

# 不動によって発生・進行した筋萎縮，筋性拘縮，筋痛に対する

## ベルト電極式骨格筋電気刺激法の効果

### —ラットの実験モデルを用いた検討—

前田俊輔・三宅純平

本研究の目的は，ラット足関節を最大底屈位で 4 週間ギプスで不動化するモデルを用い，不動 2 週後よりベルト電極式骨格筋電気刺激法 (B-SES) を用いた介入を行い，不動によって発生・進行した筋萎縮や筋性拘縮，筋痛に対する効果を検証することである。7 週齢の Wistar 系雄性ラット 18 匹を無処置の対照群と両側足関節を最大底屈位の状態で 4 週間不動化する不動群，同様に 4 週間の不動化を行うとともに，不動 2 週後より B-SES による介入を実施する B-SES 群に振り分けた。そして，実験期間終了後は腓腹筋外側頭を採取し，検索材料に供した。結果，B-SES 群には筋性拘縮と筋痛の進行抑制効果が認められた。また，腓腹筋の浅層部を構成するタイプ IIb 線維に対して筋線維萎縮の進行抑制効果が認められた。以上のことから，不動によって発生・進行した筋萎縮，筋性拘縮，筋痛に対して B-SES による介入は効果があることが明らかとなった。

#### はじめに

骨格筋が不動に曝されると，筋萎縮，筋性拘縮，筋痛といった可塑的变化に由来した病態が生じ，筋力低下や関節可動域制限，疼痛といった障害・症候に発展することが知られている<sup>1)</sup>。そして，先行研究によれば，不動によって惹起される筋萎縮，筋性拘縮，筋痛の発生メカニズムには類似性があることが明らかになっている<sup>1)</sup>。具体的には，骨格筋が不動に曝されると筋核にアポトーシスが生じ，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し，細胞質領域が減少することによって筋萎縮が発生するといわれている<sup>1,2)</sup>。また，集積したマクロファージからは炎症性サイトカインである interleukin-1 $\beta$  (以下，IL-1 $\beta$ ) が発現し，これは線維芽細胞を活性化するとともに，活性化した線維芽細胞からは transforming growth factor- $\beta$ 1 (以下，TGF- $\beta$ 1) が発現し，このような IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$ 1 の分子シグナリングの賦活化によってコラーゲンの増生，すなわち線維化が発生し，筋性拘縮に発展することが知られている<sup>1,3,4)</sup>。加えて，不動に曝された骨格筋では痛みの内因性メディエー

タである神経成長因子 (nerve growth factor, 以下，NGF) が発現するとされ，これは一次侵害受容ニューロンの興奮を引き起こし，結果，筋痛が発生する<sup>1,5,6)</sup>。なお，NGF の産生細胞の一つがマクロファージといわれている<sup>1,5,6)</sup>。

つまり，筋萎縮，筋性拘縮，筋痛といった不動に伴う骨格筋の可塑的变化の発生メカニズムの基盤となる事象は，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と考えられ<sup>1)</sup>，これを抑止できれば，筋萎縮，筋性拘縮，筋痛といった障害・症候を同時かつ効率的に予防できる可能性がある。そして，具体的な介入戦略としては積極的な筋収縮運動の負荷が重要と思われ，特に最近開発されたベルト電極式骨格筋電気刺激法 (belt electrode skeletal muscle electrical stimulation, 以下，B-SES) は大腿四頭筋やハムストリングス，下腿三頭筋など，ヒトの全身の骨格筋の約 70% を占める下肢全ての骨格筋を同時に刺激できることから，有効な介入戦略になり得ると思われる<sup>7)</sup>。事実，江崎ら<sup>8)</sup>は筋萎縮，筋性拘縮，筋痛に対する B-SES の介入効果をラットの実験動物モデルを用いて検討している。具体的には，ラット足関節を最大底屈位で 2 週間不

動化する過程で1日15分間、週6日、B-SESを実施すると腓腹筋外側頭の筋線維萎縮ならびに筋性拘縮の進行抑制効果が認められ、同筋の筋痛には軽減効果が認められている。つまり、不動によって惹起される筋萎縮、筋性拘縮、筋痛に対してB-SESを用いた介入は効果的といえる。

したがって、上記の先行研究<sup>8)</sup>の結果を踏まえ、不動後の早期からB-SESによる介入を開始するのが理想的であることは間違いない。しかし、臨床においては、骨折などの治療のために一定期間、ギプス固定などの不動処置が強いられることも多い。つまり、臨床では筋萎縮や筋性拘縮、筋痛が進行した段階から介入を開始せざるを得ない場合も多いが、このような場合におけるB-SESの介入効果に関してはこれまで明らかになっていない。

そこで、本研究ではラット足関節を最大底屈位で4週間ギプスで不動化するモデルを用い、不動2週間よりB-SESを用いた介入を行い、筋萎縮や筋性拘縮、筋痛に対する効果を検証した。

## 材料と方法

### 1) 実験プロトコル

#### 1) 実験動物

実験動物は7週齢のWistar系雄性ラット18匹で、動物実験施設にラットが搬入された後は、実験者の操作にラットを慣れさせ、後に行う筋痛評価が円滑に実施できるよう1週間にわたりハンドリングを行った。その後、これらのラットを無作為に無処置で通常飼育する対照群(n=5)、両側足関節を最大底屈位でギプスで4週間不動化する不動群(n=6)、同様に4週間の不動化を行うとともに、不動2週間よりB-SESによる介入を実施するB-SES群(n=7)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(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ギ

プス包帯を用いて4週間不動化した。なお、その際、足指は浮腫の発生を確認するため露出させ、不動期間中は浮腫の発生やギプスの緩みを防ぐ目的で2~3日ごとにギプスの巻替えを行った。

### 3) B-SESの刺激条件

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)によって麻酔を行った後、ギプスを外し、腹臥位とした後に両側の大腿近位部と下腿遠位部にB-SES電極を巻いた。そして、刺激周波数はラットの下腿三頭筋に強縮を誘発するため50Hzとし、刺激強度については、所属研究室の先行研究の結果<sup>9)</sup>を踏まえ、正常ラットに対し足関節最大底屈筋力の60%を誘発できる4.7mAとした。また、刺激サイクルは2秒収縮、2秒休止の1:1サイクルとし、刺激時間は所属研究室の先行研究の結果<sup>10)</sup>を踏まえ、筋疲労の影響が少ない15分間とした。そして、以上の刺激条件によるB-SES介入を週6回の頻度で、不動2週間から延べ2週間行った。

### 2) 検索方法

#### 1) 評価内容

不動開始前(以下、base line;BL)ならびに不動開始後は1週毎に後述の方法に準じ、覚醒下の状態で各群のラットの筋痛を評価した。また、筋痛の評価を行った後は3種混合麻酔薬(5mg/kg)の腹腔内投与によって各群のラットを麻酔し、後述の方法に準じて両側の足関節背屈可動域を測定した。加えて、4週間の実験期間終了後は、麻酔下で体重を測定した後に両側から腓腹筋外側頭を採取した。そして、以下の検索に供し、筋萎縮、筋性拘縮、筋痛の評価に用いた。

#### 2) 筋萎縮の評価

##### ① 筋湿重量ならびに相対重量比

採取した腓腹筋外側頭は電子天秤にて筋湿重量を測定した。そして、筋湿重量を体重で除し、相対重量比を算出し、これらを筋萎縮の評価の指標の一つに用いた。

##### ② 筋線維横断面積

採取した腓腹筋外側頭は筋腹中央部で2分割し、そ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(−80°C)を用いて凍結新鮮標本とした。そして、クライオスタット(Leica 社 CM1950)を用いて7μm厚の横断切片を作製し、その一部に対しては Hematoxylin & Eosin(以下、H&E)染色を施し、病理学的変化を観察した。また、一部の切片に対しては酸性前処理(pH 4.5)を施した ATPase 染色を施し、筋線維タイプの分別を行った。そして、ATPase 染色像は顕微鏡用デジタルカメラ(Nikon, DS-R1)を用いて 400 倍の拡大像で全視野をパーソナルコンピュータに取り込み、Scion Image software(W. Rasband, National Institutes of Health)を用いて、各タイプの筋線維横断面積を各筋試料につき 100 本以上計測した。なお、腓腹筋外側頭は皮膚に近い浅層部はタイプ II b 線維のみで構成されているのに対し、骨に近い深層部はタイプ I・II a・II b 線維が混在している<sup>1)</sup>。そこで、本研究では浅層部と深層部に分け、筋線維タイプ別に筋線維横断面積を計測し、部位の違い、あるいは筋線維タイプの違いによって介入効果が異なるのか検討した。

### 3) 筋性拘縮の評価

#### ① 足関節背屈可動域

麻酔した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)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、これを足関節背屈可動域として採用した。測定に際しては、基本軸を膝関節裂隙中央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 2 つの軸がなす外角を 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、筋性拘縮の評価の指標の一つに用いた<sup>3)</sup>。

#### ② ヒドロキシプロリン含有量

筋性拘縮の主要な病態である線維化については、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含有量によって評価し、筋性拘縮の評価の指標の一つに用いた。具体的には、採取した腓腹筋外側頭の一部を細切し、24 時間の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

間の加水分解処理を行い、HCl 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、濾過後に回収した試料をヒドロキシプロリン定量用の試料とした。次に、試料 5μl 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。そして、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。その後、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含有量を定量した。なお、定量したヒドロキシプロリン含有量は乾燥重量で除し、単位乾燥重量あたりの含有量で表した。

### 4) 筋痛の評価

#### ① 筋圧痛閾値

筋痛に関しては、圧刺激鎮痛効果測定装置(Randoll Selitto, Ugo Basile, Model 37215)を用い、腓腹筋外側頭の筋圧痛閾値を測定し、評価した。具体的には、ラットの上半身を布で拘束し、静寂な環境下を保った状態で、先端直径が 8mm のプローブで皮膚上から腓腹筋外側頭を 48g/秒の条件で漸増加圧し、後肢の逃避反応が出現する圧力値を測定した。この測定は 5 回実施し、最大値と最小値を除外する 3 回の測定値の平均値を筋圧痛閾値のデータとして採用し、筋痛の評価の指標の一つに用いた<sup>5)</sup>。

#### ② NGF 含有量

先行研究によれば、不動性筋痛の発生メカニズムの一つに骨格筋内における NGF の発現増加が関与しているとされている<sup>5,6)</sup>。そこで、本研究でも NGF 含有量を測定し、筋痛の評価の指標の一つに用いた。具体的には、腓腹筋外側頭の一部を細切し、ジルコニアビーズと Lysis Buffer (50mM pH 8.0 Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% NP-40, 5M Urea)を加え、ビーズ式細胞粉砕装置 Micro Smash (TOMY, MS-100R)を用いてホモジュネートした。ホモジュネート後は、4°C, 12,000rpm で遠心分離を行い、その上清液を回収した。そして、上清液内の NGF 含有量を Rat NGF/NGF-β ELISA kit (Bosterbio, EK0471)

を用いて測定し, BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23227)を用いて測定した総タンパク量で除し(単位;pg/mg), データとして採用した.

## 5) 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) 筋萎縮の評価結果

#### ① 筋湿重量

各群の筋湿重量を比較すると, 対照群と比較して不動群, B-SES 群はいずれも有意に低値を示し, 不動群と B-SES 群の間に有意差は認められなかった(図 1).

#### ② 相対重量比

相対重量比に関しても, 対照群と比較して不動群, B-SES 群はいずれも有意に低値を示し, 不動群と B-SES 群の間に有意差は認められなかった(図 2).

#### ③ 筋線維横断面積

腓腹筋外側頭の ATPase 染色像をみると, 浅層部のタイプ IIb 線維, 深層部のタイプ I・IIa・IIb 線維のすべてにおいて不動群は対照群より縮小していた. 一方, B-SES 群は不動群に比べ浅層部のタイプ IIb 線維は大きい, 深層部はすべての筋線維タイプとも不動群と大差なく, 対照群より縮小していた(図 3).

実際, 浅層部のタイプ IIb 線維の筋線維横断面積を比較すると, 対照群に比べ不動群, B-SES 群は有意に低値を示した. また, 不動群と B-SES 群を比較すると B-SES 群が有意に高値を示した. 一方, 深層部においてはタイプ I・IIa・IIb 線維とも同様に, 対照群に比べ不動群, B-SES 群は有意に低値を示し, 不動群と B-SES 群の間に有意差は認められなかった(図 4).

### 2) 筋性拘縮の評価結果

#### ① 足関節背屈可動域

各群の足関節背屈可動域を比較すると, 不動 2 週後までは不動群, B-SES 群は対照群に比べ有意に低値を示し, この 2 群間には有意差は認められなかった. 一方, 不動 3 週後以降の結果を比較すると, 不動群, B-SES 群ともに対照群に比べ有意に低値を示すものの, この 2 群を比較すると B-SES 群は不動群より有意に高値を示した(図 5).

#### ② ヒドロキシプロリン含有量

各群のヒドロキシプロリン含有量を比較すると, 対照群に比べ不動群, B-SES 群は有意に高値を示した. しかし, この 2 群を比較すると B-SES 群は不動群より有意に低値を示した(図 6).

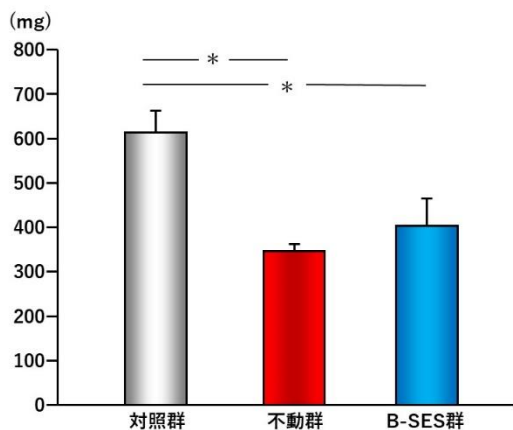


図 1 筋湿重量の比較

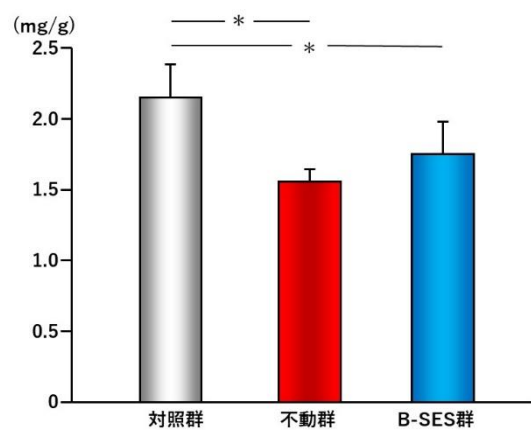


図 2 相対重量比の比較

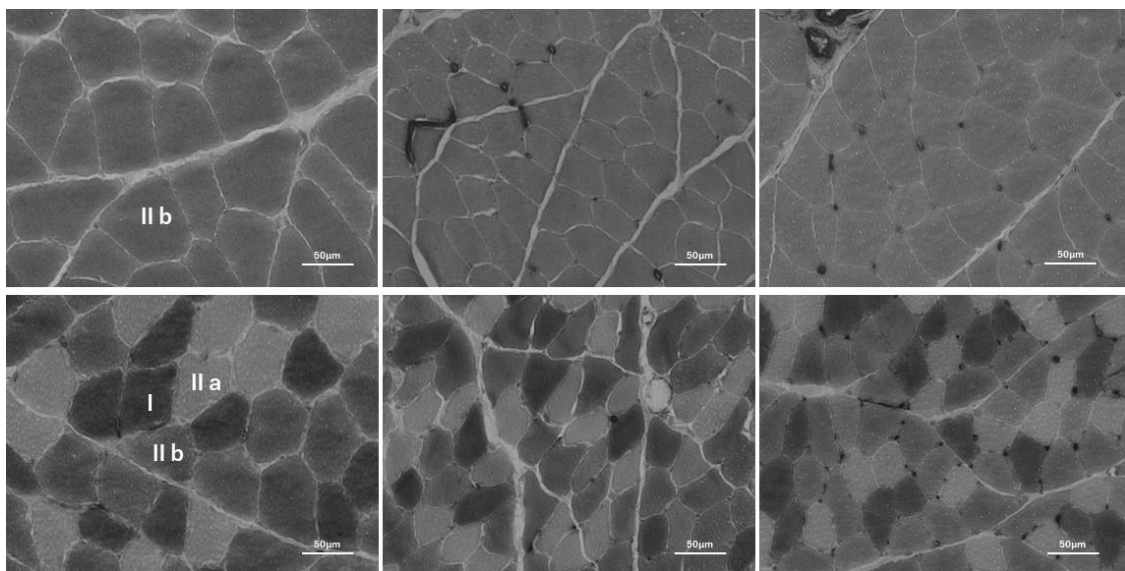


図3 ATPase 染色像

上段の写真が浅層部, 下段の写真が深層部で, 左から対照群, 不動群, B-SES 群を示している。

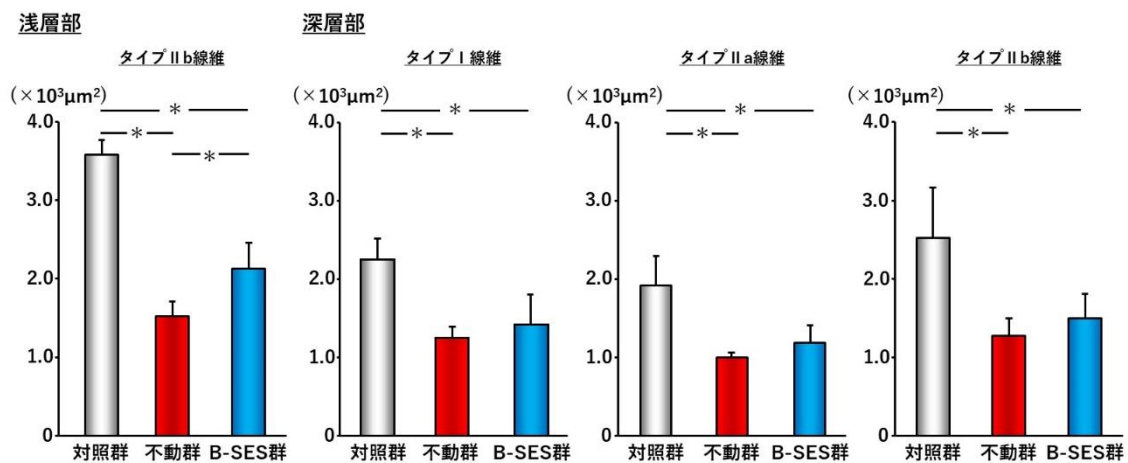


図4 筋線維横断面積の比較

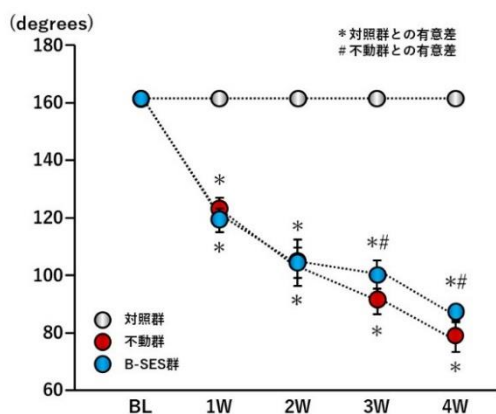


図5 足関節背屈可動域の比較

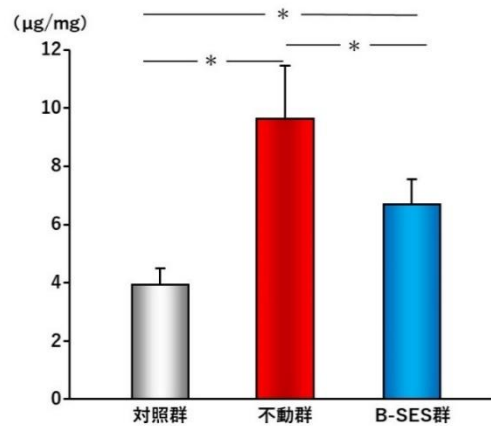


図6 ヒドロキシプロリン含有量の比較

### 3) 筋痛の評価結果

#### ① 筋圧痛閾値

各群の筋圧痛閾値を比較すると、不動 2 週後までは不動群、B-SES 群は対照群に比べ有意に低値を示し、この 2 群には有意差は認められなかった。一方、不動 3 週後以降の結果を比較すると、不動群、B-SES 群ともに対照群に比べ有意に低値を示すものの、この 2 群を比較すると B-SES 群は不動群より有意に高値を示し、しかも B-SES 群の不動 3 週後以降は不動 2 週後より改善していた(図 7)。

#### ② NGF 含有量

各群の NGF 含有量を比較すると、対照群に比べ不動群、B-SES 群は有意に高値を示した。しかし、この 2 群を比較すると B-SES 群は不動群より有意に低値を示した(図 8)。

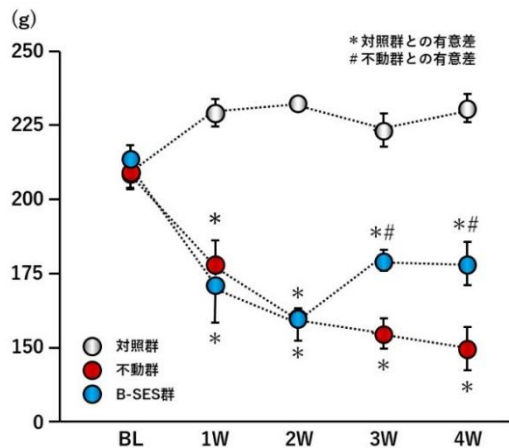


図 7 筋圧痛閾値の比較

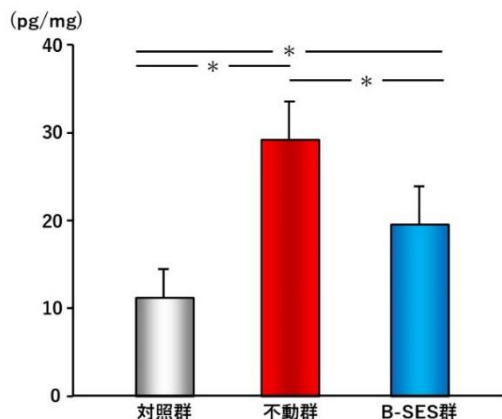


図 8 NGF 含有量の比較

### 考察

#### 1) 筋萎縮に対する効果

今回の筋線維横断面積の結果から、B-SES を用いた筋収縮運動は深層部のすべてのタイプの筋線維萎縮に対して進行抑制効果はないものの、浅層部のタイプIIb 線維の筋線維萎縮に対しては進行抑制効果があることが明らかとなった。このように、部位の違いによって効果が異なることが示唆され、これは電気刺激による筋収縮の特異性が影響している可能性がある。具体的には、随意運動による筋収縮では神経サイズが小さい運動単位に支配されている筋線維タイプから動員されることが知られており、タイプI線維、IIa 線維、IIb 線維の順に動員される。これに対して、電気刺激の場合は神経サイズが大きいほど電気抵抗は小さくなるため、タイプIIb 線維が優先的に動員される。そのため、速筋に対してトレーニング効果が高いといわれている<sup>7,12)</sup>。そして、今回検索対象としたラット腓腹筋外側頭は、深層部ではすべての筋線維タイプが混在しているが、浅層部はタイプIIb 線維のみで構成されている<sup>11)</sup>。加えて、今回の対照群の浅層部と深層部におけるタイプIIb 線維の筋線維横断面積を比較すると、明らかに浅層部が大きく(図 3, 4)、この結果は、同じタイプIIb 線維でも浅層部と深層部では支配している神経サイズが異なる可能性を示唆している。したがって、B-SES は支配している神経サイズが最も大きい浅層部のタイプIIb 線維を優先的に動員するのではないかと考えられ、このことが筋線維萎縮の進行抑制効果を認めた要因ではないかと思われる。

一方、筋線維萎縮の進行抑制効果のメカニズムに関しては、筋核のアポトーシスの軽減や筋構成タンパク質の分解抑制など、様々な機序が考えられ<sup>2,9,13)</sup>、この点の解明に関しては今後の課題である。

#### 2) 筋性拘縮に対する効果

今回のヒドロキシプロリン含有量の結果から、B-SES を用いた筋収縮運動は、不動に伴う骨格筋の線維化に対して進行抑制効果があることが明らかとなった。そして、このことが影響し、足関節背屈可動域制限の進行も抑制されたのではな

いかと推察され、ある程度進行した筋性拘縮に対しても B-SES を用いた筋収縮運動は効果があるといえる。

一方、骨格筋の線維化の進行抑制効果のメカニズムに関しては、筋核のアポトーシスの軽減に伴うマクロファージの集積抑止ならびにこのことを契機とした IL-1 $\beta$  や TGF- $\beta$ 1 などの線維化関連分子の賦活化の軽減などが関わっていることが想定される<sup>9)</sup>。しかし、今回の結果ではこの点については明らかではなく、今後の検討課題である。

### 3) 筋痛に対する効果

今回の NGF 含有量の結果から、B-SES を用いた筋収縮運動は、不動に伴う NGF の発現を軽減することが明らかとなった。周知のように、NGF は痛みの内因性メディエータであり、その発現は一次侵害受容ニューロンの興奮を引き起こし、筋痛が発生すると考えられている。つまり、NGF の発現が軽減したことで、一次侵害受容ニューロンの興奮も減弱したのではないかと推測され、結果、筋圧痛閾値が改善したのではないと思われる。つまり、不動によって筋痛が惹起されていても、B-SES を用いた筋収縮運動はその改善に効果が期待できるといえよう。

一方、筋痛軽減のメカニズムに関しては NGF の発現減少以外にも、末梢神経密度の減少や炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  の発現減少なども影響している可能性があり、さらには NGF の産生細胞の一つであるマクロファージの集積抑止の影響も否定できない<sup>5)</sup>。しかし、今回の結果ではこれらの点については明らかではなく、今後の検討課題である。

### 4) 総括

以上、本研究の結果を総括すると、不動によって発生・進行した筋萎縮、筋性拘縮、筋痛に対して B-SES による筋収縮運動は、完全ではないもののそれぞれの障害・症候に対して進行抑制効果があると結論付けることができる。しかし、そのメカニズムに関しては今回明らかにすることができなかった。

先行研究によれば、不動によって惹起される筋萎縮、筋性拘縮、筋痛の発生メカニズムには

類似性があり、具体的には、筋核のアポトーシスとそれに伴うマクロファージの集積が発生メカニズムの基盤といわれている<sup>1)</sup>。つまり、これらの事象に対する B-SES の生物学的効果を明らかにできれば、今回の課題解決につながるだけでなく、筋萎縮、筋性拘縮、筋痛に対して効果的、効率的に介入できる戦略の開発につながるのではないと思われる。

### 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導、ご協力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) 沖田 実: 疼痛と拘縮の病態と発生メカニズムおよびエビデンスに基づく治療戦略—基礎研究の動向と臨床への応用—。物理療法学。2020; 27: 1-6.
- 2) Tanaka N, Honda Y, et al.: Myonuclear apoptosis via cleaved caspase-3 upregulation is related to macrophage accumulation underlying immobilization-induced muscle fibrosis. Muscle Nerve. 2022 (in press).
- 3) 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.
- 4) 本田祐一郎, 坂本淳哉, 他: 関節可動域制限に対する基礎研究の動向と臨床への応用—筋性拘縮の発生機序の解明ならびにエビデンスに基づいた治療戦略の開発を目的とした基礎研究—。理学療法学。2018; 45: 275-280.
- 5) Oga S, Goto K, et al.: Mechanisms underlying immobilization-induced muscle pain in rats. Muscle Nerve. 2019; 61: 662-670.
- 6) 大賀智史, 関野有紀, 他: ラット足関節不動モデルの骨格筋における痛覚過敏と神経成

- 長因子の変化. 日本運動器疼痛学会誌. 2014; 6: 107-113.
- 7) 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.
  - 8) 江崎ひなた, 平島悠嗣: 筋萎縮, 筋性拘縮, 筋痛に対するベルト電極式骨格筋電気刺激の効果—効果的な刺激条件の検討—. 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. 2020; 16: 20-25.
  - 9) Honda Y, Tanaka N, et al.: Effect of belt electrode-skeletal muscle electrical stimulation on immobilization-induced muscle fibrosis. PLoS ONE 2021; 16(5): e0244120.
  - 10) 町田 響, 吉村萌華: 筋線維萎縮と筋性拘縮に効果的な B-SES の刺激条件の検討. 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. 2019; 15: 44-49.
  - 11) Kataoka H, Nakano J, et al.: The influence of aging on the effectiveness of heat stress in preventing disuse muscle atrophy. *Physiol Int* 2017; 104: 316-328.
  - 12) Bickel CS, Gregory CM, et al.: Motor unit recruitment during neuromuscular electrical stimulation: a critical appraisal. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111: 2399-2407.
  - 13) Fujita N, Murakami S, et al.: The combined effect of electrical stimulation and high-load isometric contraction on protein degradation pathways in muscle atrophy induced by hindlimb unloading. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 401493.

(指導教員 沖田 実)