

# 短時間の歩行運動ならびに温熱負荷の併用による 筋萎縮と拘縮の進行抑制効果の検討

中村 早紀

## 要旨

本研究では、筋萎縮と拘縮の進行が短時間の歩行運動で抑制できるのか、また、これに温熱負荷を併用することでその効果が高まるのかを検討した。実験動物には8週齢のWistar系雄性ラット24匹を用い、1)無処置の対照群(n = 5)、2)両側足関節を最大底屈位で2週間ギプスで不動化する不動群(n = 6)、3)不動の過程で一旦ギプスを外し、トレッドミルを用いた歩行運動(速度;10m/分、実施時間;10分間)を2日おきに行う歩行群(n = 5)、同様に2日おきに温熱負荷(実施時間;60分間)と歩行運動を行う温熱+歩行群(n = 8)の4群を設定した。結果、筋萎縮の進行抑制効果は歩行群と温熱+歩行群で認められ、この効果は温熱+歩行群が顕著であった。また、拘縮の進行抑制効果も歩行群と温熱+歩行群で認められたが、この効果には違いはなかった。つまり、運動療法の前処置として行う温熱療法は治療ターゲットによって効果が異なる可能性があるかと推察される。

## はじめに

近年の高齢化の進展に伴って理学療法の対象者の多くも障害を抱えた高齢者となってきており、これらの対象者は様々な理由で積極的な運動療法が実践できないことが多い。そのため、これらの対象者にも適用できる低強度で、かつ障害の回復に有効な運動療法の開発が求められている。短時間の歩行運動は臨床で実践できる低強度の運動療法に位置づけることができ、全身の廃用症候群の予防といった観点からも重要かつ不可欠な介入方法と思われる。しかし、その効果を明確に示した報告は少ない。

一方、物理療法は運動療法とともに理学療法の二本の柱とされ、その中でも温熱療法は臨床で広く用いられている方法である。そして、臨床においては循環の改善や疼痛軽減などを目的に温熱療法が実践されているが、近年では筋力増強の手段としての温熱療法の効果が注目されてきている<sup>1)</sup>。例えば、Yoshida<sup>2)</sup>らの先行研究ではラット腓腹筋の廃用性筋萎縮の進行過程における筋収縮運動と温熱負荷の併用効果が検討されており、この結果では、筋肥大効果のない低強度の筋収縮運動に温熱負荷を併用すると筋萎縮の進行が抑制されることが明らかになっている。つまり、この報告を参考にすると短時間の歩

行運動に温熱負荷を併用することで筋萎縮の進行抑制効果が高まる可能性があるかと推察される。

次に、拘縮の治療としても臨床では温熱療法が広く用いられており、特に運動療法の前処置として温熱療法が実践されることが多い。そして、運動療法と温熱負荷の併用効果に関しては、これまでも多数検討されているが、未だ一定の見解とはなっていない。例えば、坂口ら<sup>3)</sup>の報告では、ラットの尖足拘縮モデルを用いて、その進行過程でトレッドミル走行による運動とその前処置として温熱負荷を併用した場合の効果が検討されており、これでは併用した場合が足関節背屈可動域制限の進行抑制に効果的であったとされている。しかし、この報告では足関節周囲の軟部組織におけるコラーゲンの変化など、拘縮の病態メカニズムに対する影響については検討されていない。一方、Kondoら<sup>4)</sup>はラットの尖足拘縮モデルを用い、その回復過程におけるストレッチングのみの効果とストレッチングに温熱負荷を併用した場合の効果を検討している。これによれば、足関節背屈可動域制限の改善やヒラメ筋のコラーゲン線維配列の変化に関しては、いずれも有意差は認められず、温熱負荷との併用効果はないと結論付けている。このように、拘縮に対する運動療法と温熱療法の併用効果に関しては一

定の知見が得られておらず、短時間の歩行運動に温熱負荷を併用することで拘縮の進行抑制効果が高まるか否かは疑問視される点である。

以上のことから、本研究では筋萎縮と拘縮に焦点をあて、これらの進行が短時間の歩行運動で抑制できるのか、また、これに温熱負荷を併用することでその効果が高まるのかをラットの実験モデルを用いて検討した。

## 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 24 匹を用い、これらが無作為に無処置の対照群 ( $n = 5$ )と両側足関節を最大底屈位で 2 週間ギプスで不動化する実験群 ( $n = 19$ )に振り分け、実験群はさらに不動のみを行う不動群 ( $n = 6$ )、不動の過程で一旦ギプスを外し歩行運動を行う歩行群 ( $n = 5$ )、同様に温熱負荷と歩行運動を行う温熱＋歩行群 ( $n = 8$ )に分けた。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支援センター動物実験施設で実施した。

#### 2) 足関節の不動化の方法

不動群、歩行群ならびに温熱＋歩行群の各ラットに対してはペントバルビタールナトリウム (40 mg/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固定することで不動化を行った。ギプス固定の際の留意事項として、足指は浮腫の発生を確認するために露出させ、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うこととした。なお、ギプス固定後もラットは前肢にて飼育ケージ内を移動でき、水と餌は自由摂取とした。

#### 3) 温熱負荷の方法

温熱＋歩行群のラットに対してはペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) の腹腔内投与によって麻酔を行い、一旦ギプスを除去した。そして、42℃に設定したプラスチック製のプール内にラットの下腹部から尾方全体を 60 分間浸漬し、温熱負荷を行った。なお、その際には後肢が荷重しないよう注意した。温熱負荷は実験開始日のギプス固定前に実施し、その後は 2 日おきに実施

した。

#### 4) 歩行運動の方法

歩行群と温熱＋歩行群のラットに対しては覚醒下で一旦ギプスを除去した。そして、小動物用トレッドミル(シナノ製作所製)を用い、走行速度を 10 m/分、走行時間を 10 分間に設定し、この条件で歩行運動を実施した。なお、歩行運動の頻度はギプス固定開始翌日から 2 日おきとし、温熱＋歩行群においては温熱負荷の翌日に歩行運動を実施することとした。

### 2. 検索方法

実験期間終了後はペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) の腹腔内投与によって各群のラットを麻酔し、体重ならびに足関節背屈可動域を測定した。また、これらの測定が終了した後にヒラメ筋を採取し、後述する組織学的・分子生物学的検索に供した。

#### 1) 足関節背屈可動域の測定方法

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(大場製作所製)の先端部をあてた。そして、0.3 N 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て採用した。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) 材料採取

体重ならびに足関節背屈可動域の測定が終了した後に両側からヒラメ筋を採取した。そして、右側試料については電子天秤にて筋湿重量を測定し、その後、組織学的検索に供した。一方、左側試料については分子生物学的検索に供した。

#### 3) 組織学的検索

右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 7 μm 厚の横断切片を作製し、以下の染色を実施した。具体的には、

組織病理学的検索のために Hematoxylin & Eosin (以下, H&E) 染色を, 筋周膜ならびに筋内膜を構成するコラーゲンを可視化するために Picrosirius Red 染色を施し, 光学顕微鏡で顕鏡した. また, H&E 染色像は 100 倍の拡大像でコンピュータに取り込み, 画像解析ソフト (Scion Image) を用いて 1 筋につき 100 本以上の筋線維横断面積を計測した.

#### 4) 分子生物学的検索

左側試料は real time reverse transcription polymerase chain reaction (以下, real time RT-PCR) 法にて骨格筋内の主要なコラーゲンタイプであるタイプ I・IIIコラーゲンそれぞれの分子の mRNA 発現量を検索した. 具体的には, 左側ヒラメ筋から抽出した RNA を逆転写することで鋳型となる cDNA を作製し, real time RT-PCR 機器 (Mx 3005P; Agilent Technologies 社製) を用いて, この cDNA の増幅処理を行い, Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green (Agilent Technologies 社製) を用いて, 95-60 °C (各 20 秒) の 2 ステップ法を採用し,  $\Delta\Delta Ct$  法に基づき定量解析を行った. なお, 内因性コントロールには glyceraldehyde-3-phosphate dehydro-genase (以下, GAPDH) を採用した.

#### 5) 統計処理

各群の足関節背屈可動域, 筋湿重量を体重で除した相対重量比, 筋線維横断面積ならびにタイプ I・IIIコラーゲンの mRNA の発現量を各群で比較するため, 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, 事後検定として Scheffe の方法を適用し, 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. 相対重量比

相対重量比の平均値は対照群が 0.36 mg/g, 不動群が 0.19 mg/g, 歩行群が 0.22 mg/g, 温熱+歩行群が 0.25 mg/g であり, 実験群の 3 群すべて対照群より有意に低値を示した. また, 実験群の 3 群では温熱+歩行群は不動群より有意に高値を示したが, 不動群と歩行群, 歩行群と温熱+歩行群には有意差は認められなかった (図 1).

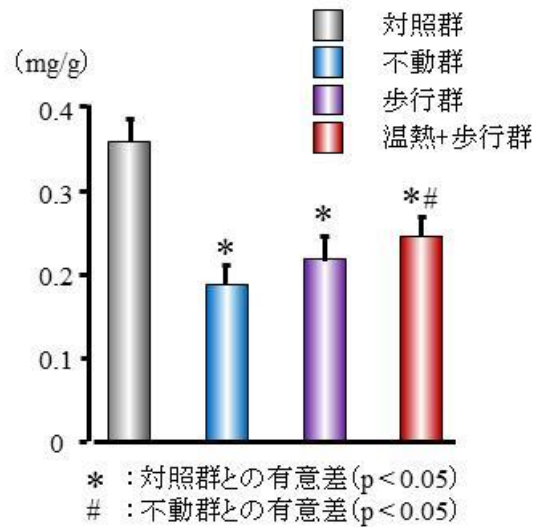


図 1 相対重量比の比較

## 2. 組織学的所見

H&E 染色像を顕鏡した結果, すべての群において細胞浸潤や壊死線維の出現といった炎症を示唆する所見は認められなかったが, 実験群の 3 群には筋線維萎縮が認められた. また, Picrosirius Red 染色像を顕鏡した結果, 実験群の 3 群は対照群と比較して筋周膜や筋内膜に肥厚が認められ, その程度は歩行群と温熱+歩行群が不動群よりも軽度であった (図 2).

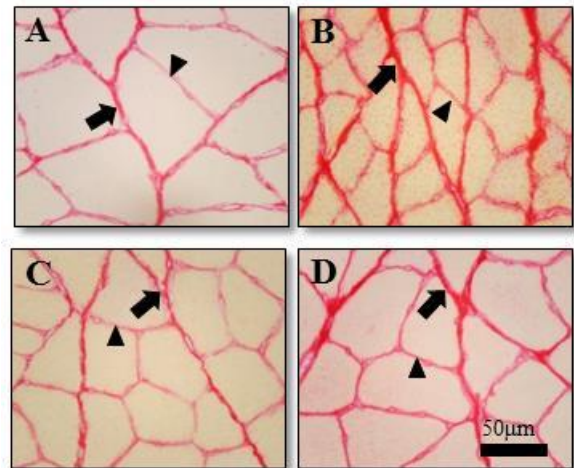


図 2 Picrosirius Red 染色像

A は対照群, B は不動群, C は歩行群, D は温熱+歩行群の顕鏡像で, 矢印は筋周膜, 矢頭は筋内膜を示す.

### 3. 筋線維横断面積

筋線維横断面積の平均値は、対照群が  $2432.3 \mu\text{m}^2$ 、不動群が  $1294.7 \mu\text{m}^2$ 、歩行群が  $1437.8 \mu\text{m}^2$ 、温熱+歩行群が  $1766.8 \mu\text{m}^2$  であり、実験群の3群はすべて対照群より有意に低値を示した。また、実験群の3群では歩行群と温熱+歩行群は不動群より有意に高値を示し、温熱+歩行群は歩行群より有意に高値を示した(図3)。

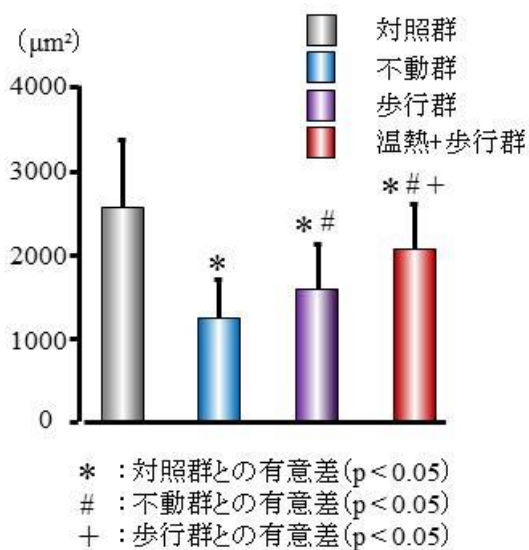


図3 筋線維横断面積の比較

### 4. 足関節背屈可動域

足関節背屈可動域の平均値は、対照群が  $160^\circ$ 、不動群が  $107.1^\circ$ 、歩行群が  $113.5^\circ$ 、温熱+歩行群が  $117.5^\circ$  であり、実験群の3群はすべて対照群より有意に低値を示した。また、実験群の3群では歩行群と温熱+歩行群は不動群より有意に高値を示したが、歩行群と温熱+歩行群との間には有意差は認められなかった(図4)。

### 5. タイプ I・IIIコラーゲンの mRNA 発現量

タイプ I コラーゲン mRNA の発現量は、対照群が 2.08、不動群が 4.07、歩行群が 1.68、温熱+歩行群が 1.93 であり、不動群は対照群より有意に高値を示した。一方、歩行群と温熱+歩行群は不動群より有意に低値を示し、対照群との有意差も認められなかった(図5)。

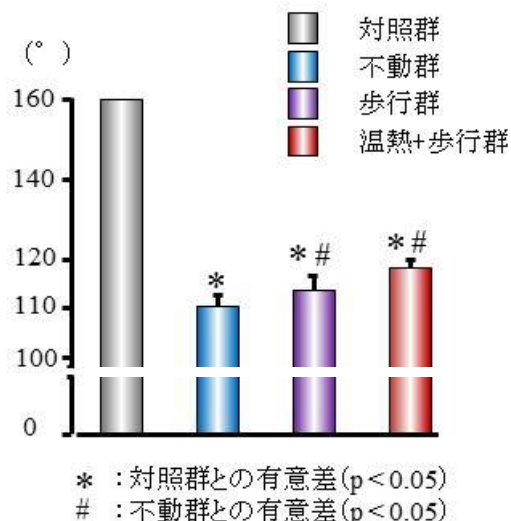


図4 足関節背屈可動域の比較

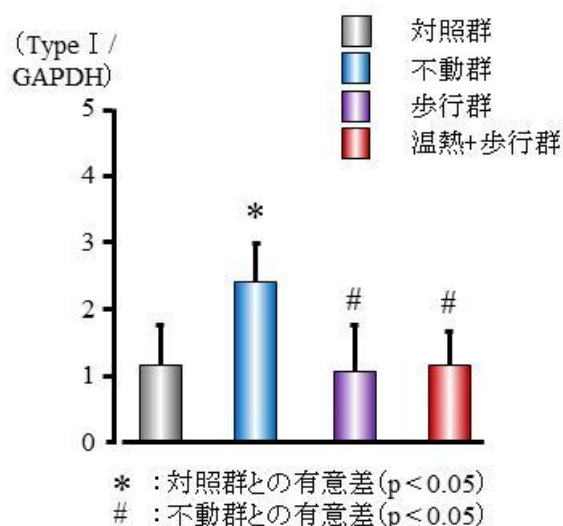


図5 type I コラーゲン mRNA 発現量の比較

タイプ III コラーゲン mRNA の発現量は、対照群が 1.51、不動群が 4.53、歩行群が 2.09、温熱+歩行群が 1.77 であり、不動群は対照群より有意に高値を示した。一方、歩行群と温熱+歩行群は不動群より有意に低値を示し、対照群との有意差も認められなかった(図6)。

### 考察

本研究では、不動によって惹起される筋萎縮と拘縮に焦点をあて、これらの進行が短時間の歩行運動によって抑制できるのか、また、温熱負荷

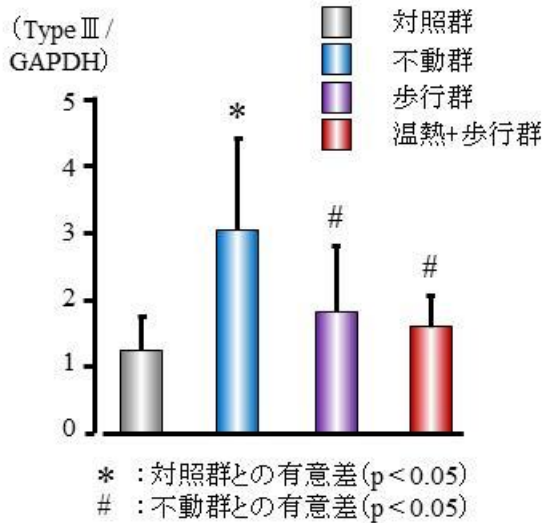


図6 typeIIIコラーゲン mRNA 発現量の比較

を併用することでその効果を高めることができるのかを検討した。

今回、筋萎縮の指標には相対重量比と筋線維横断面積を用いたが、これらの結果を歩行群と不動群と比較すると、相対重量比に関しては有意差は認められなかったが、筋線維横断面積に関しては歩行群が有意に高値を示した。つまり、この結果は短時間の歩行運動による筋線維萎縮の進行抑制効果を示唆している。そして、このメカニズムには、運動がもたらす神経系因子や内分泌系因子、機械的因子などが関与していると推察され、中でも機械的因子の影響が重要と考えられている<sup>5)</sup>。運動がもたらす機械的因子とは、骨格筋に対するメカニカルストレスの負荷であり、Insulin-like growth factor(以下、IGF)-1 と呼ばれるサイトカインの発現増加を発端とする分子シグナルの発動によって起こる筋構成タンパク質の合成促進や分解抑制といったメカニズムである<sup>5)</sup>。ただ、本研究ではこの点については検討できておらず、今後明らかにすべき課題である。

次に、温熱+歩行群と不動群を比較すると、相対重量比、筋線維横断面積いずれにおいても温熱+歩行群が有意に高値を示し、しかも筋線維横断面積に関しては、温熱+歩行群が歩行群より有意に高値を示した。つまり、この結果は短時間の歩行運動に温熱負荷を併用することで筋線維萎縮の進行抑制効果が高まることを示唆している。そして、このメカニズムには温熱負荷によって骨格筋内に発現する熱ショックタンパク質

(Heat shock protein;以下、HSP)72 が関与していると考えられる。中野ら<sup>1)</sup>によれば、42℃に設定した温水浴内にラットの後肢を60分間浸漬すると、ヒラメ筋の筋温が約41℃に達し、HSP72含有量も有意な増加を認めたと報告しており、今回の実験でもこの報告に準拠して温熱負荷を行った。つまり、今回の温熱+歩行群のヒラメ筋においてもHSP72の発現が誘導されていると推測される。そして、HSP72の発現は筋構成タンパク質の合成促進や筋衛星細胞の活性化をもたらすことが先行研究によって明らかにされており<sup>1,2,5)</sup>、短時間の歩行運動に温熱負荷を併用することで筋線維萎縮の進行抑制効果が高まった今回の結果にもHSP72のこれらの作用が影響していると推察される。ただ、今回の検索ではヒラメ筋におけるHSP72の発現状況は明らかにできておらず、今後検討すべき課題である。

次に、拘縮に対しては、指標に用いた足関節背屈可動域の結果をみると歩行群は不動群より有意に高値を示し、これは短時間の歩行運動による拘縮の進行抑制効果を示唆している。また、このことを裏付けるようにPicrosirius Red染色像の顕鏡結果でも筋周膜や筋内膜の肥厚の程度は不動群に比べ歩行群が軽度であり、タイプI・IIIコラーゲン mRNA 発現量においても不動群に比べ歩行群は有意に低値を示した。つまり、不動によって惹起される骨格筋内のコラーゲンの過剰増生、すなわち線維化の発生を短時間の歩行運動によって軽減していることが示唆され、拘縮の病態メカニズムに対しても有効に作用していると推察される。そして、先行研究によれば骨格筋が不動状態に曝され、メカニカルストレスの負荷が減弱すると、トランスフォーミング増殖因子(transforming growth factor;以下、TGF)-βと呼ばれるサイトカインの発現が増加し、これが発端となって線維芽細胞が活性化するとともに、その亜型である筋線維芽細胞への分化も促され、結果、タイプI・IIIコラーゲンの増生、すなわち線維化が発生するとされている<sup>6)</sup>。つまり、短時間の歩行運動によって骨格筋の線維化の発生が軽減した今回の結果には、歩行運動がもたらす骨格筋への周期的なメカニカルストレスの負荷が主要因として関与していると推察される。

一方、温熱+歩行群の結果をみると、拘縮の指



標に用いたすべてにおいて歩行群と有意差を認めず、このことは筋萎縮の場合とは異なり、短時間の歩行運動に温熱負荷を併用しても拘縮の進行抑制効果を高めることはないことを示唆している。そして、この結果は先に述べた Kondo ら<sup>4)</sup>の報告を支持するものである。一般に、温熱療法は軟部組織の伸張性の改善に効果があり、このことが原因で生じる拘縮は好適例とされているが、この根拠となっている研究は非常に古く、しかも適用されている温度は 45℃である<sup>7)</sup>。つまり、これらのことから考えると、拘縮に対する温熱療法の効果に関しては、その方法や実施時間・頻度、適用温度など、様々な条件について再検討する必要があると思われる。

以上のことから、筋萎縮に対しては短時間の歩行運動のみでその進行抑制効果を認め、しかもこれに温熱負荷を併用することでその効果を高める可能性があることが示唆された。一方、拘縮に対しては短時間の歩行運動のみでその進

行抑制効果を認めるものの、温熱負荷を併用してもその効果を高めることは期待できないように思われた。つまり、臨床において頻繁に実施されている運動療法の前処置として行う温熱療法は、治療ターゲットによって効果が異なる可能性があるかと推察される。ただ、今回の結果は、臨床において活動時間がリハビリテーションの時間のみといったような、ベッド上での臥床時間が長い対象者に対して、短時間の歩行運動のみでも廃用症候群の予防につながることを示唆する基礎データになると思われる、このような対象者に対する治療戦略の一助になると考える。

### 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先生方に厚く御礼申し上げます。

### 参考文献

- 1) 中野治郎, 沖田 実, 他: 温熱刺激による筋力増強. 理学療法. 2007;24:954-959.
- 2) Yoshida N, Morimoto Y, et al. : Effects of combination therapy of heat stress and muscle contraction exercise by neuromuscular electrical stimulation for disuse atrophy in rat. J Phys Ther Sci. 2013; 25:201-206.
- 3) 坂口 顕, 沖 貞明, 他: 関節拘縮発生予防を目的とした温熱負荷の効果 ラット足関節ギプス固定モデルを用いたトレッドミル走行での検討. 理学療法科学. 2006;21:181-184.
- 4) Kondo Y, Nakano J, et al. : Effects of prolonged stretching and thermotherapy on muscle contracture of immobilized rat soleus muscle. J Phys Ther Sci. 2012;24:541-547.
- 5) 片岡英樹: 筋萎縮, 機能障害科学入門. 沖田実(編), 九州神陵文庫, 福岡, 2010, pp. 180-211.
- 6) 片岡英樹, 沖田 実, 他: 骨格筋の変化に由来した拘縮, 関節可動域制限 病態の理解と治療の考え方. 沖田 実(編), 三輪書店, 東京, 2013, pp. 93-134.
- 7) 片岡英樹: 温熱療法, 物理療法第2版. 沖田 実(編), 神陵文庫, 神戸, 2009, pp. 77-134.

(指導教員 沖田 実)