

不動によって惹起される筋性拘縮ならびに筋萎縮に対する 骨格筋電気刺激の効果

—従来型 EMS と B-SES の比較検討—

稲富裕也

本研究の目的は、不動によって惹起される筋性拘縮ならびに筋萎縮に対する骨格筋電気刺激療法(EMS)の効果に従来型 EMS とベルト電極式骨格筋電気刺激療法(B-SES)で比較検討することである。実験動物は8週齢のWistar系雄性ラット22匹で、これらに無処置の対照群、両側足関節をギプスで2週間不動化する不動群、不動の過程で従来型 EMS を用い、筋収縮運動を負荷するEMS群、同様にB-SESを用い、筋収縮運動を負荷するB-SES群に振り分けた。結果、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EMS群、B-SES群ともに認められなかったが、関節可動域制限の進行抑制効果はB-SES群のみに認められた。一方、筋線維萎縮の進行抑制効果はEMS群、B-SES群ともに認められ、その効果に大差はなかった。以上のことから、筋性拘縮ならびに筋萎縮の予防戦略として、積極的な筋収縮運動の負荷は不可欠といえ、特に従来型 EMS より B-SESの方が効果的であることが示唆された。

はじめに

長期臥床やギプス固定などによって発生する関節可動域制限の主な要因は、骨格筋の変化に由来した拘縮、すなわち筋性拘縮とされ、その病態には骨格筋内におけるコラーゲンの増生、すなわち線維化が関与している¹⁾。そして、最近の先行研究²⁾では、その発生メカニズムの詳細が解明されつつある。具体的には、不動によって筋核にアポトーシスが誘導されることで、筋核が減少し、その筋核に制御されていた細胞質の処理のためにマクロファージが集積するといわれている。そして、その結果として筋線維は縮小し、筋萎縮が発生するとされている。また、マクロファージの集積は線維化関連分子の賦活化を引き起こし、結果、コラーゲンの増生に伴う線維化が発生し、筋性拘縮に発展することが明らかになっている²⁾。このように、筋性拘縮の病態形成には筋線維萎縮の発生が深く関わっており、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な筋力増強運動が筋性拘縮に対しても効果的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)の強度で実施する筋力増強運動が効果的とされている³⁾。しかし、骨折後などではギプス固定や痛みによる影響で強い筋力を発揮することが難しく、寝たきりを余儀なくされている場合などでは、随意的に筋力を発揮することが困難なケースも存在する。このような場合、臨床では骨格筋電気刺激療法(electrical muscle stimulation; 以下、EMS)がしばしば適用され、これまでは皮膚表面に電極を貼付し通電するタイプのEMS機器(以下、従来型EMSという)が広く用いられてきた。しかし、従来型EMSは通電時に痛みや不快感が生じることがあり⁴⁾、筋力増強効果が得られる強度まで漸増できないなどの課題があった。

一方、最近では従来型EMSの欠点を改善したベルト電極式骨格筋電気刺激療法(belt electrode skeletal muscle electrical stimulation; 以下、B-SES)が開発されている。B-SESは従来型EMS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で下肢全体の筋収縮運動を

促すことができる。また、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ている。加えて、電極面積が大きいので、1カ所あたりの電位分布が分散されている。そのため、下肢の様々な筋群に強い筋収縮を負荷できるメリットがあり、事実、先行研究では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⁵⁾。

そこで本研究では、ラットの実験モデルを用いて、不動によって惹起される筋性拘縮ならびに筋萎縮に対するEMSの効果を従来型EMSとB-SESで比較検討した。

予備実験

1. 目的

今回の実験では、定量・定強度の筋収縮運動を電気刺激によって再現する必要がある。そのため、筋力増強効果が期待できる60%MVCを發揮する電気刺激の強度を明らかにする目的で、予備実験を行った。

2. 方法

実験動物は8週齢のWistar系雄性ラット12匹で、これらを6匹ずつ無作為に2群に分け、従来型EMSもしくはB-SESを用いて通電を行い、刺激強度を漸増させた際の足関節底屈筋力の推移を測定した。実験に際しては、3種混合麻酔薬の腹腔内投与(5mg/kg)によって各ラットを麻酔し、腹臥位とした状態で足関節を底背屈中間位とし、足底部にプッシュプルゲージ(AIKOHENGINEERING社製)の先端を設置した。そして、従来型EMSの場合は下腿後面に表面電極を貼付し、低周波治療器トリオ300(伊藤超短波社製)を用いて通電した。なお、その際の刺激周波数は100Hz、刺激サイクルは1秒通電、5秒休止の1:5サイクルとし、刺激強度を漸増させた際の足関節底屈筋力を測定した。一方、B-SESの場合は大腿近位部と下腿遠位部に電極を巻き、動物実験用B-SES(ホームイオン研究所製)を用いて通電した。なお、その際の刺激周波数は50Hz、刺激サイクルは2秒通電、6秒休止の1:3サイクルとし、刺激強度を漸増させた際の足関節底屈筋力を測定した。

3. 結果

従来型EMSによって誘発された足関節最大底屈筋力は4.16Nであり、その際の刺激強度は10.0mAであった。つまり、60%MVCは2.50Nとなり、この筋力を誘発する刺激強度は6.0mAであったことから、これを本実験の刺激強度に決定した(図1a)。

一方、B-SESによって誘発された足関節最大底屈筋力は4.71Nであり、その際の刺激強度は14.0mA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であったことから、これを本実験の刺激強度に決定した(図1b)。

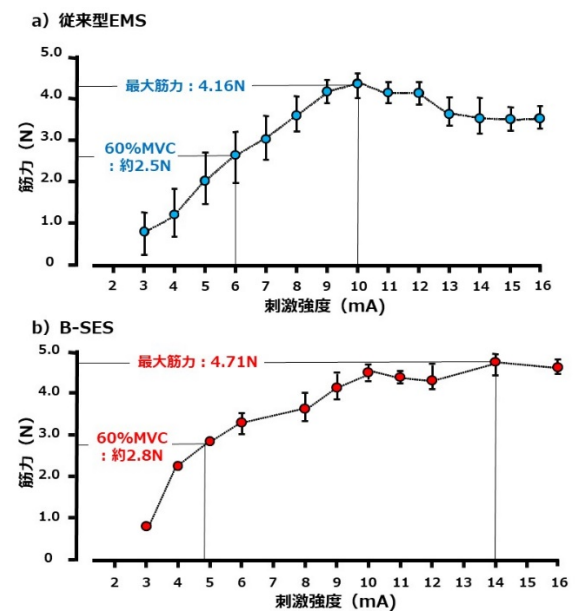


図1 刺激強度の漸増に伴う足関節底屈筋力の推移

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22匹を用い、これらを無作為に2週間通常飼育する対照群(n=5)と2週間両側足関節を最大底屈位の状態で、ギプスで不動化する実験群(n=17)に振り分けた。そして、実験群は、①不動処置のみを行う不動群(n=6)、②不動の過程で従来型EMSを用い、筋収縮運動を負荷するEMS群(n=5)、③不動の過程で動物実験用B-SESを用

い、筋収縮運動を負荷する B-SES 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: 1903281524)、長崎大学先導生命科学研究支援センター・動物実験施設で実施した。

2) 足関節の不動方法

実験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) 従来型 EMS および B-SES の方法

EMS 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、腹臥位とした。そして、下腿後面に表面電極を貼付し、予備実験と同様の方法で通電を行った。B-SES 群の各ラットも前述と同様の方法で麻酔を行い、ギプスを外した後、腹臥位とした。そして、大腿近位部と下腿遠位部にベルト電極を巻き、予備実験と同様の方法で通電を行った。そして、EMS 群、B-SES 群ともに刺激時間は 1 回あたり 20 分とし、週 6 回の頻度で、延べ 2 週間実施した。

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) 足関節背屈可動域の測定方法

不動開始前ならびに不動期間中は 1 週毎に足関節背屈可動域を測定した。具体的には、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た後側臥位とし、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測定し、これを背屈可動域とした。背屈可動域の測定は、腓骨外果に分度器の中心を合わせ、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中足骨頭を結んだ線とし、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。

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

2 週間の不動期間終了後は麻酔下でヒラメ筋を採取した。そして、採取したヒラメ筋は筋腹中央部で 2 分割し、その一部は線維化の評価のためコラーゲン含有量の測定を行った。なお、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、ヒラメ筋の一部を細切り、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°C で 15 時間加水分解を行い、塩酸を除去した後、蒸留水を 1ml 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 100µl を 2 時間 100°C で加熱処理した後、4N-NaOH を 50µl 加え、攪拌し、90°C で 2 時間再度加熱処理を行った。次に、Chloramine-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°C 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) 筋線維萎縮の評価のための組織学的検索

2 分割したヒラメ筋の一部は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、H&E)染色に供した。そして、染色像は顕微鏡用デジタルカメラ(Nikon, DS-R1i)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。

4) 統計処理

統計処理には、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. 足関節背屈可動域

不動 1 週目の足関節背屈可動域は、不動群、EMS 群、B-SES 群の実験群の 3 群すべて対照群より有意に低値を示し、実験群間には有意差は認められなかった。不動 2 週目においても実験群の 3 群は対照群より有意に低値を示したが、実験群間で比較すると、B-SES 群は不動群より有意に高値を示した(図 2)。

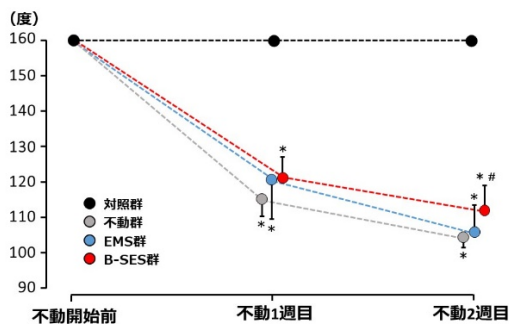


図 2 足関節背屈可動域の推移

* 対照群との有意差, # 不動群との有意差

2. ヒドロキシプロリン含有量

ヒドロキシプロリン含有量は、実験群の 3 群すべて対照群より有意に高値を示し、実験群間には有意差は認められなかった(図 3)。

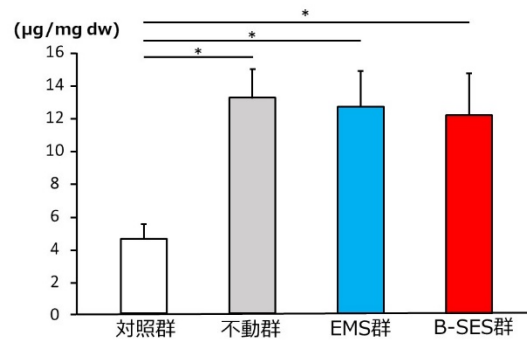


図 3 ヒドロキシプロリン含有量の比較

* 対照群との有意差

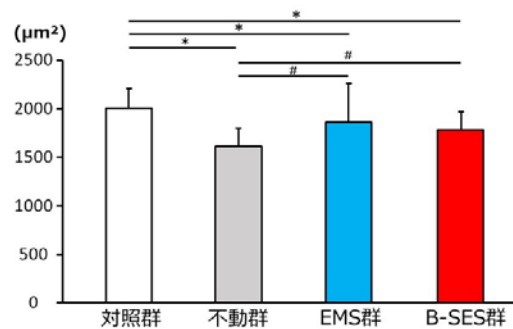


図 4 筋線維横断面積の比較

* 対照群との有意差, # 不動群との有意差

考察

先行研究^{2,6)}によれば、筋性拘縮の病態形成には筋線維萎縮の発生が深く関わっていることが明らかになっている。つまり、このことを踏まえると筋線維萎縮の予防に効果的な筋力増強運動が筋性拘縮に対しても効果的ではないかと考えられ、本研究ではEMSを活用した筋収縮運動の影響を検討した。加えて、最近ではEMS機器の開発も進んでおり、B-SESもその一つで、従来型EMSで問題となっていた通電時の痛みや不快感が改善され、しかも下肢の様々な筋群に強い筋収縮を負荷できるメリットがあるといわれている^{4,5)}。そこで、本研究では、ラットの実験モデルを用いて、不動によって惹起される筋性拘縮ならびに筋萎縮に対するEMSの効果を従来型EMSとB-SESで比較検討した。

筋性拘縮の指標の一つである足関節背屈可動域の結果をみると、不動 1 週目は実験群の 3 群すべて対照群と比較して有意に低値を示し、実

験群間には有意差は認められなかった。一方、不動 2 週目は実験群の 3 群すべて対照群と比較して有意に低値を示し、実験群間では B-SES 群が不動群と比較して有意に高値を示した。つまり、B-SES は足関節背屈可動域制限の進行抑制に効果的であるといえる。しかし、筋性拘縮の主要な病態とされる線維化の発生状況を意味するヒドロキシプロリン含有量の結果をみると、実験群の 3 群すべて対照群と比較して有意に高値を示し、実験群間に有意差は認められなかった。つまり、この結果は今回の条件での従来型 EMS ならびに B-SES を活用した筋収縮運動では、不動によって惹起される線維化の発生は抑制できなかったことを示唆している。

不動によって惹起される線維化の発生メカニズムには、筋核のアポトーシスが発端になっているとされている²⁾。つまり、これを抑止するためには筋力増強効果が期待できる 60%MVC の筋収縮運動を負荷する必要があると考え、本実験では従来型 EMS ならびに B-SES を活用し、その条件での筋収縮運動を負荷した。しかし、今回の結果では手段を問わず、線維化の発生を抑制することができず、このことから筋核のアポトーシスに対する影響も少なかったのではないかと推察される。ただし、B-SES 群には足関節背屈可動域制限の進行抑制効果が認められており、線維化の結果との矛盾が生じている。この要因に関して、本研究では足関節背屈可動域に影響する下腿三頭筋の中でヒラメ筋のみの検索であり、腓腹筋に対する影響は明らかにできていない点があげられる。なぜなら、随意筋収縮運動とは異なり、EMS によって誘発される筋収縮運動は貼付している電極周囲の表層の筋線維が選択的に収縮することから、ヒラメ筋より表層に位置する腓腹筋に対する効果が大きい可能性がある。しかし、本研究は先行研究^{1,2,6)}に従い、筋性拘縮の検索に用いられることが多いヒラメ筋のみを対象としており、腓腹筋に対する影響は不明である。したがって、今後は腓腹筋の検索も進める必要があると思われる。

次に、筋線維萎縮の指標の一つである筋線維横断面積の結果をみると、実験群の 3 群は対照群と比較して有意に低値を示し、実験群間では EMS 群、B-SES 群が不動群と比較して有意に高

値を示した。また、EMS 群と B-SES 群には有意差は認められなかった。つまり、この結果は手段を問わず、EMS による筋収縮運動は筋線維萎縮の進行抑制に効果的であることを示唆している。

先行研究^{7,10)}によれば、不動によって惹起される筋線維萎縮の発生メカニズムには、前述した筋核のアポトーシスや筋構成タンパク質の分解亢進が関与するとされている。ただし、先に述べたように今回設定した条件での EMS では手段を問わず、筋核のアポトーシスに対する影響は少なかったと考えられる。つまり、このことを踏まえると EMS による筋線維萎縮の進行抑制効果は筋構成タンパク質の分解亢進に対する影響が大きいのではないかと思われる。先行研究^{9,10)}によれば、筋構成タンパク質の分解亢進のメカニズムには、ユビキチン・プロテアソーム系の活性化が関与するとされており、中でも筋特異的ユビキチンリカーゼである muscle ring finger-1 (MuRF-1) や muscle atrophy F-box (Atrogin-1/MAFbx) の活性化が重要な役割を演じているとされている。Dupont ら¹¹⁾によると、後肢非荷重期間にラットヒラメ筋に対して EMS による筋収縮運動を負荷すると、後肢非荷重群と比較して MuRF-1 のタンパク発現を抑制できることを明らかにしている。また、藤田ら¹²⁾によると、後肢非荷重期間中のラット前脛骨筋に対して EMS による筋収縮運動を負荷すると、MuRF-1 mRNA の発現を抑制できることを明らかにしている。ただし、この報告では Atrogin-1 mRNA についても検索を行っているが、これに対する EMS の効果は認められていない¹²⁾。これらのことを踏まえ今回の筋線維横断面積の結果を考えると、手段を問わず、EMS による筋収縮運動によって骨格筋の不動状態が是正され、MuRF-1 の発現が抑制され、その結果として筋線維萎縮の進行が抑制されたのではないかと推察される。しかし、本研究では、MuRF-1 や Atrogin-1 などの筋特異的ユビキチンリカーゼの動態は明らかにできておらず、今後検討が必要である。

以上、本研究の結果を総括すると、従来型 EMS より B-SES の方が効果が高い可能性が示唆された。そのため、今後は刺激のサイクルや時間、頻度、期間など、効果的な刺激条件を明らかにすることで B-SES は筋性拘縮ならびに筋萎縮に対する有効な治療戦略になり得ると考える。

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諸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: 672-678.
- 2) 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総合研究科保健学専攻修士論文, 2017.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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: 419-427.
- 7) Van der Meer SF, Jaspers RT, et al.: Is the myonuclear domain size fixed?. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2011; 11: 286-297
- 8) Thomason DB, Booth FW: Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* 1990; 68: 1-12.
- 9) 吉岡利忠, 後藤勝正, 他: 筋萎縮のメカニズムー細胞内蛋白質分解機構とその制御. *医学のあゆみ*. 2000; 193: 598-603.
- 10) 杉浦崇夫: 筋萎縮をタンパク質・遺伝子レベルで探る, 運動とタンパク質・遺伝子. 柳原 大, 内藤久士(編), ナップ, 東京, 2004, pp 116-128.
- 11) Dupont E, Cieniewski-Bernard C, et al.: Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011, 300; R408-R417.
- 12) 藤田直人, 村上慎一郎, 他: 廃用性筋萎縮の予防に対する治療的電気刺激を用いた等尺性収縮の効果. *日本物理療学会会誌*. 2012; 19: 53-58.

(指導教員 沖田 実)