

Thesis

交流 3,000V 電位負荷及び杜仲葉併用による肉芽形成と コラーゲンの合成促進効果の研究

埼玉医科大学麻酔学教室

(指導：松本 勲教授)

古賀 義久

Studies on the Stimulative Effect of 3,000 Volts Alternating Current on Granuloma Formation and Collagen Synthesis

Yoshioka Koga (Department of Anesthesiology, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Rats raised on a 6% protein diet (low-protein diet) for three weeks have a reduced ability to synthesize collagen, and because the levels of this diet-induced reduced collagen synthesis are comparable to those for normally aged rats, low-protein diet-fed rats can be used as a model for aged rats. In the present study, 6-week-old male Wistar rats were raised on a low-protein diet for three weeks, and the effects of applying 3,000 V of alternating current and supplementing the low-protein diet with *Eucommia ulmoides* leaves on collagen synthesis were determined. 1. By applying 3,000 V of alternating current to the rats on the low-protein diet, the weight of granulation tissue and levels of hydroxyproline increased in a time-dependent manner when compared with the control group. After six weeks of applying 3,000 V of alternating current, the weight of granulation tissue and levels of hydroxyproline increased significantly by 187 and 171%, respectively ($p < 0.05$). 2. By applying 3,000 V of alternating current to rats on the low-protein diet supplemented with *Eucommia ulmoides* leaves (0.75%), the weight of granulation tissue and levels of hydroxyproline increased significantly within four weeks by 136 and 163%, respectively ($p < 0.05$ and 0.001 , respectively). The results of the present study suggest that adding *Eucommia ulmoides* leaves facilitates collagen synthesis and formation of granulation tissue in aged rats. The fact that levels of hydroxyproline in granulation tissue increased significantly suggested that reduced collagen synthesis in aged rats was activated. The formation of granulation tissue is indicative of the early stages of wound healing, and this formation facilitates wound healing.

Keywords: Aged rat, *Eucommia ulmoides* leaves, 3,000 V of alternating current, Collagen synthesis, Granuloma formation

緒言

老化研究の戦略として老化モデル動物を用いた個体レベルの研究に加え、生体を構成する成分の研究も進みその中でも細胞外基質コラーゲンが注目されている。体内の全タンパク質の約1/3を占めるコラーゲンは歯・歯肉・骨・内臓・筋肉・血管及び皮膚に至るまで主要で重要な成分である。従って老化は生

医学博士 乙第918号 平成16年3月19日(埼玉医科大学)

体成分のコラーゲンの合成分解による新陳代謝の能力低下で組織疲労と萎縮が進む現象とも表現できる¹⁾。

ラットを6%の低タンパク食で3週間飼育すると、コラーゲン合成が低下しその合成は正常に年をとったラットと同程度となる擬似老化モデルラット(以下老化ラット)の作成が可能となり老化研究に利用されている²⁻⁴⁾。更には老化ラット作成の6%低タンパク食に杜仲葉を添加することでラットの肉芽形成及びコラーゲン合成を高めるとの報告もある⁵⁻⁷⁾。

他方、生体に電位を負荷することで循環調節作用、骨折における仮骨形成作用、更には創傷治癒過程を促進させることが報告されている⁸⁻¹²⁾。しかしながら交流高圧電位負荷による肉芽形成及びコラーゲン合成に関する研究はない。今回著者は交流高圧電位を老化ラットに負荷し肉芽形成とコラーゲン合成への影響、更に杜仲葉を併用した老化ラットにも交流高圧電位を負荷し、同様に肉芽形成とコラーゲン合成への影響を検索し両者における差を検討した。

実験材料と方法

本実験には6週齢のWistar系雄ラット(体重約180 g)を使用した。

1. 老化ラットの作成

6%低タンパク食(日本クレア)で3週間飼育し作成した。6%低タンパク食で3週間飼育することでコラーゲンの合成は低下し、その合成は正常に年をとったラットとほぼ同程度であることが報告されている^{2,4)}。飼育条件は室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12時間の明暗サイクル環境内で飼育され、餌と水は自由に摂取させた。動物取り扱いには日本大学薬学部動物実験指針に従って行った。

2. 杜仲(*Eucommia ulmoides*)の葉(Du-Zhon Leaf)(以下DZL)は日本大学薬草園で夏に採取し、乾燥した後、葉1 kgあたり水1 Lを加え熱時で1時間抽出した。ろ過後抽出エキスを凍結乾燥させ粉末として使用した。

3. 実験食の組成

6%低タンパク食(以下低タンパク食)の組成及び20%タンパク食(以下通常食)をTable 1(文献5のP466のTable 1より転載)に示す。

杜仲葉換算で平均 0.6 g/kg/day 以下の摂取であれば肉芽形成、コラーゲン合成に有意差が無かったとの報告より⁵⁾、摂取量を考慮して杜仲葉換算で平均 0.6 g/kg/day 以下になるように餌の低タンパク食に杜仲葉エキス粉末を0.75%混入した。

Table 1. Composition of Experimental Diet (%)

Ingredient	6% protein diet	20% protein diet
Milk casein ^{a)}	7.0	23.5
Cornstarch	63.0	46.5
Granulated sugar	10.0	10.0
Corn oil	6.0	6.0
Cellulose powder	5.0	5.0
α -Starch	1.0	1.0
Vitamin mix ^{b)}	1.0	1.0
Mineral mix ^{c)}	7.0	7.0

a) 85%purity

b) Diet NO.B10000, Japan Clea, Co., Tokyo, Japan.

c) Diet NO.C10000, Japan Clea, Co., Tokyo, Japan.

4. 交流3,000V電位負荷法

ラットをPCゲージに入れFig. 1(文献15のP96のScheme 1より転載)に示すように配置した。交流3,000 Vの電位負荷は家庭用電位治療器スーパーダック(日本理工医学研究所製)を改良し連続使用した。電位負荷装置では電流は流れない。

5. ホルマリンろ紙法

(Formalin-Filter paper Method)(以下FFP)による肉芽形成法

FFPによる肉芽形成法は直径8 mm、重量8 mgのろ紙に7%ホルマリン20 μl を染み込ませエーテル麻酔下ラットの背部を剃毛し、左右の肩甲骨と坐骨の皮下4箇所埋め込み、1週間後にエーテル麻酔下で心臓採血により屠殺し、埋め込んだろ紙を含む肉芽組織及び臓器を摘出した。肉芽組織は重量を測定した後ヒドロキシプロリン(Hydroxyproline)(以下HP)量の分析まで -80°C で保存した^{5,13)}。

6. ヒドロキシプロリン(HP)の定量

老化ラットから摘出した肉芽中のコラーゲンを定量する目的で、コラーゲンに特徴的なアミノ酸であるヒドロキシプロリン量を測定した。肉芽からろ紙を取り除き重量を測定後、24時間凍結乾燥した。10倍量の6 N塩酸を加え、窒素雰囲気下、封管中、 110°C 、24時間加水分解した。加水分解液は減圧濃縮し、残さを0.02 N塩酸に溶解しフィルター過(DISMIC-25CS, $0.20 \mu\text{m}$, 東洋ろ紙)した。ろ液はアミノ酸自動分析器(L-8500, 日立製作所)によりヒドロキシプロリン量を測定した。

7. 統計処理

肉芽重量及びHP量は全て同じ実験系のコントロール群に対する百分率(%)として表した。値は $\text{mean} \pm \text{SE}$ で表し有意差はANOVA(Fisher's PLSD)で行い、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.001$ で有意とした。

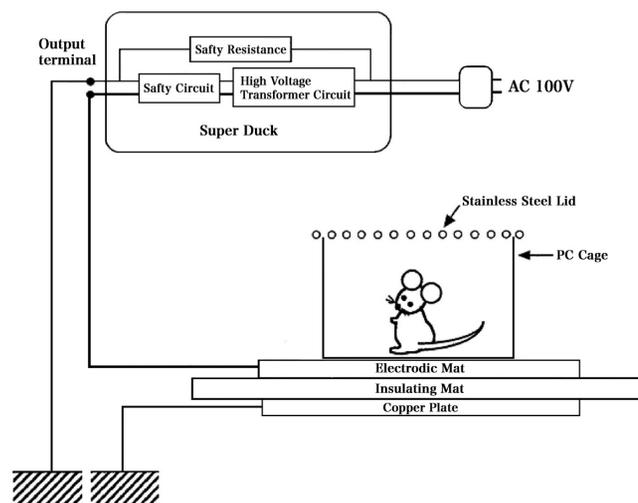


Fig. 1. Schematic diagram of the 3,000 volts alternating current apparatus.

実験

実験計画をFig. 2に示す.

実験 I-①

4週間の交流3,000V電位負荷が老化ラットの肉芽形成およびコラーゲン合成に及ぼす影響について検討した. 6週齢のWistar系雄ラット(体重約180 g) 13匹をコントロール群6匹, 交流3,000V電位負荷群7匹の2群に分けて実験した. 両群共に4週間低タンパク食で飼育したが3週終了時点でFFPによる処置を行い, 4週間終了時点で屠殺し, 埋め込んだる紙を含む肉芽組織及び臓器を摘出して肉芽と臓器の重量及び肉芽中のHP量を測定した.

実験 I-②

6週間の交流3,000V電位負荷が老化ラットの肉芽形

成及びコラーゲン合成に及ぼす影響について検討した. 実験 I-①と同様13匹のラットをコントロール群6匹交流3,000V電位負荷群7匹の2群に分けて実験した. 両群共に6週間低タンパク食で飼育したが5週終了時点でFFPによる処置を行い, 6週終了時点で屠殺し, 埋め込んだる紙を含む肉芽組織及び臓器を摘出して肉芽と臓器の重量及び肉芽中のHP量を測定した.

実験 I-③

摘出した肉芽の4個中, 1個はホルマリン固定し組織学的観察を行った.

実験 II

4週間DZL加低タンパク食のみ及び交流3,000V電位負荷下DZL加低タンパク食による老化ラットの肉芽形成及びコラーゲン合成について検討した.

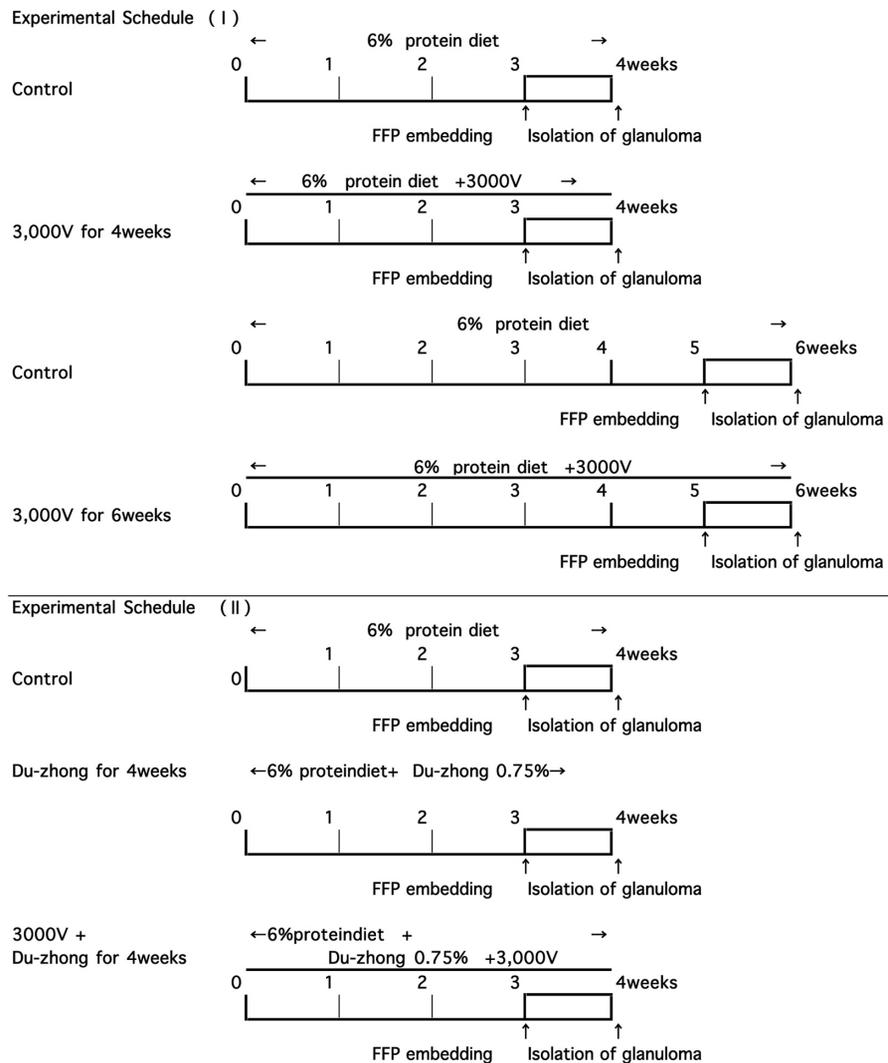


Fig. 2. Experimental Schedule. Experiment 1: The effect of 3,000 volts alternating current for 4week and 6week on granuloma formation and collagen synthesis in false age model rats. Experiment 2: The combination effect of 3,000 volts alternating current and Du-Zhong Leaf for 4week on granuloma formation and collagen synthesis in false age model rats.

6週齢のWistar系雄ラット(体重約180 g) 18匹を低タンパク食のみ6匹, DZL加低タンパク食6匹, 及び交流3,000V電位負荷下DZL加低タンパク食6匹の3群に分け実験 I -①と同様の実験を行った。

結 果

1. 4週及び6週間の交流3,000V電位負荷の有無で体重増加, 臓器重量に差は見られなかった。(Table 2-a) 文献15のP101のTable 1より転載。
2. 4週間の交流3,000V電位負荷の有無による肉芽重量及び肉芽中のHP量に有意差は生じなかった。肉芽1個(ろ紙含まず)平均重量はコントロール群 61.7 ± 4.19 mg, 4週間の交流3,000V電位負荷群 84.0 ± 9.96 mg, HP量(肉芽1個)平均はコントロール群 202 ± 13.4 μ g, 4週間の交流3,000V電位負荷群は 249 ± 32.0 μ gであった。肉芽重量及びHP量は全て同じ実験系のコントロール群に対する百分率(%)として表した。6週間の交流3,000V電位負荷では肉芽重量187% ($p < 0.05$), HP量171% ($p < 0.05$)とそれぞれ有意に増加した。肉芽1個(ろ紙含まず)平均重量はコントロール群 69 ± 0.1 mg, 6週間の交流3,000V電位負荷群 129.0 ± 11 mg, HP量(肉芽1個)平均はコントロール群 236 ± 22.4 μ g, 6週間の交流3,000V電位負荷群 403 ± 32.3 μ gであった。
3. 肉芽の組織学的な観察も同時に行ない, 6週間交流3,000V電位負荷群においてコントロール群と比較し毛細血管が著しく発達していた。また肉芽形成に関与するリンパ球, 線維芽細胞などが多数認められ, コラーゲン線維が太く発達していることから肉芽形成, コラーゲン合成の促進が示唆された¹⁵⁾。(Fig. 4) 文献15のP100のFig. 2より転載。
4. 4週間のDZL加低タンパク食と, 4週間交流3,000V電位負荷下DZL加低タンパク食では共に体重増加・臓器重量に有意差は生じなかった。(Table 2-b)
5. 4週間DZL加低タンパク食群では肉芽重量が119%増加した。有意差は見られなかった。肉芽中のHP量は142% ($p < 0.05$)と有意に増加した。他方4週

Table 2-a. Effect of 3,000 volts alternating current for 6 weeks on the body weight and organ weights of false age model rats

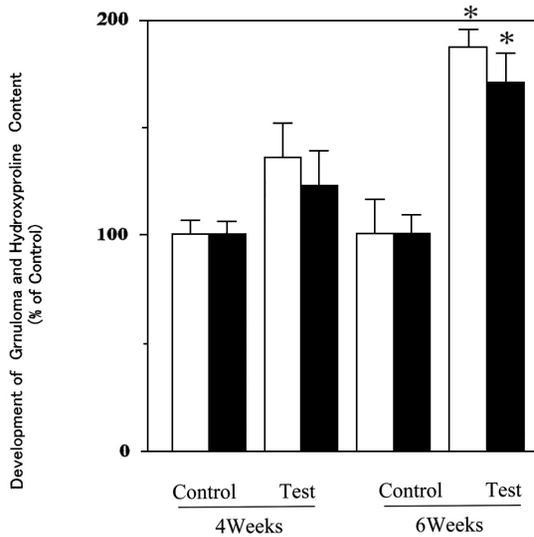
1)	control group	3,000V group
Body Weight (g)	263 \pm 5.0	260 \pm 7.7
Liver(g)	8.08 \pm 0.28	7.79 \pm 0.32
(g/100gbodyweigh+)	3.08 \pm 0.08	2.99 \pm 0.06
Kidney(g)	1.51 \pm 0.05	1.42 \pm 0.03
(mg/100gbodyweigh+)	576 \pm 15	550 \pm 9.9
Thymus(mg)	390 \pm 12	399 \pm 24
(mg/100gbodyweigh+)	148 \pm 3.3	153 \pm 6.8
Spleen(mg)	446 \pm 15	446 \pm 14
(mg/100gbodyweigh+)	170 \pm 4.4	172 \pm 4.7

Values are mean \pm SE of six rats(control group)and seven rats (3000V group).

Table 2-b. Effect of 3,000 volts alternating current and Du-zhong for 4 weeks on the body weight and organ weights of false age model rats

2)	control group	Du-zhong	3,000V+Du-zhong
Body Weight (g)	254 \pm 8.5	244 \pm 10	237 \pm 6.1
Liver(g)	8.64 \pm 0.51	7.89 \pm 0.20	8.27 \pm 0.48
(g/100gbodyweigh+)	3.42 \pm 0.21	3.25 \pm 0.06	3.48 \pm 0.14
Kidney(g)	1.54 \pm 0.08	1.42 \pm 0.05	1.35 \pm 0.03
(mg/100gbodyweigh+)	606 \pm 14	586 \pm 20	572 \pm 11
Thymus(mg)	426 \pm 36	382 \pm 56	388 \pm 37
(mg/100gbodyweigh+)	167 \pm 10	155 \pm 17	163 \pm 12
Spleen(mg)	444 \pm 33	388 \pm 24	418 \pm 21
(mg/100gbodyweigh+)	175 \pm 9.4	159 \pm 6.5	176 \pm 5.2

Values are mean \pm SE of six rats of each group.



The values are expressed as a percentage of each control value, along with the standard error. *= $p < 0.05$, compared with the control of the same week by ANOVA (Fisher's PLSD).

Fig. 3. Development of Granulomas (□) and Hydroxyproline (■) contents in granulomas for 4 weeks and 6 weeks of 3,000V compared with controls.

間交流3,000V電位負荷下DZL加低タンパク食群では肉芽重量136% ($p < 0.05$), 肉芽内HP量は163% ($p < 0.001$)と有意に増加していた. 肉芽1個(ろ紙含)平均重量はコントロール群 146.6 ± 7.59 mg, 4週間DZL加低タンパク食群 174 ± 9.88 mg, 4週間交流3,000V電位負荷下DZL加低タンパク食群 199 ± 12.0 mgであった. HP量(1匹)平均はコントロール群 1.42 ± 0.08 mg, 4週間DZL加低タンパク食群 2.02 ± 0.21 mg, 4週間交流3,000V電位負荷下DZL加低タンパク食群 2.31 ± 0.07 mgであった. 肉芽重量及びHP量は全て同じ実験系のコントロール群に対する百分率(%)として表した. (Fig. 5)

考 察

成長の過程に比べて老化の過程には著しく個人差がみられる. 死に至るまで生体機能を最適状態に保つ方法を探ることは老化研究の最大の目的である. 老化研究には臨床研究が重要であることは論を待たないが, 一方では老化の基礎的研究もこれに劣らず重要である. 老化の研究には個体レベルで健常な高齢者を対象として正常老化の過程を明らかにする研究や老化モデル動物を用いた老化の機序を調べる研究が進んでいる. 個体レベルの基礎研究では, 高次神経機能, 循環

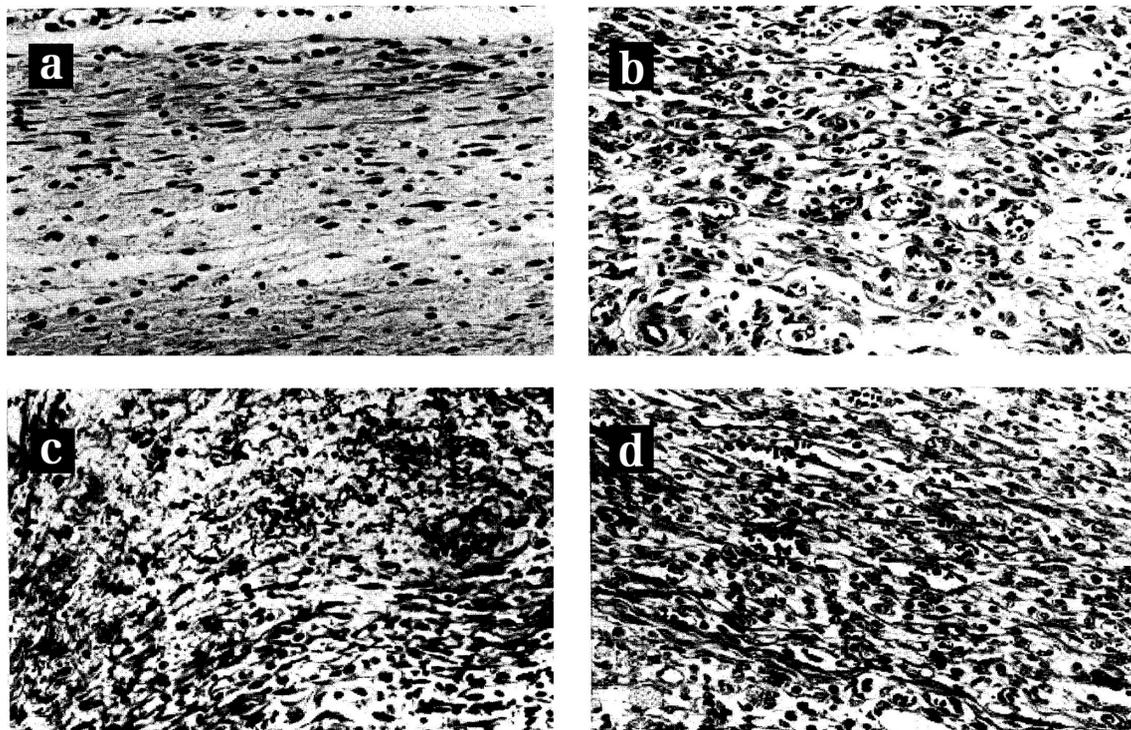
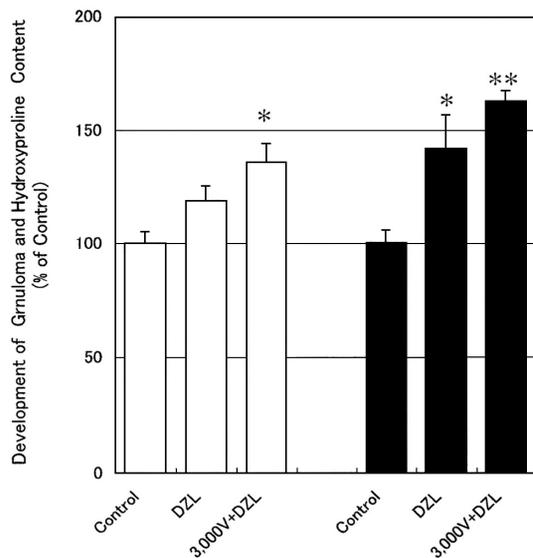


Fig. 4. Morphologic effect of 3,000 volts alternating current for 6 weeks on the granuloma formation of false age model rats compared with controls. Serial sections from control group (a and c) and high voltage group (b and d). Granulomas were stained with hematoxylin-eosin (a and b) and with Masson trichrome (c and d). (Magnification=300×)



The values are expressed as a percentage of each control value along with the standard error. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, compared with the control of the same week by ANOVA (Fisher's PLSD).

Fig. 5. Development of Granulomas (□) and Hydroxyproline (■) Contents in Granulomas for 4 Weeks of Du-Zhong Leaf and 4 Weeks of 3,000V + Du-Zhong Leaf compared with Controls.

機能, 内分泌機能に加え免疫機能の加齢変化により個体としての老化に対処する方法が探られている. 更に老化研究の戦略としては個体レベルの研究に加え生体を構成する細胞分子レベルの研究が進んでいる. その結果として①細胞分裂寿命はテロメアにより規定されている. ②老化を発現する遺伝子や寿命を変える遺伝子が存在する. ③老化にアポトーシス機構が関連する. ④活性酵素とその消去系の活性が寿命に関連する. ⑤ミトコンドリアDNAの傷害が老化に関連する. ⑥細胞外基質や接着分子が老化に関連する, 等が今日知られている¹⁴⁾. 著者は本研究で細胞外基質であるコラーゲンに注目した.

コラーゲンは線維芽細胞や軟骨細胞, 骨芽細胞で作られ生体の全タンパク質の約1/3を占める. 細胞と細胞の間を埋める形で線維状のタンパク質として存在し特に皮膚, 骨, 軟骨, 腱など結合組織の重要な構成成分で, 細胞同士をくっつける基質として接着剤の役割も果たす. これら物理的機能の他に細胞の増殖や器官の形成, 創傷部の治癒促進などに影響を与える.

老化の原因の1つとしてコラーゲンの新陳代謝の衰えが考慮されている.

著者は本研究で肉芽形成とコラーゲンの合成に老化ラットを利用し現在まで研究されていない交流3,000V電位負荷やDZLの併用による肉芽形成及びコラーゲン

の合成への影響を検討した.

低タンパク食でラットを3週間飼育することにより低下したコラーゲン合成の賦活に交流3,000V電位負荷やDZLの併用で肉芽形成・コラーゲン合成への影響を明確に観察することが可能であると考えた. 実験Iでは交流3,000V電位負荷により期間依存的に肉芽重量, HP量共に増加し, 6週間の交流3,000V電位負荷群ではコントロール群に比較して肉芽重量で187%, HP量で171%と有意に増加した. 肉芽中のHP量が有意に増加したことからコラーゲン合成の促進が示唆された. 体重増加と臓器重量については, 6週間の交流3,000V電位負荷群とコントロール群との間には有意差が見られなかったことから交流3,000V電位負荷条件下においてもラットは順調に成育したものと考えられる.

以上のことからコラーゲン合成能を低下させた老化ラットに6週間交流3,000V電位負荷を行うことにより, 血管新生が促進し肉芽形成に必要な各種免疫賦活細胞・栄養・酸素が創傷部位に十分に供給され, よって線維芽細胞の発生が速やかとなりコラーゲン産生が亢進し肉芽形成が促進すると考えられる. つまりコラーゲン合成の低下した状態から, 正常なコラーゲン合成へと賦活させることが示唆された. 肉芽形成は創傷治癒の初期段階に位置し, 線維芽細胞の発達は肉芽の成熟や創傷治癒過程を促進するものと考えられる.

実験IIではDZLを0.75%混入した低タンパク食で, 肉芽重量でコントロール群に比し119%増加したが有意差は見られなかった. しかし肉芽中のHP量は142% ($p < 0.05$) 増加し有意差が認められた. また4週間の交流3,000V電位負荷に, DZLを併用したところ肉芽重量は136% ($p < 0.05$), 肉芽中のHP量は163% ($p < 0.001$) 共に有意に増加した. この結果から交流3,000V電位負荷とDZLの併用で短期間に老化ラットの肉芽形成及びコラーゲン合成を促進させる相互効果があることが示唆された. DZLは今日我が国においても健康飲料として用いられており老化防止に寄与しているかもしれない.

結 語

1. 6週間交流3,000V電位負荷群とコントロール群では体重増加, 臓器重量に有意差がなく, 6週間の交流3,000V電位負荷条件下においても老化ラットは順調に成育した.
2. 6週間交流3,000V電位負荷で肉芽重量が有意に増加したことから肉芽の形成が促進され, また肉芽中のHP量が有意に増加したことからコラーゲン合成が促進された.
3. 4週間交流3,000V電位負荷下DZL加低タンパク食群とコントロール群では体重増加・臓器重量に有意な差が認められなかったことから, 4週間交流

3,000V電位負荷下DZL加低タンパク食条件下においても順調に成育したと考える。

4. 4週間交流3,000V電位負荷下DZL加低タンパク食群では肉芽重量が有意に増加し肉芽形成が促進され肉芽中のHP量が有意に増加したことから肉芽形成、コラーゲン合成が促進され、併用されることでコラーゲン合成効果を高めることが示唆された。

謝 辞

実験に際し、ご指導を頂いた埼玉医科大学麻酔学教室松本勲先生、日本大学薬学部生化学教室高橋周七先生、小池勝也先生、目鳥幸一先生、大和雅之先生、古津みを先生に深く感謝致します。また組織染色をお願いした日本大学生物資源学部佐藤常雄先生、白井弥先生、ヒドロキシプロリンの定量でお世話になった分析センターの諸先生に深謝致します。

引用文献

- 1) 高橋周七. 肌の健康とコラーゲン. *Food Style* 21 1999;3:61-6.
- 2) Rao JS, Rao VH, Dhar SC, Bose SM. Effect of protein malnutrition on the metabolism of dermal collagen in ageing. *Leather Sci* 1986;33:1-7.
- 3) Mitchell GV, Jenkins YJ, Vanderveem JE, Ahrens RA. Effect of diet composition on the growth of rats fed casein or collagen hydrolyzates. *Nutr Rep Int* 1980; 21:893-9.
- 4) McClain PE, Wiley ER, Beecher GR. Influence of high and low levels of dietary of dietary of protein on the biosynthesis and cross-linking of rat skin and muscle collagen. *Nut Rep Int* 1975;12:317-24.
- 5) Metori K, Tanimoto S, Takahashi S. Promotive effect of eucommia leaf extract on collagen synthesis in rats. *Natural Medicines* 1998;52:465-9
- 6) Metori K, Furutsu M, Takahashi S. The preventive effect of ginseng with du-zhong leaf on protein metabolism in aging. *Boil Pharm Bull* 1997;20: 237-42.
- 7) Li Y, Metori K, Koike K, Kita F, Che QM, Sato T, et al. Granuloma maturation in the rat is advanced by the by the oral administration of eucommia ulmoides oliver leaf. *Biol Pharm Bull* 2000;23:60-5.
- 8) 原平助. 交流高圧静電位負荷の血液電解質に及ぼす影響について. *新潟医学会雑誌* 1961;75:265-73.
- 9) 橋本猛. 交流高圧電界負荷の仮骨形成に及ぼす影響に関する実験的研究. *京府医大誌* 1975;84:89-108.
- 10) 伊藤不二夫, 古家きよ子. 交流高圧電界の生体に与える影響—血圧・内分泌・血清脂質の変化—. *日本温泉気候物理医学会雑誌* 1981;45:6-17.
- 11) 石井権二, 池田博信, 土山道夫, 佐治大介, 辻昭雄, 矢野昌彦, 他. 高圧家庭用電位治療器の効能効果の生理学的機序に関する研究—高血圧自然発症ラットに対する反復電界エクスポージャーの血圧に及ぼす影響—. *新しい医療機器研究* 2000;6:33-43.
- 12) 広藤道男. 人体の負電位負荷に関する実験的ならびに臨床的研究—第5報 動物実験的創傷治癒に及ぼす影響について—. *通信医学* 1969;21:275-84.
- 13) Tanaka A, Kobayashi F, Miyake T. A new anti-inflammatory activity test for corticosteroids. The formalin-filterpaper pellet method. *Endocrinol Japon* 1960;7:357-64.
- 14) 佐藤昭夫. 老化に関する基礎的研究はどこまで進んでいるか. *Medicina* 1995;32:1269-73.
- 15) Koga Y, Sato T, Shirai W, Matumoto I, Koike K, Takahashi S. The stimulative effect of 3,000 volts alternating current on the collagen synthesis of false aging model rats. *J J A Phys M Baln Chin* 1999;62: 95-102.