

# 白血病モデルラットの骨格筋に対する 低出力レーザーの影響

上村愛実・山木理恵

本研究では、白血病モデルラットを作成し、その骨格筋に対する低出力レーザーの影響について検討した。実験動物には8週齢のWistar系雄性ラットを21匹用い、これらを1)対照群(n=6)、2)白血病を惹起させる白血病群(n=15)に振り分けた。白血病群には8週齢時からN-ニトロソ-Nメチル尿素を隔週6回投与して白血病を発症させた後、左側の前脛骨筋に対してレーザー照射を2週間行った。レーザー照射期間の前後には筋出力の測定を行い、その後、前脛骨筋を採取してミトコンドリア活性の測定と組織学的解析を行った。結果、両群においてレーザー照射による筋出力の変化は認められなかった。一方、白血病群においては、照射側前脛骨筋のミトコンドリア活性と筋線維直径が非照射側のそれと比べて有意に高値を示した。これらの結果から、白血病モデルラットの骨格筋に対するレーザー照射はミトコンドリアを活性化し、筋ボリュームを維持させることが示された。ただ、レーザー照射のみでは筋出力の改善には至っておらず、ミトコンドリア活性および筋線維直径の結果と一致しなかった。この点に関しては、白血病モデルラットの筋力低下にはミトコンドリア活性以外の要因が関わっている可能性があると考えられ、今後検討を加える必要がある。

## はじめに

血液のがんといわれている白血病の治療法は、化学療法や放射線療法、骨髄移植が主である<sup>1)</sup>。それらの治療法の進歩により近年では生存期間が延長されつつある。それに伴い、入院期間も長期化してきており、そのため入院中のリハビリテーションは非常に重要になってくる<sup>1)</sup>。しかし、血液がん患者の場合、がん自体の身体症状に化学療法や放射線療法の副作用が加わって低栄養状態に陥りやすく、骨格筋に対するがん悪液質の影響は深刻となり<sup>2)</sup>、リハビリテーションの効果が得られにくくなる。実際に、血液がん患者は通常のリハビリテーションを行っても約40%の患者では膝伸展筋力の低下を防げていなかったことが報告されている<sup>3)</sup>。このように、血液がん患者のリハビリテーションにおいては、筋力の維持または改善が大きな課題となっている。

がん悪液質による筋力低下または筋萎縮は慢性炎症、代謝異常、低栄養などによって進行す

ることが古くから知られているが、そのメカニズムにおいては、ミトコンドリアの機能異常が深く関わっていることが最近の研究で明らかにされつつある。例えば、Tothら<sup>4)</sup>は、健常者とがん患者の骨格筋を比較したところ、大腿四頭筋の筋線維面積はほぼ変わらないにもかかわらず、筋出力はがん患者の方が有意に低く、その原因としてはがん悪液質に伴うミトコンドリア活性の低下が関係していることを報告している。すなわち、がん悪液質によるミトコンドリアの機能異常が生じると筋ボリュームの減少がなくても筋力が有意に低下する可能性がある。これらの特徴はがん臓器の種類には依存しないと考えられ、増田ら<sup>5)</sup>の報告では白血病モデルラットの骨格筋においても筋萎縮とミトコンドリア活性の低下が認められている。したがって、白血病患者に対するリハビリテーションにおいてはミトコンドリア活性の低下に目を向けてアプローチを考えることが必要であると思われる。

ミトコンドリアを活性化する可能性があるリハビ

リテーションの手段としては、高強度運動<sup>6)</sup>、電気刺激<sup>7)</sup>、低出力レーザー<sup>8)</sup>があげられる。ここで、骨髄移植を行う白血病患者のケースを想定すると、移植直前から数週間は血小板が極端に減少して出血傾向が強くなる。また、白血球が極端に減少すると感染リスクが高まり、加えて移植に対する免疫反応が起きるため多くのケースで皮膚に炎症などの病変が発生する。このような状況に陥った患者においては、強い筋収縮は禁忌となり、感染対策を徹底し、皮膚への刺激を避けなければならない<sup>9)</sup>。つまり、ミトコンドリアを活性化するための高強度運動は筋内出血を起こすリスクがあり、また、電気刺激は皮膚に刺激を与えるとともに電極パッドの接触により感染リスクが高まる。これに対して、低出力レーザーは骨髄移植した血液がん患者に適用できる可能性がある。すなわち、低出力レーザーは筋収縮を引き起こさないため出血のリスクはなく、また、皮膚に接触せずレーザー照射することも可能であるため感染を防げる。加えて、低出力レーザーは皮膚炎などの皮膚疾患にも適応できるため、皮膚病変を呈する白血病患者に対しても実施できる<sup>10)</sup>。つまり、低出力レーザーは白血病患者の骨格筋に対する治療手段として利用できる可能性がある。しかしながら、がん悪液質に伴うミトコンドリアの機能異常と筋力低下、筋萎縮に対する低出力レーザーの効果を検討した報告は見あたらない。

そこで、本研究の目的は、白血病モデルラットの骨格筋に対して低出力レーザーを照射し、ミトコンドリアの活性と筋力および筋萎縮に対する影響を検証することとした。

## 材料と方法

### 1. 実験動物

実験動物には8週齢のWistar系雄性ラット21匹を用い、これらは無作為に1) N-ニトロソ-Nメチル尿素(以下, NMU)を投与し、白血病を惹起させる群(以下, 白血病群; n=15), 2) 白血病の疑似処置として生理食塩水を投与する群(以下, 対照群; n=6)の2群に振り分けた。なお、今回の実験は長崎大学が定める動物実験指針に準じ、長崎大学先端生命科学研究所支援センター動物実験施設で実施した。

### 2. 白血病モデルラットの作成方法

白血病モデルラットの作成方法は、Tsaiら<sup>11)</sup>の方法を参考にし、白血病群の各ラットにNMU(35 mg/kg)を隔週6回、尾静脈から投与した。対照群に対しては疑似処置として上記と同様の方法で生理食塩水を静脈投与した。すべてのラットには餌と水を自由に与えた。

### 3. 実験プロトコル

先行研究<sup>11-13)</sup>の結果を参考にすると、本モデルは8週齢にNMU投与開始した後、約25週齢から発症し始め、28~29週齢付近から症状が悪化、死亡していくと予想される。そこで、今回はレーザー照射する期間を32週齢から34週齢の2週間とした。また、白血病の病態の推移を確認するため、NMU投与前(8週齢時)および22, 29, 31, 32, 34週齢時に体重測定し、採血により白血球数および血球沈降速度を測定した(図1)。

### 4. 低出力レーザーの照射方法

32週齢から34週齢の2週間では、対照群および白血病群のすべてのラットの左側前脛骨筋に対してレーザー照射を行った。今回の実験で

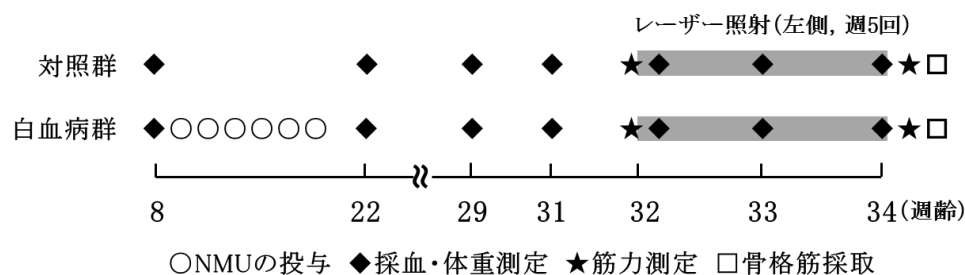


図1 実験プロトコル

は Ga-Al-As レーザー治療器(MLD-2001, 持田製薬社製, 830nm, 0.3cm<sup>2</sup>)を使用し, 出力は 60mW での持続照射, 照射時間は合計 10 分と設定した. なお, 1 スポットに照射する時間は 10 秒とし, 前脛骨筋範囲全体にレーザーを照射した(図 2). なお, 低出力レーザーの透過率に関しては予備実験を行い, ラット皮膚を透過するのは約 20mW, 前脛骨筋深部に達するのは約 5mW であることを確認した.



図 2 レーザー照射の様子

#### 4. 血液学的解析

NMU 投与前(8 週齢時)および 22, 29, 31, 32, 34 週齢時に抗凝固剤添加にて尾静脈から採血した. そして, チュルク液を添加して赤血球のみを破壊した後, ビルケルチュルク式血球計算盤と顕微鏡を用いて白血球をカウントした. また, 同日にガラス毛細管を使用して遠心分離(400ppm, 5 分)を実施した後, 血球沈降速度を測定し, 炎症の指標とした. 加えて, 血液をスライドガラスに添加し, ギムザ染色を行った後に血液学的病理所見を検鏡した.

#### 5. 最大筋出力の測定方法

電気刺激を用いて前脛骨筋の最大等尺性収縮力を測定した. 具体的には, 三種混合麻酔薬の腹腔内投与によって麻酔した後, ラットを背臥位, 膝関節完全伸展位, 足関節最大底屈位で固定し, 足背部の上からプッシュプルゲージ(アイコーエンジニアリング社, RX)のアタッチメントをあてた(図 3). 次に, 下腿前面に対して経皮的電気刺激(伊藤超短波社, トリオ 300; 周波数 100Hz, パルス幅 250 $\mu$ s, 刺激時間 2sec)を行い前脛骨筋を収縮させ, 足関節背屈運動を出現さ

せた. この時, 足部はプッシュプルゲージで押さえられているため実際には関節運動は生じず, プッシュプルゲージに筋出力(足関節の背屈力)の数値が表示される. そして, 電気強度(mA)を上昇させていくと, それに比例して筋出力も上昇していくが, ある一定の値でプラトーとなる. この時の値を筋出力として採用した.

筋出力の測定は, レーザー照射開始前の 32 週齢時, およびレーザー照射終了後の 34 週齢時に実施した. 34 週齢時の最大筋出力を測定した後は, 麻酔下で前脛骨筋を採取し, 筋湿重量を測定した後, 以下に述べる解析を行った.



図 3 筋出力測定方法

#### 6. ミトコンドリア活性の解析方法

ミトコンドリア活性の解析は生化学的方法にて行った. 具体的には, 筋試料の一部(前脛骨筋の遠位 1/3 外側, 白筋部 50 mg)を細分してホモジナイズし, 遠心分離(12000ppm $\times$ 15min)と上清回収を 2 回繰り返した後, 市販のキット(Cayman Chemical 社, MitoCheck<sup>®</sup> Complex I Activity Assay Kit)を用いてミトコンドリア活性を測定した. これは, 試料に NADH を加えた時に起きる吸光度の経時変化からミトコンドリアの活性を測定するものである(計測時間 15min, Interval 30sec, 波長 340nm). なお, 上記の作業は筋採取から 4 時間以内に行った.

#### 7. 組織学的検索

筋試料の一部はトランドガムに包埋し, 液体窒素で冷却したイソペンタン液内(-80 $^{\circ}$ C)で急速凍結した. そして, クリオスタット(Leica 社製)を用いて連続横断切片(7 $\mu$ m)

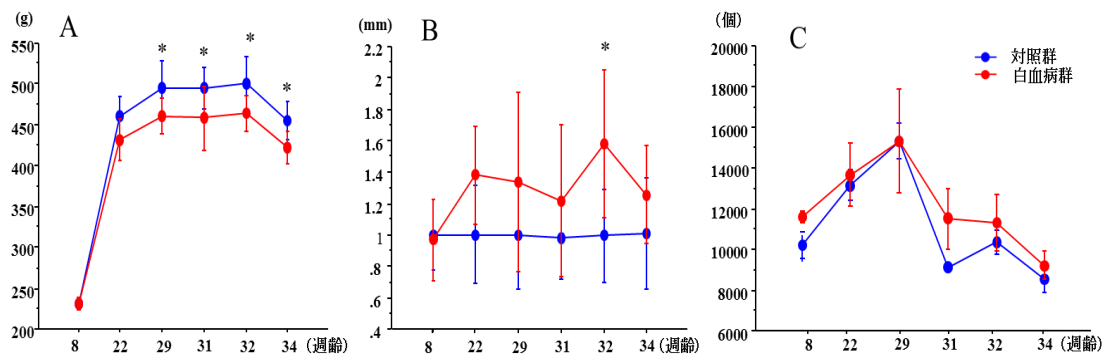


図4 体重(A)・血球沈降速度(B)・白血球数(C)

\*: 対照群との比較 (p<0.05)

を作製した。連続横断にはヘマトキシリン・エオジン(以下 H&E)染色を施して筋線維壊死などの筋病理学的所見の有無を確認した。

次に、筋線維タイプを分別するため連続横断切片にミオシン ATPase 染色(ph4.3)を施し、筋線維タイプの分別を行った。そして、顕微鏡用デジタルカメラで前脛骨筋の浅部を撮影(100倍)した後、画像解析ソフト(Image J)を用いてタイプ II b 線維の筋線維直径を1筋あたり100本以上計測した。なお、今回は低出力レーザーの透過率を考慮し、前脛骨筋の浅部のみを解析対象とした。前脛骨筋の浅部はタイプ II b 線維のみで構成される白筋・速筋部である。

#### 8. 統計学的処理

統計学的処理としては、群間比較では対応のあるt検定、群内比較では対応のないt検定を適用し、有意水準は5%未満とした。

#### 結果

##### 1. 体重・血球沈降速度・白血球数の推移

白血病群は、レーザー照射を開始する32週齢時までに9匹が病変により死亡したため、残り6匹を対象とした。体重はNMU投与以降、対照群に比べ白血病群が有意に低値を示した(図4-A)。血球沈降速度は32週齢に一時的に対照群に比べ白血病群が高値を示した(図4-B)。白血

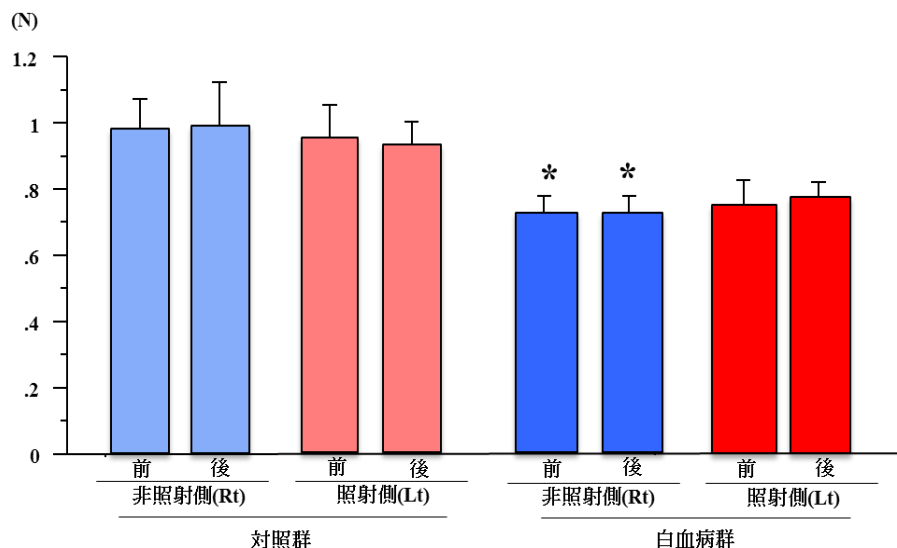


図5 最大筋出力

\*: 対照群の非照射側との比較 (p<0.05)

球数は常に高値を示したが、増加または減少する時期とその程度に個体間のばらつきが大きく、統計学的な有意差には至らなかった(図 4-C)。ギムザ染色による検鏡の結果、白血病群のすべてのラットにおいて白血病発症時に見られる白血球が観察された。

## 2. 最大筋出力

レーザー照射前の 32 週齢時では、非照射側・照射側ともに対照群に比べ白血病群の筋出力が有意に低値を示した。次に、レーザー照射後の 34 週齢時に再び筋出力を測定して比較すると、両群とも照射側と非照射側の間に有意差は認められなかった。また、群内でレーザー照射前と照射後を比較しても、有意な変化は認められなかった(図 5)。

## 3. ミトコンドリアの活性

レーザー照射終了後、ミトコンドリア活性を測定したところ、白血病群の非照射側は対照群のそれに比べて有意に低値を示した。また、白血病群の群内では、非照射側と比べ照射側が有意に高値を示した(図 6)。

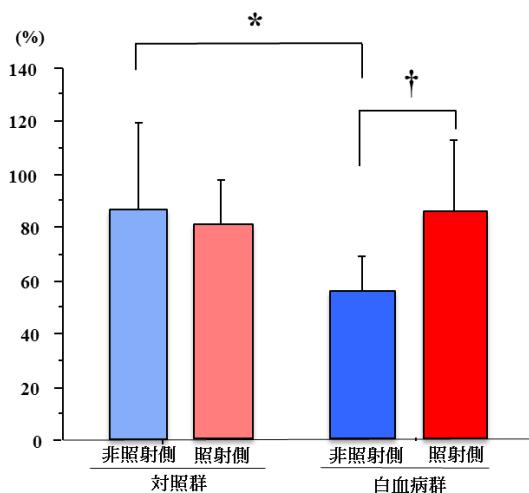


図 6 ミトコンドリア活性

\*: 対照群の非照射側との比較 ( $p < 0.05$ )

†: 白血病群の非照射側との比較 ( $p < 0.05$ )

## 5. 筋湿重量・筋病理学的所見

筋湿重量に関しては対照群、白血病群ともに非照射側、照射側の間に有意差は認められな

った(図 7)。また、H&E 染色後の検鏡の結果、筋損傷などの筋病理学的所見は認められなかった(図 8-A~D)。ミオシン ATPase 染色の結果、筋線維タイプの分布に群間、群内に違いは認められなかった(図 8-E~H)。

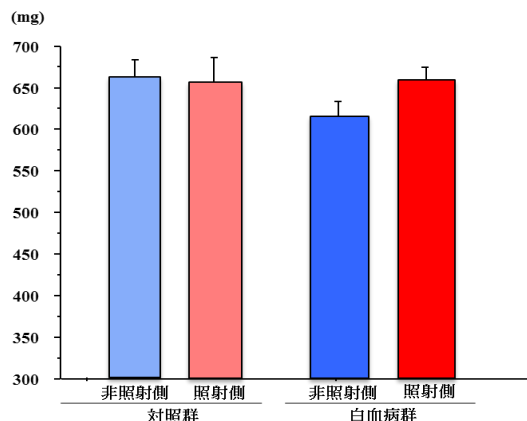


図 7 筋湿重量

## 6. 筋線維直径

白血病群の非照射側は、対照群のそれに比べて有意に低値を示した。また、白血病群の群内では、非照射側に比べ照射側が有意に高値を示した(図 9)。

## 考察

本研究では、白血病モデルラットを用い、白血病の骨格筋に対する低出力レーザーの影響を検討した。今回作成したすべての白血病モデルラットにおいて体重の減少が見られ、一時的ではあるものの炎症症状が認められた。また、血液学的解析にて白血球も観察された。ただ、増田ら<sup>5)</sup>の先行研究と比較すると、今回作成したモデルラットの体重の減少や炎症の程度は軽度であった。筋線維直径を見ても、白血病群における萎縮率は低い。これは、レーザー照射を開始するまでにラット 9 匹が死亡し、結果、実験対象となったのは死亡しなかった 6 匹のモデルラットであり、それらの症状は軽度であったと思われる。一方、骨格筋を解析した結果、白血病群のミトコンドリア活性、筋線維直径は対照群に比べて有意に低値を示した。また、レーザー照射前の白血

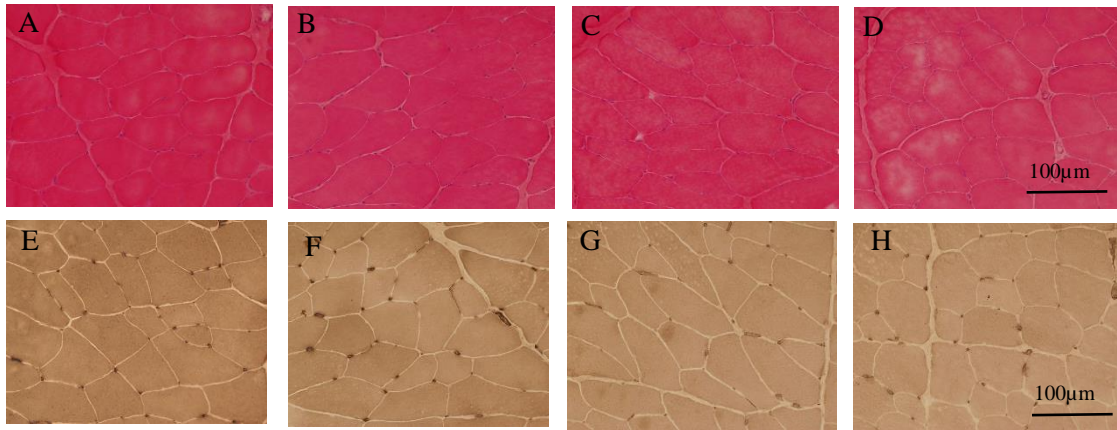


図8 H&E染色とミオシン ATPase 染色の結果

上段は H&E 染色 (A~D), 下段はミオシン ATPase 染色 (E~H) の結果を示す. A, E: 対照群の非照射側. B, F: 対照群の照射側. C, G: 白血病群の非照射側. D, H: 白血病群の照射側.

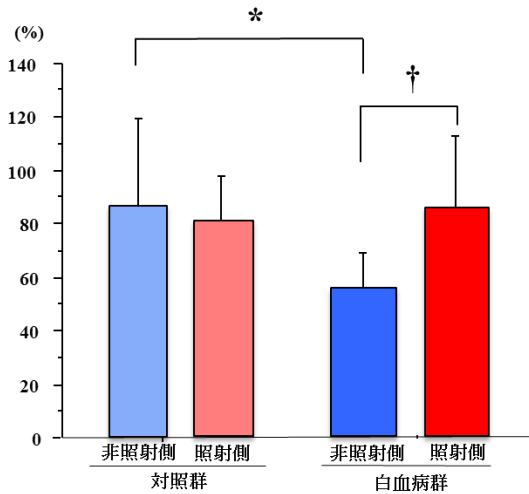


図9 筋線維直径

\*: 対照群の非照射側との比較 ( $p < 0.05$ )

†: 白血病群の非照射側との比較 ( $p < 0.05$ )

病群の前脛骨筋の最大筋出力は対照群に比べて有意に低値を示していた。つまり、がん悪液質にさらされた白血病群の骨格筋には、ミトコンドリアの機能異常が生じ、それに伴い筋萎縮、筋力低下が進行していたことが示唆された。したがって、白血病群の6匹の白血病モデルラットは、症状は軽度であったものの、本実験の対象としての妥当性は得られていると考える。

次に、がん悪液質の影響を受けた骨格筋にはミトコンドリアの機能異常が生じ、それに対して低出力レーザーを照射することでミトコンドリア活性が上昇し、それに伴い筋力低下、筋萎縮の改善

も見込めるという仮説のもと、その検証を行った。結果、2週間の低出力レーザー照射を行った白血病群の前脛骨筋においては、ミトコンドリア活性の上昇と筋萎縮の改善が認められた。これは、低出力レーザー照射がミトコンドリア活性を上昇させてがん悪液質の影響を打ち消し、その結果として筋萎縮が回復したものと推測できる。しかしながら、最大筋出力は予想を反して改善せず、ミトコンドリア活性および筋線維直径の結果と一致しなかった。その原因としては2つの可能性が考えられる。第1に、がん悪液質の影響を受けた骨格筋では筋ボリュームと筋出力が相関しないことがあげられる。先行研究によると、がん患者の筋線維には収縮機構の崩壊が認められ、筋線維直径は変わらなくても筋張力はおよそ1/6に低下していたとの報告がある<sup>14)</sup>。つまり、今回の研究において筋出力が向上しなかった理由として筋線維構造の崩壊により筋収縮機能が低下し、筋張力が十分に発揮できなかった可能性がある。そのため、今後筋線維の微細構造についても検討していく必要がある。第2の可能性は、筋出力測定方法の感度の問題である。筋出力を正確に測定するためには、骨格筋を摘出した後、マグヌス管内の酸素供給環境で電気刺激を行い、最大単収縮張力と最大強縮張力を測定する必要がある<sup>15)</sup>。今回はレーザー照射前後の最大筋出力を比較するため *in Vivo* で測定を行っており、測定誤差が大きかった可能性がある。この点は再検

討の余地があり、今後の課題である。

筋出力に関して不明な点を残したものの低出力レーザー照射によりミトコンドリアを活性化し、筋ボリュームを維持することが可能であることは示された。Vieira ら<sup>16)</sup>の報告によると、健康人に対して筋トレーニングと低出力レーザーを併用すれば最大筋出力および筋持久力が有意に向上したとされている。したがって、白血病患者においても、筋力増強が実施困難な期間は低出力レーザー照射にてミトコンドリア活性を保ち、骨格筋の機能低下を防ぎ、症状の回復に合わせて運動療法を取り入れていけば、効率的に筋力増強効果が得られ、ADL の向上につながるのではないかと期待される。

以上のことから、白血病モデルラットの骨格筋に対する低出力レーザー照射は、ミトコンドリアの機能障害を改善させ、筋ボリュームを維持させる効果があると思われた。ただ、今回の白血病患者においては個体数が6匹と少なく、症状にばらつきが大きかったため、統計学的解析に限界がある。また、今回は筋出力を測定したが、ミトコンド

リア活性は筋持久力にも深く関連するといわれており<sup>8)</sup>、その点の検討も必要である。冒頭に述べた通り、低出力レーザーは感染リスクを避け、皮膚への刺激も避けることが可能であることから白血病患者に対する理学療法としては有用と思われる。また、一般的な低出力レーザー治療器の出力では透過性が不足し骨格筋には届かないが、近年では骨格筋を治療対象とした高出力のレーザー治療器も販売されている。したがって、本研究の仮説を臨床応用できる可能性は十分にあると考えられ、今後の報告が待たれる。

## 謝辞

今回の実験において、ご指導、ご協力をいただきました。長崎大学大学院医歯薬学総合研究科運動障害リハビリテーション学研究室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 中野治郎, 石井 瞬: 化学療法・放射線療法実施中のがん患者に対する理学療法. 理学療法 MOOK21 がんの理学療法, 井上順一郎・神津 玲(編). 三輪書店, 東京, 2017, pp.106-114.
- 2) Nakano J, Ishii S, et al.: Factors affecting muscle strength in cancer patients receiving chemotherapy. *J Nov Physiother Rehabil.* 2017; 1: 56-66.
- 3) 中野治郎, 石井 瞬, 他: 化学療法実施中に低強度の運動療法を行った造血器悪性腫瘍患者の運動機能, 倦怠感, 精神症状の変化. *Palliative Care Research.* 2017; 12: 277-284.
- 4) Toth M, Miller MS, et al.: Molecular mechanisms underlying skeletal muscle weakness in human cancer: reduced myosin-actin cross-bridge formation and kinetics. *J Appl Physiol.* 2013; 114: 858-868.
- 5) 増田彩香, 村田千晶: 白血病モデルラットのヒラメ筋における形態学および組織化学的变化. 卒業研究論文集. 2016; 12: 56-63.
- 6) 橋本健志: 運動によるミトコンドリア活性化ー乳酸の役割ー. *日本抗加齢医学会雑誌.* 2015; 11: 42-50.
- 7) Zampieri S, Mammucari C, et al.: Physical Exercise in aging human skeletal muscle increases mitochondrial calcium uniporter expression levels and affects mitochondria dynamics. *Physiol Rep.* 2016; 4: 1-15.
- 8) Silveira P, Sliva L, et al.: Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 95: 89-92.
- 9) 辻 哲也: がんのリハビリテーション Q&A(第1版). 中外医学社, 東京, 2015, pp. 74-76.

- 10) 森田秀樹:皮膚科領域における低出力レーザー治療. 日本レーザー医学会誌. 2007;27:285-288.
- 11) Tsai TC, Huang HP, et al.: An anthocyanin-rich extract from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus N-nitrosomethylurea-induced leukemia in rats. *J Agric Food Chem.* 2014; 62: 1572-1580.
- 12) 平林容子, 井上 達:化学発がんモデル. モデル動物利用マニュアルー疾患モデルの作成と利用(がん). 小幡裕一・他(監修), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 2012, pp. 445-459
- 13) Chang YC, Hsu JD, et al.: High incidence of acute promyelocytic leukemia specifically induced by N-nitroso-N-methylurea (NMU) in Sprague-Dawley rats. *Arch Toxicol.* 2012; 86: 315-327.
- 14) Banduseela V, Ochala J, et al.: Muscle Paralysis and Myosin Loss in a Patient with Cancer Cachexia. *Acta Myol.* 2007; 26: 136-144.
- 15) 沖 貞明, 積山和加子, 他:廃用性筋萎縮に対する筋伸張位短縮位交互固定法による筋力の維持 ラットによる実験的研究. 総合リハビリテーション. 2013;41:949-952.
- 16) Vieira WH, Ferraresi C, et al.: Effects of low-level laser therapy (808nm) on isokinetic muscle performance of young women submitted to endurance training: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2012; 27: 497-504.

(指導教員:中野治郎)