

筋線維萎縮ならびに筋性拘縮に対する ベルト電極式骨格筋電気刺激法の効果

町田 響・吉村 萌華

本研究の目的は、ベルト電極式骨格筋電気刺激法(B-SES)を活用した筋収縮運動が筋線維萎縮ならびに筋性拘縮におよぼす影響を検討し、これらの病態の進行抑制に効果的な刺激条件を明らかにすることである。8週齢のWistar系雄性ラット26匹を無処置の対照群と両側足関節を最大底屈位で2週間不動化する不動群、不動の過程で1:3の刺激サイクルで1日20分間、B-SESを実施するB-SES①群、同様に1:1の刺激サイクルで1日15分間、B-SESを実施するB-SES②群に振り分けた。結果、筋線維萎縮の進行抑制効果はB-SES①群、B-SES②群ともに認められ、B-SES②群がより効果的であった。一方、筋性拘縮の主要な病態とされる線維化の進行抑制効果はB-SES②群のみに認められた。以上のことから、B-SESを活用した筋収縮運動は筋線維萎縮ならびに筋性拘縮の予防戦略として有効であり、特に筋収縮回数が増える刺激条件の方が効果的であることが示唆された。

はじめに

ギプスや装具による関節固定や安静臥床などによって関節の不動が惹起されると、骨格筋の伸張性が低下し、筋性拘縮に由来した関節可動域制限が発生する。先行研究によれば、筋性拘縮の主要な病態はコラーゲンの増生に起因した線維化といわれており¹⁾、その発生メカニズムに関わる分子機構の詳細も明らかになっている²⁾。具体的には、不動によって惹起される骨格筋の線維化は、マクロファージの集積を発端として炎症性サイトカインである interleukin-1 β (以下、IL-1 β) の発現が亢進し、その作用により線維芽細胞が活性化され、強力な線維化促進作用を有するサイトカインの transforming growth factor- β (以下、TGF- β) の発現が亢進するというマクロファージを介した IL-1 β /TGF- β シグナリングならびに TGF- β の作用による線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化過程の賦活化が関与するとされている²⁾。加えて、筋性拘縮発生時には筋線維萎縮が同時に発生することも明らかになっており²⁾、このメカニズムには、不動によって筋核にアポトーシスが誘導され、この筋核に制御されていた細胞質領域の処理のためにマクロファージが集積することが関与するとされている³⁾。つまり、筋核のアポト

ーシスを発端としたマクロファージの集積が筋線維萎縮のみならず、筋性拘縮、すなわち線維化の発生メカニズムに関わる重要かつ共通の事象であることが明らかになっている³⁾。そして、このメカニズムを踏まえると、筋線維萎縮の予防に効果的とされる積極的な筋収縮の負荷が筋性拘縮の予防戦略としても有効ではないかと考えられる。

通常、筋線維萎縮の予防には最大筋力 (muscle voluntary contraction; 以下、MVC) の60%以上(以下、60%MVC)の負荷強度で実施する筋力増強運動が効果的といわれている⁴⁾。しかし、運動器外科術後の急性期などでは痛みなどの影響で強い筋力を発揮することが難しく、筋力増強運動の効果は得られにくい。そのため、臨床ではその代替手段として骨格筋電気刺激療法 (electrical muscle stimulation; 以下、EMS) が適用されている。ただ、皮膚表面に電極を配置して通電する従来の方法は、刺激パターンや刺激強度の違いによってその効果にばらつきがあり、痛みなどの不快な通電感が生じることも多く、効果的な刺激強度で実施できないなどの問題があった⁵⁾。

一方、最近ではベルト電極式骨格筋電気刺激法 (belt electrode skeletal muscle electrical stimulation; 以下、B-SES) と呼ばれる新型の

EMS が開発されている。具体的に、B-SES は従来の電気刺激とは異なり、腰部と下肢に巻き付けるベルト電極を使用することにより、大腿四頭筋、ハムストリングス、下腿三頭筋などの下肢全体の筋収縮運動を同時に誘発することができる利点がある。加えて、出力波形や電極素材の開発により皮膚表面の痛みや不快感が軽減され、出力を上げ、強い筋収縮力を得ることが可能になっており⁵⁾、実際、廃用性筋萎縮の改善に効果的であることが明らかにされている⁶⁾。しかし、筋性拘縮の主要な病態である線維化に対するB-SESの効果を検討した報告は非常に少ない。

そこで、本研究では B-SES を活用した筋収縮運動が筋線維萎縮ならびに筋性拘縮におよぼす影響をラットの実験モデルを用いて検討し、あわせて、これらの病態の進行抑制に効果的な刺激条件についても検討した。

予備実験

今回の実験では、定量・定強度の筋収縮運動を B-SES によって再現する必要がある。そこで、筋力増強効果が期待できる 60%MVC を発揮する出力強度を明らかにする目的で、以下の予備実験①を行った。また、刺激時間を決定する上では筋疲労の影響を考慮する必要があることから、2つの刺激サイクルの条件下における筋力維持時間を明らかにする目的で、以下の予備実験②を行った。

1. 予備実験①

実験動物は 8 週齢の Wistar 系雄性ラット 6 匹で、各ラットに対しては 3 種混合麻酔薬の腹腔内投与 (5mg/kg) によって麻酔を行った後、先行研究⁷⁾を参考に以下の実験を行った。具体的には、大腿近位部と下腿遠位部に B-SES 電極を巻き付けた後にラットを腹臥位とし、足関節底背屈中間位の状態で足底部にプッシュプルゲージ (AIKOHENGINEERING 社製) のプローブを密着させた。そして、刺激周波数を 50Hz、刺激サイクルを 2 秒通電、6 秒休止の 1:3 サイクルとし、この条件で出力強度を漸増させながら通電し、足関節底屈の最大筋力を測定した。

結果、最大筋力は 4.8N であり、その際の刺激

強度は 14.5mA であった。つまり、60%MVC は 2.88N となり、この筋力を誘発する刺激強度は 4.7mA であることから、これを本実験の刺激強度に決定した (図 1)。

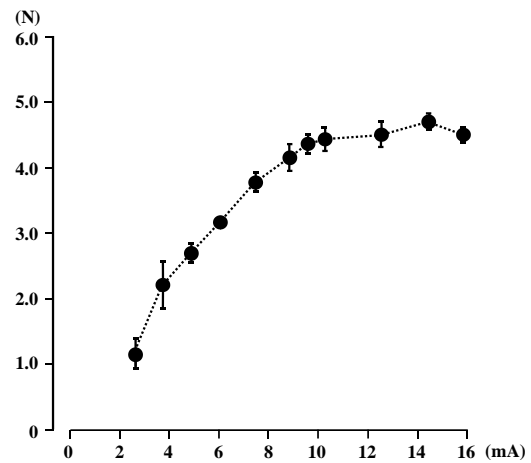


図 1 電気刺激強度の漸増に伴う足関節底屈筋力の変化

2. 予備実験②

使用したラットは予備実験①と同様であり、B-SES の刺激周波数は 50Hz、刺激強度は 60% MVC の足関節底屈筋力を誘発できる 4.7mA とした。そして、刺激サイクルは 2 秒通電、6 秒休止の 1:3 サイクルおよび 2 秒通電、2 秒休止の 1:1 サイクルの 2 条件を設定し、日を変えてそれぞれの条件で 30 分間通電を行った。そして、予備実験①と同様の方法で足関節底屈筋力を 1 分間隔で測定した⁷⁾。なお、1:3 の刺激サイクルでは 1 分間で 7 回、1:1 の刺激サイクルでは 1 分間で 15 回の筋収縮が誘発されることから、足関節底屈筋力は 7 回および 15 回の測定データの最大値を採用し、その推移を経時的に検討した。

結果、1:3 の刺激サイクルでは実施後 28 分まで 60%MVC の発揮筋力を維持することが可能であった (図 2a)。一方、1:1 の刺激サイクルでは実施後 18 分まで 60%MVC の発揮筋力を維持することが可能であり、それ以降は筋疲労のため発揮筋力の顕著な低下が認められた (図 2b)。以上の結果ならびに臨床での介入可能な時間を考慮し、1:3 の刺激サイクルでは 20 分間、1:1 の刺激サイクルでは 15 分間を刺激時間に決定

した。

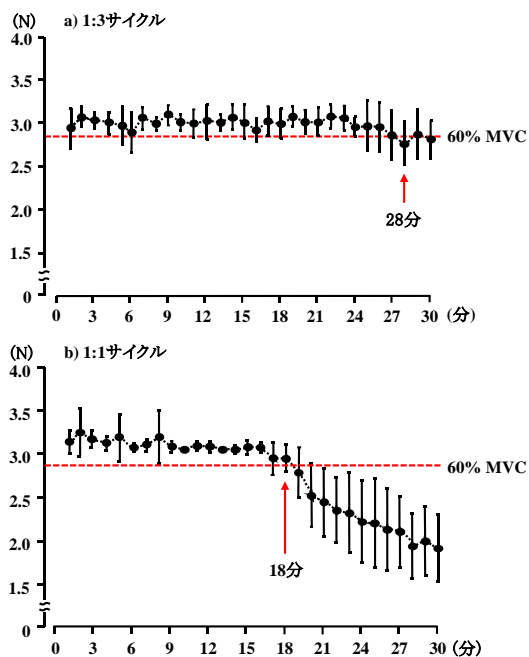


図2 刺激サイクルの違いが足関節底屈筋力におよぼす影響

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26匹を用い、これらを実験的に①無処置で通常飼育を行う対照群(n=6)、②両側足関節を最大底屈位でギプスで2週間不動化する不動群(n=6)、③不動の過程でB-SESによる筋収縮運動を負荷するB-SES群(n=14)に振り分け、B-SES群については刺激条件の違いによってさらにB-SES①群(n=6)とB-SES②群(n=8)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(承認番号:1903281524)、長崎大学先端生命科学センター・動物実験施設で実施した。

2) 足関節の不動方法

不動群とB-SES群の各ラットに対しては、3種混合麻酔薬の腹腔内投与(5mg/kg)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で2週間不動化した。なお、同モデルのラットは不動後も前肢にて飼育ケージ内を移動できることから、水と餌は自由摂取とした。

3) B-SESの方法

B-SES群の各ラットは前述と同様の方法で麻酔を行い、ギプスを外した後に後肢骨格筋にB-SESによる筋収縮運動を負荷した。具体的には大腿近位部と下腿遠位部にB-SES電極を巻き付け、B-SES①群、B-SES②群とも刺激周波数は50Hz、刺激強度は4.7mAに統一した。そして、B-SES①群は2秒通電、6秒休止の1:3の刺激サイクルで20分間の連続通電とし、B-SES②群は2秒通電、2秒休止の1:1の刺激サイクルで15分間の連続通電とした。そして、以上の条件で1回/日、6回/週の頻度で延べ2週間、B-SESによる筋収縮運動を負荷した(図3)。

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行った。

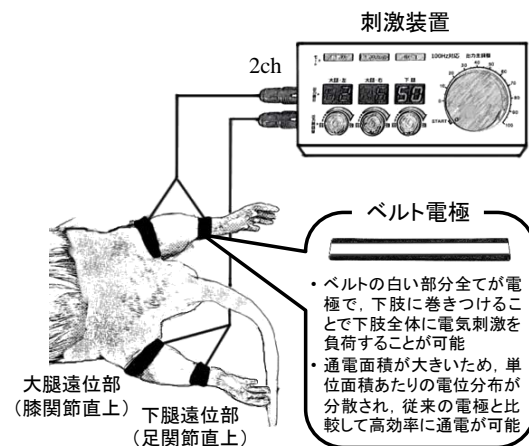


図3 動物実験用B-SESの概要

2. 検索方法

2週間の実験期間終了後は3種混合麻酔薬の腹腔内投与(5mg/kg)によって各群のラットを麻酔し、両側のヒラメ筋を採取した。そして、採取したヒラメ筋は以下に述べる組織学的・生化学的検索に供した。

1) 筋線維萎縮の評価のための組織学的検索

左側試料は筋腹中央部で2分割し、トラガントガムに包埋後、液体窒素で冷却したイソペンタン液内(-80℃)で急速凍結した。凍結した試料はクリオスタット(Leica社製)を用いて7μm厚の横断切片を作製し、Hematoxylin-Eosin(以下、HE)染色を実施した。そして、染色像は顕微鏡用デジタルカメラ(Nicon, DS-Ril)を用いて100倍の拡大像で全視野パーソナルコンピューターに取り込み、Scion Image Software(W. Rasband, National Institutes of Health)を用いて各筋試料につき100本以上の筋線維横断面積を計測した。

2) ヒラメ筋の線維化の評価のための生化学的検索

① 試料作製

ヒラメ筋内のコラーゲン含有量は、コラーゲン特有の構成アミノ酸であるヒドロキシプロリンを定量することによって行った。まず、試料作製として、右側ヒラメ筋の一部を細断し、24時間凍結乾燥処理を行い、乾燥重量を測定した。次に、この試料に6N-HClを1ml加え、110℃で15時間加水分解を行い、塩酸を除去した後、蒸留水1mlを加え、試料を溶解した。そして、0.6μmのフィルターで試料を濾過し、これをヒドロキシプロリン定量用の試料とした。

② ヒドロキシプロリンの定量

試料5μlを2時間、100℃で加熱処理した後、4N-NaOHを50μl加え、攪拌し、90℃で2時間再度加熱処理を行った。次に、Chlamine-T溶液を500μl加え、室温で25分間処理した後、Ehrlich溶液を500μl加え、攪拌し、80℃で20分間加熱処理し、試料を発色させた。そして、波長540nmで試料の吸光度を測定し、ヒドロキシプロリン濃度に基づく標準曲線を基に試料内のヒドロキシプロリンを定量した。なお、定量したヒドロキシプロリンは乾燥重量で除し、単位乾燥重量あたりの含有量として表した。

3) 統計処理

各群のデータは一元配置分散分析とScheffe法による事後検定を適用し、危険率5%未満をもって有意差を判定した。

結果

1) 筋線維萎縮の発生状況

各群の平均筋線維横断面積を比較すると、対照群と比較して不動群、B-SES①群、B-SES②群はいずれも有意に低値を示した。しかし、B-SES①群とB-SES②群は不動群よりも有意に高値を示し、B-SES②群はB-SES①群よりも有意に高値を示した(図4)。

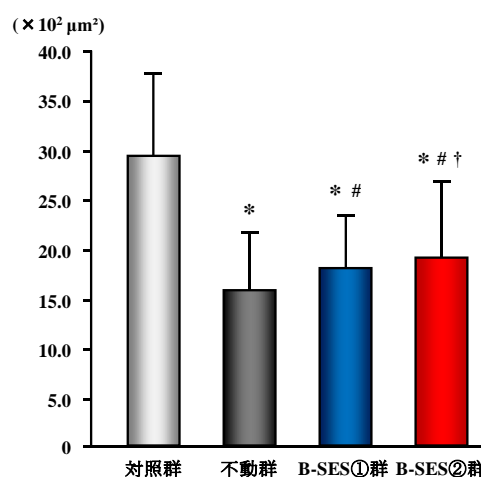


図4 平均筋線維横断面積

*: 対照群との有意差, #: 不動群との有意差, †: B-SES①群との有意差

2) 線維化の発生状況

各群のヒドロキシプロリン含有量を比較すると、対照群と比較して不動群、B-SES①群、B-SES②群は有意に高値を示した。また、不動群とB-SES①群ならびにB-SES②群には有意差は認められなかったが、B-SES②群はB-SES①群より有意に低値を示した(図5)。

考察

不動によって惹起される廃用性筋萎縮や筋性拘縮は、筋力低下や関節可動域制限といった運動器の機能障害を引き起こし、ADLやQOLの低下を招く。そのため、理学療法においては適切な介入戦略を講じ、その発生予防に努めることが重要である。ただ、これまでは廃用性筋萎縮

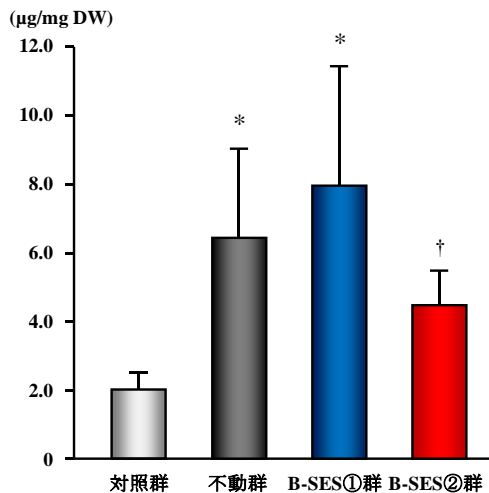


図5 ヒドロキシプロリン含有量

*: 対照群との有意差, #: 不動群との有意差,
†: B-SES①群との有意差

と筋性拘縮の発生メカニズムは異なると理解されており、そのため異なる介入戦略が別途展開されてきた。実際、臨床では廃用性筋萎縮に対しては筋力増強運動が、筋性拘縮に対しては関節可動域運動が積極的に展開され、ある程度の効果も確認されている。

一方、最近の先行研究によると、廃用性筋萎縮と筋性拘縮の病態形成には深い関連があることが明らかになっており、具体的には、筋核のアポトーシスを発端としたマクロファージの集積がこれらの発生メカニズムに関わる重要かつ共通の事象であるといわれている³⁾。つまり、このメカニズムを踏まえると、筋線維萎縮の予防に効果的とされる積極的な筋収縮運動の負荷が筋性拘縮の予防戦略としても有効ではないかと仮説できる。そこで、本研究では B-SES を活用した筋収縮運動が筋線維萎縮ならびに筋性拘縮におよぼす影響をラットの実験モデルを用いて検討し、あわせて、これらの病態の進行抑制に効果的な刺激条件についても検討した。

今回の平均筋線維横断面積の結果をみると、B-SES①群、B-SES②ともに対照群より有意に低値であるものの、不動群と比較すると有意に高値を示した。つまり、B-SES の刺激条件が異なっても、筋力増強効果が期待できる 60%MVC の強度の筋収縮運動を不動の過程で負荷すると、筋線維萎縮の進行抑制が図られるといえる。

前述したように、不動によって惹起される筋線維萎縮の発生メカニズムは、筋核のアポトーシスが要因となっているが^{3,8,9)}、それ以外にも筋構成タンパク質の合成低下あるいは分解亢進が関与することが先行研究によって明らかになっている¹⁰⁾。中でも、筋構成タンパク質の分解亢進は、不活動を開始した 48 時間後より徐々に増加し始め、約 2 週間でピークとなり、これに準拠して筋構成タンパク質の損失の程度も顕著になることが知られている¹⁰⁾。つまり、1~2 週間程度の不活動によって惹起される筋線維萎縮の発生メカニズムの主因は筋構成タンパク質の分解亢進にあると考えられる。そして、今回の実験の不動期間は 2 週間であり、これを踏まえると、B-SES による筋収縮運動は、筋核のアポトーシスの抑止に加え、筋構成タンパク質の分解亢進の抑制に作用した可能性が推測される。しかしながら、今回の実験では筋核や筋構成タンパク質の動態に関しては明らかにできておらず、今後検討が必要である。

一方、今回の実験では刺激サイクルと刺激時間が異なる 2 条件を設定し、不動の過程で B-SES による筋収縮運動を負荷した。その結果、B-SES①群と B-SES②群の平均筋線維横断面積を比較すると、B-SES②群が有意に高値を示した。つまり、この結果は 1 回の実施で 150 回の筋収縮が誘発される B-SES①群より、1 回の実施で 225 回の筋収縮が誘発される B-SES②群の方が筋線維萎縮の進行抑制効果が大きいことを意味しており、筋収縮回数が効果に影響をおよぼすことを示唆していると思われる。

次に、線維化の発生状況の指標となるヒドロキシプロリン含有量の結果をみると、B-SES①群、B-SES②群ともに不動群との有意差は認められなかったものの、B-SES①群と B-SES②群を比較すると、B-SES②群が有意に低値を示した。つまり、今回の刺激条件での B-SES による筋収縮運動では、不動によって惹起される線維化の進行を確実に抑制できるとは結論付けられない。ただ、今回の結果をみると、B-SES②群は線維化の進行が抑制されている傾向にある。つまり、筋線維萎縮同様、線維化、すなわち筋性拘縮に対しても筋収縮回数が効果に影響をおよぼす可能性があるといえる。事実、このことを裏付けるように所属研究室の先行研究では、B-SES①群の条

件でも1日に2回の介入を行えば線維化の進行が抑制されることを明らかにしている¹¹⁾。ただ、1日に2回の介入は臨床においては非効率的であり、実施できないことも多いため、1日1回の単回介入によって効果的な刺激条件を明らかにする必要があると思われる。残念ながら、今回はその刺激条件を明確に示すことはできなかったが、今後はマクロファージやIL-1 β 、TGF- β などといった線維化関連分子の動態もあわせて検討し、上記の課題解決につなげたいと考えている。

以上、今回の結果を総合的に捉えると、B-SESを活用した筋収縮運動は不動によって惹起される筋線維萎縮のみならず、筋性拘縮に対し

でも予防戦略として有効であり、特に筋収縮回数が増える刺激条件の方が効果的であることが示唆された。

謝辞

今回の実験において、ご指導、ご協力頂い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先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Honda Y, Tanaka M, et al.: Relationship between extensibility and collagen expression in immobilized rat skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 2018; 57(4): 672-678.
- 2) Honda Y, Sakamoto J, et al.: Upregulation of interleukin-1 β /transforming growth factor- β 1 and hypoxia relate to molecular mechanisms underlying immobilization-induced muscle contracture. *Muscle Nerve*. 2015; 52(3): 419-427
- 3) 田中なつみ: 不動によって生じる骨格筋内のマクロファージ集積のメカニズムー筋性拘縮の発生に関わる分子機構の検討ー。長崎大学大学院医歯薬学総合研究科保健学専攻修士論文, 2017.
- 4) 阪本良太: 筋力増強訓練, 運動療法学テキスト(改訂第2版)。植松光俊, 大川裕行, 他(編), 南江堂, 東京, 2015, pp 164-177.
- 5) 森谷敏夫: 運動できない人に優れた運動効果をもたらす電気刺激を用いた方法。スポーツメディスン. 2006; 18: 20-23.
- 6) Hasegawa S, Kobayashi M, et al.: Effect of early implementation of electrical muscle stimulation to prevent muscle atrophy and weakness in patients after anterior cruciate ligament reconstruction. *J Electromyogr Kinesiol*. 2011; 21: 622-630.
- 7) 中川晃一, 永田明日翔: 不動に伴う痛みに対する等尺性収縮運動の効果ー行動学的評価による検討ー。長崎大学医学部保健学科理学療法学専攻卒業研究論文集. 2015; 11: 41-48.
- 8) Shenkman BS, Turtikova OV, et al.: Skeletal muscle activity and the fate of myonuclei. *Acta Naturae* 2010; 2(2): 59-66.
- 9) Machida S, Booth FW: Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36(1): 52-59.
- 10) Thomason DB, Booth FW: Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* 1990; 68(1): 1-12.
- 11) 本田祐一郎, 梶原康宏, 他: B-SESによるラットヒラメ筋の筋性拘縮の進行抑制効果に関する検討。第5回日本骨格筋電気刺激研究会学術集会プログラム・抄録集; 2018; 30.

(指導教員: 沖田 実)