

# 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—

江崎ひなた・平島悠嗣

本研究の目的は, 不活動によって惹起される筋萎縮, 筋性拘縮, 筋痛に対するベルト電極式骨格筋電気刺激法(B-SES)の介入効果を明らかにするとともに, 効果的な刺激条件についても検討することである. 7週齢のWistar系雄性ラット34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, 筋線維萎縮と筋性拘縮の進行抑制効果はB-SES②群のみに認められた. 一方, 筋痛の軽減効果はB-SES①群, B-SES②群ともに認められた. 以上の結果を総括すると, 不活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であり, しかも, 筋収縮頻度が高くなる刺激条件が有効であることが示唆された.

### はじめに

(公社)日本理学療法士協会から報告されている2010年度の理学療法実態調査の結果をみると, 筋力低下, 関節可動域障害, 疼痛といった機能障害・症候が理学療法的主要な対象にあげられている<sup>1)</sup>. そして, 臨床においてこれらの障害・症候はギプス固定や安静臥床などといった身体局所あるいは全身の不活動によって惹起されることが多く, 運動器, 中でも可塑性に富んだ骨格筋が不活動の影響を受けた結果ではないかと推察される. そして, 最近の所属研究室の先行研究によれば, 不活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>2)</sup>. 具体的には, 骨格筋が不活動に曝されると, 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し, 細胞質領域が減少することによって筋萎縮が生じるとされている<sup>3)</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, これを発端として線維化関連分子が発現, 活性化することでコラーゲンの増生, すなわち線維化が発生し, 筋性拘縮に

発展するとされている<sup>4,5)</sup>. また, 不活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)が発現することも知られており<sup>6,7)</sup>, その産生細胞の一つがマクロファージである<sup>2)</sup>. つまり, 筋萎縮, 筋性拘縮, 筋痛といった不活動に伴う骨格筋の可塑的変化の発生メカニズムに関わる重要事象は, 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ている<sup>2)</sup>.

しかし, これまでは筋萎縮, 筋性拘縮, 筋痛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. ただし, 前述の発生メカニズムの類似性を踏まえると, 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のではないかと考えられる. 具体的には, 積極的な筋収縮運動の負荷が効果的ではないかと仮説でき, 安静臥床中など, 自身での随意運動が困難な患者にも適用できる骨格筋電気刺激は有効な介入戦略になると考えられる. ただし, 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、効果的な刺激強度まで漸増できないなどの問題があった。一方、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ての骨格筋を同時に刺激できることから、高い運動効果を得ることができる<sup>8)</sup>とされている。また、出力波形や電極素材の開発により痛みなどの不快な通電感が軽減されている<sup>8)</sup>。しかし、不活動によって惹起される筋萎縮、筋性拘縮、筋痛に対する B-SES の介入効果は明らかになっていない。

本研究の目的は、不活動によって惹起される筋萎縮、筋性拘縮、筋痛に対する B-SES の介入効果を明らかにするとともに、効果的な刺激条件についても検討することである。

## 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 34 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、後に行う筋痛の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=7)、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=10)、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=17) に振り分けた。そして B-SES 群については、2 秒通電、6 秒休止の 1:3 サイクルでの刺激を行う B-SES①群 (n=8) と 2 秒通電、2 秒休止の 1:1 サイクルでの刺激を行う B-SES②群 (n=9) を設定した。

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 2 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に露出させ、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 の方法 (図 1)

#### ① 電極の設置と刺激周波数

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 電極を巻き付けた。そして、刺激周波数はラットの下腿骨格筋に強縮を誘発する目的で、B-SES①群、B-SES②群とも 50Hz とした。

#### ② 刺激強度

所属研究室の先行研究<sup>9)</sup>によれば、60% MVC の足関節底屈筋力を正常ラットに誘発させるためには 4.7 mA の刺激強度が必要であることが明らかになっている。そこで、刺激強度は B-SES①群、B-SES②群とも 4.7 mA とした。

#### ③ 刺激サイクルと刺激時間

所属研究室の先行研究<sup>9)</sup>では、4.7 mA の刺激強度で通電した際の足関節底屈筋力の推移が調査されている。この結果によれば、2 秒収縮、6 秒休止の 1:3 の刺激サイクルでは 28 分、2 秒収縮、2 秒休止の 1:1 の刺激サイクルでは 18 分で筋疲労が出現することが明らかになっている。そこで、この結果と臨床適用を考慮し、刺激時間は B-SES①群が 20 分、B-SES②群が 15 分とした。

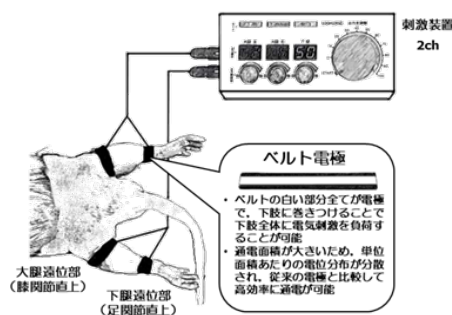


図 1 動物実験用 B-SES の概要

### 2. 検索方法

#### 1) 評価内容

不動開始前 (以下, base line; BL) と不動 1 週

後、2 週後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三種混合麻酔薬(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、2 週間の不動期間終了後は、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 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、筋萎縮の評価の指標の一つに用いた。

### ② 筋線維横断面面積

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 7 $\mu$ m 厚の横断切片を作製し、Hematoxylin & Eosin(以下, H&E)染色に供した。染色像は顕微鏡用デジタルカメラ(Nicon, DS-R1)を用いて 200 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面積を測定し、筋萎縮の評価の指標の一つに用いた。

## 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>4)</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、0.6 $\mu$ m 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 5 $\mu$ l を 2 時間 100°Cで加熱処理した後、4N-NaOH を 50 $\mu$ l 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 500 $\mu$ l 加え、室温で 25 分間処理した後、Ehrlich 溶液を 500 $\mu$ l 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>6,7)</sup>。

### ② NGF 含有量

先行研究によれば、不活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>6,7)</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りし、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、ビーズ式細胞粉碎装置 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  $\beta$  PicoKine ELISA kit (Boster Immunoleader, 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質量で除し (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 相対重量比

各群の相対重量比を比較すると、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。また、実験群の3群間に有意差は認められなかった(図2)。

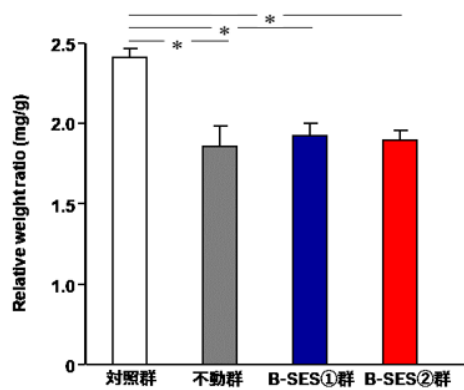


図2 相対重量比の比較

#### ② 筋線維横断面積

各群の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。また、実験群の3群間を比較すると B-SES②群は不動群、B-SES①群より有意に高値を示した(図3)。

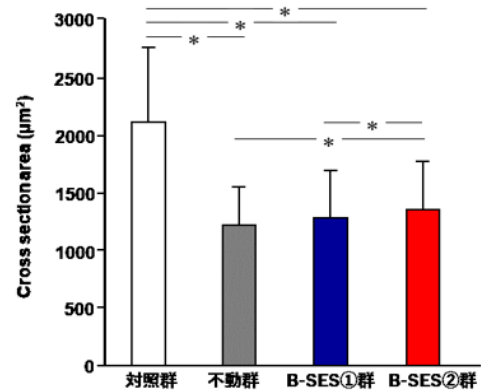


図3 筋線維横断面積の比較

### 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1週後、2週後ともに不動群、B-SES①群、B-SES②群の3群すべて対照群より有意に低値を示した。しかし、実験群の3群間を比較すると、B-SES②群は不動1週後、2週後ともに不動群、B-SES①群より有意に高値を示した(図4)。

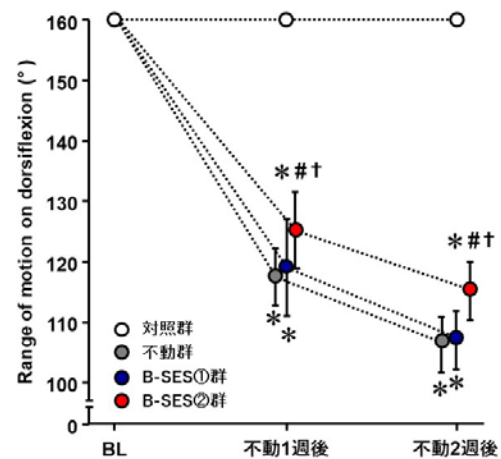


図4 足関節背屈可動域の推移

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

#### 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、不動群と B-SES①群は対照群より有意に低値を

示した。一方、B-SES②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)

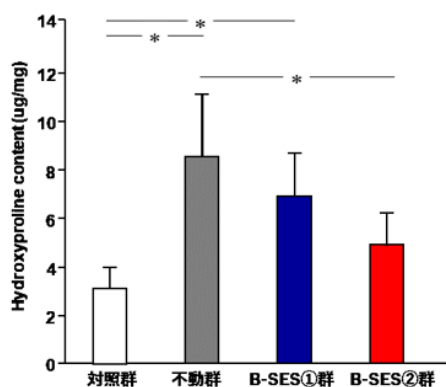


図5 ヒドロキシプロリン含有量の比較

### 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1週後、2週後ともに不動群、B-SES①群、B-SES②群の3群すべて対照群より有意に低値を示した。しかし、実験群の3群間で比較すると、不動1週後、2週後ともにB-SES①群とB-SES②群は不動群より有意に高値を示し、この2群間に有意差は認められなかった(図6)。

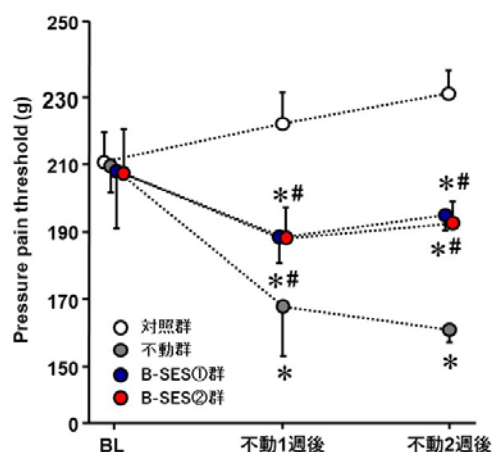


図6 筋圧痛閾値の推移

\*: 対照群との有意差, #: 不動群との有意差

#### ② NGF含有量

各群のNGF含有量を比較すると、不動群、B-SES①群、B-SES②群の3群すべて対照群より有

意に高値を示した。しかし、実験群の3群間を比較すると、B-SES①群、B-SES②群は不動群より有意に低値を示し、この2群間には有意差は認められなかった(図7)。

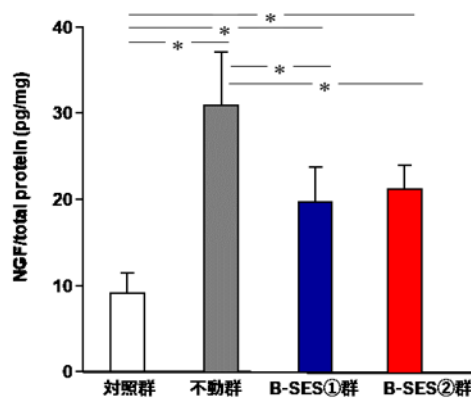


図7 NGF含有量の比較

### 考察

筋萎縮の評価結果をみると、相対重量比に関しては実験群の3群間に有意差は認められなかったが、筋線維横断面積はB-SES②群が不動群やB-SES①群より有意に高値を示した。つまり、この結果はB-SES②群のみに筋線維萎縮の進行抑制効果がみられることを示唆している。加えて、筋性拘縮の評価結果をみると、不動1週後、2週後ともに足関節背屈可動域はB-SES②群が不動群やB-SES①群より有意に高値を示し、ヒドロキシプロリン含有量もB-SES②群が不動群より有意に低値を示した。つまり、この結果はB-SES②群のみに筋性拘縮の進行抑制効果がみられることを示唆している。ここで、B-SES①群とB-SES②群の刺激条件を比較すると、異なっているのは刺激サイクルと刺激時間であり、これは1回の介入における筋収縮頻度が2群間で異なることを意味する。具体的には1回の介入でB-SES①群は150回、B-SES②群は225回の筋収縮頻度であり、このことが介入効果に影響している可能性があると思われる。つまり、不活動によって惹起される筋萎縮ならびに筋性拘縮をB-SESを用いて予防するためには、筋収縮頻度が高くなる刺激条件が有効といえよう。

一方、筋痛の評価結果をみると、不動1週後、2週後ともに筋圧痛閾値はB-SES①群、B-SES

②群が不動群より有意に高値を示し、この2群間には有意差は認められなかった。また NGF 含有量に関しても B-SES①群、B-SES②群は不動群より有意に低値を示し、この2群間には有意差は認められなかった。つまり、この結果は B-SES①群、B-SES②群ともに筋痛の発生を軽度抑える効果がみられることを示唆しており、筋痛に対するB-SESの介入効果には筋収縮頻度はさほど影響しないと思われる。沖田ら<sup>10)</sup>によれば、末梢組織が不活動に曝されると、感覚刺激入力が増弱・消失し、結果的に神経系にも何らかの変調をきたし、痛みの発生につながる可能性があるとして述べている。つまり、このような現象は骨格筋においても認められる可能性があり、事実、Ogaら<sup>7)</sup>は骨格筋を不活動に曝すと NGF が発現するとともに、一次侵害受容ニューロンの一つである C 線維の分布密度も増加することを明らかにしている。要するに、このような変化は感覚刺激を感知しやすい状態にするための骨格筋内で起こる可塑的变化であり、筋痛の発生メカニズムの一つと考えられている<sup>10)</sup>。このことを踏まえ今回の結果を考えると、筋収縮頻度が異なっても B-SES によって筋収縮運動を促すと、骨格筋に感覚刺激が入力され、NGF の発現増加といった骨格筋内での可塑的变化が軽減し、筋痛も軽度に抑えられたのではないかと推察される。しかしながら、今回の検索だけではメカニズムの全貌は明らかではなく、この点は今後の検討課題である。

以上、本研究の結果を総括すると、不活動によって惹起される筋萎縮、筋性拘縮、筋痛を B-SES を用いて予防するためには、筋収縮頻度が高くなる刺激条件が有効であると結論付けることができるとされる。しかし、本研究では日内介入頻度の影響などは明らかにできておらず、効果的な B-SES の刺激条件を明確にしていくためにはこれらの点の検討も今後必要と思われる。

## 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) 仙波浩幸, 青木菜摘, 他: 理学療法士実態調査報告—2010年1月実施—. 理学療法学. 2010; 37: 188-217.
- 2) 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—. 物理療法科学. 2020; 27: 1-6.
- 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—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学総合研究科保健学専攻修士論文, 2017.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 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) Oga S, Goto K, et al.: Mechanisms underlying immobilization-induced muscle pain in rats. Muscle Nerve. 2019; 61: 662-670.
- 8) 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.
- 9) 町田 響, 吉村萌華: 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. 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.
- 10) 沖田 実, 松原貴子: 痛みの発生メカニズム. ペインリハビリテーション入門, 三輪書店, 東京, 2019, pp 23-33.

(指導教員 沖田 実)