in a 1.5-mm² area was measured 72 hours after muscle contusion, its rate was significantly lower in the cold stimulation ($21.19 \pm 6.01\%$) than non-cold stimulation ($38.14 \pm 3.98\%$) group ($p < 0.01$).
- 2) Necrotized muscle fibers were observed after 24 hours in the non-cold stimulation group. At 72 hours, Pax7 was detected in muscle fibers that had regenerated around the necrotized muscle fibers. In addition, muscle satellite cells were observed under a scanning electron microscope.
- 3) On immunohistochemical staining 72 hours after muscle contusion, strong and weak reactions with VEGF were detected in the non-cold stimulation and cold stimulation groups, respectively.

Based on the above findings, cold stimulation following muscle contusion reduced pain and inflammatory reactions. However, it suppressed vascular permeability and delayed macrophage infiltration into the damaged region. Moreover, it delayed muscle fiber reconstruction by inhibiting the induction of muscle satellite cells and of vascularization.

(J.Sport Sci.Osteo.Thera,17(3),155-162,March,2016)

Key words : rat(ラット), macrophage(マクロファージ), muscle satellite cell(筋衛星細胞), scanning electron microscope (走査型電子顕微鏡)

【目的】

骨格筋は、肉離れや打撲などの外力によって筋損傷が発生する。筋損傷後における寒冷刺激の効果に関する研究では^{1) 2)}、疼痛の軽減や炎症反応の抑制に効果が認められているが、組織損傷後に生じる炎症反応は、組織治癒過程を反映する現象であるため、この現象を寒冷刺激により抑制することについては組織修復の抑制要因となる可能性が考えられる。そして、寒冷刺激による組織修復に及ぼす影響について、筋サテライト細胞の形態に着目した組織学的研究は見当たらない。その理由として、筋サテライト細胞の検索には、免疫組織化学染色による種々の一次抗体に対する反応について検討がなされているが、抗原の

一次抗体に対する交差性や反応性についての再現性が得られていないからである。また、筋サテライト細胞の微細形態については、細胞形態は筋芽細胞や筋原線維に比べて極めて小さく、基底膜下の限局した部位に局在するため、筋サテライト細胞の観察法は確立されていないからである。筋挫傷後の筋修復過程に関する基礎研究を進めることは、筋修復と筋サテライト細胞との関係を明らかにするために重要である。

そこで本研究は、筋損傷後の修復過程において、寒冷刺激が筋修復過程を促進させるのか、もしくは筋損傷部に出現するマクロファージの貪食作用を介して筋線維の再生と組織修復が促進されるのかといった機序を検討するため、筋修復過程における

筋サテライト細胞の形態に着目し、組織学的研究を行った。

【方法】

1. 実験動物

実験動物は、5週齢のSprague-Dawley系雄ラット(n=30, 日本SLC, 静岡)を用いて動物実験を行った。その内訳は、筋挫傷直後に寒冷刺激を実施する寒冷刺激群と寒冷刺激を実施しない非寒冷刺激群に分け、両群ともに筋挫傷から24時間後、72時間後(各群n=6)および通常飼育を行った対象群(筋挫傷無し, n=6)の計5群とした。実験期間は筋挫傷開始時から3日間の実験を行った。なお、本実験は、大阪体育大学動物実験倫理委員会の承認を得て、日本生理学会の制定した「生理学領域における動物に関する基本方針」及び大阪体育大学、動物に関する倫理規定を厳守し、実験を行った。

2. 飼育方法

ラット飼育は、個別ゲージにて、環境温度24℃、湿度40%—60%に維持した。明暗サイクルは8:00—20:00を明期、20:00—8:00を暗期となるよう調節した。飼料はRodent Laboratory Diet EQ(日本SLC, 静岡)を30g/day、水(水道水)を自由飲水させた。

3. ラット筋挫傷モデル作製法

ラット筋挫傷モデルは、Jaevine⁴⁾の方法を改良し、Pentobarbital Sodium麻酔下において、ラットを伏臥位にし、後肢筋を固定し、筋腹に直径20mm、質量650gの鉄製の錘を高さ25cmから自由落下させるマストロップ法(0.65*9.8*0.25=1.59joule)により、実験開始時に一度実施し、左後肢筋挫傷モデルを作製した。

4. 寒冷刺激方法

ラット後肢筋の寒冷刺激には、筋挫傷直後から20分間、水温2℃に維持した恒温槽(TB-2N, アズワン社, 大阪)へ挫傷肢を浸水させ、寒冷刺激を施した。

5. 灌流固定法、組織の摘出及び固定法

ラットの解剖は、筋挫傷24時間後、72時間後に腹腔内に体重100gあたり5mgのPentobarbital Sodium麻酔下にて、開胸し左心室に灌流用注射針を挿入し、0.9%生理食塩水(4℃)にて灌流を行った後、Kamovsky固定液(pH7.2, 4℃)にて灌流固定を行った。灌流固定後、速やかに後肢筋を摘出した。その後、2.5% glutaraldehyde 燐酸緩衝液(pH7.2, 4℃)中に浸漬固定した。

6. 光学顕微鏡による観察

光学顕微鏡試料は、採取した筋組織を2.5%glutaraldehyde 燐酸緩衝液(pH7.2, 4℃)にて固定後、实体顕微鏡下にて、筋腹を中心に鋭利な刃物で横軸方向に切断し、上昇エタノール系列で

脱水し、パラフィンブロックを作製した。その後、大型滑走式ミクローム(TU-213, 大和工機工業社, 埼玉)にて、厚さ6μmの連続横断切片を作製し、Hematoxylin Eosin stain(以下HE染色と略す)及び、免疫組織化学染色⁵⁾を行った。免疫組織化学染色は、一次抗体としてMacrophage(cloneNo.RM-4, Trans Genic Inc, 熊本)、Pax7(Cat.#bs-2413R, Bioss Inc, USA)、Vascular Endothelial Growth Factor(VEGFと略す, Cat.#RB-222, LABVISION Inc, USA)を用い、streptavidin・ビオチン抗体法(Labeled streptavidin - biotinylted antibody method: LSAB method, Dako, 東京)を行った。一次抗体は、Phosphate buffered saline(以下PBSと略す)で100倍に希釈した後、室温にて60分間反応させた。二次抗体はBiotin標識抗ウサギIgG抗体を用い、室温にて10分間反応させた。その後、Peroxidase標識Streptavidinを用い10分間反応させ、Diaminobenzidine・H₂O₂溶液にてPeroxidase発色のため5分間反応させた。次にHematoxylinにて核染色後、脱水、透徹、封入を行った。一方、作製した一部の連続切片は、対比染色としてPBSによるネガティブ染色を行い光学顕微鏡(BX51, OLYMPUS, 東京)にて観察し、撮影を行った。また、Macrophageの免疫染色画像解析は、Windows PCにデジタルデータとして入力、保存し、病理画像解析システムとしてcellSens Dimension(OLYMPUS, 東京)を用いて、損傷を与えた筋腹部を、1枚あたり1.5mm²の筋組織像を各群6枚撮影し、1.5mm²に占めるマクロファージの浸潤範囲を算出した。

7. 走査型電子顕微鏡による観察

走査型電子顕微鏡試料は、採取した筋組織をエタノール系列で脱水し、パラフィン包埋後、大型滑走式ミクローム(TU-213, 大和工機工業社, 埼玉)にて、厚さ10μmの連続横断切片を作製した。作製した切片はキシレン中に10分間浸漬し、脱パラフィン後、アセトン系列(50%, 70%, 90%, 95%, 99%, 100%)にて脱水し、臨界点乾燥(臨界点乾燥装置, TOPCON, 東京)、金蒸着(SC7610, TOPCON, 東京)を行った。走査型電子顕微鏡(SEM DS-600, TOPCON, 東京)による観察条件として、筋組織は生物試料電子ビームによる組織、細胞成分の損傷やチャージアップ現象を抑制し、高分解能の維持と試料内透過に伴う内部情報混入を生じさせないため、加速電圧を7kVに設定し、筋サテライト細胞及び筋線維の微細形態観察を行った(図1)。

8. 統計処理方法

得られたデータの統計処理は、統計処理ソフトSPSS statistics ver21(IBM, USA)を使用し、各群間の比較には、対応のないt検定を行い、危険率5%以下をもって統計的に有意とした。

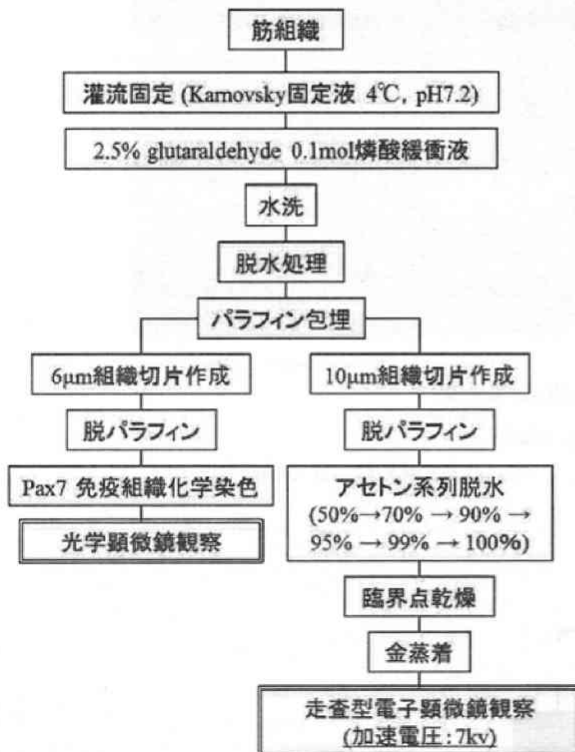


図1. 筋サテライト細胞観察用の標本作製手順

走査型電子顕微鏡試料は、10 μ m のパラフィン連続切片を作製し、キシレンにて脱パラフィン後、アセトン系列にて脱水し、臨界点乾燥と金蒸着を行った。

走査型電子顕微鏡による観察条件として、生物試料電子ビームによる筋組織の細胞成分の損傷やチャージアップ現象を抑制し、高分解能の維持と試料内透過を生じさせない設定にするため、加速電圧を 7kv に調整し、筋サテライト細胞の観察を行った。

【結果】

1. 筋挫傷部の光学顕微鏡観察結果

筋挫傷 24 時間後の筋挫傷部の HE 染色像では両群ともに、筋細胞膜や細胞骨格の損傷により、筋線維内に貪食細胞の浸潤及び筋線維が消化された壊死筋線維像が観察された (図 2-A, B)。筋挫傷 72 時間後の Macrophage の免疫組織化学染色結果は、寒冷刺激群が非寒冷刺激群に比べて陽性反応が弱かった (図 3-A, B)。1.5mm² に占めるマクロファージの浸潤範囲は、寒冷刺激群: 21.19 $\pm$ 6.0% が非寒冷刺激群: 38.14 $\pm$ 3.98% に比べて有意に低かった ($p < 0.01$) (図 4)。

筋挫傷 72 時間後の Pax7 の免疫染色結果は、寒冷刺激群では非寒冷刺激群に比べ、陽性反応が弱いものに対して、非寒冷刺激群の壊死筋線維近傍に強い陽性反応が観察された (図 5-A, B)。寒冷刺激群では VEGF の陽性反応が弱かった。非寒冷刺激群において壊死筋線維とその近傍に VEGF の陽性反応が強く観察された (図 6-A, B)。

2. 筋挫傷部の走査型電子顕微鏡観察

対象群では、筋線維が筋内膜で囲まれ、筋線維束を構成し、筋線維束は筋周膜により囲まれている像が観察された (図 7)。

筋挫傷 24 時間後の筋挫傷部には、両群ともに血球成分が損傷領域に観察され、非寒冷刺激群において血球成分がより集積している像が観察された (図 8-A, B)。筋挫傷 72 時間後の筋挫傷部には、両群ともに挫傷部に空胞形成が観察された。観察された空胞部の形状は、非寒冷刺激群: 直径 38.47 $\pm$ 4.4 μ m は寒冷刺激群: 直径 5.91 $\pm$ 0.68 μ m に比べて有意に大きい空胞形成像が観察された ($p < 0.01$) (図 9-A, B)。また、壊死筋線維の筋線維間に核小体が発達し、細胞膜と核膜の二重膜を有した筋サテライト細胞: 直径 3.55 $\pm$ 0.50 μ m が観察された (図 10-A, B)。

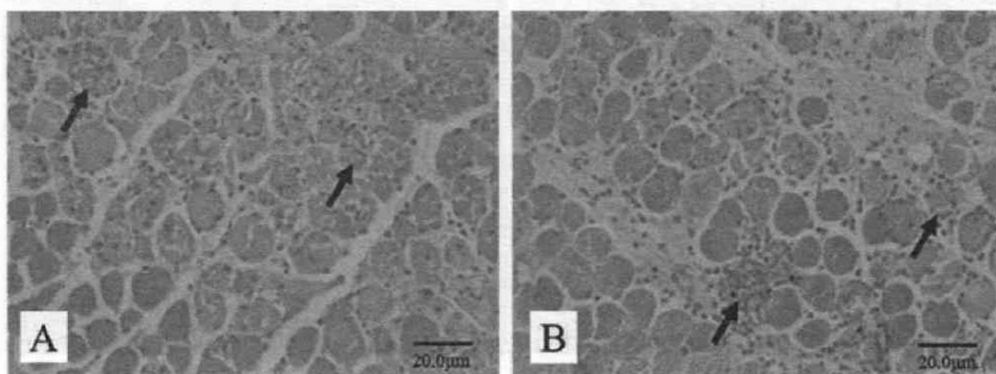
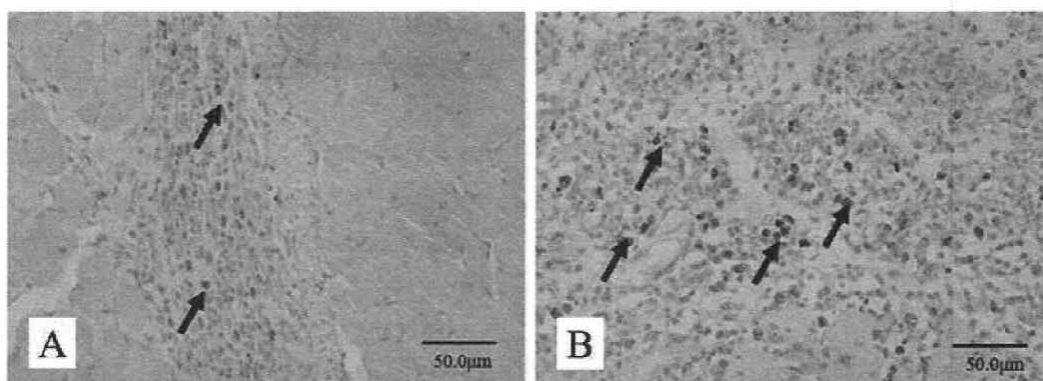


図2. 筋挫傷 24 時間後の HE 染色像

A: 寒冷刺激群, B: 非寒冷刺激群

両群ともに筋細胞膜や細胞骨格の損傷により筋線維内に貪食細胞の浸潤及び筋線維が消化した壊死筋線維像が観察された。



Arrow : Positive Stain

図3. 筋挫傷72時間後のMacrophage染色像

A:寒冷刺激群、B:非寒冷刺激群

寒冷刺激群 (A) は、筋挫傷部にMacrophageの反応が弱かった。一方、非寒冷刺激群 (B) の筋挫傷部ではMacrophageの反応が強かった。

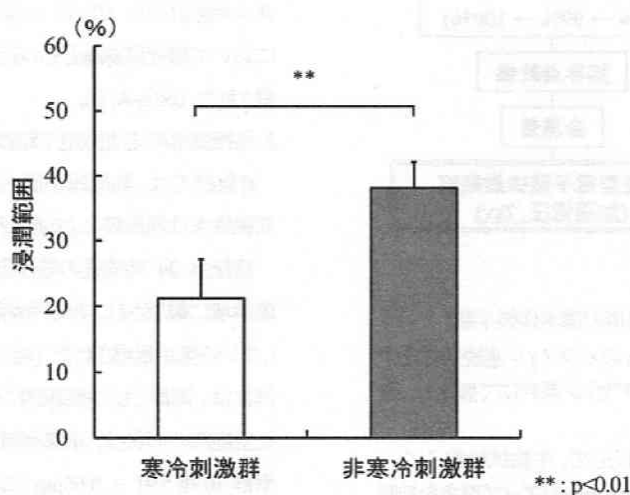
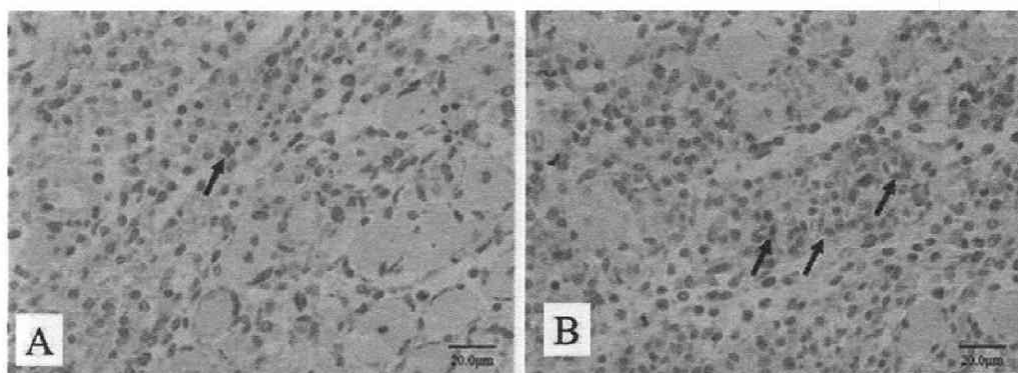


図4. 筋挫傷72時間後の損傷部に占めるMacrophage浸潤範囲の比較

1.5mm²に占めるマクロファージの浸潤範囲は、寒冷刺激群 (21.19 ± 6.0 %), 非寒冷刺激群 (38.14 ± 3.98%) で、寒冷刺激群が非寒冷刺激群に比べて有意に低かった (p<0.01)。



Arrow : Positive Stain

図5. 筋挫傷72時間後のPax7免疫染色像

A:寒冷刺激群、B:非寒冷刺激群

寒冷刺激群 (A) では非寒冷刺激群 (B) に比べ、Pax7の陽性反応が弱いものに対して、非寒冷刺激群 (B) の壊死筋線維近傍に強い陽性反応が観察された。

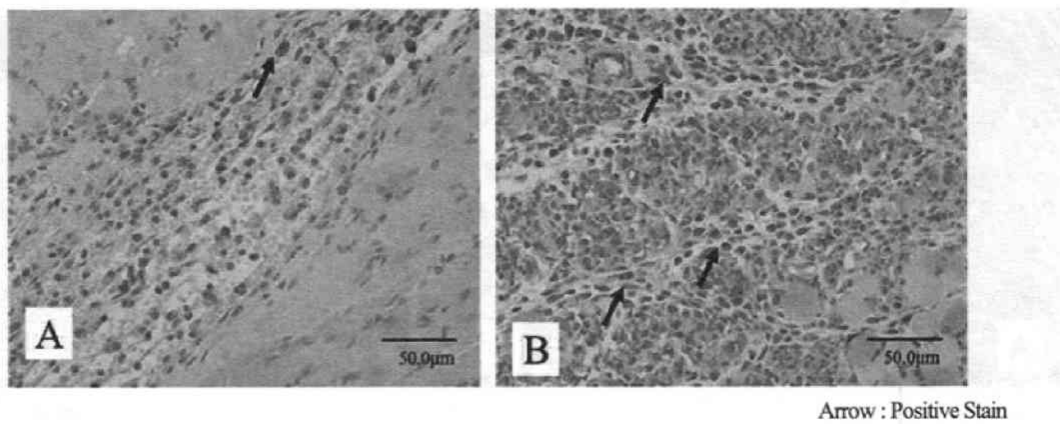


図6. 筋挫傷 72 時間後の VEGF 免疫染色像

A:寒冷刺激群、B: 非寒冷刺激群

寒冷刺激群 (A) では VEGF の陽性反応が弱かった。非寒冷刺激群 (B) において壊死筋線維とその近傍に VEGF の陽性反応が強く観察された。

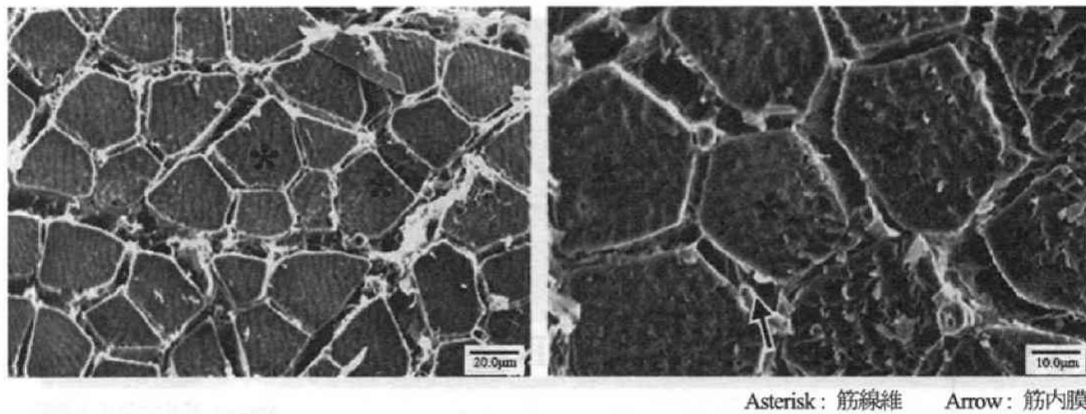


図7. 対照群の筋線維像

対象群では、筋線維が筋内膜で囲まれ、筋線維束を構成し、筋線維束は筋周膜により囲まれている像が観察された。

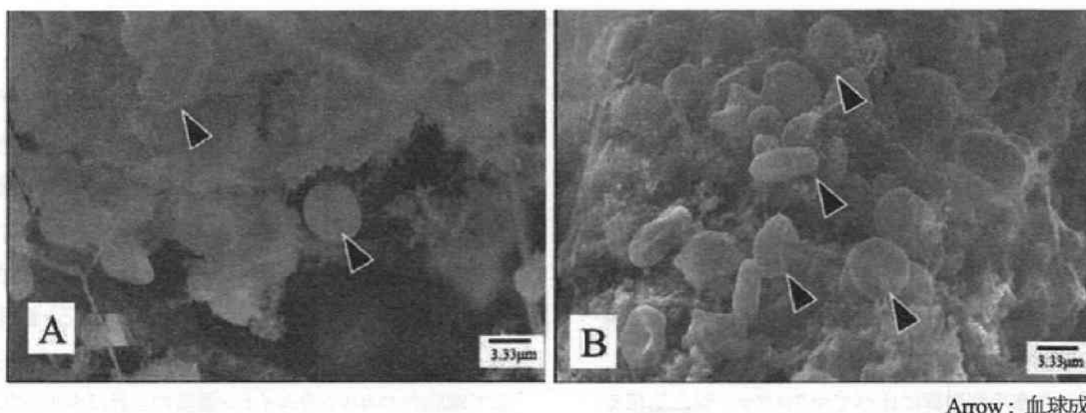
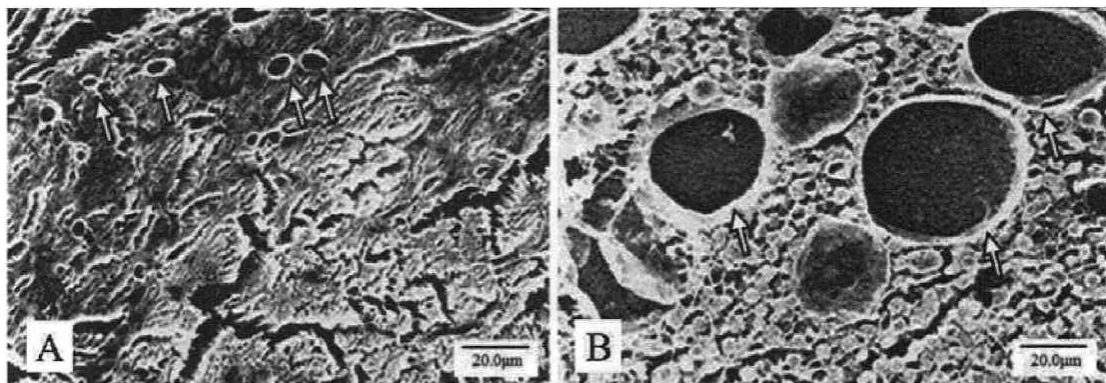


図8. 筋挫傷 24 時間後の筋損傷部における血球像

A:寒冷刺激群、B: 非寒冷刺激群

両群ともに血球成分が損傷領域に観察され、寒冷刺激群 (A) より非寒冷刺激群 (B) に、血球成分がより集積している像が観察された。

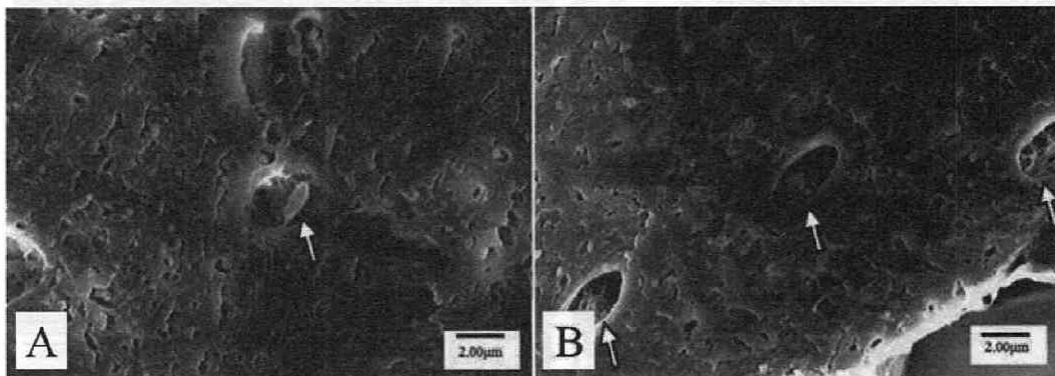


Arrow: 空胞部

図9. 筋挫傷 72 時間後の筋損傷部の空胞形成像

A: 寒冷刺激群, B: 非寒冷刺激群

筋挫傷 72 時間後の筋挫傷部には、両群ともに挫傷部に空胞形成が観察された。観察された空胞部の形状は、寒冷刺激群 (直径 $5.91 \pm 0.68 \mu\text{m}$) (A)、非寒冷刺激群 (直径 $38.47 \pm 4.47 \mu\text{m}$) (B) で、寒冷刺激群は非寒冷刺激群に比べて有意に小さい空胞形成像が観察された ($p < 0.01$)。



Arrow: 筋サテライト細胞

図10. 筋挫傷 72 時間後の筋サテライト細胞像

A: 寒冷刺激群, B: 非寒冷刺激群

筋線維間に核小体が発達し、細胞膜と核膜の二重膜を有した筋サテライト細胞が観察された。寒冷刺激群 (A) より非寒冷刺激群 (B) において筋サテライト細胞がより多く観察された。

【考察】

骨格筋は、再生能に優れた組織で、筋損傷後に、正常な筋再生を引き起こすためには、組織変性や炎症反応の過程に、好中球やリンパ球、単球及びマクロファージ等の免疫細胞の損傷部への浸潤や貪食といったプロセスを経て行われる。今回、筋損傷後のマクロファージを経目的に追跡していないが、損傷筋線維周辺の72時間後のマクロファージ浸潤範囲を計測したところ、寒冷刺激群が非寒冷刺激群に比べてマクロファージの集積や浸潤の遅れが観察され、寒冷刺激がマクロファージの浸潤による変性組織の処理及び筋再生を抑制させることが推察された。

ところで、損傷した筋細胞や浸潤したマクロファージは損傷修復のために必要な Transforming growth factor- β (以下 TGF- β と略す) や Insulin-like growth factor-1 (以下 IGF-1 と略す) といった成

長因子を合成するが、寒冷刺激によって合成が遅延する⁹⁾。このことは、寒冷刺激によって損傷後に起こる組織内の反応開始が遅延することが推察される。すでに著者は、寒冷刺激によって細胞内の様々な反応の開始が遅延し筋の修復が遅れている間にその空いたスペースからコラーゲンによって線維化されることをすでに報告している⁷⁾。一方、筋損傷が生じると弛緩筋では、筋小胞体の損傷に伴うカルシウムイオンの浸潤が考えられる。そして細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇はカルシウム依存性の蛋白分解酵素や脂質分解酵素の活性を促し、収縮蛋白、構造蛋白や細胞膜の分解を引き起こすため、筋線維は変性し壊死にいたると報告されている⁸⁾⁹⁾。そして、その後の血管透過性が亢進、好中球やマクロファージ等の免疫細胞が損傷部位に集積し、変性、壊死した組織を除去する。マクロファージは貪食細胞とし

て筋修復に関わるだけでなくその後の筋再生そのものにも影響を与えらると思われ。

ところが、非寒冷刺激群においては、肉眼的に腫張が観察され。その部位の走査型電子顕微鏡観察では、直径 $38.47 \pm 4.47 \mu\text{m}$ からなる空胞形成が認められた。このことは、筋組織に何らかの有害な刺激を起こす物質が作用した時に生体が示す局所の反応であるが、炎症反応は本質的には共通の基本様式を示す。すなわち、組織の障害と変性、成分と細胞の滲出、組織の修復と増殖であり、局所での血管透過性の亢進がこれらを引き起こす。今回、損傷から 24 時間後までの損傷部位に浸潤すると思われる好中球については観察していないが、損傷部位に集積した好中球は、高濃度の蛋白分解酵素を放出し、細胞内の壊死筋線の除去や炎症性サイトカインの分泌を促進し、マクロファージの動員を促す。マクロファージは血中では単球として存在するが、損傷部位に遊走する過程でマクロファージに分化する¹⁰⁾。著者の結果では、筋損傷後にマクロファージの浸潤範囲が寒冷刺激群の方が小さかったことは、損傷後にマクロファージの浸潤を阻害することで炎症反応や筋再生が抑制された可能性が考えられる。いずれにしてもマクロファージの浸潤は、炎症反応や筋再生にとって重要となる。さらに寒冷刺激は、出血に伴う血球成分の漏出や損傷部の組織液の滲出を抑制し、血漿蛋白による代謝産物等の除去及びマクロファージの浸潤の遅れが伺えた。これらのことは、寒冷刺激の効果として、寒冷刺激に対する細胞内外の適応によって組織の浸透圧を減ずることはできないが、損傷後の浸透圧の上昇を抑制することができると考えられている。これは損傷部局所での代謝と透過性の低下という 2 つの方法でなされている¹¹⁾。局所での代謝が低下すると、二次的低酸素症の軽減につながる。二次的低酸素症が軽減されると、放出される遊離蛋白も少なくなり、組織の浸透圧も低くなる。これは、血管透過性が亢進するため、血管内皮細胞の分離や、血管壁の隙間を形成し、白血球の血管壁通過や、組織の隙間への浸潤に影響を及ぼす可能性が考えられる。一方、毛細血管の役割は、酸素供給や、代謝産物等の物質交換の場として重要である。毛細血管は、筋線維の走行に沿って伸展しながら、その走行は大きく蛇行している。毛細血管の蛇行は、筋線維との接触面積をより広く保つ事ができる利点となる。このことは、血液と筋線維間との間の物質交換を効率よく行う事に貢献することができる¹²⁾。また、筋再生には、結合組織の再構築、血管新生および再生筋の機能回復が必要である。筋損傷により毛細血管や結合組織などの損傷が引き起こされると、組織再生には血管新生が必須となり、VEGF が作用する。これらの点を踏まえ、筋挫傷 72 時間後の非寒冷刺激群で VEGF の反応が強かったことについて、著者らは

次のように考えている。挫傷した筋線維では酸素や栄養素等の需要が高まる事が考えられ、それに見合った量の血液供給が必要となるが、血液供給が十分行われていないと筋線維は必要量の酸素や栄養を摂取する事ができないことになる。また、損傷した組織の低酸素状態は、血管新生因子を増殖させる¹³⁾。VEGF は細胞の増殖と形態形成を調整するため、炎症期以降の非寒冷刺激群は、これらの血管新生因子の発現量を増加させ、毛細血管を伸展させる可能性が示唆される。

また、組織の修復に関するマクロファージの発現は、筋損傷後の、損傷部位を食食するために浸潤し、マクロファージの刺激が筋サテライト細胞の活性化に影響を与えるものと考えられる。その理由として、筋線維膜損傷による細胞外液流入や線維形態の変化が生じ、修復過程では、カルシウムイオンの細胞内流入による蛋白分解酵素の活性化や食食反応によるマクロファージの出現、筋線維核の断片化が惹起されるからである¹⁴⁾。筋挫傷 72 時間後の損傷部位では、寒冷刺激群においてマクロファージ反応が弱く、浸潤範囲が小さかった。このことは、寒冷刺激の影響による細胞内の温度の低下が損傷部位の酵素活性を低下させ、マクロファージの浸潤による壊死筋線維の処理を抑制したものと考えられる。

一方、免疫組織化学染色による筋サテライト細胞の識別は、用いる抗体は確立されておらず、筋損傷後の筋サテライト細胞をより効率的に識別するため未分化な細胞から筋サテライト細胞への分化には転写因子として Pax7 が作用する¹⁵⁾とされており、筋挫傷 72 時間後の非寒冷刺激群では寒冷刺激群と比較して、壊死筋線維近傍に Pax7 の反応が強かった。壊死筋線維近傍の走査型電子顕微鏡試料観察は、細い電子線を走査し、電子線を当てた座標の情報から像を構築して表示する。観察試料を高真空中に置き、その表面を電界や磁界で絞った電子線で走査する。走査は直線的であるが、走査軸を順次ずらしていくことで試料表面全体の情報を得ることになる。電子線が試料に当たると、二次電子放出など様々な現象が生じ、試料から発せられるこれらの信号は検出器で検出され光電子倍增管による増幅を得て陰極線管 (Cathode Ray Tube) では、信号量の違いによりその輝度を変調する。走査型電子顕微鏡では、輝度変調信号の処理結果が像としてディスプレイに表示され、これを観察することになる。ところが、今回用いた筋組織の試料、すなわち導電性の低いものを高真空二次電子法で高加速電圧をかける場合、試料はあらかじめ導電性の物質でコートしておく必要がある。これは二次電子を効率よく放出させるため、チャージアップによる露出オーバーと像の歪みを防ぐために、電子線の余剰エネルギーを逃がし試料表面の破損を最小限に留めるために行った。その結果、筋

損傷後の筋サテライト細胞の動きを詳細に観察することが可能となり、筋細胞膜と基底膜に介在する筋サテライト細胞は、非寒冷刺激群において速やかな再生現象が観察され筋再生に重要な役割を果たすものと思われる。

通常、筋サテライト細胞は筋線維の形質膜と基底膜の間に静止状態にある。筋損傷後は、損傷部にマクロファージや血管内皮細胞、血球成分が出現し、それらの細胞から分泌される Fibroblast growth factor (以下 FGF と略す)、Hepatocyte growth factor (以下 HGF と略す) や Interleukin (以下 IL と略す) -6、IGF-1、TGF- β 等の作用により筋サテライト細胞の機能が活性化され、増殖を始める¹⁴⁾。寒冷刺激群においても筋サテライト細胞が観察されたが極めて小さかったことが特徴的であった。寒冷刺激では、マクロファージの出現のみでなく筋サテライト細胞の活性化が遅れるのかも知れない。このことは、活性化した筋サテライト細胞から筋芽細胞が誘導され、活発に増殖を繰り返しながら損傷部へと遊走し、活性化した一部が再び静止状態に戻るには時間を要すると思われる。筋芽細胞が増殖を止め、互いに融合し多核の筋管に分化し、神経支配を受けて成熟した筋線維になるまで時間を要するものと思われる。非寒冷刺激群に筋サテライト細胞が多数観察された。このことは、寒冷刺激は単球やマクロファージの出現を減弱化させるものの、筋サテライト細胞の出現は遅延することが明らかとなった。すなわち、マクロファージの侵入は筋損傷後の活発な筋線維の再生にとって重要である。このことは、マクロファージから分泌される何らかの物質が再生をさらに促進させるものと考えられる。筋損傷 72 時間後の再生にとって寒冷刺激は骨格筋が壊死に陥った後の筋線維にはマクロファージの侵入がないと再生されないことが推測された。

著者の結果は、重度の筋挫傷モデルという限定された実験条件であり、捻挫や筋損傷を伴わないような外傷に当てはまるかについては注意を要して考える必要がある。今後、寒冷刺激のメカニズムの解明に基づいた適切な対処法、予防法に関する基礎的な研究を推進する必要がある。

【文献】

- 1) Kalenak, A., Medlar, C., Fleagle, S. and Hochberg W. (1975) Athletic injuries : Heat vs. cold. *Am Fam Physician*, 12 (5) : 131-134.
- 2) Sugiura, T., Tominaga, M., Katsuya, H. and Mizumura, K. (2002) Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol*, 88 (1) : 544-548.
- 3) 横山茂樹 (2009) 寒冷療法概論. 物理療法学 第2版 神
- 4) Jaevinen, M. and Sorvari, T. (1975) Healing of a crush injury in rat striated muscle. *Acta Pathol Microbiol Scand, SectA*, 83 : 259-265.
- 5) 向井裕貴・滝瀬定文・河上俊和 (2012) 骨折治癒過程における免疫組織化学的研究. *スポーツ整復療法学研究*, 13 (3) : 161-169.
- 6) Takagi, R., Fujita, N., Arakawa, T., Kawada, S., Ishii, N. and Miki, A. (2011) Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *J Appl Physiol*, 110 (2) : 382-388.
- 7) 奥田修人・滝瀬定文・河上俊和・古河準平・佐川光一 (2013) ラット筋挫傷後におけるアイシングが組織修復に及ぼす影響. *スポーツ療法学研究*, 15 (2) : 115.
- 8) Bodensteiner, J. and Engel, A. (1978) Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies : a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology*, 28 (5) : 439-446.
- 9) Oberc, M. and Engel, W. (1977) Ultrastructural localization of calcium in normal and abnormal skeletal muscle. *Lab Invest*, 36 (6) : 566-577.
- 10) Tamura, T., Nagamura-Inoue, T., Shmeltzer, Z., Kuwata, T. and Ozato, K. (2000) ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity*, 13 (2) : 155-165.
- 11) Rippe, B. and Grega, G. (1978) Effects of isoprenaline and cooling on histamine induced changes of capillary permeability in the rat hindquarter vascular bed. *Acta Physiol Scand*, 103 (3) : 252-262.
- 12) Ledvina, M. and Segal, S. (1995) Sarcomere length and capillary curvature of rat hindlimb muscles in vivo. *J Appl Physiol*, 78 (6) : 2047-2051.
- 13) 池田栄二 (2009) 低酸素刺激による血管系の改築と疾患. *山口医学*, 58 (4) : 137-142.
- 14) Hawke, T. and Garry, D. (2001) Myogenic satellite cells : physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 91 (2) : 534-551.
- 15) Seale, P., Sabourin, L., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P. and Rudnicki, M. (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 15 : 102 (6) : 777-786.

(受付 平成27年9月2日)

筋損傷後の温熱刺激が筋再生過程初期に及ぼす影響

佐川光一¹, 滝瀬定文¹, 河上俊和², 古河準平¹, 奥田修人¹¹大阪体育大学スポーツ医学研究室, ²太成学院大学

Influence of heat stimulation after muscle damage on the early phase of muscle repair in rats

Koichi Sagawa¹, Sadafumi Takise¹, Toshikazu Kawakami², Junpei Furukawa¹, Shuto Okuda¹¹Department of Sport Medicine, Osaka University of Health and Sport Sciences,²Taisei Gakuin University

Abstract

The influence of heat stimulation after muscle damage on immunocytes was histologically investigated using a rat muscle damage model. Five-week-old male Sprague-Dawley rats (n=10) were used. The rats were divided into those with muscle damage without treatment (muscle damage group) and those with heat stimulation immediately after muscle damage (heat stimulation group).

Hind leg muscle tissue was excised 24 hours after muscle damage. Paraffin-embedded serial sections were prepared and subjected to hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical staining of macrophages and heat shock protein 70 (LSAB method). In addition, the micromorphology was observed using a scanning electron microscope (SEM).

1) The numbers of immunocytes per field (0.041 mm²) were 19.33±4.44 and 30.56±6.64/mm² in the muscle damage and heat stimulation groups, respectively, showing that the number was higher by 11.23/mm² in the heat stimulation than in the muscle damage group (p<0.01).

2) On immunohistochemical staining, macrophage- and HSP70-positive reactions were noted near necrotized muscle fibers more frequently in the heat stimulation than muscle damage group.

3) On SEM, more marked immunocyte infiltration was observed in the heat stimulation compared to muscle damage group.

It was clarified that heat stimulation after muscle damage promoted muscle regeneration in the early phase of the muscle regeneration process through activating immunocytes and HSP70.

(J.Sport SCI.Osteo.Thera,17(3),163-170,March, 2016)

Key Words: rat (ラット), muscle damage (筋損傷), heat stimulation (温熱刺激)

[目的]

骨格筋は肉離れや打撲などの外力によって損傷が発生する。しかし、骨格筋は損傷を受けた後、速やかな再生能を有していることから、骨格筋の再生には損傷後、筋の変性、炎症反応、再生、再構築の一連の流れにより、数週間後には回復することが多い¹⁾²⁾。筋損傷・再生過程において重要な役割を担っている免疫細胞や骨格筋の組織細胞である筋衛星細胞の活性化、増殖、分化、さらに遊走を修飾するサイトカインをはじめとする液性因子が明らかにされつつある。一般的に筋損傷直後の処置として、安静や冷却、圧迫、挙上を用いられている。その効果は、筋収縮活動や血液灌流量を減少させ、炎症反応や腫脹、疼痛の抑制に有効であるとされているが、ラット筋損傷直後にIcingを施行すると筋修復が遅延し、瘢痕組織も長期間残存する³⁾。さらに、筋損傷後の再構築機構に着目した場合、貪食細胞の浸潤や液性因子の発現を抑制し、瘢痕組織が長期間残存し、筋再生を遅

延させている可能性が考えられる⁴⁾。

一方で、筋損傷後の急性期に用いられることが少なかった温熱療法はどのような影響を与えるのであろうか。温熱刺激はタンパク合成の促進など、筋再生を促進させるという報告がなされてきているが⁵⁾⁶⁾、組織学的に検討した報告は見当たらない。

本研究は、筋損傷 24 時間後の炎症反応過程での成長因子の発現と微細形態に着目し、温熱刺激が筋再生に及ぼす影響について組織学的検討を行った。

[実験方法]

1. 実験動物

実験動物は、5 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット (n=10, 日本 SLC, 静岡) を用い、筋損傷群 (筋損傷 24 時間後: 対照群) (n=5)、温熱刺激群 (筋損傷+温熱刺激 24 時間後) (n=5) に分け、実験を行った。

なお、本実験は、大阪体育大学動物実験倫理委員会の承認を得て、日本生理学会の制定した「生理学領域における動物に関する基本方針」及び大阪体育大学の動物に関する倫理規定を厳守し、実験を行った。

2. 飼育方法

ラットの飼育は、個別ゲージにて環境温度を 24℃、湿度 40%—60%に維持した。明暗サイクルは、8:00—20:00 を明期、20:00—8:00 を暗期となるように調節した。飼料は、Rodent Laboratory Diet EQ (日本 SLC、静岡) を 1 日 30 g 与え、水 (水道水) を自由飲水させた。

3. 損傷方法

ラット筋損傷モデルは、ラットは体重 100 g 当たり 5 mg の Pentobarbital sodium 麻酔下にて左下腿部の皮膚を 1 cm 切開後、20 ゲージ注射針を腓腹筋とアキレス腱移行部との間から筋腹中央部に向かい長軸方向 (筋線維走行) に 20 mm 挿入し、20 ゲージ注射針 (直径: 0.90 mm) のサイズの筋損傷 (筋微細損傷) モデルを作成した。

4. 温熱刺激方法

ラット筋損傷モデルの温熱刺激は、筋損傷部の感染予防のため、小動物用のゴム製保護具を作成し、筋損傷直後に 42℃に維持した恒温槽 (TB-2N, アズワン社、大阪) に損傷肢を浸水させ、20 分間の温熱刺激を与えた (図 1)。

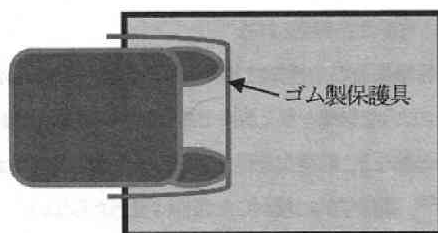


図1 温熱刺激方法

ラット筋損傷モデルの温熱刺激は、筋損傷部の感染予防のため、小動物用のゴム製保護具を作成し、筋損傷直後に 42℃に維持した恒温槽 (TB-2N, アズワン社、大阪) に損傷肢を浸水させ、20 分間の温熱刺激を与えた。

5. 灌流固定法、組織の摘出及び固定法

ラットの解剖は、損傷方法で述べた同様の麻酔下にて開胸し、左心室に灌流用注射針を挿入し、0.9% 生理食塩水 (4℃) にて

灌流を行った後、Karnovsky 固定液 (pH 7.2, 4℃) にて灌流固定を行った。灌流固定後、速やかに後肢筋を摘出した。その後、2.5% Glutaraldehyde 磷酸緩衝液 (pH 7.2, 4℃) 中に浸漬固定した。

6. 光学顕微鏡による観察

光学顕微鏡試料は、採取した筋組織を 2.5% Glutaraldehyde 磷酸緩衝液 (pH 7.2, 4℃) にて固定後、実体顕微鏡下にて、筋腹を中心に鋭利な刃物で横軸方向に切断し、エタノール系列 (50%, 70%, 90%, 95%, 99%, 100%) で脱水し、パラフィンブロックを作製した。その後、大型滑走式マイクローム (TU-213, 大和工機工業社、埼玉) にて、厚さ 6 μm の連続横断切片を作製し、Hematoxylin Eosin stain (HE 染色) 及び、免疫組織化学染色⁷⁾を行った。

免疫組織化学染色は、一次抗体として Macrophage (clone No. RM-4, Trans Genic Inc, 熊本), Heat shock protein 70 (HSP70, Cat. #bs-0126R, Bioss, Inc, USA) を用い、ストレプトアビジン・ビオチン抗体法 (Labeled streptavidin - biotinylated antibody method: LSAB method, Dako, 東京) を行った。一次抗体は、PBS で 100 倍に希釈した後、室温にて 60 分間反応させた。二次抗体は Biotin 標識抗ウサギ IgG 抗体を用い、室温にて 10 分間反応させた。その後、Peroxidase 標識 Streptavidin を用い 10 分間反応させ、Diaminobenzidine $\cdot$ H_2O_2 溶液にて Peroxidase 発色のため 5 分間反応させた。次に Hematoxylin にて核染色後、脱水、透徹、封入を行った。

一方、作製した一部の連続切片は、対比染色として PBS によるネガティブ染色を行い、光学顕微鏡 (BX51, OLYMPUS, 東京) にて観察し、撮影を行った。

また、HE 染色により Hematoxylin で紫色に染色された免疫細胞の染色画像解析を行い、Windows PC にデジタルデータとして入力、保存し、病理画像解析システムとして Cell Sense Dimension ver 1.11 (OLYMPUS, 東京) を用いて、1 区画あたり 0.041 mm^2 の筋損傷部の像を 9 区画 (計 0.37 mm^2) を用い、1 区画あたりに占める免疫細胞数を算出した。

7. 走査型電子顕微鏡による観察

走査型電子顕微鏡試料は、2.5% Glutaraldehyde (pH 7.2, 4℃) にて 5 日間の後固定後、1% オスmium酸で後固定し、アセトン脱水後、アセトン系列 (50%, 70%, 90%, 95%, 99%, 100%) にて脱水し、臨界点乾燥 (臨界点乾燥装置, TOPCON, 東京) 後、金

蒸着 (SC7610, TOPCON, 東京) を行い, 走査型電子顕微鏡 (Scanning electron microscope : SEM DS-600, TOPCON, 東京) による筋損傷部の微細形態観察を行った。

8. 統計処理方法

得られたデータの統計処理は, 統計処理ソフト SPSS statistics ver 21 (IBM, USA) を使用し, 群間の比較には, 対応のない t 検定を行い, 危険率 5% 以下をもって統計的に有意とした。

[結果]

1. 筋損傷部の光学顕微鏡観察結果

HE 染色像では両群ともに, 筋線維内に免疫細胞の浸潤及び筋線維が消化された壊死筋線維像が観察され, 筋内構造の異常が認められた。壊死筋線維の形質膜は損傷しているが, 基底膜は残存しているのが観察された (図 2-A, B)。

図 3 には, 1 区画あたり (0.041 mm^2) に占める免疫細胞数は, 筋損傷群 : $19.33 \pm 4.44 \text{ 個/mm}^2$, 温熱刺激群 : $30.56 \pm 6.64 \text{ 個/mm}^2$ で, 温熱刺激群が筋損傷群に比べて 11.23 個/mm^2 有意に高かった ($p < 0.01$)。

Macrophage の免疫組織化学染色結果 (図 4-A, B) は, 温熱刺激群は筋損傷群に比べ, 壊死筋線維近傍に Macrophage の陽性反応が多く観察され, 温熱刺激群が筋損傷群よりマクロファージの浸潤が促進されていることがうかがえた。

HSP70 の免疫組織化学染色結果 (図 5-A, B) では, 温熱刺激群において, 筋損傷群に比べ, 壊死筋線維とその近傍に HSP70 の陽性反応が多く観察された。

2. 筋損傷部の走査型電子顕微鏡観察

筋損傷群では, 筋原線維のサルコメアの乱れが観察された。腓腹筋とアキレス腱移行部との間から筋腹中央部に向かい長軸方向 (筋線維走行) に挿入した 20 ゲージ注射針 (直径 : 0.90 mm) により起こった現象であると思われる (図 6)。一方, 温熱刺激群においては, 筋原線維のサルコメアの乱れが観察され, 好中球による免疫細胞が筋損傷群より浸潤している像 (直径 : $0.2 \mu\text{m} - 0.9 \mu\text{m}$) が多数観察された。そして, 免疫細胞の形状は半球状のものから平坦なものまで様々な形状が観察された (図 7)。

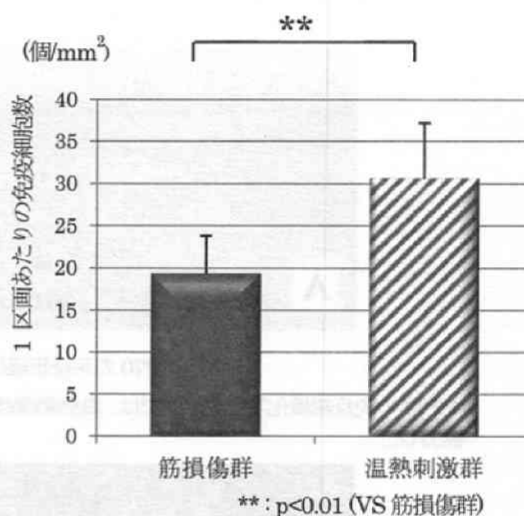
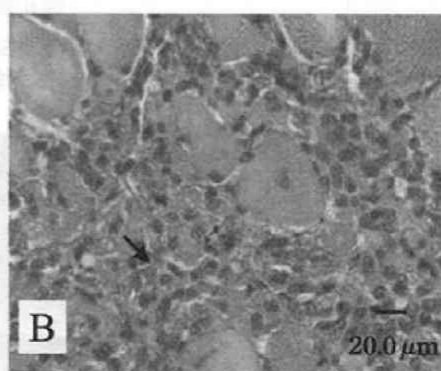
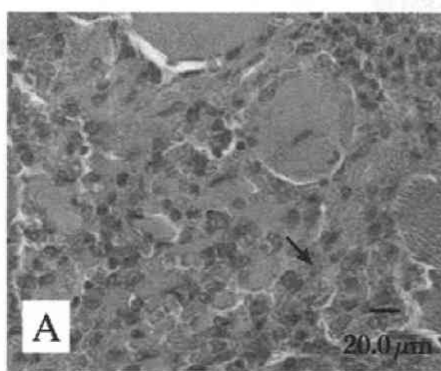


図 3 HE 染色による免疫細胞数の比較

1 区画あたり (0.041 mm^2) に占める免疫細胞数は, 筋損傷群 : $19.33 \pm 4.44 \text{ 個/mm}^2$, 温熱刺激群 : $30.56 \pm 6.64 \text{ 個/mm}^2$ で, 温熱刺激群が筋損傷群に比べて 11.23 個/mm^2 有意に高かった ($p < 0.01$)。

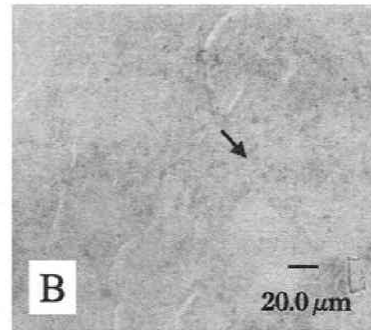
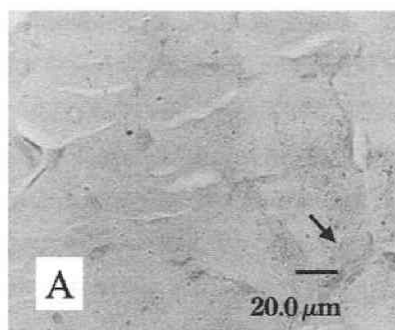


Arrow: 壊死筋線維

図 2 筋損傷部の HE 染色像

A 筋損傷群 B 温熱刺激群

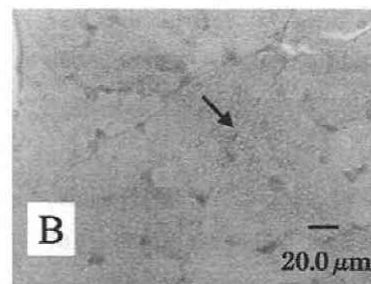
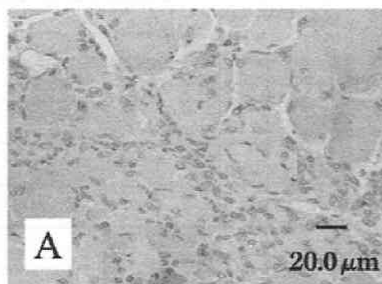
HE 染色像では両群ともに, 筋線維内に免疫細胞の浸潤及び筋線維が消化された壊死筋線維像が観察され, 筋内構造の異常が認められた。壊死筋線維の形質膜は損傷しているが, 基底膜が残存しているのが観察された。



Arrow : Positive Stain

図4 Macrophage の免疫組織化学染色像 A 筋損傷群 B 温熱刺激群

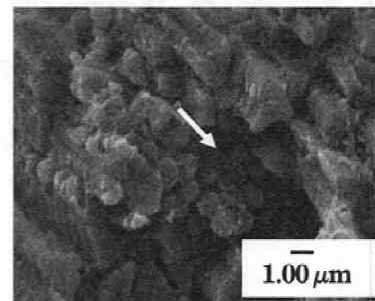
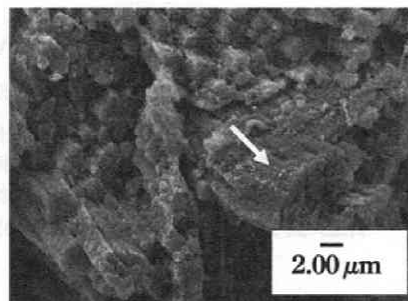
Macrophage の免疫組織化学染色結果は、温熱刺激群は筋損傷群に比べ、壊死筋線維近傍に Macrophage の陽性反応が多く観察され、温熱刺激群が筋損傷群よりマクロファージの浸潤が促進されていることがうかがえた。



Arrow : Positive Stain

図5 HSP70 の免疫組織化学染色像 A 筋損傷群 B 温熱刺激群

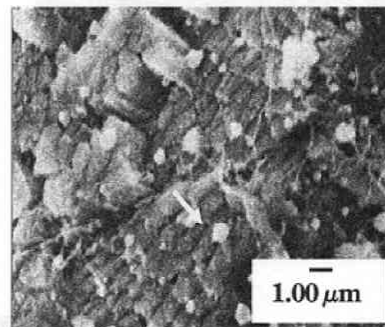
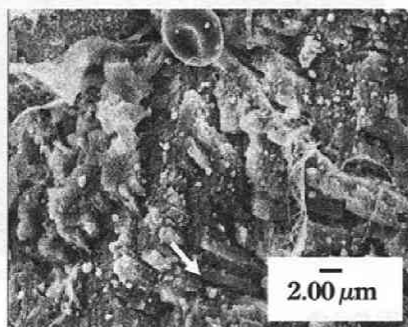
HSP70 の免疫組織化学染色結果では、温熱刺激群において、壊死筋線維とその近傍に HSP70 の陽性反応が多く観察された。



Arrow : サルコメア

図6 筋損傷群のSEM像

筋損傷群では、筋原線維のサルコメアの乱れが観察された。腓腹筋とアキレス腱移行部との間から筋腹中央部に向かい長軸方向（筋線維走行）に挿入した20ゲージ注射針（直径：0.90 mm）により起こった現象であると思われる。



Arrow : 好中球

図7 温熱刺激群のSEM像

温熱刺激群では筋原線維のサルコメアの乱れが観察され、筋損傷群よりも好中球などの免疫細胞が筋損傷群より浸潤している像（直径：0.2 μm — 0.9 μm）が多数観察され、免疫細胞が散在していることが確認された。そして、免疫細胞の形状は半球状のものから平坦なものまで様々な形状が観察された。

[考 察]

筋挫傷モデルには、これまで塩酸ピバカイン局注モデル、マストロップ法やクリッピング法による実験モデルが作成されてきた³⁴⁸⁾。しかし、これらの損傷モデルはで筋損傷範囲が広範囲に及びマストロップ法では直径20 mmの質量650 gの鉄製の錘を高さ25 cmから自由落下させての損傷 ($0.65 \times 9.8 \times 0.25 = 1.59 \text{ joule}$) を与えるといった実験の為、筋損傷範囲が広く、筋損傷から組織変性、そして、炎症反応に続く再生、再構築の過程が、損傷範囲が広いために再生過程のどのプロセスなのかを特定することはやや困難である。そこで、筋損傷範囲を最小限にすることにより、損傷部位から放出される腫瘍壊死因子(TNF- α)やインターロイキン(IL)-1 β 等のサイトカインの産生によって生じる炎症反応の特定が可能となる¹⁾。これらの物質が、血管内皮細胞に作用し、細胞接着因子であるセレクチンの発現を増加させる。そしてセレクチンの発現やケモカイン(chemokine)による誘導により好中球やマクロファージ等の細胞が損傷部位へ動員される¹²⁾。本実験において、損傷範囲を最小限にとどめるために注射針にて損傷を与え、観察した結果、炎症反応過程での好中球やマクロファージを観察することができた。さらに鍼刺激は生体に対する微小な損傷刺激であることは自明のことと思われるが、鍼治療を受容する生体側では組織学的に表皮、真皮、皮下組織、さらに深部には筋組織が存在する。今回の注射針とは異なった径であるが、鍼治療の生体への効果を考えるとき、鍼が組織学的にどの深さまで到達しているか、鍼が貫通した組織にどのような損傷を与えているかを確認することは重要である⁹⁾。さらに外傷治療においては、施術開始直後は冷却法を実施し、急性期の疼痛が軽減した時点で温熱療法に切り替えるといったように、単に時間経過から経験的に判断して行われていることも少なくない¹⁰⁾。柔道整復師や鍼治療における物理療法を始めるとする温熱療法や冷却法の有効性を再検証し、evidenceを示す必要がある点について、本研究の得られた結果は意義が大きい。

著者らは、これまで骨粗鬆症とそれに伴う骨折に関連する最も重要な組織として骨組織に着目し、骨の強度は骨密度に深く関係する。また、骨吸収や骨形成に関する骨代謝の機序や骨に加わるメカニカルストレスが骨細胞の微細形態と深く関わることを報告してきた¹¹⁾。さらに、骨折治癒過程において、運動がコラーゲン架橋形成の促進や形質転換成長因子 TGF- β の発現を上昇させることを報告してきた¹²⁾¹³⁾。これらの基礎的研究の結果は、柔道整復療法学の確立や治療現場で施行されている骨折

修復過程や関節拘縮や骨以外の修復に用いられている低出力超音波パルス療法等に有益な情報をもたらすものと思われる¹⁰⁾。筋損傷後の寒冷刺激が筋損傷直後に修復に与える影響について、異物を貪食する免疫細胞である好中球やマクロファージは、組織の損傷などに対して生じる炎症反応を引き起こすことから、炎症細胞とも呼ばれている¹⁾。炎症細胞の中でも最初に損傷部位に浸潤するのが好中球であり、骨髓の造血幹細胞から分化・成熟し、その数は末梢血白血球の半数以上を占める。好中球は、血中では不活性化状態で存在しているが、損傷を感知すると活性化されて損傷後数時間以内に血液から損傷部位(組織)に移動しはじめ、炎症反応の初期(急性期)に主体となって働く。損傷部位に集積した好中球は、高濃度のタンパク分解酵素を放出し、細胞内の壊死線維の除去や炎症性サイトカインの分泌を促進し、マクロファージの動員を促す要因である²⁾。

一般に筋損傷直後の処置として、安静、冷却、圧迫、挙上が有効であるとされている。そして、損傷後、急性期の安静と冷却療法の根拠として患部周辺の血管収縮により、血液の露出や炎症反応を抑制させる。その結果として発熱や疼痛、そして腫張の軽減が期待される。ところが、ラットを用いた実験結果では、ラット筋損傷直後にIcingを施行すると筋修復に関わる筋衛星細胞の出現が遅く、筋膜周辺に生じた癒痕形成も長期間残存する³⁾。スポーツ現場でしばしば見受けられる外傷性の有無にかかわらず、Icingの施行が行われている。ところで、外傷による筋再生構築のメカニズムとして壊死に陥った筋線維を貪食する為にマクロファージの侵入が不可欠で、マクロファージは、筋芽細胞の増殖や壊死組織を貪食のみでなく、筋芽細胞の分化促進にサイトカイン IL-6 の発現や過剰なコラーゲン産生の抑制等が考えられる¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。筋が再生するために、外傷の程度によってもIcingの範囲も異なる。また、再生時間やマクロファージによる貪食や基底膜内で増殖や分化、そして、筋芽細胞に分化するプロセスがIcingの時間や範囲によっても異なる。さらに、Icing時間や範囲が筋線維となるための神経支配や血管新生及び再生筋の機能回復にとって異なってくる。いずれにしてもIcingによってマクロファージの出現を遅延させ筋芽細胞の増殖の促進を遅らせるものと思われるため、検証が必要である。

それでは、筋損傷に用いられることが少ない温熱療法はどのような影響をもたらすのであろうか。ラット後肢骨格筋の廃用性筋萎縮の過程で42°Cの温水浴を実施すると筋萎縮が抑制され、筋細胞内に熱ショックタンパク質 Heat shock protein (以下、HSP70) が誘導さ

れる¹⁷⁾。HSP70は、温熱等のストレスを受けた細胞で誘導されるストレスタンパク質の一つである¹⁸⁾。このストレスタンパク質は、種々のストレス刺激によって傷害された細胞を修復する¹⁹⁾。さらに多くのHSPは、ストレス緊急時のみでなく平常時でも分子シャペロンとして、細胞内タンパク質の輸送やタンパク質分解細胞の生存に必要な基本的な遺伝子産物である²⁰⁾。今回の結果において、筋損傷・再生過程において、筋損傷部にHSP70の反応が温熱刺激により強く観察されたことから、温熱刺激群でHSP70の誘導が促進されたことが推察された。

また、筋損傷部のSEM観察では、筋損傷群、温熱刺激群で筋原線維のサルコメアの乱れが観察された。これは腓腹筋とアキレス腱移行部との間から筋腹中央部に向かい長軸方向（筋線維走行）に挿入した注射針により起こった現象で、注射針を挿入したことでカルシウムイオンが細胞内へ流入、そして、カルシウム依存性のカルパインなどのタンパク質分解系が活性化し、炎症反応が惹起されたと考えられる²⁾。炎症反応のはじまりは、損傷部位から放出される腫瘍壊死因子(TNF- α)やインターロイキン(IL)-1 β 等のサイトカインの産生によって生じる。これらの物質は、血管内皮細胞に作用し、細胞接着因子であるセレクチンの発現を増加させ、そのセレクチンの発現やケモカインの誘導により好中球やマクロファージ等の細胞が損傷部位へ動員される¹⁾。

今回の損傷24時間後の観察で炎症反応過程に置ける免疫細胞の出現時間として変性、炎症反応期に相当し、好中球、マクロファージの出現期に相当する。好中球やマクロファージの細胞が損傷部へ動員された像が観察され、損傷後初期に炎症反応が主体となって働いたことが伺える。そして、損傷部に集積した好中球は、高濃度のタンパク分解酵素を放出し、細胞内の壊死線維の除去やタンパク分解酵素を放出し、細胞内の壊死線維の除去や炎症性サイトカインの分泌を促進しマクロファージの動員をもたらしたと思われる²⁾。

温浴の末梢循環動態に及ぼす影響は、主に静水圧の作用と見られるが、この静水圧が循環へ作用することが比較的良好に知られている²¹⁾。水圧による頭部方向への体液移動により、venous returnが増加し、左心房にある圧受容体を刺激する結果、視索上核からのヴァソプレッシン(VP)が抑制されて、利尿がもたらされる²²⁾。一方で、相対的なcentral hypervolemiaは血中レニン-アンギオテンシン(RA)系の抑制により、ナトリウム利尿が促進される。これらの結果、心拍出量が増加し、この増加によって末梢血流量も増加する²³⁾。温

浴の末梢血流量に対する影響をラット後肢の腓腹筋で調べると、温浴後では、34℃と40℃のいずれの場合にも、末梢血流量は増加することが認められることから、損傷部の循環が促進されたものと思われる²⁴⁾。さらに、筋再生過程における制御機構の1つであるサイトカインは、マクロファージ、線維芽細胞など種々の細胞などが産生、分泌するポリペプチドで、多くの生物活性を有している。細胞表面のレセプターを介して核内へ信号を伝達し、増殖、遊走、血管新生、タンパク質発現、酵素産生などを促すことにより、細胞内シグナル並びに筋衛星細胞を活性化することが考えられる²⁴⁾。そして、温熱刺激は筋衛星細胞のproliferative potentialを活性化させることで筋芽細胞や分化を促進する³⁾。したがって、骨格筋の再生に寄与すると考えられている筋衛星細胞は温熱刺激により活性化すると考えられることから、損傷した骨格筋組織に対して温熱刺激を与えることで損傷からの回復が促進するものと思われる。しかし、これまで報告されている筋の損傷に関する実験方法³⁾⁽⁸⁾は、今回の筋損傷の方法とは損傷範囲や損傷程度に異なる点があることやIcingと温熱療法との比較も行っておらず、更なる実験が求められる。また、筋損傷モデルの実験は過酷な動物実験であり、通常、スポーツ現場での筋ダメージは筋収縮時に強い衝撃を受けて筋損傷が引き起こされると考えている。本研究は、動物に対して筋収縮を行わせ、筋損傷させることは困難であるため、麻酔下で筋が弛緩した状態で損傷を与えている。そのため、筋収縮時と筋弛緩時での損傷範囲やその後の細胞の修復過程に時間的な差があることが推察される。今後、スポーツ現場により近いモデルの検討が必要であると思われる。

筋損傷後の処置としてRICEを原則とする急性期の冷却法が基本とされ、急性期の炎症反応が沈静化した後に温熱療法により血流を増加させることで組織再生を促す。ところが、損傷した筋組織の再生を促進させるという観点からは貪食細胞の浸潤・活性化により崩壊細胞の除去とそれに続く損傷筋細胞の再生は組織の再構築にとって必要不可欠である。したがって、損傷した筋組織の再生には十分な血液還流が必要であり、筋再生の促進に有効に働くことが考えられる。また、冷却療法は末梢血管収縮をもたらす、RICE処置の安静は筋収縮活動を抑制させる。いずれにしても損傷した筋組織への血液還流量が低下する現象である。このような対処法は損傷部位への腫張を軽減させるが、損傷部の再生のみを考えた場合、再生が遅延する。現在、スポーツ現場で行われている損傷後、あるいは損傷のおそれがある場合の急性期にRICE処置を行っている

が、筋損傷後の再生過程におけるプロセスとして、組織変性、炎症反応、再生・再構築過程での筋再生において細胞の活性や、増殖分化をして融合を促進、または抑制因子によって巧みに制御されている。筋損傷がない場合、免疫細胞は発現しないが、最低限度の損傷を超え、損傷量が強くなると強く発現する量—反応関係が十分把握できる。マクロな観点からのみでなく、細胞動態や分子メカニズムを含めたミクロな観点、すなわち、科学的根拠にもとづいた治療法の確立が望まれる。

参考文献

- 1) 町田修一・畑山元政・黒坂光寿 (2011) 筋再生の分子メカニズム. 体育の科学, 61 (3): 203-209
- 2) Carosio, S., Berardinelli, M. G., Aucello, M. and Musarò, A. (2011) Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev*, 10 (1): 35-42
- 3) Takagi, R., Fujita, N., Arakawa, T., Kawada, S., Ishii, N., and Miki, A. (2011) Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *J Appl Physiol*, 110 (2): 382-388.
- 4) 奥田修人・滝瀬定文・河上俊和・古河準平・佐川光一 (2013) ラット筋挫傷後におけるアイシングが組織修復に及ぼす影響. *スポーツ療法学研究*, 15 (2): 115
- 5) 後藤勝正・小島敦・森岡茂太・杉浦崇夫・大平充宣・吉岡利忠 (2005) 温熱刺激は損傷した骨格筋の回復を促進する. *宇宙航空環境医学*, 42 (4): 16
- 6) Oishi, Y., Hayashida, M., Tsukiashi, S., Taniguchi, K., Kami, K., Roy, R.R. and Ohira, Y. (2009) Heat stress increases myonuclear number and fiber size via satellite cell activation in rat regenerating soleus fibers. *J Appl Physiol* (1985), 107 (5): 1612-21
- 7) 向井裕貴・滝瀬定文・河上俊和 (2012) 骨折治癒過程における免疫組織化学的研究. *スポーツ整復療法学研究*, 13 (3): 161-169.
- 8) Benoit, P., and Belt, W. (1970) Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic bupivacaine. *J Anat*, 107: 547-556
- 9) 米山榮・尾崎朋文・干思・米山義・竹田博文 (1995) 微小組織損傷としての鍼刺激—病理組織学的検討—. *全日本鍼灸学会雑誌*, 45 (3): 192-197
- 10) 外林大輔・川畑浩久・根来信也・葉山直史・吉川徹 (2014) 靱帯損傷、筋損傷に対する治療法の検討. *兵庫学術誌*, 99-105
- 11) 河上俊和・滝瀬定文・細川賢司・松本賢次・井出貴久・岩田勝 (2010) 運動条件の違いが成長期ラットの骨細胞に及ぼす影響. *体力科学* 59 (6): 37
- 12) 斎藤充・丸毛啓史 (2008) 骨芽細胞のコラーゲン架橋への影響. 骨折に対する低出力超音波パルス治療の基礎と臨床, 株式会社メディカルレビュー社: 57-64
- 13) Leung, M. C., Ng, G. Y. and Yip, K. K. (2006) Therapeutic ultrasound enhances medial collateral ligament repair in rats. *Ultrasound Med Biol*, 32 (3): 449-452
- 14) Zhang, C., Li, Y., Wu, Y., Wang, L., Wang, X. and Du, J. (2013) Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration. *J Biol Chem*, 18: 1489-1499
- 15) Summan, M., Warren, G. L., Mercer, R. R., Chapman, R., Huldeman, T., Van Rooijen, N. and Simeonova, P. P. (2006) Macrophage and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290 (6): 1488-1495
- 16) Novak, M. L., Weinheimer-Haus, E. M. and Koh, T. J. (2014) Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury. *J Pathol*, 232(3):344-55.
- 17) 渡部由香・吉川紗智・片岡英樹・片岡紀香・坂本淳哉・中野治郎・沖田実 (2006) 温熱負荷方法の違いがラットヒラメ筋の廃用性筋萎縮の進行抑制に及ぼす影響—温水浴と電熱プレートと比較—. *理学療法学* 33 (7): 355-362
- 18) 内藤久士 (2000) 身体活動とストレス蛋白質. *日本臨床*, 58: 97-101
- 19) 小坂光男・山根基・加藤貴英・小粥隆司・松本実・塚中敦子・大西範和 (2004) ストレス蛋白 (HSP70) が運動による筋損傷・筋疲労の修復に及ぼす影響. *中京大学体育学論叢* 45 (2): 77-90
- 20) 矢原一郎 (1992) 総説 ストレス応答とストレス蛋白質. *生化学*, 10: 1244-1261
- 21) 横山巖・阿岸祐幸・東威・植田理彦・小嶋碩夫・古元嘉昭・延永正編 (1990) 温泉医学. 初版, 交通印鼎株式会社, 東京

- 22) 岡田晃 (1991) 温浴刺激と神経伝達物質. 日温気物医誌 55 (1): 3-9 一 筋の障害と予防. 福永哲夫編, 初版, 株式会社朝倉書店, 東京: 471-482
- 23) Phillips, M. I. (1987) Functions of angiotensin in the central nervous system. Ann Rev Physiol. 49: 413-435 (受付 平成27年9月2日)
- 24) 星川淳人・渡會公治 (2002) 筋の科学辞典—構造・機能・運動

後肢非荷重後の再荷重がラットヒラメ筋毛細血管に与える 筋線維タイプ特異的な影響

金澤佑治^{1,2)}、大井優紀¹⁾、杉生真一¹⁾、重吉康史²⁾、片岡幸雄¹⁾、武田功¹⁾

¹⁾ 宝塚医療大学保健医療学部、²⁾ 近畿大学医学部

Muscle fiber-type-specific effect of reloading after hindlimb unloading in the rat soleus muscle capillary

Yuji KANAZAWA^{1,2)}, Yuki OI¹⁾, Shinichi SUGIYO¹⁾, Yasufumi SHIGEYOSHI²⁾,
Yukio KATAOKA¹⁾ and Isao TAKEDA¹⁾

¹⁾ Faculty of Health Care Sciences, Takarazuka University of Medical and Health Care,

²⁾ Faculty of Medicine, Kinki University

Abstract

In this study, we investigated the effect of reloading after hindlimb unloading in the soleus muscle capillary. Adult male Sprague-Dawley rats were subjected to 2 weeks of hindlimb unloading followed by 1 week of reloading. In the soleus muscle, hindlimb unloading resulted in significant decreases in soleus muscle weight, cross-sectional area, capillary-to-fiber (C/F) ratio, and the number of capillaries in contact (CC) with type I and IIC fibers. Reloading resulted in significant increases in the soleus muscle weight and cross-sectional area than those observed after unloading. This recovery was not accompanied by a significant change in the C/F ratio and the CC with type IIC fibers. However, a significant change was observed in the CC with type I fibers. These results suggest that the angio-adaptive response to unloading and reloading was specific to muscle fiber type.

(J.Sport SCI.Osteo.Thera,17(3),171-176,March, 2016)

Key Words: 骨格筋毛細血管 (Skeletal Muscle Capillary)、後肢非荷重 (Hindlimb Unloading)、再荷重 (Reloading)、筋線維タイプ (Muscle Fiber Type)

目的

骨格筋毛細血管は、筋線維膜に付着しており蛇行しながら筋線維に沿うように走行している。その主な機能は筋線維へ酸素や栄養素を運搬することであり、正常な骨格筋機能を維持するために必須である¹⁾。また、骨格筋毛細血管は筋線維タイプに応じて分布が異なっている^{2,3)}。有酸素的にエネルギーを産生する能力に優れている遅筋線維においては毛細血管密度が高いが、主に嫌気性代謝によってエネルギーを産生している速筋線維においては、毛細血管密度が低くなっている。さらにこの骨格筋毛細血管は筋活動に応じて新生あるいは退行性変化が生じ、可塑性の高い組織とされている。例えばヒトを対象とした先行研究では、エルゴメーターを用いた持久運動を14週間実施した結果、外側広筋の毛細血管-筋線維比が有意に増加した⁴⁾。さらにラットでトレッドミルを用いた持久運動を4週間実施した結果、ヒラメ筋と足底筋の毛細血管-筋線維比がともに増加した⁵⁾。また毛細血管

の退行性変化については、後肢非荷重がラットのヒラメ筋における毛細血管数を減少させ、筋持久力の低下を伴ったとの報告がある^{6,8)}。このように、骨格筋毛細血管は筋活動の増減に伴い明らかな変動を示す。

一方、非荷重後の再荷重の回復過程において毛細血管と筋線維を比較すると、毛細血管の回復が遅いとの報告がある⁹⁾。Däppら⁹⁾は非荷重で減少した毛細血管数は再荷重後、筋横断面積の回復と比較して回復が遅延することを報告しており、毛細血管の退行性変化は筋線維サイズに比較して回復が遅延することを示唆している。しかしながら、この研究における毛細血管-筋線維比は筋横断面上における単一筋線維あたりの毛細血管数であり、筋線維タイプごとの毛細血管数の動態については報告されていない。骨格筋毛細血管は筋線維タイプによって分布が異なり、運動に対する適応反応も異なるため²⁾、非荷重後の再荷重刺激に対しても筋線維タイプ別に個別の反応を示すことが予想される。

そこで今回、後肢非荷重後の再荷重が骨格筋毛細血管に与える影響を筋線維タイプ別に検討した。

方 法

実験動物は、8週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット 15 匹(体重 256—293 g)を用いた。これらを実験動物に無作為に対照群(Control, n=5)、後肢非荷重群(HU, n=5)と、再荷重群(RE, n=5)に分けた。後肢非荷重はモーレー法に準じた尾懸垂法を採用した¹⁰⁾。尾部を懸垂することで後肢を免荷するが、その際に動物は前肢によってケージ内を自由に移動する事が可能であった。再荷重群の動物においては後肢非荷重後に尾懸垂から解放し通常飼育を実施することで、後肢に再荷重を負荷した。尾懸垂の期間は2週間とし、その後の再荷重による回復期間は1週間とした。すべての実験動物は 22±2℃、12 時間の明暗周期の環境下で個別ケージにて飼育され、食餌と飲水は自由とした。

実験開始から2あるいは3週間後、ペントバルビタールナトリウム(50mg/kg)の腹腔内投与で実験動物に麻酔をかけ体重を測定した後、筋サンプルとして抗重力筋であるヒラメ筋を摘出した。ヒラメ筋は筋質量を測定した後、ドライアイスによって冷却したイソペンタンで急速凍結し、解析までの間、-80℃のディープフリーザーで保存した。なお全ての実験および実験動物への処置は宝塚医療大学動物実験指針に従って実施した。

-25℃のクリオスタット内で、ヒラメ筋の筋腹レベルにおいて厚さ 10μm の連続横断切片を作成し、筋線維タイプの区別と筋横断面積の計測のためにアデノシン 3 リン酸分解酵素 (adenosine triphosphate; ATPase) 染色と毛細血管を同定するためにアルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase; AP) 染色を実施した。AP 染色は Hansen-Smith らの方法を用い¹¹⁾、切片を 10 mM ホウ酸緩衝液に 0.02% 5bromo-4-chloro-3 -indoxyl phosphate p-toluidine salt と 0.1% nitro blue tetrazolium を混合した反応液で 60 分間、室温にて反応させた。ATPase 染色は酸性 (pH4.3、pH4.4) あるいはアルカリ性 (pH10.5、pH10.6) で前処理を実施した後、0.2% ATP 溶液で室温にて反応させた。その後 1% 塩化カルシウム溶液で洗浄し、2% 塩化コバルト水溶液で反応させ、0.005 M パルビタールナトリウム溶液、蒸留水の順で洗浄し、2% 硫化アンモニウム溶液にて染色した。

筋線維タイプの分類については、Brookeら¹²⁾の方法を用いた。まずアルカリ処理の ATPase 染色によって染色されないタイプ I 線維と染色されるタイプ II 線維に区別し、酸処理の ATPase 染色の結果から染色活性を失うタイプ IIA と染色活性を保つタイプ IIC に区別した。これらの標本は光学顕微鏡 (CX41, Olympus) で観察し、毛細血管-筋線維比、各筋線維タイプにおける単一筋線維

周囲の毛細血管数、筋横断面積を計測した。得られた値は平均値±標準誤差で表し、各群間の有意差は、Turkey 法を用い、危険率 5%未満 ($p < 0.05$) をもって有意差ありと判定した。

結 果

2 週間の非荷重によって、体重、ヒラメ筋の筋質量、相対筋質量 (筋質量/体重) ならびに全筋線維タイプの筋横断面積は、通常飼育のラットと比較して有意に減少した。その後、再荷重を1週間実施すると、ヒラメ筋の筋質量、相対筋質量と全筋線維タイプの筋横断面積は、非荷重時に比べて有意に増加した (表 1、図 1)。このことから2週間の非荷重はヒラメ筋に筋萎縮を惹起させ、その後の 1 週間の再荷重は筋萎縮を有意に回復させることが確認された。

次に単一筋線維あたりの毛細血管数を示す指標である毛細血管-筋線維比を計測した。その結果、非荷重とすることによって毛細血管-筋線維比は低下した。その後、再荷重を行ったが非荷重時と比較して1週間目までには有意な増加を認めなかった。さらに筋線維タイプ別に毛細血管数を計測した。タイプ I 線維とタイプ IIC 線維周囲の毛細血管数は、非荷重により減少した。その後、1週間の再荷重によって、タイプ I 線維周囲の毛細血管数は非荷重時と比較して有意に増加した。一方、タイプ IIC 線維周囲の毛細血管数は有意な増加を示さなかった。またタイプ IIA 線維周囲の毛細血管数は非荷重と再荷重のいずれにおいても有意な変動を認めなかった (図 2)。すなわち、(1) 非荷重はタイプ I および IIC 筋線維においてのみ骨格筋毛細血管の退行性変化を招くこと、(2) 再荷重 1 週間では、タイプ I 線維のみに毛細血管の増加が認められることが明らかになった。

考 察

本研究では、廃用性筋萎縮を惹起する後肢非荷重とその後の再荷重に対する骨格筋毛細血管の適応反応が、単一骨格筋において、筋線維タイプに異なることが明確となった。

骨格筋毛細血管は筋線維に対して収縮エネルギーの産生に必要な酸素を供給している。非荷重や関節固定などで筋活動が減少する条件下では筋線維におけるエネルギー需要が減少するため、筋線維の代謝活性は低下した状態になる。骨格筋毛細血管も隣接する筋線維の代謝活性の低下に伴い、退行性変化が生じる¹³⁾。その反対に筋活動の増加により収縮エネルギーの需要が高まると、酸素供給に必要な骨格筋毛細血管は増殖する¹³⁾。本研究では後肢非荷重後の萎縮したヒラメ筋において、毛細血管-筋線維比が低下しており、骨格筋毛細血管に退行性変化が生じたことが確認された。

表1 体重と筋質量

	Body mass (g)	Soleus muscle mass (mg)	Relative soleus muscle mass (mg/g)
Control	374.2 ± 8.4	159.0 ± 7.9	0.427 ± 0.028
HU	334.0 ± 11.2 *	76.2 ± 1.3 **	0.229 ± 0.005 **
RE	356.4 ± 4.0	117.9 ± 5.1 ††	0.331 ± 0.017 ††

値は平均値±標準誤差. n = 5 rats in each group * $P < 0.05$ vs Control, ** $P < 0.01$ vs Control, †† $P < 0.01$ vs HU

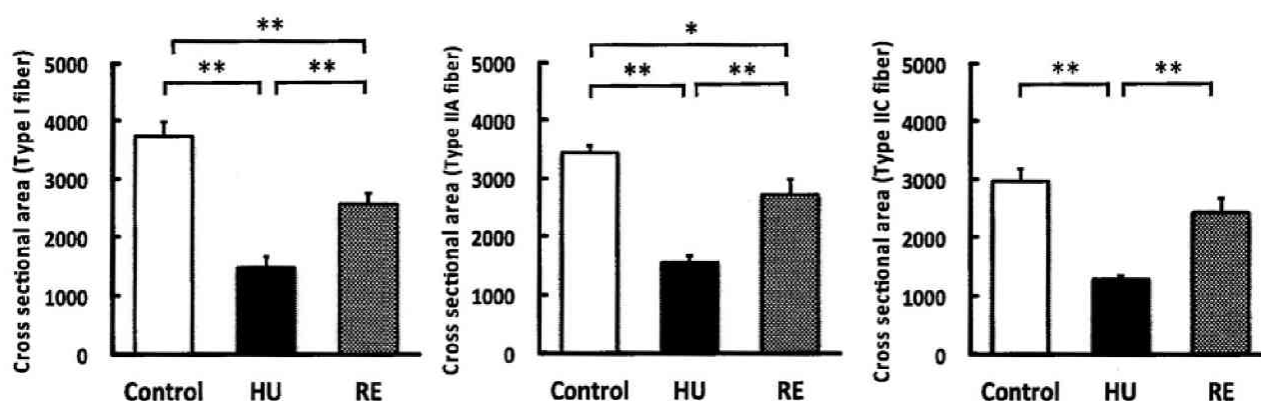


図1 各筋線維タイプにおける筋横断面積

タイプI線維(A), タイプIIA線維(B), タイプIIC線維(C)の筋横断面積. 値は平均値±標準誤差. n = 5 rats in each group * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

この現象は先行研究の結果⁶⁸⁾と一致しており、筋活動の低下により筋線維の酸素需要が減少し、それに伴って毛細血管数も減少したものと考えられる。

一方、再荷重後には筋線維サイズと毛細血管数の回復に乖離が観察された。すなわち1週間の再荷重により筋線維サイズは回復を示したが、筋線維あたりの毛細血管数は非荷重時から回復しなかった。しかし、これは筋線維タイプを考慮しないで計測を行ったものであり、筋線維タイプによって反応が異なる可能性がある²⁾。そこで、さらに筋線維タイプごとに毛細血管数を検討した。その結果、1週間の非荷重はタイプIおよびIIC線維においてのみ骨格筋毛細血管の退行性変化を招くことがわかった。すなわち筋線維タイプによって、非荷重、再荷重による毛細血管数の減少、回復の過程が異なることが明らかになった。Brookeら¹²⁾はラットヒラメ筋を、ATPase染色を用いてタイプI線維、タイプIIA線維、タイプIIC線維に分類している。タイプI線維は遅筋線維でタイプIIA線維は遅筋と速筋の両方の特性を有しており、これらがヒラメ筋を構成している主な筋線維である。タイプIIC線維は、幼若期や脱神経ある

いは筋損傷からの回復過程にその出現頻度が高まることから未分化筋線維あるいは脱分化や再生中の筋線維であるとされている^{14, 15)}。Roudierら¹⁷⁾は非荷重5日目の時点で、ヒラメ筋(遅筋)には毛細血管の退行性変化が生じたが、足底筋(速筋)では非荷重9日間の時点でも毛細血管数が維持されたことを示している。これは速筋と遅筋が、非荷重時の毛細血管数において異なる反応を示すことを示唆する。このような遅筋と速筋における非荷重への反応の差異がどのような機序で生じるかについてRoudierら¹⁶⁾とOlfertら¹¹⁾は、遅筋と速筋で血管新生シグナルと抗血管新生シグナルのバランスの相違があるという仮説を提唱している。すなわち、毛細血管数は血管新生シグナルと抗血管新生シグナルの釣り合いで調整されており、遅筋では非荷重下で抗血管新生シグナルが優位となり退行性変化が生じる。しかし速筋では非荷重に伴い血管新生シグナルが優位となり、毛細血管数が維持される^{1, 16)}。今回の我々の実験結果においてもこの仮説をあてはめることが可能である。すなわちヒラメ筋のタイプI線維とIIC線維では非荷重により抗血管新生シグナルが優位となり毛細血管数が減少し、一方タイプIIA線維では血管

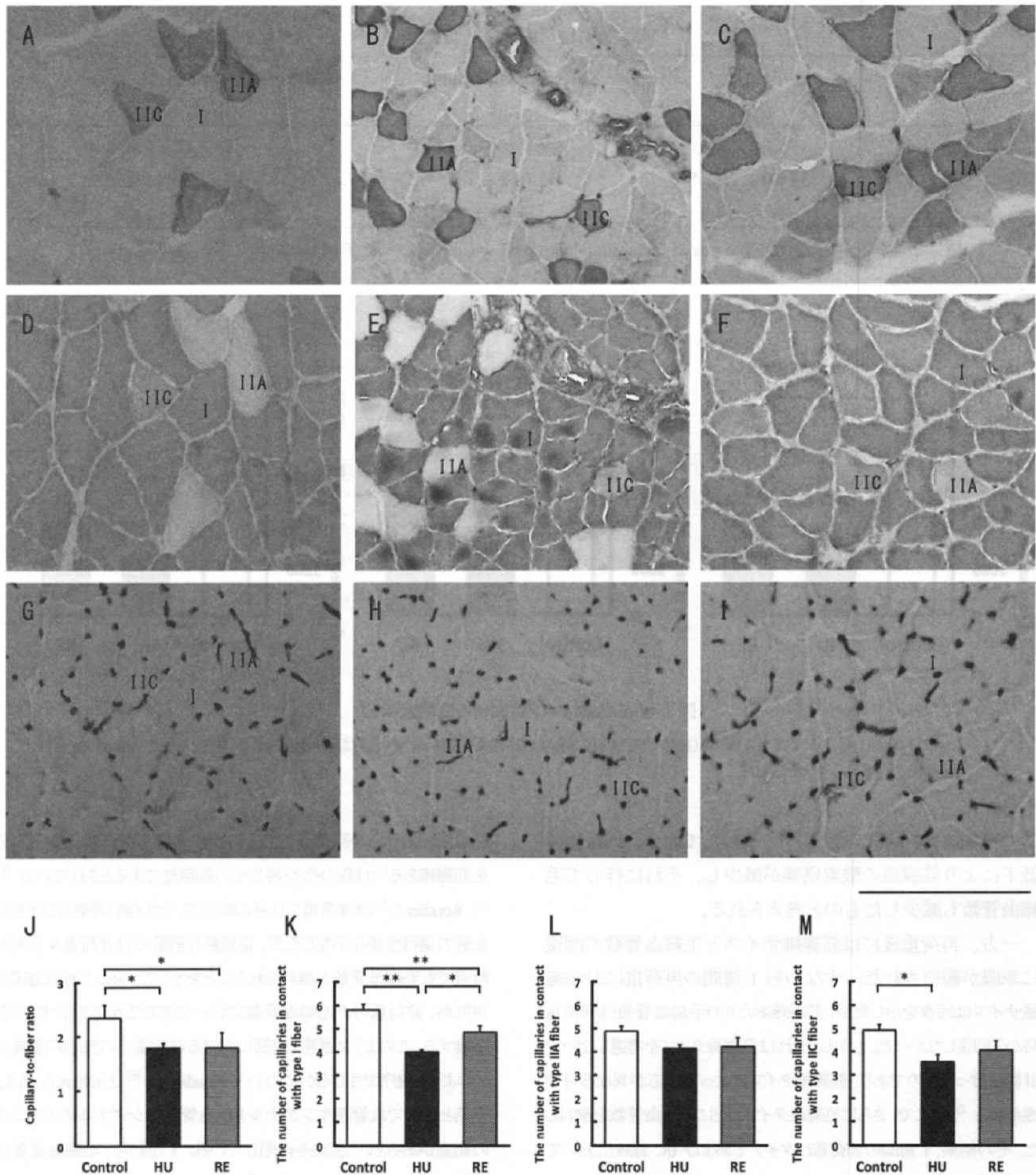


図2 毛細血管-筋線維比と各筋線維タイプにおける単一筋線維周囲の毛細血管数

Control (A, D and G), HU (B, E and H), RE (C, F and I) におけるアルカリ処理(pH10.6)後の ATPase 染色 (A-C), 酸処理 (pH4.4) 後の ATPase 染色 (D-F) と AP (G-I) 染色の画像。スケールバーは 200 μ m。毛細血管-筋線維比 (J), タイプ I 線維 (K), タイプ IIA 線維 (L), タイプ IIC 線維 (M) 周囲の毛細血管数。値は平均値 $\pm$ 標準誤差。n = 5 rats in each group * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

新生シグナルが優位であり毛細血管数が維持されたのかもしれない。

次に再荷重期における筋線維タイプ別の毛細血管数の解析結果から、再荷重1週間の時点ではタイプI線維のみに毛細血管数の増加が認められた。すなわち非荷重時と同様に筋線維タイプによって異なる反応が認められた。このように再荷重に対して筋線維タイプごとに毛細血管数の反応性が異なることには再荷重時に動員される筋線維タイプが異なることも関与しているかもしれない。骨格筋は加えられた負荷の大きさによって動員される筋線維タイプが異なる。遅筋線維においては低強度の負荷でも収縮するが、速筋線維においてはその収縮にはより高強度の負荷が必要となる^{17,18)}。加えて毛細血管数の増加は隣接している筋線維が収縮エネルギーを産生するための酸素供給を上昇させることが引き金になると考えられている^{19,20)}。よって我々の検討においても、再荷重負荷の際に遅筋であるタイプI線維に主に負荷がかかり筋周囲の毛細血管が増加し、しかしタイプIIA線維ならびにタイプIIC線維においては血管新生を引き起こすまでの負荷がかからず、隣接した毛細血管の増加がいたらなかった可能性がある。

本研究では非荷重後の再荷重による骨格筋毛細血管の回復が筋線維タイプに応じて異なることを示した。このことから骨格筋毛細血管の退行性変化を回復させるためには筋線維タイプを考慮した治療戦略を立てる必要があると考えられる。また骨格筋毛細血管は筋への酸素供給を担い筋持久力に強く関係する。本研究で得られた知見は筋持久力をより高めるリハビリテーションの開発に寄与するものと考えられる。

結論

本研究では、後肢非荷重後の再荷重に対する骨格筋毛細血管の適応反応が、単一骨格筋において筋線維タイプに特異的であり、タイプI線維周囲の毛細血管数は比較的速やかに増加するが、タイプIIAやIIC線維周囲の毛細血管数は、そのような傾向を示さないことが明らかとなった。

謝辞 本研究は、日本スポーツ整復療学会の研究助成ならびにJSPS 科研費 15K21540 の助成を受けたものである。

引用文献

- 1) Olfert, I. M. and Birot, O. (2011) Importance of anti-angiogenic factors in the regulation of skeletal muscle angiogenesis, *Microcirculation*. 18:316-330.
- 2) Waters, R. E., Rotevatn, S., Li, P., Annex, B. H. and Yan Z (2004) Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle, *Am J Physiol Cell Physiol*. 287:1342-1348
- 3) Porter, M. M., Stuart, S., Boij, M. and Lexell, J. (2002) Capillary supply of the tibialis anterior muscle in young, healthy, and moderately active men and women, *J Appl Physiol*. 92:1451-1457
- 4) Charifi, N., Kadi, F., Feasson, L., Costes, F., Geyssant, A. and Denis, C. (2003) Enhancement of microvessel tortuosity in the vastus lateralis muscle of old men in response to endurance training, *J Physiol*. 554:559-569
- 5) Poole, D. C. and Mathieu-Costello, O. (1996) Relationship between fiber capillarization and mitochondrial volume density in control and trained rat soleus and plantaris muscles, *Microcirculation*. 3:175-186
- 6) Fujino, H., Kohzuki, H., Takeda, I., Kiyooka, T., Miyasaka, T., Mohri, S., Shimizu, J. and Kajiya, F. (2005) Regression of capillary network in atrophied soleus muscle induced by hindlimb unweighting, *J Appl Physiol*. 98:1407-1413
- 7) Desplanches, D., Mayet, M. H., Sempore, B. and Flandrois, R. (1987) Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle, *J Appl Physiol*. 63:558-563
- 8) McDonald, K. S., Delp, M. D. and Fitts, R. H. (1992) Fatigability and blood flow in the rat gastrocnemius-plantaris-soleus after hindlimb suspension, *J Appl Physiol*. 73:1135-1140
- 9) Däpp, C., Schmutz, S., Hoppeler, H. and Flück, M. (2004) Transcriptional reprogramming and ultrastructure during atrophy and recovery of mouse soleus muscle, *Physiol Genomics*. 20:97-107
- 10) Morey, E. R., Sabelman, E. E., Turner, R. T. and Baylink, D. J. (1979) A new rat model simulating some aspects of space flight, *Physiologist*. 22:23-24
- 11) Hansen-Smith, F. M., Blackwell, L. H. and Joswiak, G. R. (1992) Expression of muscle capillary alkaline phosphatase is affected by hypoxia, *J Appl Physiol*. 73:776-780
- 12) Brooke, M. H. and Kaiser, K. K. (1970) Muscle Fiber Types: How Many and What Kind? *Arch Neurol*. 23:369-379
- 13) Bogdanis, G. C. (2012) Effects of physical activity and inactivity on muscle fatigue, *Front Physiol*. 3: 1-15
- 14) Wernig, A. A., Salvini, T. F. and Irintchev, A. (1991) Axonal sprouting and changes in fibre types after running-induced muscle damage, *J Neurocytol*. 20: 903-913
- 15) Morini, C. C., Pereira, E. C. L., Selistre de araujo, H. S., Ownby, C. L. and Salvini, T. F. (1998) Injury and recovery of fast and slow skeletal muscle fibers affected by ACL myotoxin isolated from

- Agkistrodon contortrix laticinctus (Broad-Banded Copperhead) venom, *Toxicon*. 36: 1007-1024
- 16) Roudier, E., Gineste, C., Wazna, A., Dehghan, K., Desplanches, D. and Birot, O. (2010) Angio-adaptation in unloaded skeletal muscle: new insights into an early and muscle type-specific dynamic process, *J Physiol*. 588: 4579-4591
- 17) Henneman, E., Somjen, G., Carpenter, D. O. (1965) Functional significance of cell size in spinal motoneurons, *J Neurophysiol*. 28:560-580
- 18) Egan, B. and Zierath, J. R. (2013) Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation, *Cell Metabolism*. 17:162-184
- 19) Wenger, R. H. (2000) Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation, *J Exp Biol*. 203:1253-1263
- 20) Semenza, G. L. (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia, *J Appl Physiol*. 88:1474-1480

(受付 平成27年11月15日)

第17回日本スポーツ整復療学会大会印象記

岩本芳照(岩本接骨院)

今年は、関西支部(田邊美彦実行委員長)の主管によって兵庫県の宝塚医療大学において開催され、全国各地から多くの会員及び学生の参加があった。

日時:平成27年10月24日(土)・25日(日)

会場:兵庫県宝塚市 宝塚医療大学

日程:(前日23日)○役員会・理事会開催

(大会1日目)

○会員発表

○部門別専門分科会シンポジウム

○評議員会・昼食

○大会特別シンポジウム

○学生ポスター発表

○ワークショップ

○懇親会・情報交換会



(大会2日目)

○会員発表

○大会特別講演1

○総会・昼食

○大会特別講演2・市民公開講座



(大会1日目)

○一般発表:会員による研究発表が演題1~9まで行われ、発表内容については、フロアーを交え活発な質疑応答があった。



○部門別専門分科会シンポジウム

「2020 東京オリンピック・パラリンピックに向けて～柔道整復師の役割～」と題し、アスレチックトレーナー実践学会がシンポジウムを行った。

座長:原 和正(部会長)

演者:吉塚 亮一(城南スポーツ整骨院)、

永田 勝章(ながた接骨院)

内容:吉塚亮一氏からは整骨院の現状とイメージの説明と、FSC(ふくおかスポーツコネクション)の紹介などがあり、今後、柔道整復師が個人として、またJSSPOTが組織として、オリンピック参画に向けてどう関わって行くべきかなどの問題提起があった。

永田勝章氏からは、今年の第1回姫路マラソン救護トレーナー活動について具体的な実施報告があった。オリンピック参加に向けては、メディカルでの参加は困難と思われるので、トレーナーとして如何にボランティア参加するかを考えることが急務であると述べた。

原和正座長は、現在の柔道整復師及び業界組織の実情を述べ、柔整界の問題点を厳しく批判した。かつて原氏が中心となり、JATAC 長野が苦労と努力の末に冬季オリンピック選手村においてオフィシャルサポートを行ったが、その経験を紹介し、今後のオリンピック参入の指針を示した。

○大会特別シンポジウム

「筋・腱における修復と骨折治癒の分子メカニズム」

座長:滝瀬 定文(大阪体育大学)

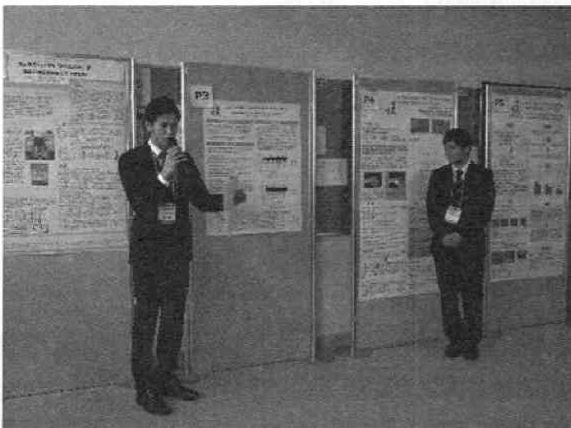
演者:牛島 詳力(関西医療大学)、

伊藤 俊治(関西医療大学)

内容:牛島詳力氏から「筋・腱における修復のメカニズム」について、急性期・修復期・再形成期に分けた詳細な説明があり、その治癒課程においてなすべき適切な処置などの講演があった。

伊藤俊治氏からは「骨折治癒の分子メカニズム」について、炎症細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞などが関与する複雑な治癒過程の解説があった。我々専門外の会員には少し難しい内容であったが、骨折を扱う臨床家として是非理解を深めたい講演であった。

滝瀬座長が常々言われるように、なぜ治るのか、いつ冷やすのか温めるのかなどを医科学的に考え、漫然と行うのではなく、たえずエビデンスを探索しながら臨床に繋げることが重要である。そのための学会として、これらの研究を続けることが必要だと言えよう。



○学生ポスター発表

今回は、学生によるポスター発表が10題もあり、宝塚医療大学と明治国際医療大学の学生が活発に研究成果を発表した。本学会に若い会員が増え、研究のエネルギーが蓄積されたとき、スポーツ選手や愛好家だけでなく、高齢者も含めた国民全体に広く役立つ研究が生まれるのではないかと希望を感じた。

○ワークショップ

「肩・肘の脱臼・骨折の整復法」

演者:橋本 等(橋本整骨院)

内容:大学の柔道場に移動し、まず、肩・肘の脱臼整復法について橋本氏の行っている方法についてスライド説明を交えながらの実演があった。古来の方法に工夫を加えたその方法を参加者全員が実習し、整復経験のない学生には大変良いシミュレーションになった。



また、鎖骨骨折の整復固定法は、さらしを半分に裂いて2裂にしたものを使っており、その独特の巻き方は再転

位し難いように思われた。今までにない優れた固定法のようにあり、違う方法を行っている会員にとっても大いに参考になった。



○懇親会・情報交換会

1日目のセッション終了後に大学の学生食堂で懇親会が開催された。適度にアルコールが回った後、田邊実行委員長の進行で情報交換も行われ、和やかな雰囲気での懇親会が行われた。



(大会2日目)

○一般発表: 会員による研究発表が2会場で行なわれ、演題10~18までは大講義室、演題19~26までは中講義室を使って行われた。

近年、減少傾向にある演題数だが、今回は増加して36演題であった。しかし、理事会・評議員会・総会を通じて、演題数をさらに増やすことが必要との意見が多かった。



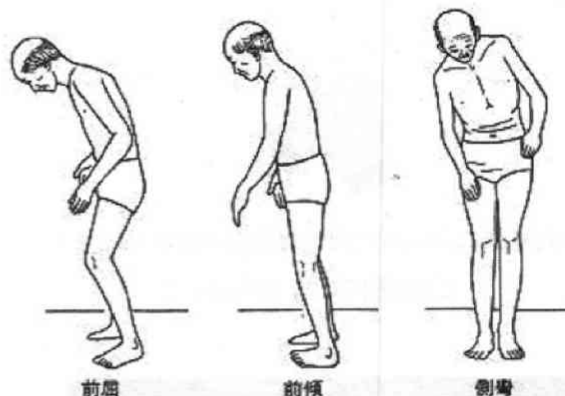
○大会特別講演1

「成人中枢神経系障害患者の評価と治療アプローチ～歩行を中心に～」

演者: 弓岡 光徳(宝塚医療大学副学長)

内容: 人の歩行には、立脚期と遊脚期があるが、それはさらに細かく初期接地・荷重応答期・立脚中期・立脚終期・前遊脚期と、遊脚初期・遊脚中期・遊脚終期に分けられる。それらを分析し、それぞれについて理学療法士の立場から詳細な説明があった。腰椎骨盤リズムやロコモーター(下肢)の動きが、パッセンジャー(上肢)をコントロールしバランスを取りながら連携して歩行しているが、その異常歩行を分析して原因となる関節や筋肉を見つけなければならない。それらを理解するためには、床反力・ベクトル・力のモーメントなどに着目し、代表的な異常歩行を見つけなければならない。として、それらの異常について臨床歩行分析に基づいた治療アプローチが紹介された。大腿四頭筋などの筋力低下が原因の場合や、足関節の可動範囲に制限がある場合など、原因によって治療方法は変わるが、それぞれの手法がスライドや動画を使って分かりやすく紹介された。柔道整復師も患者の歩容をみて疾患を予想するが、ここまでの細かな分析

と手法は持っていないので、大変勉強になる内容だった。

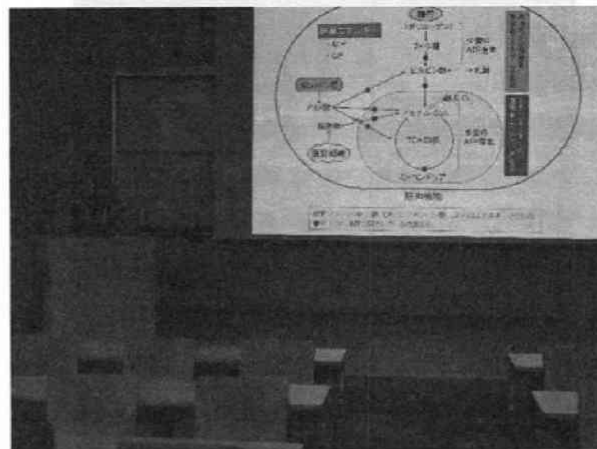


○大会特別講演2・市民公開講座

「みんなのマラソン医学」

演者: 賀来 正俊(賀来医院院長、神戸大学医学部総合内科臨床教授、オリンピック・アカデミー(JOA)正会員)

内容: 100m走 11秒2の公認記録を持つ「日本最速の内科医」の講師による市民公開講座だったが、最終のセッションであるため、遠方の会員が帰っていたことは少し残念に思われた。まず、神戸マラソンのスタートからゴール後までを



スライドで解説しながら、救急搬送や心肺停止についての報告があった。そして、過酷なマラソン競争の落とし穴について、例を挙げながら具体的に説明がなされた。マラソン完走後は生体データを見ると「別人 28 号」になっており、短距離走とは比較にならないダメージがある。マラソン中の腹痛やアナフィラキシーショック、急性心筋梗塞や熱中症などを予測して準備し対策を練っておかなくてはならない。そのため給水捕食の注意点や、事前の食生活などについて、質

疑応答を含めて大変分かりやすく内容豊富な特別講演となった。



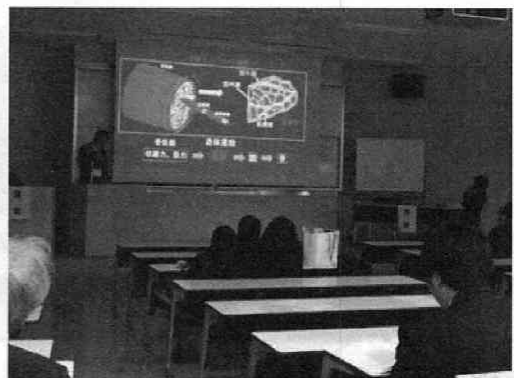
大会運営にご尽力いただいた皆様に感謝いたします。
ご苦労様でした。(参加者より)



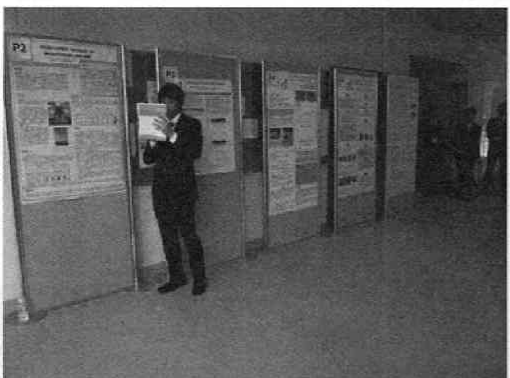
受付の皆様ご苦労様です。



熱心に聞き入る参加者・・・！



演題発表中・・・。



学生発表中！ かなり緊張！！



学生のポスター発表を見守る先生方？



メディカルサポートOMG様



わかさ生活様

展示ありがとうございました。今後とも、よろしくお願いします。

第18回日本スポーツ整復療法学大会のご案内（第一報）

1、会期：平成28年10月29日（土）～30日（日）

2、会場：北海道立道民活動センター（かでの2.7）（〒060-0002 北海道札幌市中央区北2条西7丁目 道民活動センタービル）

3、交通：千歳空港より、JRエアポート「新千歳空港駅」乗車－「札幌駅」下車（所要時間37分）

バス 新千歳空港線[札幌都心]（ロイトン札幌行き、京王プラザ札幌行きなど、札幌駅前下車
所要時間1時間10分）

※札幌駅前まで行かない路線がありますので、乗車時ご確認ください。

4、アクセス



- ・ JR札幌駅南口：徒歩13分
 - ・ 地下鉄
さっぽろ駅（10番出口）：徒歩9分
大通駅（2番出口）：徒歩11分
西11丁目駅（4番出口）：徒歩11分
 - ・ JRバス北1条西7丁目（停留所）：徒歩4分
 - ・ 中央バス北1条西7丁目（停留所）：徒歩4分
- 公共地下歩道（地下歩行空間から北1条地下駐車場連絡口をお通りください）1番出口：徒歩4分

5、日程

- | | |
|--------------|--|
| 1) 10月28日（金） | 大会前日
役員会
理事会 |
| 2) 10月29日（土） | 大会1日目
研究発表・活動報告
特別講演・シンポジウム
評議員会
夜－懇親会 |
| 3) 10月30日（日） | 大会2日目
研究発表・活動報告
特別講演・シンポジウムなど
総会 |

※1 日程表につきましては変更する場合がございます。詳細が決まり次第お知らせいたします。

※2 札幌市内のホテルは予約しづらいので、お早めの宿泊先確保をお願いいたします。

日本スポーツ整復療法学会第18回大会
実行委員会

日本スポーツ整復療法学会 平成27年度第1回理事会議事録

日 時：平成27年6月28日 13:00～

場 所：アワーズイン阪急ツイン館4階会議室8(東京都品川区大井1-50-5)

出席者：増原光彦、岩本圭史、原 和正、片岡幸雄、加藤 剛、草場義昭、工藤四海、佐野裕司、渋谷権司、行田直人
理事10名 今野廣隆(監事)1名
(委任状出席 岩本圭史・岡本武昌・佐竹弘靖・吉田正樹 4名 杉山英雄(監事)1名)

・開会の辞

増原副会長の挨拶に始まる。理事会開催に当たり、片岡理事長より定款第22条により、出席者(委任出席あり)3分の2以上の為、理事会が成立する旨の知らせがあった。

・議事録署名人の指名

議事録署名人として渋谷権司理事が選出された。

議事開催に先立ち、理事会議事録掲載についての意見がなされ、毎年、本会誌3号に議事録内容が記載されていたが、近年記載無く、本来記載すべきである意見があった。本会誌3号に掲載するように総務委員に要請することとした。また、これまでの議事録について役員で確認することとし、理事会で了承を得た。

審議事項

1)平成26年度事業報告および決算報告について

支部研修会報告について

北信越支部は26年度に2回研修会を開催しており、報告の研修回数が一つ増え117回となるはずであり、事務局と確認すると報告があった。その他、訂正箇所:平成26年度事業報告の3...誤:第110回～第113回、正:第114回～117回

決算報告について

国際交流・研究基金積立金の項目に、「顧問・相談役用」第16回大会参加費補助、とあるが、この項目は支出の部の管理費(旅費交通費)へ入れるべきである意見があった。国際交流・研究基金積立金にある「統計雑誌」は支出の部の雑収入に、「顧問・相談役用」は旅費交通費へ、「事務作業」は管理費の項へ移すべきかの意見があった。参加理事表決にて11名中8名の理事が理事長の発言内容に賛同し了承した。従って、平成28年度予算より、上記内容の変更(予算の管理費の増額)を行うこととした。

2)平成28年度事業計画案・予算案について

第18回学会大会の開催

北海道(北海道支部主管:開催地未定)にて開催することとした。開催地は第17回学会大会時に公表することとした。
その他、事業計画案を承認した。

平成28年度予算案

本議事録1)決算報告にある通り、支出の部を変更することとし、承認された。

大会開催について

学会大会委員会が東日本、西日本とあり、何時からこうなったのか(以前は関東、その他の地域、関東、その他の地域の順となっていた)質問があった。増原会長より理事の役割分担説明と第15回より東西に分けて交互に、また場合により続けて同じ担当の開催でもよい旨の説明があり、大会開催地の順番が確認された。

3)平成27年度研究助成・第11回共同研究プロジェクトについて

平成27年度海外研修助成・第11回共同研究プロジェクトいずれも希望者なしとの報告があった(理事長)。

4)理事・評議員選挙について

総務委員会から、理事・監事・評議員候補者の選考規則案、前回の公示内容について資料が提出され、学会定款12条3「選出細則は別に定める」とあることから、本案について採用に向けた意見を求めた。

役員:細則を作成するには時間がかかり、今回の選挙には間に合わず、従来通りの方法(理事は立候補、定数を超えれば選挙、評議員は選挙)で行いたい旨の意見があった。また、理事の立候補の資格は在籍3年とするか5年にするかで審議された。賛成多数により5年とすることとした。総務委員会からの細則案は今後検討していくこととした。

報告事項

1. 第17回学会大会説明について

学会大会委員会(西日本担当)、大会実行委員会の林評議委員より学会大会の進捗状況説明(大会日程表(案))があった。

以上

議 長	理事長	片岡 幸雄
議事録署名人	理 事	渋谷 権司
議事録署名人	理 事	行田 直人



日本スポーツ整復療法学会 平成27年度第2回理事会議事録

日 時：平成27年10月23日(金)17:00～18:00

場 所：宝塚医療大学大会議室

出席者：増原光彦、原 和正、片岡幸雄、岩本芳照、佐野裕司、村松成司、渋谷権司、草場義昭、加藤 剛、荒井俊雅、
工藤四海、行田直人、理事12名 今野廣隆(監事)1名
(委任状出席 岩本圭史・岡本武昌・佐竹弘靖・吉田正樹 4名 杉山英雄(監事)1名)

・開会の辞

増原副会長の挨拶に始まる。定款通り理事長を議長とし、議事進行となった。理事16名の内、欠席者3名から委任状を受
理した。1名は理事以外の委任のため無効とした。定款第22条2)の通り理事会は成立した。

・議事録署名人の指名 議事録署名人として 行田直人 理事、渋谷権司 理事が選出された。

議事に入る前、前理事会の議事録の閲覧が出来ていない旨の質問が出た。また休んだ理事や会員のためにも、雑誌や
ホームページに載せてもよいのではとの意見もあった。会長より、今後はシステムとして公表していくことを確認した。

・評議員会・総会の進行について

評議員会・総会の進行と対策として以下の会員が推薦された。

司 会	荒井俊雅(総務委員会)	開会の辞	原 和正副会長	閉会の辞	片岡幸雄理事長
議長団	林知也(関西支部)	草野久一(東北支部)			
議事録署名人	岩田勝(関西支部)	今井裕之(関東支部)			

・審議事項(評議員会及び総会提案事項)

1)平成26年度事業報告および決算報告について(1、2号議案)

総務委員会及び財務委員会より報告。今野廣隆監事より監査報告がなされ、1号議案、2号議案共に承認された。

2)平成28年度事業計画案および予算案について(3、4号議案)

総務委員会及び財務委員会より報告。第18回学会大会は北海道支部主催で札幌を会場として開催されることとな
った。日程は平成28年9月23日(金)役員会、24、25(土、日)学会大会を予定しているとの報告があった。しかし、本
学会は会員の諸事情(他学会等)を鑑み、例年10月最後の土日を開催日としているとの指摘があった。出席出来ない
理事等も多く予想されることから、日程に関しては再検討することとなった。

また、会員名簿の会誌掲載についての質問があった。「以前は大会誌に載せていたが、ここのところ載っていない。
今回の選挙で名前だけでも載せて頂くと評議員の割り振りも含め全体像が分かるし、助かる。」個人情報に関する問
題、選挙における掲載の有効性について質疑がなされたが、今回は本誌への名前の掲載については今後会員に問う
こととし、3、4号議案共に承認された。

3)その他、次期役員など(5号議案)

次期理事、評議員候補について報告がなされ、報告の通り承認された。

以上

議 長	理事長	片岡 幸雄
議事録署名人	理 事	行田 直人
議事録署名人	理 事	渋谷 権司



日本スポーツ整復療学会 新理事会(次期理事)議事録

日時：平成27年10月23日(金)18:10～

場所：宝塚医療大学 大会議室

出席者：増原光彦、片岡幸雄、岩本芳照、原和正、加藤剛、草場義昭、工藤四海、渋谷権司、菊池俊紀、嶋木敏輝、千足耕一、白石聖、住田卓也、行田直人、村松成司(事務局長) 15名 委任出席：草野久一、西島稔了2名(計17名)
(新理事による理事会のため、以下の文章中の理事の表記はすべて新理事を示す。会長、副会長、理事長については現役職を示し、新役員には新をつけて表記するようにした)

・開会の辞

新理事会開催に当たり、定款第22条により、出席者(委任出席あり)3分の2以上の為、理事会が成立することが確認された。議事進行は、片岡幸雄理事長が行った。

・新理事の紹介および会長挨拶

新理事(平成28年4月～)の自己紹介の後、増原光彦会長より挨拶があった。

・議事録署名人の指名

議事録署名人として 原 和正 理事、渋谷 権司 理事が選出された。

審議事項

新役員(平成28年4月～平成31年3月)選出

理事長より、定款第11条、12条の説明がなされ、総会で新役員の承認が必要であることが確認された。そして、新会長、新副会長、新理事長の選出を行うこととした。

まず、これまでの選出経緯について以下のように説明があった。

「新会長はスポーツ系と柔道整復系で交互に選出していた。新会長を選出後は、新会長より他の新役員(理事長、副会長)を推薦していた。前回より投票にて選出した。」

審議に先立ち、今回欠席理事の委任状についての説明を求められた。欠席者2名の委任状について事務局より説明があった。いずれも会長委任であった。佐竹弘靖理事の委任状は提出されていないことを確認した。

理事長より、委任・欠席者も含めて自薦・他薦で会長を決めてはどうかとの意見がなされた。複数の理事より各役員の選出の順番についての質問がなされた。理事長より、「これまで会長選出後、副会長、理事長の順番で決めていたが必ずしもそうしなければならないということではない」との回答があった。新会長選出から進めることになった。

・会長選出

会長より、「自薦からはじめて、いなければ他薦でいかが」との意見があった。全理事に自薦、他薦を求めた。

しかし、自薦・他薦を受ける前に以下のような意見が複数の理事からなされた。

○会長選出同様、他の役員選出においても個別に自薦、他薦で決めることが望ましい。(定款に互選と記してある)

他の理事よりも同意見がなされた。推薦複数人の場合は選挙(投票)を行うように。

○一方、全て選挙だと問題もあるのではとの意見があった。会長が運営しやすいように配慮することも必要では。

(会長とコンタクト取りやすい環境等を考慮するなど)

○定款第11条3項の会長推薦理事についての質問があった。全ての役員が決まってからの回答があった。

○他理事より自薦、他薦にて先ず会長を選出すべきとの意見があった。会長は職務を遂行しやすいように配慮することは良いが、異なる考えを持っている者も組織としては必要との意見があった。

会長より、再度、推薦(自薦、他薦)の問い合わせがあった。

自薦はなかった。増原光彦理事が新会長候補として複数の理事より推薦された。(もう1期頑張ってもらいたいとの意見)

この間、理事より、「先ほどの各役員の推薦複数の場合は選挙するか」についての質問あった。各理事で選挙の有無について意見が割れたため、まずは現在推薦のあった増原光彦理事の会長選出についての表決を求めた(理事長)。

結果、全員一致で増原光彦理事を次期新会長に選出した。

増原光彦新会長より挨拶があった。「これから選出される新副会長、新理事長は、一緒に学会の運営に責任を持って臨む考えてほしい」との話があった。新会長より、新理事長選出への指示があった。全員一致。

・理事長選出

まず、自薦が求められたが該当者がいないということで、他薦が求められた。

佐竹弘靖理事、片岡幸雄理事が推薦された。推薦に当たって以下のような意見が交わされた。

○佐竹弘靖理事推薦理由の説明が求められた。「何期も理事を務めて本会をよく知っている為、今後も責任もって運営に携わって頂けると思っている。」

○北海道支部の会員も減ってきている。ここで若い者が出てきてもよいと考えている。

○複数の理事より片岡幸雄理事にもう一期お願いしたい。

○増原光彦新会長より、「もう一期自身とともに勤めて欲しい」と片岡幸雄理事を推薦する発言があった。

○片岡幸雄理事より「会長からの推薦であるので理事長を務めるが、選挙であるならば辞退する」旨の意見があった。

(それは、会長からの推薦なら引き受けるが、そうでなければ引き受けないという事なのかとの質問があった。)

理事より、表決で決めるとの意見があり、原和正理事に進行をお願いした。表決の結果、8:7 で片岡幸雄理事を新理事長に選出された。

続いて副会長選出について原理事司会進行で行った。

・副会長選出

進行に先だって増原光彦新会長の意見を聞きたいとの意見が理事よりなされた。

新会長:「会長を補佐する副会長であると考え、学術と臨床の両方がうまく相まることで会がより良く進行すると考える。

(これまでの副会長選出においても、学術系と臨床系から各1名選出するようにしている。)

増原光彦新会長から、学術系からは佐竹弘靖理事、臨床系からは原和正理事が新副会長に推薦された。

結果 新会長の推薦に理事が賛同を示し、佐竹弘靖理事と原和正理事に新副会長をお願いすることになった。

新役員は以下の通り決定した。

任期 平成28年4月～平成31年3月

会 長 : 増原光彦

副会長 : 原 和正 ・ 佐竹弘靖

理事長 : 片岡幸雄

以上

議 長

理事長

片岡 幸雄

議事録署名人

理 事

原 和正

議事録署名人

理 事

渋谷 権司



「スポーツ整復療法学研究」寄稿規約

1. スポーツ整復療法学研究は、日本スポーツ整復療法学会の機関誌で、「総説」「原著論文」「症例研究」「研究資料」「活動報告」「教育講座」「学会通信」「会員動向」等を掲載する。
2. 本誌への寄稿は原則として、共著者を含めて日本スポーツ整復療法学会正会員に限る。内容はスポーツ整復療法学の研究領域における「総説」「原著論文」「症例研究」「研究資料」および「活動報告」で、未発表で完結したものに限る。
3. 論文等を寄稿する際は「執筆要領」に従って作成する。
4. 「総説」「原著論文」「症例研究」「研究資料」および「活動報告」の掲載に際し、その採否、修正の要求、掲載順位の指定および校正(初校は著者)などは編集委員会が行い、編集委員長名で著者に連絡する。
5. 投稿原稿は書留便で、封筒の表に「スポーツ整復療法学研究投稿原稿」と朱書き、オリジナル 1 部とコピー3部(図表を含む)を学会事務局宛に送る。掲載が決定した後に、最終原稿を入力した記録媒体(USBもしくは CD)を提出する。ファイルはワード、一太郎、TXT 形式のいずれかとPDFファイルの 2 種類とする。提出原稿および記録媒体等は原則として返却しない。
6. 寄稿に際し、「総説」「原著論文」および「症例研究」は 1 万円、「活動報告」および「研究資料」は 5 千円を審査料として学会事務局の郵便振込口座に振り込み、振込用紙のコピーを同封する。振込用紙には必ず内訳を記入する。
7. 別刷は 30 部までを無料とし、それ以上は著者の負担とする。

「執筆要領」

A 「総説」「原著論文」「症例研究」および「研究資料」

1. 「総説」「原著論文」「症例研究」および「研究資料」は図表を含めて刷り上がり 8 ページ以内を原則とする。超過したページについては著者負担とする(料金は別に定める)。
2. 原稿は必ずワードプロセッサを用いて、新かな使い、常用漢字を用いて、A4 版用紙に横書き印刷する。
3. 外国語言語は欧文フォントを使用する。ただし、日本語化した語はカタカナ標記(全角)を使用してもよい。数字は算用数字、単位符号は原則として CGS 単位を用い、mm, sec, cm, ml, μ g などとする。圧の単位は mmHg を用いてもよい。
4. 図(写真)表は必要最低限にとどめ、A4 版用紙に各 1 枚に収載し、番号(例:Table.1, Fig.1, または表 1、図 1)とタイトルを付け、且つ英文併記が望ましい。図(写真)表の挿入場所を本文原稿の余白に朱書きする。なお、製版が不適当と認められる図表は書き変えることがある。その際の実費は著者負担とする。
5. 和文論文原稿の形式は以下の順に従う。
 - a) 原稿の第 1 ページに「表題」「著者名」「所属名」「キーワード 5 個以内」「原稿の種類」「別刷請求部数」「連絡先:住所、氏名、電話 FAX 番号、E-mail」等を記載する。
 - b) 本文は目的(緒言)、方法、結果、考察、結論、引用文献および図表(写真)の順とし、印刷は「10 ポイント、23 文字 X38 行の 2 段組み、総文字数 1748 字」程度で行う。改行は冒頭 1 字を下げる。
6. 和文原稿には英文のタイトル、著者名、所属名、キーワードを必ずつける。また、英文抄録(400 語以内)をつけることが望ましい。英文は専門家のチェックを必ず受けること。
7. 英文原稿には原則として、上記に準じ、和文抄録をつける。
8. 引用文献は主要なものに限り 30 編以内とする(総説の場合は制限なし)。文献は本文の引用順に引用番号を付し(半角片カッコ内に半角数字で記入する。例:片岡ら 1))によれば・・)、引用番号順に記載する。
 - a) 雑誌の場合は、全著者名、年号、表題、雑誌名、巻数、頁一頁の順に記す。
 - 1) 佐野裕司、白石聖、片岡幸雄(1998)背側筋群の強化を目的とした体幹筋運動が腰筋の圧痛に及ぼす効果、柔道整復・接骨医学 7(1):3-12
 - 2) Kataoka, K., Sano, Y., Imano, H., Tokioka, J. and Akutsu, K. (1993) Changes in blood pressure during walking in the elderly persons with hypertension, Chiba Journal of Physical Education. 17:33-38
 - b) 単行本は全著者名、発行年、標題、書名、編集者名、版数、発行所、発行地、引用頁の順に記す。
 - 1) 熊谷秋三:誤った運動法(1993)健康と運動の科学、九州大学編、初版、大修館書店、東京:209-211
 - 2) Expert Committee of Health Statistics (1995) Report of the Second Session, WHO Technical Report Series, 25

B 「活動報告」

- 図表写真を含め 2 ページ(400 字原稿用紙 8 枚)以内を原則とし、上記の執筆要領に準じて作成する。

「スポーツ整復療法学研究」論文投稿確認書

・申込はこの用紙をコピーして必要事項を記入の上、事務局へFAXもしくは添付ファイルで転送して下さい

投稿年月日(西暦) 年 月 日(投稿者記入)

論文タイトル (日本語)	
論文タイトル (英語)	
分野 (審査希望分野)	a)整復療法 b)整復工学 c)スポーツ療法学 d)原理・倫理 e)評価 f)その他 ()

投稿者氏名			会員確認(該当項目に○を付ける) ・会員 ・入会手続き中	
所 属				
連絡先 (資料送付先)	〒			
	電 話		FAX	
	E-mail			
共同研究者 (不足の場合 は別紙に書き 加えて下さい)	氏名	所属		会員確認
				・会員 ・入会手続き中
				・会員 ・入会手続き中
				・会員 ・入会手続き中
				・会員 ・入会手続き中
				・会員 ・入会手続き中
				・会員 ・入会手続き中
別刷部数	部 (30 部までは無料、学会負担)			
送付資料確認	・原稿3部(コピー可) ・投稿料振込確認(コピー可) ・その他、同封した物があれば記入下さい。			

＜注意＞共同研究者の会員登録をご確認ください。投稿料振込および投稿者（共同研究者含む）の登録確認が終了後、論文審査に入ります。この用紙はHPからも入手できます。

「日本スポーツ整復療学会」個人会員入会申請用紙

・申込はこの用紙をコピーして必要事項を記入の上、事務局へ FAX で転送して下さい

申請年月日	(西暦) 年 月 日	事務局 FAX:043-290-3776	
会員資格	正会員 ・ 学生会員	都道府県名	
ふりがな 氏 名	印	郵便物送付先に○を付ける 自宅 勤務先	
生年月日	(西暦) 年 月 日生		
勤務先名			
勤務先住所	〒		
	電 話		FAX
	E-mail		
自宅住所	〒		
	電 話		FAX
	E-mail		
職業分野・免許 ○印を付ける	柔道整復師 鍼師 灸師 マッサージ師 理学療法士 カイロプラクター 大学教師 専門学校教師 医師 大学院生 学部生 専門学校生 その他()		
所属職能団体 ○印を付ける	日整 JB NSK 全国柔整師会 医師会 JATAC 大学 学生 専門学校生 研究所 その他()		
所属学会			
学 歴	高 校: 大学: 専門学校等:		
推薦者会員名	印	都道府県名	

※(正会員・学生会員ともに、申請時は推薦者として正会員1名の推薦が必要)

正会員:入会金 2,000 円、年会費 8,000 円 学生会員:入会金 0 円、年会費 5,000 円

下記にお振込下さい。

郵便振替番号:00110-4-98475 口座名義:日本スポーツ整復療学会

第 回日本スポーツ整復療法学学会大会 演題申込書

平成 年 月 日申込

和文演題		
英文 タイトル		
Key words (5 個以内)		
該当する発表分野に○印を付けて下さい。また、一般研究は a~f のいずれかに○印を付けて下さい。 発表分野 1. 一般研究発表 2. 特別講演・シンポジウム 3. 活動報告 4. その他 一般研究発表 a) 整復療法 b) 整復工学 c) スポーツ療法学 d) 原理・倫理 e) 評価 f) その他		
	氏名 (下段ローマ字)	住所・電話・Fax (E-mail)
演者		〒
		E-mail: 電話: Fax:
共同研究者		〒
		E-mail: 電話: Fax:
		〒
		E-mail: 電話: Fax:
		〒
		E-mail: 電話: Fax:
		〒
		E-mail: 電話: Fax:
		〒
		E-mail: 電話: Fax:

共同研究者が5名を超える場合はこの用紙をコピーして追加してください。

第18回日本スポーツ整復療法学会大会号への広告掲載のお願い

日本スポーツ整復療法学会

会長 増原 光彦 (印略)

本年は第18回日本スポーツ整復療法学会大会を北海道札幌市にて開催することとなりました。今回は現状では会場の都合で展示は設置できないとの連絡を受けております。したがって、大会の円滑な運営のために今年度は今まで以上に広告掲載が必要となってきます。本大会におきましては特に会員に皆様方のお力を仰ぎ、ご協力者の紹介をお願いすることとなりました。誠に勝手なお願いではありますが、諸事情ご理解の上、関係企業、大学、団体等のご紹介をお願い申し上げます。

<広告掲載および賛助会員のお願い>

従来、広告および展示をご希望の場合には賛助会員に入会して頂くことを原則としておりましたが、本大会においてはご協力企業の方々にさらなる負担とならないように賛助会員としてのご登録は自由にさせていただきました。賛助会員は広告、展示とは別に本学会の趣旨にご賛同いただき、ご協力願える場合をお願いいたします。賛助会員としてご協力願える場合には、当該年度の学会誌の配布、大会研究会の案内等を送らせていただきます。広告が掲載される大会号は本会の機関誌である「スポーツ整復療法学研究」第18巻第2号として10月初旬に送付する予定であります。なお、申請に関わる諸費用については以下になりますので、なにとぞご理解、ご協力ほどお願い申し上げます。

1. 賛助会員入会(ご自由です) ・入会金2千円 ・年会費 8千円

(入会金は新規登録年度のみです。すでに賛助会員になられている場合入会金は不要です。)

2. 大会号広告掲載

広告掲載料	・A4で1ページ	3万円
	・同 2分の1ページ	2万円
	・同 4分の1ページ	1万円

3. 研究助成基金寄付金(本学会の研究活動基金への寄付金として) ・一口8000円(何口でも可)

4. 申込方法 ・方 法 次ページの申込書にご記入のうえ、FAXでご送付ください。

・締 切 随時(ご指定の号あるいは大会の予定により調整、お問い合わせ下さい)

・宛 先 〒263-8522 千葉県稲毛区弥生町1-33 千葉大学教育学部村松成司研究室

「日本スポーツ整復療法学会事務局」宛

TEL/FAX:043-290-3776 E-mail: mshigeji@faculty.chiba-u.jp

5. 送金方法

・締 切 2016年9月15日(大会号製本の関係上)

・振込先 郵貯振替の場合 口座番号:00110 - 4 - 98475

口座名義: 日本スポーツ整復療法学会

銀行の場合 千葉銀行穴川特別出張所 普通口座

口座番号 3282277

口座名義: ニホンスポーツセイフクヨウホウガクカイ

注) お申し込みいただきましたら、ご指定のメールアドレスへ申込受理のお知らせをいたします。

問い合わせはFAX またはE-mail をお願いいたします。

第18回日本スポーツ整復療学会大会

広告掲載および賛助会員の申込書

平成 年 月 日

日本スポーツ整復療学会における賛助会員入会金および年会費、広告掲載料および寄付金として下記の金額を送金します。

1. 会社・団体名:

2. 所在地: 〒

3. 電話:

4. E-mail :

5. 代表者名: 印

6. 担当者名:

記

1. 金 額

賛助会員	入会金(新規の場合)	2,000円	_____	件	_____	円
	年会費	8,000円	_____	件	_____	円
広告掲載料	A4 1ページ	30,000円	_____	件	_____	円
	同 2分の1ページ	20,000円	_____	件	_____	円
	同 4分の1ページ	10,000円	_____	件	_____	円
寄附金	1口	8,000円	_____	口	_____	円
			↑	総計	_____	円

該当する部分にのみ数字を記入下さい

2. 振込予定日 平成 年 月 日

FAX 番号 043-290-3776(千葉大学教育学部村松成司研究室)

事務局より

1. 先に学会HPでお知らせしましたが、第18回日本スポーツ整復療法学会学術大会が今年度は北海道で開催されます。北海道支部の先生方も張り切って学会準備をしております。年に一度の全国大会、北海道まで足を伸ばし、参加くださるようお願いいたします。今回は第一報として日程・概要を掲載いたしました。次号第18巻1号に詳細をご連絡いたします。参加ならびに演題発表も是非お願いします。本誌発刊が遅れましたので、通常次号に掲載する演題申込用紙ならびに広告依頼の案内を組み入れました。先生方の早めのご準備に利用ください。抄録についてはこれまでの大会号をご参照ください。今大会では会場の都合で展示は行わないことになったと報告がありました。大会号への広告掲載をお願いできる企業等の紹介をしていただければ幸いです。

2. 日本スポーツ整復療法学会の機関誌「スポーツ整復療法学研究」への寄稿を募集しております。寄稿は、「総説」、「原著論文」、「症例研究」、「研究資料」、「活動報告」、「教育講座」、「学会通信」、「会員動向」等、様々な形があります。是非、寄稿くださるようお願いいたします。皆様の情報発信の機関誌としてご活用下さい。

3. 年度会費納入についてのお願い

今回は振込用紙は都合上同封しておりません。次号18巻1号発送時に同封させていただきますのでご利用ください。なお、郵便局に設置してある振替用紙を用いても振込ができます。その際には振込先氏名、番号を間違えないようにご記入ください。いずれにおきましても、振込証明書等は手元に残すようにしてください。第18巻1号送付時に振替用紙を同封させていただきますが、二重の振込にはくれぐれもご注意ください。なお、二重の振込みをされた場合には、過去の未納入年度あるいは2017年度に充当させていただきます。その旨ご連絡をさせていただきます。

これまで年会費未納の方がかなりおられます。平成28年度年会費と合わせて遡及納入していただけますようお願いいたします。3年以上年会費未納の会員の方には学会機関誌の発送および各種案内の発送を停止しております。是非、納入していただけますようお願いいたします。これまでの納入が不明の場合は事務局までお問い合わせください。ご退会される場合は本部事務局までご連絡いただけますようお願いいたします。(退会される場合は未納年度会費の納入をお願いいたします。)

年度会費	正会員	8,000 円	(新規入会時には入会費 2000 円を加算する)
	学生会員	5,000 円	(新規入会時の入会費不要、正会員に資格変更する際には 2000 円加算)
	賛助会員	8,000 円	(新規入会時には入会費 2000 円を加算する)
	購読会員	8,000 円	(新規入会時には入会費 2000 円を加算する)

納入先 郵便振替 日本スポーツ整復療法学会 口座番号 00110-4-98475
千葉銀行 穴川特別出張所 普通 3282277 日本スポーツ整復療法学会

4. 学会誌等が返送されてくる会員がおられます。諸連絡、学会誌等が会員のお手元に確実に届くためにも、移動された会員の方は変更(移動)届を出していただけますようお願いいたします。用紙はホームページにて入手ください。

学会ホームページ <http://www.e.chiba-u.jp/~mshigeji/JSSPOTH/JSSPOTHP.html>

5. 会員諸氏の関係者で当学会への入会を希望する方がおられましたら、是非、ご紹介ください。入会用紙はホームページより入手していただくか、FAX またはメールで事務局までお知らせ下さい。必要書類を送付いたします。また、広告、展示等で協賛いただける企業のご紹介も是非お願いいたします。広告掲載(1~3号対象)および展示(学会大会)に関わる情報は学会ホームページから入手できます。あるいは事務局にお問い合わせください。資料を送付させていただきます。

6. 当学会についての問合せ、ご意見等ありましたら事務局(村松)までご連絡ください。e-mail あるいは Fax でお願います。折り返し、連絡させていただきます。

(文責 村松成司)

編集後記

本誌第17巻3号におきましては原著論文4編を掲載することができましたが、発刊までかなりの時間が経過したことを編集委員としてお詫びいたします。特に投稿された先生方には多大なご心配をおかけしました。査読にかなりの時間を要しておりますが、忙しい中、査読の先生方にしっかりと審査していただいていることはご理解いただけますようお願いいたします。もう少し事務局として頻繁に連絡を差し上げればよかったのではないかと今更ながら反省しております。今回掲載の論文は内容的には柔道整復学が1編、ラットを用いた基礎研究が3編となりました。先の第17巻1号の編集後記で述べられていましたが、スポーツ整復療法学研究が対象とする分野は今後ますます拡大する傾向にあると思われます。したがって、もっと多方面にわたる内容の論文の掲載がなされてもよいような気がします。特に、現場の先生方が日頃問題視している内容あるいは独自で検討されている内容も本誌に投稿していただけますようお願いいたします。原著論文にこだわらず、臨床現場での研究情報、活動報告、問題提議・提案、あるいは、資料などの形で会員の皆様に情報をご提供くださるようお願いいたします。今回の編集後記は反省の弁ばかりですが、できる限り多くの情報を本誌に掲載できるように、また、投稿された先生にご迷惑のかからないように円滑に作業を進めていきたいと思っております。陳謝。(SM)

編集委員会

吉田正樹(委員長)

増原光彦 行田直人 片岡幸雄 渋谷権司 村松成司

Journal of Sport Sciences and Osteopathic Therapy

Vol.17 No.3 March 2016

禁無漸転載

スポーツ整復療法学研究(第17巻・第3号)

非売品

2016年3月30日発行

発行者 日本スポーツ整復療法学会 会長 増原光彦

発行所 日本スポーツ整復療法学会事務局

(<http://www.e.chiba-u.jp/~mshigeji/JSSPOTH/JSSPOTH.html>)

〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1-33

千葉大学教育学部スポーツ科学 村松成司

TEL&FAX: 043-290-3776 E-mail: mshigeji@faculty.chiba-u.jp

郵便振替: 0110-4-98475

印刷所: 三陽メディア株式会社

〒260-0824 千葉県千葉市中央区浜野町1397番地

TEL: 043-209-3411 FAX: 043-209-3451

JOURNAL OF SPORT SCIENCES AND OSTEOPATHIC THERAPY

CONTENTS

Originals

- Masashi TAKEUCHI, Takeo ICHIGAYA[151]
Causative disorder and manipulative reduction for patients with knee joint locking at osteopathic clinic
- Shuto OKUDA, Sadafumi TAKISE, Toshikazu KAWAKAMI, Junpei FURUKAWA and Koichi SAGAWA[155]
Effects of cold stimulation after muscle contusion on muscle repair process in rats
- Koichi SAGAWA, Sadafumi TAKISE, Toshikazu KAWASHIMA, Junpei FURUKAWA, Shuto OKUDA[163]
Influence of heat stimulation after muscle damage on the early phase of muscle repair in rats
- Yuji KANAZAWA, Yuki OI, Shinichi SUGIYO, Yasufumi SHIGEYOSHI, Yukio KATAOKA and
Isao TAKEDA[171]
Muscle fiber-type-specific effect of reloading after hindlimb unloading in the rat soleus muscle capillary

News

- Report of "The 17th J Japan sports Sciences and Osteopathic Therapy congress in 2015"
- Guidance of "The 18th Japan sports Sciences and Osteopathic Therapy congress in 2016" (First Report)
- Report of meetings
- Editor's postscript