

不動に伴う骨格筋の可塑的变化に対する 持続的伸張運動と電気刺激誘発性筋収縮運動の効果について

阪本 忠宥

要旨

本研究の目的は、不動に伴う骨格筋の可塑的变化に対する持続的伸張運動と電気刺激誘発性筋収縮運動の効果を検討することである。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ギプスで2週間不動化する実験群に振り分け、実験群はさらに、①不動のみを行う不動群、②不動の過程で下腿三頭筋に持続的伸張運動を負荷する伸張群、③不動の過程で下腿三頭筋に電気刺激誘発性筋収縮運動を負荷する電気刺激群、④不動の過程で足関節中間位保持のみを行う中間位保持群に分けた。結果、持続的伸張運動、電気刺激誘発性筋収縮運動とも足関節背屈可動域制限に対する効果はないものの、ヒラメ筋の線維化の発生はいずれの介入でも抑制され、その効果に大差はなかった。一方、筋線維萎縮の進行抑制効果は電気刺激誘発性筋収縮運動のみに認められた。以上のことから、不動に伴う骨格筋の可塑的变化を予防するためには、積極的な筋収縮運動の負荷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り骨格筋が不動状態に曝されると、可塑的变化が生じる。その一つがコラーゲンの増生に起因した線維化であり、これは筋性拘縮の主要な病態とされ、骨格筋の伸張性低下を惹起し、関節可動域制限に発展する¹⁾。あわせて、筋線維が萎縮・縮小することも知られており、いわゆる廃用性筋萎縮に由来した筋力低下に発展する。そして、最近の先行研究を概観すると、不動に伴う骨格筋の可塑的变化である筋性拘縮と廃用性筋萎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きている^{2,3)}。具体的には、不動によって筋核のアポトーシスが誘導されることで、筋核数が減少し、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のではないかと考えられている²⁾。そして、その結果、筋線維は縮小し、廃用性筋萎縮が発生するとともに、線維化関連分子が賦活化され、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とされている^{2,3)}。このように、筋性拘縮と廃用性筋萎縮の病

態形成には関連性があり、効果的な介入戦略を展開するためには、以上のようなメカニズムを考慮する必要があると思われる。

一方、先行研究を概観すると、拘縮のアウトカムである関節可動域をパラメータとし、持続的伸張運動の効果が数多く検討されている^{4,7)}。しかし、筋性拘縮の主要な病態である骨格筋の線維化に対する持続的伸張運動の効果を明らかにした報告は非常に少ない。また、筋性拘縮の病態形成に筋線維萎縮の発生が深く関わっているという前述のメカニズムを踏まえると、筋収縮を伴わない持続的伸張運動より、積極的な筋収縮運動の負荷が不動に伴う骨格筋の可塑的变化に対しては、より効果的ではないかと考えられる。

積極的な筋収縮運動の方法としては、レジスタンストレーニングをはじめ、荷重・歩行運動など、様々な方法がある。しかし、臥床中や随意運動が困難な場合などではこれらの介入戦略を適用することは難しい。これに対し、電気刺激誘発性筋収縮運動はこのような状態にある対象者にも適用できる介入戦略であり、筋性拘縮や廃用性筋萎縮といった不動に伴う骨格筋の可塑的变化

の予防に効果的と思われる。

つまり、本研究の目的は持続的他動運動と電気刺激誘発性筋収縮運動が関節可動域制限や筋性拘縮、廃用性筋萎縮におよぼす影響を検討し、両者の効果について比較することである。

予備実験

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、先行研究⁸⁾を参考に筋力増強効果が期待できる最大筋力 (maximum voluntary contraction; MVC) の 60% (以下、60%MVC)⁹⁾ を発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。

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、以下の実験を行った。具体的には、腹臥位としたラットの足関節を底背屈中間位の状態とし、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、下腿後面に表面電極を貼付し、刺激周波数;100Hz, パルス幅;200 μ sec, 刺激サイクル;1 秒通電, 5 秒休止の条件で、低周波治療器トリオ 300 (伊藤超短波社製) を用い、刺激強度を 1mA ずつ漸増させ、通電した。そして、各刺激強度によって誘発される足関節底屈力を上記のプッシュプルゲージで測定した。

結果、電気刺激によって誘発された最大底屈力は 4.16N で、その際の刺激強度は 10mA であった。そこで、最大底屈力が発揮されるまでの刺

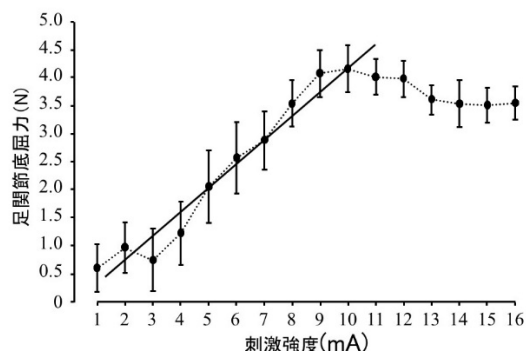


図 1 電気刺激強度の漸増に伴う足関節底屈力の変化

激強度と底屈力の関係性を示す一次回帰直線を求めた。最大底屈力の結果より、60%MVC は 2.496N となり、これを一次回帰直線に当てはめると刺激強度は 5.92N となった。この結果から本実験の刺激強度 6mA に決定した (図 1)。

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、これらが無作為に 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=21) に振り分けた。そして、実験群は、①不動のみを行う不動群 (n=6)、②不動の過程で下腿三頭筋に持続的伸張運動を負荷する伸張群 (n=5)、③不動の過程で足関節中間位にて下腿三頭筋に電気刺激誘発性筋収縮運動を負荷する電気刺激群 (n=5)、④電気刺激群の疑似処置として足関節中間位保持のみを行う中間位保持群 (n=5) 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) 持続的伸張運動の方法

伸張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、側臥位とした。次に、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 の張力で足関節を背屈させ、その背屈角度を保持することにより下腿三頭筋に持続的伸張運動を負荷した。

4) 電気刺激誘発性筋収縮運動の方法

電気刺激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、足関節を底背屈中間位の状態とし、6mA の刺激強度で予備実験と同様の方法で下腿三頭筋に電気刺激誘発性筋収縮運動を負荷した。

なお、今回の収縮様式は足関節底背屈中間位での等尺性収縮となっており、その疑似処置のため中間位保持群も設定した。

5) 介入の頻度

伸張群、電気刺激群、中間位保持群の3群の実験群に対する介入時間は、いずれも1日20分間、頻度は週6回とした。

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

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、足関節背屈可動域を測定した。そして、両側のヒラメ筋を採取し、後述する生化学的・組織学的検索に供した。

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、0.3N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回を行い、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

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を筋腹中央部で2分割し、その一部を細切り、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。

② ヒドロキシプロリンの定量

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。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°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で表した。

3) 筋線維萎縮の評価のための組織学的検索

2分割した右側試料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、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-Ri1)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

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) 関節動域制限の発生状況

すべての実験群の足関節背屈可動域は、対

照群のそれと比較して有意に低値を示した。また、実験群間では電気刺激群が最も高値であったが、各群間に有意差は認められなかった(図2)。

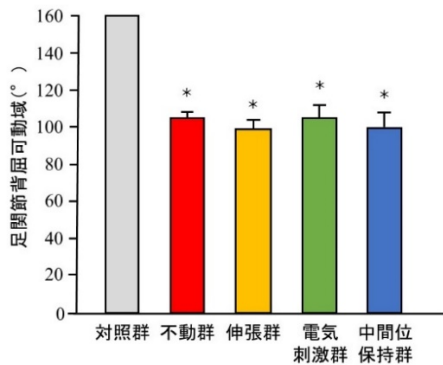


図2 足関節背屈可動域

平均±標準偏差 * : 対照群との有意差

2) 線維化の発生状況

不動群と中間位保持群のヒドロキシプロリン含有量は対照群のそれと比較して有意に高値を示した。一方、伸張群と電気刺激群のそれは不動群や中間位保持群より有意に低値を示し、対照群との有意差も認めなかった。また、伸張群と電気刺激群を比較すると、この2群間に有意差は認められなかった(図3)。

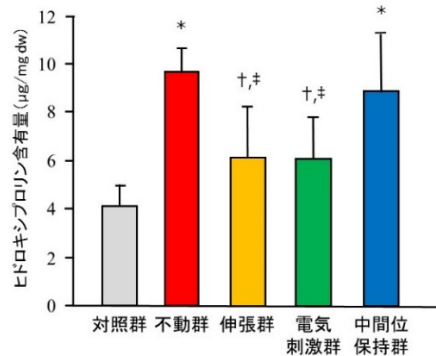


図3 ヒドロキシプロリン含有量

平均±標準偏差 * : 対照群との有意差

† : 不動群との有意差 ‡ : 中間位保持群との有意差

3) 筋線維萎縮の発生状況

筋線維横断面積の分布状況をみると、対照群と比較して実験群の4群は左方に位置していた。また、実験群間で比較すると、電気刺激群のみ右方に位置していた(図4)。

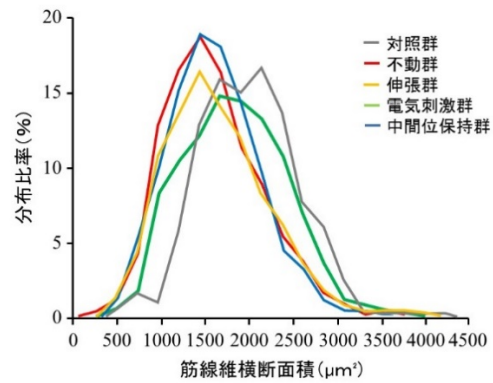


図4 筋線維横断面積の分布状況

各群の平均筋線維横断面積を比較すると、実験群の4群は対照群より有意に低値を示した。また、実験群間を比較すると、電気刺激群は他の群より有意に高値を示した(図5)

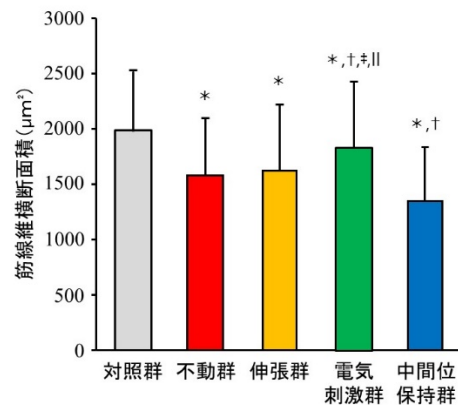


図5 平均筋線維横断面積

平均±標準偏差 * : 対照群との有意差

† : 不動群との有意差 ‡ : 中間位保持群との有意差

II : 伸張群との有意差

考察

筋性拘縮や廃用性筋萎縮といった不動に伴う骨格筋の可塑的变化は、関節可動域制限や筋力低下といった機能障害を引き起こし、ADL や QOL に直接的な影響をおよぼすことから、適切な介入戦略を早期から実践する必要がある。また、最近の先行研究によれば、筋性拘縮と廃用性筋萎縮の病態形成には関連性があり、効果的な介入戦略を展開するためには、そのメカニズム

を考慮する必要があると思われる。つまり、筋収縮運動を伴わない持続的伸張運動より、積極的な筋収縮運動の負荷が不動に伴う骨格筋の可塑的变化に対しては、効果的ではないかと考えられ、しかも、臥床中や随意運動が困難な場合でも適用できる電気刺激誘発性筋収縮運動が有効な介入戦略になるのではないかと仮説を立て、本研究を行った。

今回の結果から、足関節背屈可動域は対照群と比較してすべての実験群で有意に低値を示し、実験群間では有意差を認めなかった。すなわち、今回の実験条件での持続的伸張運動と電気刺激誘発性筋収縮運動では、関節可動域制限の発生を予防することは困難であったといえる。関節可動域制限に対する持続的伸張運動の効果を検討した報告は数多くあるが、伸張力を規定している報告は非常に少ない。その中で、Kondo ら¹⁰⁾はラット足関節を最大底屈位で4週間不動化した後、不動を解除し、その後2週間、麻酔下で0.9Nの張力で足関節を背屈させ、この状態を30分間保持するといった方法で持続的伸張運動による介入を行っている。その結果、介入による足関節背屈可動域制限の回復促進効果が認められている。一方、今回は不動の過程における介入であり、開始当初は0.3Nの張力で足関節を背屈させれば正常域まで可動することが可能であった。そのため、その後の不動期間中も伸張力は0.3Nで行ったが、結果的には伸張力が不十分なため、関節可動域制限の発生を許してしまったのではないかとと思われる。加えて、今回の電気刺激誘発性筋収縮運動は足関節の関節運動を伴わない等尺性収縮であり、このことが関節可動域制限の発生を許してしまった要因ではないかと推察される。

しかしながら、筋性拘縮の病態に関わる線維化の発生状況をヒドロキシプロリン含有量の結果から検討すると、伸張群と電気刺激群は不動群や中間位保持群より有意に低値を示し、対照群との有意差も認めなかった。また、伸張群と電気刺激群の間にも有意差を認めなかった。つまり、持続的伸張運動と電気刺激誘発性筋収縮運動のいずれの介入でも不動によって惹起される骨格筋の線維化が抑制される可能性が示唆され、その効果には大差はないといえる。ただ、ヒドロキ

シプロリン含有量の結果だけでは、骨格筋の線維化に対する介入効果の検証は不十分であり、線維化関連分子の動態など、今後さらに詳細な検討が必要と思われる。

次に、筋線維横断面積の結果をみると、対照群と比較してすべての実験群で有意に低値を示し、実験群間では電気刺激群が他の群より有意に高値を示した。つまり、不動によって惹起される筋線維萎縮の進行が電気刺激誘発性筋収縮運動によって抑制されることが明らかとなり、これは筋力増強効果が期待できる60%MVCを發揮する刺激強度で通電を行ったことが影響していると思われる。一方、持続的伸張運動にも筋線維萎縮の進行抑制効果があることはよく知られており、例えば、沖田ら¹¹⁾は1週間の後肢懸垂によって惹起されるラットヒラメ筋の筋線維萎縮の進行が持続的伸張運動によって抑制されることを報告している。しかし、今回の持続的伸張運動では筋線維萎縮の進行抑制効果は認められず、沖田ら¹¹⁾の報告とは異なる結果となった。当然、今回の実験とは実験モデルや実験期間が異なるため一概に比較はできないが、一番の違いはやはり伸張力ではないかと思われる。実際、沖田ら¹¹⁾の報告では足関節を最大背屈位、すなわち背屈の正常域まで可動させ、その位置で背屈位を保持することでヒラメ筋に対して持続的伸張運動を行っている。つまり、明らかに今回の実験よりも強い張力が負荷されており、これが結果に影響していると思われる。

以上、今回の結果を総合的に捉えると、持続的伸張運動より電気刺激誘発性筋収縮運動が不動に伴う骨格筋の可塑的变化の予防に効果的であるといえる。そして、このことから積極的な筋収縮運動は廃用性筋萎縮のみならず、筋性拘縮の介入戦略としても有効であることが示唆され、今後は効果的な介入条件についての検討が必要と思われる。

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総合研究科運動障害リハビリテーション研究室の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 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 93-134.
- 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—筋性拘縮の発生に関わる分子機構の検討—. 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) 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.
- 4) Williams PE: Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle. *Ann Rheum Dis*. 1990; 49: 316-317.
- 5) 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.
- 6) 西田まどか, 沖田 実, 他: 持続的伸張運動と間歇的伸張運動が拘縮と筋線維におよぼす影響—関節固定法と後肢懸垂法を組み合わせたラットの実験モデルによる検討—. *理学療法学*. 2004; 31: 304-311.
- 7) 沖田 実, 中野治郎, 他: 持続的他動運動 (CPM) による拘縮の予防効果—ラットヒラメ筋の筋内膜コラーゲン線維網の形態変化から—. *日本物理療法学会誌*. 2005; 12: 61-66.
- 8) 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—行動学的評価による検討—. *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*. 2015; 11: 41-48.
- 9) 阪本良太: 筋力増強訓練, 運動療法学テキスト(改定第 2 版), 植松光俊, 大川裕行, 他(編), 南江堂, 東京, 2015, pp 164-177.
- 10) 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.
- 11) 沖田 実, 中居和代, 他: 廃用性筋萎縮の予防としての温熱負荷の影響に関する研究. *理学療法学*. 2003; 30: 63-69.

(指導教員 沖田 実)