

# 拘縮発生後からラットヒラメ筋に対して周期的筋収縮を誘発すると その重篤化を予防できるか？

高原杏菜

## 要旨

本研究では4週間ギプス固定中のラットヒラメ筋に対して、ギプス固定2週後より電気刺激を用いた周期的な単収縮を誘発する介入を行い、足関節尖足拘縮ならびにヒラメ筋の線維化におよぼす影響を検討した。Wistar系雄性ラット18匹を無作為に6匹ずつ、①4週間通常飼育する対照群、②4週間両側足関節を最大底屈位でギプス固定する不動群、③ギプス固定を開始した2週後より電気刺激による介入(周波数;10Hz, 30分/日, 6回/週)を行う電気刺激群に振り分けた。結果、電気刺激による介入を行っても足関節尖足拘縮の進行抑制効果は認められず、ヒラメ筋の線維化の発生も抑止することは困難であった。このことから、拘縮の治療戦略としてはできる限り早期から介入を開始し、その発生予防に努めることがいかに重要であるかが改めて再確認され、あわせて拘縮改善効果が期待される新たな治療戦略の開発に関する研究を推し進める必要性が示唆された。

## はじめに

医療現場において、骨折などの治療としてギプスなどによる四肢の一部の不動は頻繁に行われている。これは医学的処置として必要であるが、一方で一定期間の不動によって関節拘縮(以下、拘縮)が惹起されるというマイナス面も持ち合わせている。拘縮の発生は、リハビリテーション(以下、リハ)介入の円滑さを損なわせるだけでなく、対象者の自立を妨げる原因にもなることから、その予防対策は極めて重要である。そして、先行研究を概観すると、拘縮予防を目的としたリハ介入効果についても検討されており、一定のエビデンスが示されている<sup>1-6)</sup>。しかしながら、実際の臨床場面においては、拘縮が進行した段階からリハ介入をせざるを得ない場合も多い。そして、前述のように拘縮予防を目的としたリハ介入効果に関しては、多くの報告があるが<sup>1-6)</sup>、既に拘縮が進行した途中段階からのリハ介入効果を検証した報告は非常に少ないのが現状である。

先行研究によれば、拘縮の責任病巣の中心

は骨格筋であるとされており<sup>7)</sup>、その病態には筋内膜、筋周膜におけるコラーゲンの増生、すなわち線維化の発生が関与しているといわれている<sup>7)</sup>。そして、このような骨格筋の線維化が生じるメカニズムについては、近年、分子レベルまで掘り下げられて研究が進められている<sup>8)</sup>。具体的には、骨格筋の不動によって線維化を促進するサイトカインである transforming growth factor(以下、TGF)- $\beta$  の発現が増加し、このことによって線維芽細胞が活性化され、線維芽細胞の亜型である筋線維芽細胞への分化も促されることで、コラーゲンが増生するといわれている。またこれに加え、不動による骨格筋の循環不全から低酸素状態に陥ると、筋線維芽細胞の分化がさらに促進し、コラーゲンの増生が著しくなるといわれている<sup>8)</sup>。

一方、Yoshimuraら<sup>9)</sup>によると4週間のギプス固定による不動性尖足拘縮ラットのヒラメ筋に対し、1日60分、週5回の頻度で周波数1Hzの電気刺激による周期的な単収縮を誘発させる介入を行ったところ、足関節背屈可動域制限の進行が抑制されたと報告している。また、この研究で

はヒラメ筋を検索材料に線維化関連分子の遺伝子発現についても検討しており、その結果では、単収縮を誘発する介入を行うことで、低酸素状態の指標となる hypoxia inducible factor (以下, HIF)-1 $\alpha$  mRNA の発現が抑制され、あわせて TGF- $\beta$  mRNA ならびにタイプ I・IIIコラーゲン mRNA の発現が抑制されることが示されている。つまり、この研究結果は不動の過程において骨格筋に対して単収縮を誘発すると、拘縮ならびに骨格筋の線維化の進行を抑制できることを示唆している。しかしながら、Yoshimura ら<sup>9)</sup>の研究は不動開始直後から電気刺激による介入を開始しており、拘縮が進行した途中段階からの介入効果については不明である。

そこで、本研究では4週間ギプス固定中のラットヒラメ筋に対して、ギプス固定2週後より電気刺激を用いた周期的な単収縮を誘発する介入を行い、足関節尖足拘縮ならびにヒラメ筋の線維化におよぼす影響を検討した。

## 材料と方法

### 1. 実験プロトコル

#### 1) 実験動物

実験動物には8週齢の Wistar 系雄性ラット18匹を用い、これらを無作為に、①4週間通常飼育する対照群 (n=6)、②4週間両側足関節を最大底屈位でギプス固定する不動群 (n=6)、③同様に4週間のギプス固定を行い、ギプス固定を開始した2週後より電気刺激による介入を実施する電気刺激群 (n=6) 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(承認番号:1404161137)、長崎大学先導生命科学研究支援センター・動物実験で実施した。

#### 2) 足関節の不動方法

不動群、電気刺激群の各ラットに対しては、三種混合麻酔薬(5mg/kg)の腹腔内投与によって麻酔を行い、両側足関節を最大底屈位の状態で前足部から膝関節上部までギプスを用いて4週間不動化した。また、電気刺激群に対しては下腿三頭筋の筋腹上にリード線付きの表面電極を貼付し、その上からギプスを用いて不動化した。

ギプス固定の際は、足指は浮腫の発生を確認するため露出させ、ギプスの緩みや浮腫の発生を認めた場合には麻酔下で適宜巻き替えを行った。なお、ラットはギプス固定中も飼育ケージ内を移動でき、水と餌は自由に摂取させた(図1)。



図1 足関節の不動方法

#### 3) 電気刺激の方法

電気刺激群の各ラットに対しては、週6日の頻度で腹腔内に三種混合麻酔薬(5mg/kg)を投与し、麻酔を行った後、ギプス固定を行った状態で以下の方法で下腿三頭筋に単収縮を誘発させた。具体的には、ギプスから露出させた表面電極のリード線に電気刺激装置(伊藤超短波製; Trio300)を接続し、沖田ら<sup>5)</sup>の報告を参考に周波数10Hz、パルス幅250 $\mu$ 秒の刺激条件で1日30分間電気刺激を行い、周期的な単収縮を誘発する介入を実施した。なお、麻酔による成長不良などの影響を排除する目的で、対照群と不動群の各ラットに対しても同頻度で麻酔のみを行った。

## 2. 検索方法

### 1) 体重の測定

実験開始時ならびに2, 4週間のギプス固定期間終了後、各群のラットに対しては三種混合麻酔薬(5mg/kg)の腹腔内投与によって麻酔を行い、不動群、電気刺激群においてはギプスを除去した。その後、各群の全てのラットの体重を測定した。

### 2) 足関節背屈可動域の測定

体重を測定した後は、ラットを側臥位とし、股・

膝関節を他動的に最大屈曲させ、足底部に丸型テンションゲージ(大場製作所製)の先端部をあてた。そして、0.3Nの張力で足関節を他動的に背屈させた際の背屈角度をゴニオメーターで測定し、これを背屈可動域とした。背屈角度の測定は、基本軸を膝関節裂隙中央部と腓骨外果を結んだ線、移動軸を腓骨外果と第5中足骨を結んだ線とし、これらの軸がなす外角を5°単位で読み取った。なお、以上の測定は3回行い、その最大値をデータとして採用した。

### 3) 材料採取

足関節背屈可動域の測定が終了した後、両側からヒラメ筋を採取した。採取したヒラメ筋はRNA laterに浸漬、冷凍保存し、以下に述べる分子生物学的検索に供した。

### 4) 分子生物学的検索

分子生物学的検索には、real time reverse transcription polymerase chain reaction(以下、real time RT-PCR)法を用い、低酸素状態の指標となるHIF-1 $\alpha$ 、骨格筋内の主要なコラーゲンタイプで、線維化の指標となるタイプI・IIIコラーゲンそれぞれの分子のmRNAの発現量を検索した。具体的には、RNA laterに浸漬したヒラメ筋から核酸(DNA/RNA)を抽出し、その核酸に含まれるmRNAを逆転写することでPCR反応の鋳型となる相補的DNA(complementary DNA;以下、cDNA)を作製した。次に、real time PCR機器(Mx 3005P; Agilent Technologies社製)を用いて作製したcDNAを増幅し、SYBR Green法で呈色を行い、 $\Delta\Delta Ct$ 法に基づいて定量化を行った。なお、内因性コントロールには $\beta$ -actinを用いた。

### 5) 統計処理

各群の体重、足関節背屈可動域、各分子のmRNAの発現量を比較するため、一元配置分散分析(以下、ANOVA)を適用し、有意差を判定した。そして、ANOVAにて有意差を認めた場合は、事後判定としてFisherのPLSD法を適用し、有意差を判定した。なお、すべての統計手法とも有意水準は5%未満とした。

## 結果

### 1. 体重の変化

実験開始時の体重の平均値は対照群が247.4 $\pm$ 13.0g、不動群が239.8 $\pm$ 12.3g、電気刺激群が242.9 $\pm$ 15.9gで3群間に有意差は認められなかった。一方、ギプス固定2週後の体重の平均値は、対照群が312.5 $\pm$ 21.4gであったのに対し、不動群は245.4 $\pm$ 20.0g、電気刺激群は250.4 $\pm$ 22.5gでいずれも有意に低値で、この2群間に有意差は認められなかった。また、ギプス固定4週間においても、対照群が330 $\pm$ 7.8gであったのに対し、不動群は268.6 $\pm$ 5.6g、電気刺激群は240.5 $\pm$ 6.2gでいずれも有意に低値で、この2群間に有意差は認められなかった(図2)。

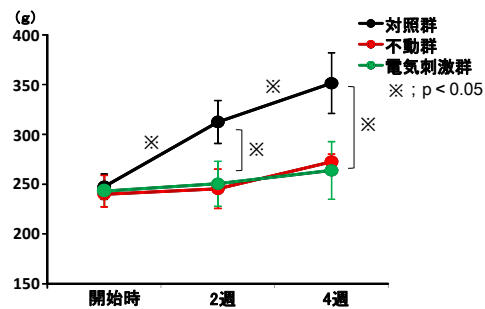


図2 体重の変化

### 2. 足関節背屈可動域の変化

ギプス固定2週後の足関節背屈可動域の平均値は、対照群が160 $\pm$ 0°であったのに対し、不動群は100.0 $\pm$ 4.3°、電気刺激群は99.6 $\pm$ 4.5°でいずれも有意に低値であった。しかし、この2群間に有意差は認められなかった。また、ギプス固定4週間においても、対照群は160 $\pm$ 0°であったのに対し、不動群は76.9 $\pm$ 4.6°、電気刺激群は76.7 $\pm$ 5.2°で有意に低値であり、この2群間に有意差は認められなかった(図3)。

### 3. 線維化関連分子の遺伝子発現

#### 1) HIF-1 $\alpha$ mRNA 発現量

HIF-1 $\alpha$  mRNA発現量は対照群に比べ不動群と電気刺激群は有意に高値を示した。しかし、不動群と電気刺激群の2群間においては有意差は認められなかった(図4)。

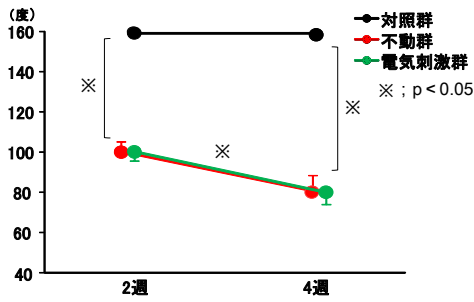


図3 足関節背屈可動域の変化

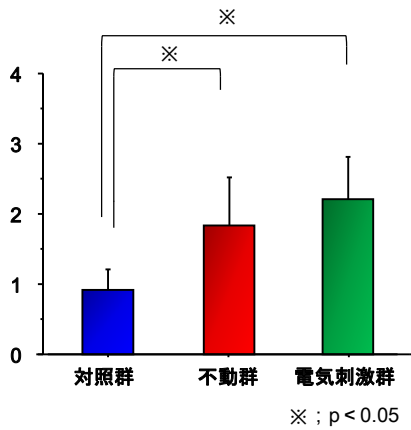


図4 HIF-1α mRNA の変化

## 2) タイプ I コラーゲン mRNA 発現量

タイプ I コラーゲン mRNA 発現量は対照群に比べ不動群と電気刺激群は有意に高値を示した。しかし、不動群と電気刺激群の 2 群間においては有意差は認められなかった(図5)。

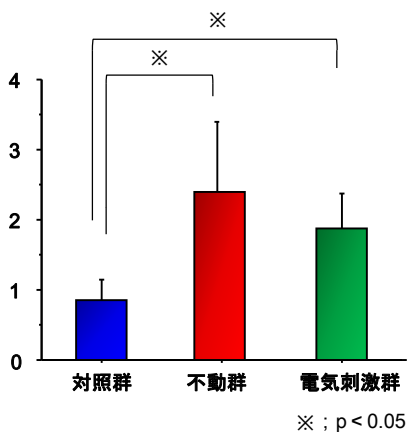


図5 タイプ I コラーゲン mRNA の変化

## 3) タイプ III コラーゲン mRNA 発現量

タイプ III コラーゲン mRNA 発現量は、不動群のみ対照群より高値を示した。しかし、不動群と電気刺激群の間にも有意差は認められなかった(図6)。

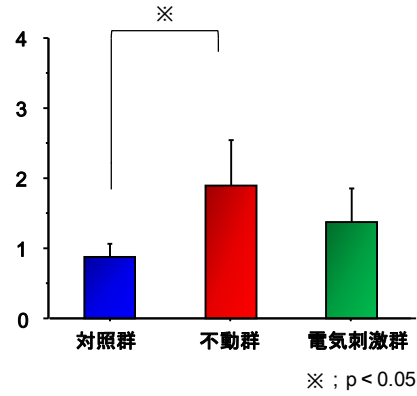


図6 タイプ III コラーゲン mRNA の変化

## 考察

拘縮の発生を予防することは極めて重要であるが、実際の臨床場面においては、拘縮が進行した段階からリハビリ介入をせざるを得ない場合も多い。先行研究を概観すると、骨格筋は拘縮の責任病巣の中心であり、その病態には線維化の発生が関与しているとされている<sup>7)</sup>。そして、不動による骨格筋の循環不全から低酸素状態に陥ると、線維化も進行するとされ、実際、ラット尖足拘縮モデルのヒラメ筋の検索結果では、低酸素状態の指標である HIF-1α mRNA の発現は不動 4 週後以降に認められるとされている<sup>8)</sup>。

これを踏まえ、本研究では拘縮が進行した段階であっても、低酸素状態が惹起されていない不動 2 週後から骨格筋の循環不全の改善に効果が期待できる周期的な筋収縮を誘発する介入を行えば、線維化の進行を抑制でき、拘縮の重篤化の予防につながるのではないかと仮説していた。しかし、今回の電気刺激群の結果をみると、低酸素状態の指標に用いた HIF-1α mRNA 発現量は不動群と同様に高値を示し、不動群との間にも有意差は認められなかった。また、線維化の指標として用いたタイプ I・III コラーゲン mRNA

発現量も不動群と同様に高値を示し、不動群との間にも有意差は認められなかった。加えて、ギプス固定4週後の足関節背屈可動域の結果も電気刺激群と不動群で有意差は認められなかった。したがって、電気刺激群においても低酸素状態の惹起は抑止できず、拘縮の進行と線維化の発生が認められたといえ、今回の結果では介入効果は確認できなかった。

以上の点に関連して、臓器は異なるものの、肺の線維化に関する分子メカニズムを検討しているUenoら<sup>9)</sup>の報告では、マクロファージ内に存在するtype-1 plasminogen activator inhibitor (以下、PAI-1)遺伝子から放出されるsmad 3 遺伝子にTGF- $\beta$ が応答し、この経路によってHIF-1 $\alpha$ が活性化されるとしている。つまり、この報告<sup>9)</sup>を参考にすると、HIF-1 $\alpha$ はTGF- $\beta$ に応答することで、それ自体が活性化すると考えられる。そして、今回と同様のラット尖足拘縮モデルを用いて、不動によって惹起されるヒラメ筋の線維化の分子メカニズムを検討しているHondaら<sup>8)</sup>の報告によると、TGF- $\beta$ の発現は不動1週間後から認められるとされており、HIF-1 $\alpha$ の発現時期よりも早いことが明らかになっている。したがって、今回の電気刺激群はギプス固定2週間後から介入を開始しているものの、この時期はすでにTGF- $\beta$ の発現がみられることから、結果的にHIF-1 $\alpha$ の発現を招き、線維化の発生とそれに伴う拘縮の進行を抑制でき

なかったのではないかと考える。

以上のことから、拘縮の治療戦略としてはできる限り早期からリハ介入を開始し、その発生予防に努めるかがいかに重要であるかが改めて再確認された。ただ、実際の臨床場面においては、拘縮が進行した段階からリハ介入をせざるを得ない場合も多いのは事実である。そのため、今後はこのような場合の効果的な介入戦略に関する開発研究を推し進める必要もあると思われる。近年は筋性拘縮のみならず<sup>8)</sup>、関節包が責任病巣となっている関節性拘縮においてもHIF-1 $\alpha$ が発生メカニズムに寄与する標的分子と想定されており、HIF-1 $\alpha$ の発現を阻害する薬剤の効果を検討した研究も行われている<sup>10)</sup>。つまり、薬剤とリハ介入とのコンビネーション治療というものが、拘縮の重篤化の予防に効果的である可能性も推測され、今後はこのような治療戦略の開発研究の進展を期待したい。

## 謝辞

今回の実験において、ご指導、ご協力いただいた沖田実教授ならびに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) Williams PE: Effect of intermittent stretch on immobilised muscle. *Ann Rheum Dis.* 1988; 47: 1014-1016.
- 2) Williams PE: Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle. *Ann Rheum Dis.* 1990; 49: 316-317.
- 3) 中田 彩, 沖田 実, 他: 持続的伸張運動の実施時間の違いが関節拘縮の進行抑制効果におよぼす影響—マウスにおける実験的研究—. *理学療法学.* 2002; 29: 1-5.
- 4) 沖 貞明, 柴田大法, 他: 不動性萎縮筋に対する電気刺激の効果—筋性拘縮の発生を抑制できるか?—. *運動・物理療法.* 1997; 8: 53-57.
- 5) 沖田 実: 関節可動域制限の発生メカニズムとその治療戦略. *理学療法学.* 2014; 41: 523-530.
- 6) Yoshimura A, Sakamoto J, et al.: Cyclic muscle twitch contraction inhibits immobilization-induced muscle contracture and fibrosis in rats. *Connect Tissue Res.* 2016; 58: 487-495.
- 7) 沖田 実: 関節可動域制限の病態, 関節可動域制限第2版—病態の理解と治療の考え方. 沖田

実(編), 三輪書店, 東京, 2013, pp 50-68.

- 8) Honda Y, Sakamoto J, et al.: Upregulation of interleukin-1 $\beta$ /transforming growth factor- $\beta$ 1 and hypoxia relate to molecular mechanisms underlying immobilization-induced muscle contracture. *Muscle Nerve*. 2015; 52: 419-427.
- 9) Ueno M, Maeno T, et al. : Hypoxia-inducible factor-1 mediates TGF--induced PAI-1 production in alveolar macrophages in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011; 300: L740–L752.
- 10) Sotobayashi D, Kawahata H, et al.: Therapeutic effect of intra-articular injection of ribbon-type decoy oligonucleotides for hypoxia inducible factor-1 on joint contracture in an immobilized knee animal model. *J Gene Med*. 2016; 18: 180-192.

(指導教員: 沖田 実)