

# 靱帯損傷、筋損傷に対する治療法の検討

◎外林大輔<sup>1,2)</sup>、◎川畑浩久<sup>1,2)</sup>、根來信也<sup>3)</sup>、葉山直史<sup>1)</sup>、吉川徹<sup>1)</sup>

1) 森ノ宮医療学園専門学校 柔道整復学科 2) 森ノ宮医療大学大学院 保健医療学研究科

3) 公益社団法人 兵庫県柔道整復師会



## 【はじめに】

2008年に「柔道整復学」が発刊されて以来、さまざまな研究機関で「柔道整復学」をさらに発展させるべく取り組みが行われているが、基礎研究を実践している施設は未だ多くは存在しない。その中で2009年には富山大学大学院医学薬学研究部柔道整復（神経・整復）学講座が開講され、柔道整復後療法の効果を科学的に解明すべく研究が行われており、柔道整復術が疼痛の軽減に有効であることが示されつつある。

一方で我々も2009年から兵庫県柔道整復師会からの研究助成を受け、これまで「骨折修復過程」、「関節拘縮の病態」に焦点をあて、組織学および分子生物学的な解析を行い、学術研修会および本学術誌に報告してきた。そのなかで骨折修復に力学的負荷が影響を与えること、関節拘縮は固定期間に依存して病態が進行することなどの研究結果は、これまで行われてきた柔道整復術の正当性を示すためには重要な知見であることから、基礎研究は柔道整復に有益な情報を与えることが示された。すなわちこれは組織学や分子生物学などの基礎研究が柔道整復学にevidenceをもたらし、「科学的根拠に基づいた柔道整復（Evidence based Judothrapy）」を確立する大きな手がかりとなることを示した。さらに今回、本誌ではこれまで報告されていない研究と現在取り組んでいる研究について報告させていただく。

## 【低出力超音波パルス療法は関節拘縮の進展を抑制する】

現在柔道整復師による後療法では物理療法や手技療法、運動療法が行われているが、これらは外傷に限らず、さまざまな運動器の障害においても実施されており、その方法や機器も数多く存在する。しかしながら使用に際しては、どれほどのevidenceを

もっているかについては疑問が残るところである。

そこで昨年度は「低出力超音波パルス療法（以下LIPUSとする）」による治療介入が関節可動域制限に対してどのような影響を与えるかについて検討ならびに報告した<sup>1)</sup>。

この研究はそれまでの病態解析を中心とした研究に対し、実際に臨床現場でもちいられている物理療法の有効性について、マクロな観点からだけでなく、細胞動態や分子メカニズムも含めたミクロな観点での研究であり、これまで柔道整復ではほとんど行われていなかった観点での研究であったが、本研究の結果、従来難治性骨折の治療に用いられてきたLIPUSは滑膜組織の増殖を抑制し、関節可動域制限を抑制する効果を有することが明らかとなった。すなわちLIPUS関節拘縮の予防、治療に有効であることを明確に示すものであった。またこのことはLIPUSが骨のみならず、軟部組織の障害に対しても影響を与え、今後柔道整復の分野で幅広く活用できることを期待させるものであった。

## 【靱帯損傷におけるLIPUSの与える影響】

この結果を受け、今年度はさらに骨以外の組織修復にLIPUSがもたらす影響についても検討した。LIPUSは従来難治性骨折の治療において、骨癒合を促進させる目的で使用されてきた<sup>2,3,4)</sup>が、近年骨折以外のさまざまな組織損傷においてもその有効性が報告されている。とくに関節軟骨や椎間板、腱損傷などにおいて、それぞれの細胞の機能を活性化し、基質産生や成長因子の発現を上昇させることにより組織修復を促進するのである<sup>5)</sup>。これは靱帯損傷においても同様であり、すでにいくつかの報告<sup>6,7,8)</sup>があるが、今回我々はとくに力学的強度と修復の関連について着目し検討を行った。

## 1. 靭帯損傷の修復過程

一般に靭帯損傷は創傷治癒と同様の段階を経て修復される。すなわち炎症期、修復期、リモデリング期の大きく3段階の過程を経て修復されるが、とりわけ修復期においては機能的に修復靭帯の強度も重要となる。そのためには損傷靭帯断端部を可能な限り密着させ、損傷断端部に出現する未分化間葉系細胞を効率よく増殖、分化させる必要がある。

靭帯の損傷直後は断端部周辺に血腫が形成されるが、この部には同時にマクロファージや好中球などが出現する。これらの細胞は炎症を維持するとともに、破壊、壊死された組織細胞を除去し、修復組織が速やかに形成されるように環境を整えているとされている。したがって組織損傷が良好に修復するためには、ある程度これらの細胞が存在、機能する必要がある。さらに形成された血腫内の血小板やマクロファージなどは、血小板遊走因子PDGFや形質転換成長因子TGF- $\beta$ などの成長因子を産生し、いずれ修復を直接担う細胞に分化する未分化間葉系細胞を凝集、増殖させるとされている<sup>9,10,11</sup>。また同時にこれらの細胞は血管内皮成長因子VEGFを産生し、新生血管の形成も促している。すなわち炎症期にはその後の修復にきわめて重要な役割を果たす線維芽細胞、血管内皮細胞への分化を決定づける因子が産生されることから、損傷靭帯を良好に修復させるためには、この時期の分子や細胞の動態や変化を正確に捉え、それらを阻害しないような治療方針を立案する必要がある。

さらに修復期には、損傷部位に凝集した未分化間葉系細胞が周囲組織の環境に応じて線維芽細胞に分化し、靭帯の構造や力学的強度を決定づけるコラーゲンが産生される。修復期の早期に産生されるコラーゲンはIII型コラーゲンである。しかしながらIII型コラーゲンはI型コラーゲンより細いことから、柔軟性のある肉芽組織などにおいては豊富に存在するが、力学的強度の必要な靭帯では十分な強度を維持することには適さない。したがって靭帯が修復し、力学的負荷に対抗できるようにするためにIII型コラーゲンは組織の成熟に伴ってI型コラーゲンに置換される<sup>12,13</sup>。すなわちコラーゲンの質が変化することにより、より強度をもった組織へとリモデリングされるのである。

## 2. 靭帯損傷の修復過程にLIPUSが与える影響

そこで我々はこのような繊細かつ精密な修復過程において、LIPUSがどのような影響を与えるのかについて、組織学的ならびに分子生物学的に検討した。

これまでの報告でラット膝内側側副靭帯はヒトの靭帯修復過程を効率よく再現することがわかっており、ラット膝内側側副靭帯を外科的に切離す靭帯損傷モデルを作成し、解析を行った。すでにこの靭帯損傷モデルをもちいてLIPUSを照射することで損傷から12日目には修復靭帯の力学的強度が増すことが報告されており<sup>6,8</sup>、我々もLIPUS照射7日目では外反ストレスに対する不安定性も軽減することを確認している<sup>14</sup>。しかしこれらの研究は力学的強度についてのみの検討であり、LIPUSの影響について十分なevidenceを示したとは言い難い。そこで今回はLIPUS照射が早期に靭帯の修復過程にどのような影響を与え、力学的強度が増すかを検討するために、LIPUS照射7日目での組織学および分子生物学的検討を行った。

靭帯損傷モデル作成直後からLIPUS照射群、非照射群に分け、照射群ではオステオトロンBRソニック-Pro（伊藤超短波社製）をもちいて、周波数3MHz、出力240mW/cm<sup>2</sup>、照射時間率30%で、1日30分×7日間の条件でLIPUS照射を行った。

その結果、一般的な染色法（ヘマトキシリン・エオジン染色）では両群とも損傷部に肉芽組織を認めたが、LIPUS照射群、非照射群の間に差があるような所見は認められなかった（図1）。

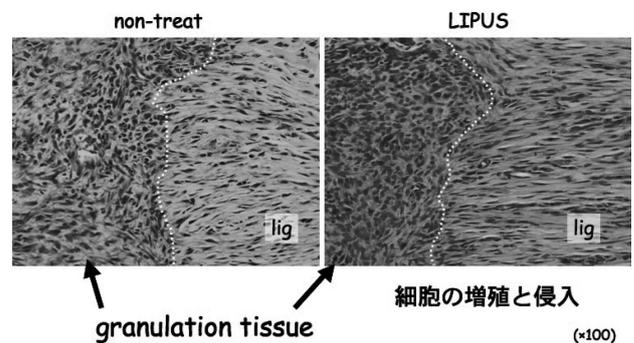


図1. 靭帯損傷後7日目の損傷部の組織像（ヘマトキシリン・エオジン染色）  
右：LIPUS照射群、左：非照射群

そこで次にコラーゲン線維を特異的に染色するPicrosirius Red染色を行ったところ、LIPUS照射群の肉芽組織内により明瞭なコラーゲン線維が確認さ

れた(図2)。

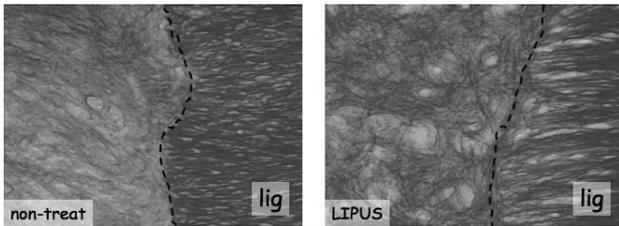


図2. 靭帯損傷後7日目の損傷部のコラーゲン(Picrosirius Red染色)  
右: LIPUS照射群、左: 非照射群

またこれを定量するために分子生物学的手法である定量的PCR (Real Time PCR) 法をもちいてI型コラーゲン、III型コラーゲンのmRNAの発現量を確認したところ、いずれもLIPUS照射群で有意な発現量の増加を認めた(図3)。

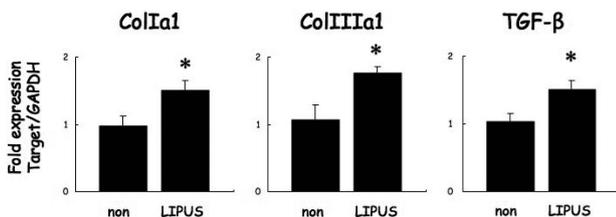


図3. 靭帯損傷後7日目のI型およびIII型コラーゲンの遺伝子発現  
右: I型コラーゲン、中央: III型コラーゲン、左: TGF-β (\* p<0.05)

LIPUSに関しては、これまで実験動物およびヒトにおいて骨折修復を促進することが示されており、そのメカニズムについてもLIPUSによる微小な振動すなわち力学的負荷が直接骨形成細胞に作用し、その機能を向上させることが明らかにされている。またLIPUSは単に骨形成細胞にコラーゲン産生を促進させるだけでなく、コラーゲンの力学的機能を担うコラーゲン架橋形成をも促進させ、コラーゲンの成熟を促すとの報告もある。このことは靭帯損傷の治療においてもきわめて重要であり、靭帯損傷に対しLIPUSをもちいることにより損傷部が生物学的に修復されるのみならず、力学的にも修復されることを示唆している<sup>15)</sup>。さらに従来の超音波療法や培養線維芽細胞に力学的負荷を加えた研究において、力学的刺激は形質転換成長因子TGF-βの発現を上昇させることが報告されている<sup>16,17)</sup>。

TGF-βは炎症や創傷治癒に関与することが知られているが、Leungらはそのメカニズムとして超音

波療法により産生されたTGF-βがマクロファージや線維芽細胞に作用し、コラーゲン合成を促進することで、靭帯修復を促進すると報告している<sup>16)</sup>。岩崎らもアキレス腱損傷モデルラットにLIPUSを照射したところ、線維芽細胞においてTGF-βの発現が上昇することでコラーゲン産生を促進し、腱の強度を高めることを述べている<sup>18)</sup>。

そこで我々もLIPUSが靭帯損傷においてTGF-βの発現に影響を与えるかについて調査してところ、遺伝子レベルでTGF-β発現が有意に上昇することを認めた(図3)。またこれらに加え、創傷治癒にきわめて重要な血管新生についても検討したところ、血管新生を誘導する血管内皮成長因子VEGFの発現がLIPUS照射群で有意に発現が上昇していた(data not shown)。

これらのことからLIPUSは損傷部においてTGF-βの発現を上昇させ、線維芽細胞でコラーゲンの発現量を上昇させること、さらに組織修復に必須である新生血管形成を促すことにより靭帯修復を促進させる作用をもつことが示めされた。

したがって本研究からLIPUSは骨折修復のみならず、靭帯損傷においても修復過程を促進させることから、LIPUSは柔道整復においても有用な物理療法であることが大いに期待させる結果が得られた。

#### 【温熱療法が筋損傷の修復過程に与える影響】

さらに柔道整復師が一般的にもちいるLIPUS以外の物理療法についても、その有効性を再検証し、evidenceを示す必要性がある。

なかでも外傷治療においては、施術開始直後は冷罨法(Icing)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を考える。

そこで温熱療法の有効性について、あらためて文献的に調査してみると、関節や筋損傷の修復を促進することについて臨床的な報告はみられるものの、そのメカニズムについて調査検討されている報告は散見されるのみであった。

ところが最近になって、特に骨格筋の萎縮や損傷に対する温熱療法の有効性について複数の施設から報告されてきている<sup>19,20,21)</sup>。これらの報告による

と温熱療法は循環機能を改善するだけでなく、細胞の代謝活動を活発にし、タンパク合成を促進することや、炎症を抑制することが示されている<sup>22)</sup>。また我々もすでに筋損傷に対する灸刺激が修復過程を促進することを確認している (unpublished date) ことから、従来急性期症状の消退後からおこなわれていた温熱療法が、実際には損傷直後から使用することで組織修復を促進させる作用をもつことが示唆された。しかしこれらの研究は温熱療法の条件、頻度などが異なることから、温熱療法の有効性を示すにはさらなる検証が必要であると考えられる。

そこで温熱療法が筋損傷の修復過程においてどのような影響を与えるのかについて組織学的ならびに分子生物学的に調査検討したので報告する。

## 1. 筋の再生過程

骨格筋の修復・再生についてはこれまで数多くの報告がなされており、とりわけ骨格筋内に存在する筋衛星細胞が修復の中心的な役割を担っていることが知られている<sup>23,24)</sup>。すなわち損傷によりいったん壊死に陥った筋線維にかわって、筋衛星細胞が増殖、分化することであらたな筋線維を形成するのである。これについては詳細に報告されており、筋が再生するにはいくつかの条件が必要である。まず損傷部においては、壊死に陥った筋線維を貪食するためにマクロファージが侵入してくるが、これは単に壊死組織を貪食するためだけではなく、筋芽細胞の増殖や分化を促進するサイトカインIL-6を発現したり、また癒痕組織の原因となる過剰なコラーゲン産生を抑制することが報告されている<sup>25,26,27)</sup>。またマクロファージが筋芽細胞の増殖を直接促進する作用をもつことも報告されている<sup>28)</sup>。

次に筋衛星細胞が筋芽細胞の分化するための環境として、基底膜の存在が必要である。基底膜はいわゆる筋線維を包む筋内膜であり、通常はこの基底膜と細胞膜の間に筋衛星細胞が存在しているが、いったん損傷が起こり、筋線維が壊死に陥り、マクロファージによる貪食を受けた後、筋衛星細胞は残存した基底膜内で増殖、分化し、筋芽細胞に分化する。この筋芽細胞はやがて融合し筋管細胞となり、神経支配を受けて成熟した筋線維となる<sup>29,30)</sup>。

したがって筋修復においては筋衛星細胞の増殖・

分化をいかに効率よく引き出すかが鍵となる。

## 【筋損傷に対する温熱療法の効果】

一般に筋損傷直後はRICE処置として安静、冷却 (Icing)、圧迫、挙上を行うが、近年これについてきわめて興味深い報告がなされた<sup>31)</sup>。この論文で示されたのは、ラット筋損傷直後にIcingを施行すると筋修復が遅延し、癒痕組織も長期間残存するという結果であった。すなわちこれまで我々が疑うこともなく使用してきたIcingは実際には筋損傷の修復に悪影響を与えるという結果が示唆された。このことは筋損傷の治療に深く携わってきた柔道整復においても衝撃的な結果であった。

そこで我々は筋損傷においてIcingが悪影響をもたらすのであれば、逆にこれまで急性期にはもちいられた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か調査すべく「筋損傷に対する温熱療法の効果」という研究を行った。

## 1. 筋損傷モデルおよび作成法

対象として8週齢のSDラット雄の前脛骨筋を使用し、筋損傷モデルを作成した。筋損傷についてはさまざまな方法が報告されており、一般には物理的損傷による筋損傷モデルが最も適切と考えられているが、損傷の程度、範囲が一定しないことから、今回は一定の損傷状態を効率よく再現できる薬剤による損傷モデルを作成した。0.5%塩酸ブピバカインを直視下に前脛骨筋に注入し、筋損傷モデルを作成し、その後42℃の温浴による温熱療法を行う群 (Heat群) (42℃×30min/day×4 or 7 day)、行わない群 (Non Heat群) に分けて、組織学的ならびに分子生物学的に検討を行った。

## 2. 組織学的評価ならびに分子動態の解析

筋損傷モデル作成後4、7日後に前脛骨筋を採取し、調査解析を行った。

まず組織損傷ならびに修復の状況を評価するために、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い検討したところ、損傷後7日目において炎症細胞の存在は両群で大きな差はみられないものの、7日目でわずかながらHeat群で筋芽細胞と思われる細胞が確認でき、より修復が進行している様子が観察された。

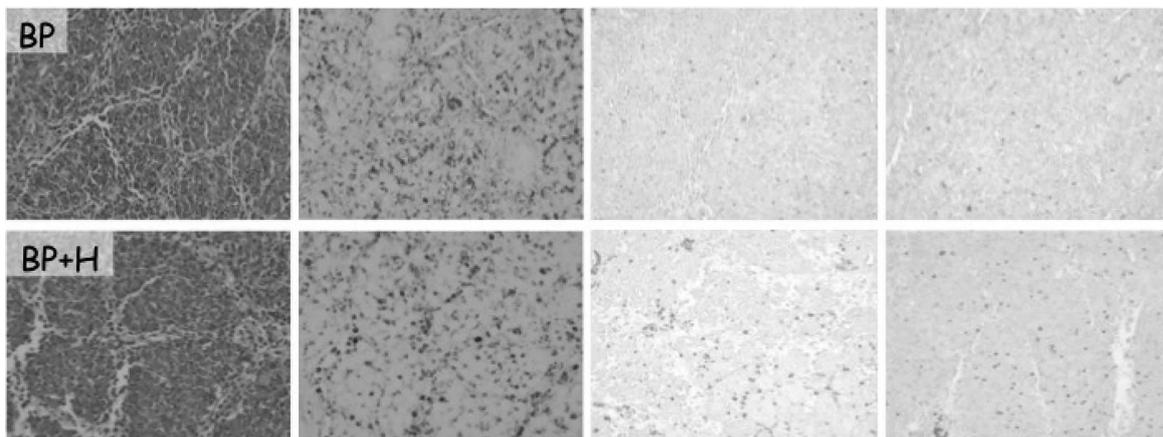


図4. 損傷後4日目の組織学的変化

上段：Non Heat群、下段：Heat群

最右段：HE染色、右中段：マクロファージに対する免疫組織化学的染色(抗RM-4抗体)

左中段：筋衛生細胞に対する免疫組織化学的染色(抗Pax7抗体)

最左段：筋芽細胞の分化マーカーに対する免疫組織化学的染色(抗MyoD抗体)

そこでマクロファージおよび筋衛生細胞の時間的・空間的分布の変化を免疫組織化学的染色にて検討したところ、炎症細胞であるマクロファージ (RM-4 陽性細胞) の分布は4、7日と大きな差は認められなかったのに対し、筋衛星細胞の活性化を促進する転写因子Pax 7に対する抗体と筋芽細胞の分化を促進する転写因子に対するMyoD抗体をもちいた免疫染色では、損傷後4日目においてHeat群でPax 7陽性細胞、MyoD陽性細胞が明らかに多くみられた(図4)。すなわち温熱刺激により炎症は増悪することはなかったが、筋衛生細胞の活性化や分化が促進していることが示唆された。

また筋修復過程における種々の分子動態を解析するために、採取した組織からtotal RNAを抽出・調整し、炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ 、IL-6、筋衛星細胞の活性化を示すPax 7、筋芽細胞の分化を促進する転写因子MyoDの遺伝子発現状況を定量的PCR (Real time PCR) で解析したところ、IL-1 $\beta$ 、IL-6の発現量については両群で有意な差はみられなかったが、Pax 7、MyoDはHeat群で有意に発現の上昇がみられた(図5)。これは組織学的な変化とも一致しており、温熱刺激は炎症を増悪させることなく、筋衛生細胞の活性化や分化を促進する作用をもつことが示された。

したがって今回の結果とIcingが筋損傷の修復を遅延させるという報告をあわせて考えると、より確実かつ良好な治癒を得るためにも、長期間継続的に

Icingを行うのではなく、できるだけ早期から温熱療法を行うことが有効であると考えられる。

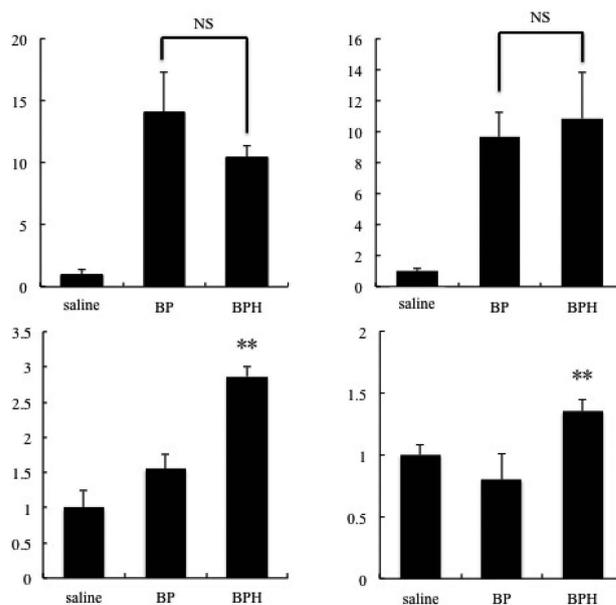


図5. 損傷後4日目の各遺伝子の発現状況

右上：IL-1 $\beta$ 、左上：IL-6、右下：Pax7、  
左下：MyoD

(\*\* p<0.01 vs saline、BP)

### 【まとめ】

今回の研究では、柔道整復師が日常きわめてよく遭遇する靭帯損傷に対して、本来骨折治療に使用される低出力超音波パルスLIPUSが修復過程を促進することが明らかとなった。これまで靭帯損傷は損傷靭帯が修復するまで、安静固定を中心としたいわゆる自然治癒力に依存してきたが、今後は骨折のみな

らず靭帯損傷に対してもevidenceをもって積極的保存療法を行っていくことができることから、本研究においてこのことを明らかにしたことは柔道整復にとっても意義深いと考える。

またあわせて従来Icingが積極的に行われてきた筋損傷において、温熱療法が修復過程を促進することを明らかにした。これについては本筋損傷モデルでは出血が生じないため、外傷による筋損傷とは異なる点があることやIcingとの比較も行っていないことから、今後さらなる検討を加えていく必要があるが、筋損傷に対する温熱療法のもつ作用を明らかにしたことは、LIPUS同様柔道整復分野において軟部組織損傷の治療法に一定の指針を与えるという点できわめて意義深いことであると考ええる。

今後もEvidence based Judo therapyの確立の一助となるべく、研究を継続していきたいと考える。

#### 【謝 辞】

本研究を進めるにあたり、公益社団法人兵庫県柔道整復師会から研究事業助成をいただきましたことにつきまして心より感謝申し上げます。

#### 【参考文献】

- 1) 外林大輔,川畑浩久,吉川徹,穴田夏希,細田明菜,根來信也,青木元邦: 関節拘縮における滑膜の分子生物学的変化とLIPUSによる治療介入の検討. 兵庫学術誌38号: pp87-94, 2013.
- 2) Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. Arch Orthop Trauma Surg. 1983; 101(3):153-9.
- 3) Pilla AA, Mont MA, Nasser PR, Khan SA, Figueiredo M, Kaufman JJ, Siffert RS. Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. J Orthop Trauma. 1990;4(3):246-53.
- 4) Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. J Bone Joint Surg Am. 1994 Jan;76(1):26-34.
- 5) Khanna A, Nelmes RT, Gougoulias N, Maffulli N, Gray J. The effects of LIPUS on soft-tissue healing: a review of literature. Br Med Bull. 2009;89:169-82.
- 6) Takakura Y, Matsui N, Yoshiya S, Fujioka H, Muratsu H, Tsunoda M, Kurosaka M. Low-intensity pulsed ultrasound enhances early healing of medial collateral ligament injuries in rats. J Ultrasound Med. 2002 Mar;21(3):283-8.
- 7) Warden SJ, Avin KG, Beck EM, DeWolf ME, Hagemeyer MA, Martin KM. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates and a nonsteroidal anti-inflammatory drug delays knee ligament healing. Am J Sports Med. 2006 Jul;34(7):1094-102.
- 8) Sparrow KJ, Finucane SD, Owen JR, Wayne JS. The effects of low-intensity ultrasound on medial collateral ligament healing in the rabbit model. Am J Sports Med. 2005 Jul;33(7):1048-56.
- 9) Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. Sports Med. 2003;33(5):381-94.
- 10) Boykiw R, Sciore P, Reno C, Marchuk L, Frank CB, Hart DA. Altered levels of extracellular matrix molecule mRNA in healing rabbit ligaments. Matrix Biol. 1998 Oct;17(5):371-8.
- 11) Marui T, Niyibizi C, Georgescu HI, Cao M, Kavalkovich KW, Levine RE, Woo SL. Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. J Orthop Res. 1997 Jan;15(1):18-23.
- 12) Kim SG, Akaike T, Sasagawa T, Atomi Y, Kurosawa H. Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. Cell Struct Funct. 2002 Jun;27(3):139-44.
- 13) 遠山晴一,安田和則. 靭帯の修復メカニズム. 整形災害外科. 2005. 48: 417-422.
- 14) 伊黒浩二,外林大輔,川畑浩久,葉山直史,吉川徹,澤田規,永瀬佳孝,中村辰三,廣橋賢次. 低出力超音波刺激 (low intensity pulsed ultrasound) のラット靭帯修復モデルにおける影響. 日本柔道整復接骨医学会. 2009. 17巻5号: 413.
- 15) 斉藤充,丸毛啓史. 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. 2008. 57-64: 株式会社メディカルレ

- 16) Leung MC, Ng GY, Yip KK. Therapeutic ultrasound enhances medial collateral ligament repair in rats. *Ultrasound Med Biol*. 2006 Mar;32(3):449-52.
- 17) Kim SG, Akaike T, Sasagaw T, Atomi Y, Kurosawa H. Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Struct Funct*. 2002 Jun;27(3):139-44.
- 18) 岩崎剛, 正岡利紀, 朝日盛也, 深田栄一, 山本謙吾. 低出力超音波刺激によるアキレス腱損傷の治癒効果. *東京医科大学雑誌*. 2007 65 (2): 178-186.
- 19) Kojima A, Goto K, Morioka S, Naito T, Akema T, Fujiya H, Sugiura T, Ohira Y, Beppu M, Aoki H, Yoshioka T. Heat stress facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in rats. *J Orthop Sci*. 2007 Jan;12(1):74-82.
- 20) Oishi Y, Hayashida M, Tsukiashi S, Taniguchi K, Kami K, Roy RR, Ohira Y. Heat stress increases myonuclear number and fiber size via satellite cell activation in rat regenerating soleus fibers. *J Appl Physiol* (1985). 2009 Nov;107(5):1612-21.
- 21) Takeuchi K, Hatade T, Wakamiya S, Fujita N, Arakawa T, Miki A. Heat stress promotes skeletal muscle regeneration after crush injury in rats. *Acta Histochem*. 2013 Sep 23. [Epub ahead of print]
- 22) 中野治郎, 中願寺風香, 片岡英樹. 温熱療法の生理学的効果. *理学療法*. 2012. 29 (9) : 978-986.
- 23) Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem*. 2002 May;50(5):589-610.
- 24) Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004 Jan;84(1):209-38.
- 25) Zhang C, Li Y, Wu Y, Wang L, Wang X, Du J. 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*. 2013 Jan 18;288(3):1489-99.
- 26) Summan M, Warren GL, Mercer RR, Chapman R, Hulderman T, Van Rooijen N, Simeonova PP. Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Jun;290(6):R1488-1495.
- 27) Novak ML, Weinheimer-Haus EM, Koh TJ. Macrophage Activation and Skeletal Muscle Healing Following Traumatic Injury. *J Pathol*. 2013 Nov 19. [Epub ahead of print].
- 28) Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007 May 14;204(5):1057-69.
- 29) 埜中征哉, 神裕子. 筋肉の再生と修復機構 - 治療をめざして -. *実験医学* 2000.18(4).444-448.
- 30) 埜中征哉. 筋肉の再生機構. *医学のあゆみ*. 2001.199(13).1045-1048.
- 31) Takagi R, Fujita N, Arakawa T, Kawada S, Ishii N, Miki A. Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *J Appl Physiol* (1985). 2011 Feb;110(2):382-8.

