

不動によって惹起される筋萎縮, 筋性拘縮, 筋痛に対する 持続的他動運動の効果

芥川瑠梨・田中涼晟・松本幸則

本研究の目的は、持続的他動運動(以下、CPM)装置を用いて骨格筋の不動の過程で介入を行い、筋萎縮、筋性拘縮、筋痛に対してどのような影響をおよぼすのかを動物実験で検証することである。7週齢 Wistar 系雄性ラット 25 匹を無処置の対照群、両側足関節を最大底屈位で 2 週間不動化する不動群、不動の過程で 1 日 15 分間、角速度 30°/秒による CPM 介入を行う CPM①群、同様に 1 日 15 分間、角速度 15°/秒による CPM 介入を行う CPM②群に振り分けた。結果、各条件とも CPM 介入では筋萎縮、筋性拘縮、筋痛の発生を予防することは困難であったが、筋性拘縮に限ってはその進行を抑制する効果が認められた。そして、骨格筋に対するメカニカルストレスの暴露頻度はその効果に影響をおよぼさないことも明らかになった。ただし、その効果量は大きいものではなく、この点を踏まえ、先行研究で効果が確認されている筋収縮運動を不動後早期から負荷することが重要と思われる。

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¹⁾。そして、先行研究¹⁾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。具体的には、骨格筋が不動に曝されるとアポトーシスに由来した筋核の減少が生じ、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、結果、細胞質領域が縮小し、筋萎縮が生じるといわれている²⁾。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 β (以下、IL-1 β) が発現し、これを契機に線維芽細胞が活性化すると、transforming growth factor- β 1 (以下、TGF- β 1) の発現も相ま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といわれている³⁾。加えて、不動に曝された骨格筋は筋痛が発生するとされ、これは神経成長因子 (nerve growth factor, 以下、NGF) の発現が関与しており^{4,5)}、その産生細胞

の一つがマクロファージである。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¹⁾。

したがって、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、筋痛といった骨格筋の可塑性変化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、積極的な筋収縮運動の負荷が重要と思われる。事実、電気刺激装置を用いて筋力増強効果が期待される高負荷の筋収縮運動を不動の過程で実施すると、筋萎縮、筋性拘縮、筋痛の発生を予防できることが動物実験で確かめられている^{6,7)}。しかしながら、臨床では疾病や術後の急性期など、積極的な筋収縮運動が実施できない時期もあり、このような場合、徒手や機械を用いて他動的な関節運動を行い、拘縮の発生予防に努めている。ただし、このような他動的関節運動は持続的伸張運動と異なり、施行中に骨格筋の伸張・短縮といったメカニカルストレスが暴露できる利点があり、筋萎縮、筋性拘縮、筋痛といった骨格筋の可塑性変化に対しても影響をお

よぼす可能性がある。

そこで、本研究では持続的他動運動 (continuous passive motion; 以下, CPM) 装置を用い、骨格筋の不動の過程で介入を行い、筋萎縮、筋性拘縮、筋痛に対してどのような影響をおよぼすのか、動物実験で検証することを目的とする。

材料と方法

1. 実験プロトコル

1) 実験動物

本研究における動物実験に関しては、長崎大学が定める動物実験指針ならびに長崎大学動物実験委員会で承認を受けた実験計画書(承認番号; 1903281524)に準じ、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科バイオメディカルモデル動物研究センターで実施した。

実験動物には、7 週齢の Wistar 系雄性ラット 25 匹を使用した。そして、これらのラットは無処置の対照群 (n=6)、両側足関節を 2 週間不動化する不動群 (n=6)、不動の過程で CPM 装置を用いて足関節底背屈の持続的他動運動を行う群 (以下, CPM 群, n=13) に振り分け、CPM 群については後述するように角速度の違いによって 2 群に振り分けた (以下, CPM①群, CPM②群という)。

なお、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、後に行う筋圧痛閾値の評価が円滑に実施できるようハンドリングを行った。

2) 足関節の不動方法

3 種混合麻酔薬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毎日ギプスの巻替えを行った。

3) CPM の条件ならびに実施方法

CPM 装置の角速度を変えることで関節運動の頻度、すなわち骨格筋に対するメカニカルストレスの暴露頻度が異なってくることが想定される。そこで、本研究では以下に述べる 2 つの条件の

角速度を設定し、不動の過程で介入を行い、筋萎縮、筋性拘縮、筋痛に対する効果を検討した。

①角速度の条件

本研究で使用した CPM 装置は酒井医療製アングルストレッチャーであり、本装置は 5° 単位で角速度の設定が可能である。そこで、角速度を 30° /秒とし、速いスピードで関節運動を行い、関節運動の頻度、すなわち骨格筋に対するメカニカルストレスの暴露頻度が高くなる条件 (以下, CPM①群) ならびに角速度を 15° /秒とし、ゆっくりとしたスピードで関節運動を行い、骨格筋に対するメカニカルストレスの暴露頻度が低くなる条件 (以下, CPM②群) を設定した。

②実施時間ならびに実施頻度

先行研究^{6,7)}では、電気刺激を用いた筋収縮運動を不動の過程で 1 日 15 分間 (週 6 回) 実施し、筋萎縮、筋性拘縮、筋痛に対する効果を明らかにしている。そこで、本研究の結果もこの先行研究^{6,7)}の結果と比較する必要があると考え、CPM の実施時間は 1 日 15 分間、実施頻度は週 6 回とした。

③実施方法

CPM①群ならびに CPM②群の各ラットは 3 種混合麻酔薬の腹腔内投与によって麻酔を行い、背臥位の状態で膝関節が最大伸展位、足関節が最大底屈位となるよう調整した上で CPM 装置に固定した。そして、CPM①群は 30° /秒の角速度で、CPM②群は 15° /秒の角速度で足関節底背屈の持続的他動運動を実施した。なお、不動の過程で足関節背屈方向の関節可動域制限が発生した後は後述する方法で足関節背屈可動域を 3 回測定し、その最小値をその日の背屈角度に設定し、上記の角速度で足関節底背屈の持続的他動運動を実施した。

2. 検索方法

1) 足関節背屈可動域の評価

不動開始前 (以下, base line; BL) ならびに不動 1, 2 週間が終了した後は 3 種混合麻酔薬の腹腔内投与によってラットを麻酔し、所属研究室の先行研究^{2,3)}に基づき以下の方法で足関節背屈可動域を測定した。具体的には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た。

2) 筋痛の評価

筋痛に関しては、不動開始(以下、Base line; BL)と不動 1, 2 週間後に圧刺激鎮痛効果測定装置(Randoll-Selitto, Ugo Basile 社製)を用いて腓腹筋外側頭の筋圧痛閾値を測定し、評価した^{4,5)}。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した 3 回の測定値の平均値を筋圧痛覚閾値のデータとして採用した。

3. 検索試料の採取方法

2 週間の不動期間終了後は、3 種混合麻酔薬の腹腔内投与によって各群のラットを麻酔した。そして、体重を測定後、両側から腓腹筋外側頭を採取した。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、筋湿重量を体重で除した相対重量比を算出した。なお、腓腹筋外側頭はその後、後述する組織学的・生化学的検索に供した。

4. 組織学的検索

1) 筋線維横断面積の計測

筋試料は筋腹中央部で 2 分割し、トラガントゴムに包埋後、液体窒素で冷却したイソペンタン液内で急速凍結した。そして、クリオスタットを用いて 7 μ m 厚の連続横断切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(以下、H&E)染色ならびに酸性前処理(pH 4.5)によるミオシン ATPase 染色を施し、筋線維をタイプ I・II a・II b 線維に分別した。なお、腓腹筋外側頭の深層部はタイプ I・II a・II b 線維が混在して構成されているのに対し、浅層

部はタイプ II b 線維のみから構成されている。そこで、ミオシン ATPase 染色像は深層部と浅層部に分け、各々オールインワン顕微鏡(KEYENCE BZ-X800)で撮影し、パーソナルコンピュータに取り込み、深層部と浅層部における各筋線維タイプの筋線維横断面積を 1 筋につき各々 100 本以上計測した。

5. 生化学的検索

1) ヒドロキシプロリン含有量の計測

線維化の指標となるコラーゲン含有量に関しては、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を定量することによって行った。まず、試料作製として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、0.64 μ 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。

試料 5 μ l を 2 時間で 100°C で加熱処理した後、4N NaOH を 50 μ l 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 500 μ l 加え、室温で 25 分間処理した後、Ehrlich 溶液を 500 μ 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。

2) NGF 発現量の計測

先行研究^{4,5)}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。そこで、本研でも NGF 発現量の検索を western blot 法にて行った。具体的には、筋試料の一部に Lysis Buffer (50mM pH8.0 Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% NP-40, 5M Urea) を加えてホモジナイズ処理を行い、上清液を回収して 2mg/ml のタンパク量に調整した。次に、各サンプルに SDS sample buffer (Bio-Rad) ならびに 2-

メルカプトエタノールを加えて熱処理を行った後、15 μ l を 12.5%濃度のポリアクリルアミドゲルにロードし、20mA 定電流の条件で電気泳動を行った。電気泳動後はポリアクリルアミドゲルを40Vの定電圧の条件でPVDF膜へ転写した。転写後のPVDF膜はカゼインにてブロッキング処理を行い、一次抗体として抗NGF抗体(1:500; Santa Cruz)を用い、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。続いてHRP標識二次抗体(1:20,000; MBL)を用いて室温で1時間反応させた。そして、ECLキットとCCDカメラタイプ画像解析装置(ImageQuant, LAS 500)を用いてNGFのバンド像を検出した。NGFのバンド像を検出後、PVDF膜は50 $^{\circ}$ Cのストリッピングバッファーで30分間リブロービング処理を行った。その後、内因性コントロールとして β -actinを上記と同様の処理で検出した。NGFと β -actinのバンド像の輝度は画像解析ソフト(Scion image)を用いて半定量し、NGF/ β -actinの値を算出し、これをNGF発現量とした。

6. 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た。なお、有意水準は5%未満とした。

結果

1. 筋萎縮の評価結果

1) 筋湿重量ならびに相対重量比

各群の筋湿重量を比較すると、対照群に比べ不動群、CPM①群、CPM②群はいずれも有意に低値を示し、この3群間には有意差は認められなかった(図1a)。相対重量比に関しても、対照群に比べ不動群、CPM①群、CPM②群はいずれも有意に低値を示し、この3群間には有意差は認められなかった(図1b)。

2) 筋線維横断面積

腓腹筋外側頭部のミオシン ATPase 染色像をみると、浅層部のタイプIIb線維ならびに深層部のタイプI・IIa・IIb線維のすべてにおいて不動群、CPM①群、CPM②群は対照群より縮小していた(図2)。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

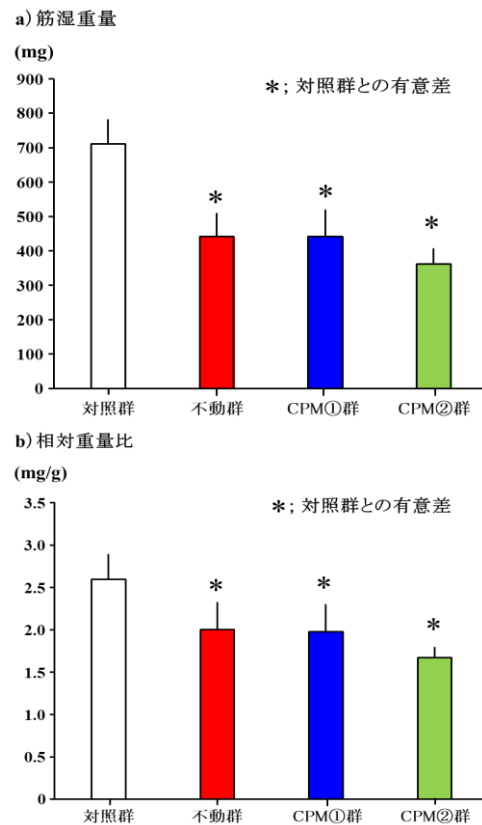


図1 筋湿重量ならびに相対重量比の比較

群、CPM①群、CPM②群は有意に低値を示し、この3群間には有意差は認められなかった(図3a)。また、深層部のタイプI・IIa・IIb線維に関してもすべて対照群に比べ不動群、CPM①群、CPM②群は有意に低値を示し、この3群間には有意差は認められなかった(図3b~d)。

2. 筋性拘縮の評価結果

1) 足関節背屈可動域

足関節背屈可動域を比較すると、不動1, 2週後ともに対照群に比べ不動群、CPM①群、CPM②群は有意に低値を示した。そして、この3群間を比較すると、不動1週後では有意差を認めないものの、不動2週後では不動群に比べCPM①群、CPM②群は有意に高値を示した(図4)。

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、CPM①群、CPM②群は有意に高値を示した。そして、この3群間を比較

すると、CPM①群、CPM②群は不動群に比べ有意に低値を示した(図5)。

筋圧痛閾値を比較すると、不動1,2週後ともに対照群に比べ不動群、CPM①群、CPM②群

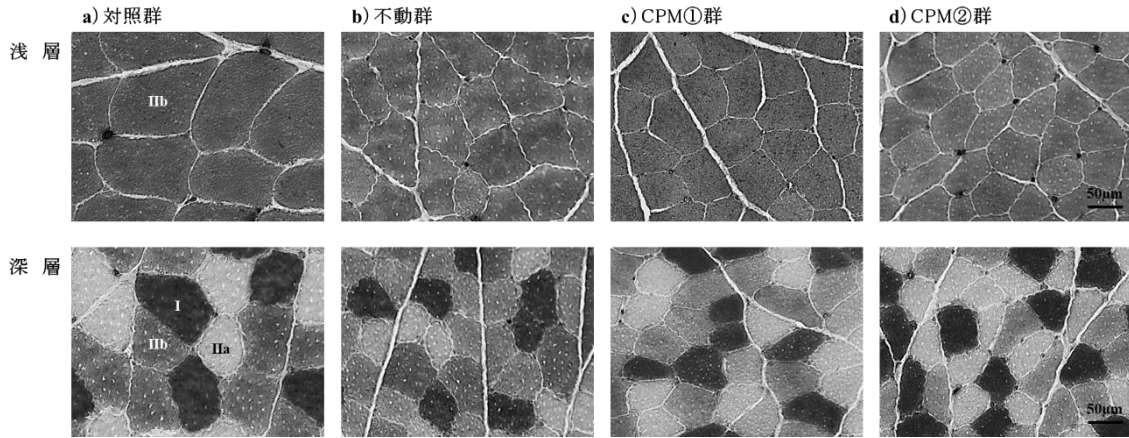


図2 腓腹筋外側頭のみオシンATPase染色像

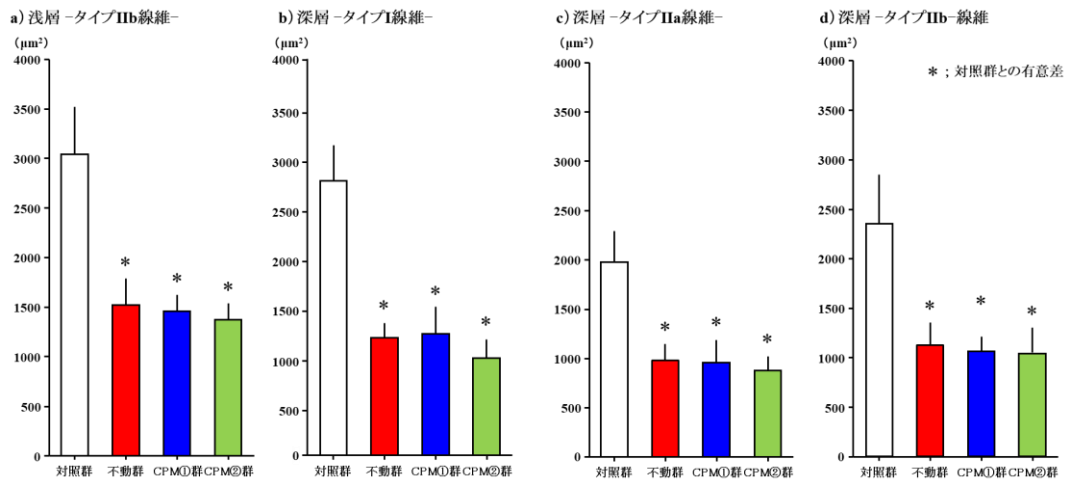


図3 筋線維横断面積の比較

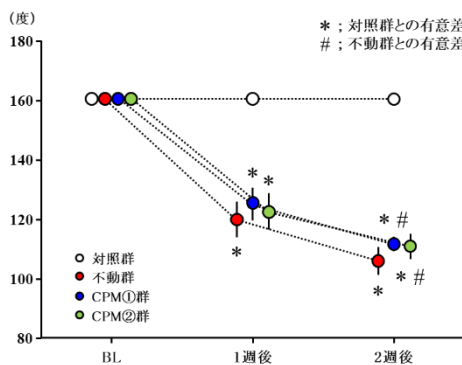


図4 足関節背屈可動域の比較

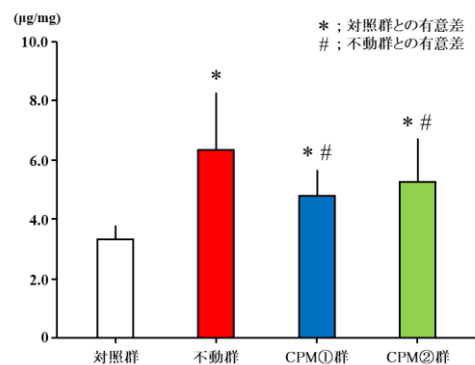


図5 ヒドロキシプロリン含有量の比較

3.筋痛の評価結果

1)筋圧痛閾値

は有意に低値を示した。そして、この3群間を比較すると、不動1,2週後とも有意差は認められ

なかった(図 6).

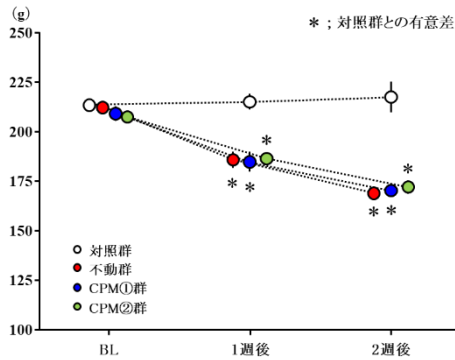


図 6 筋圧痛閾値の比較

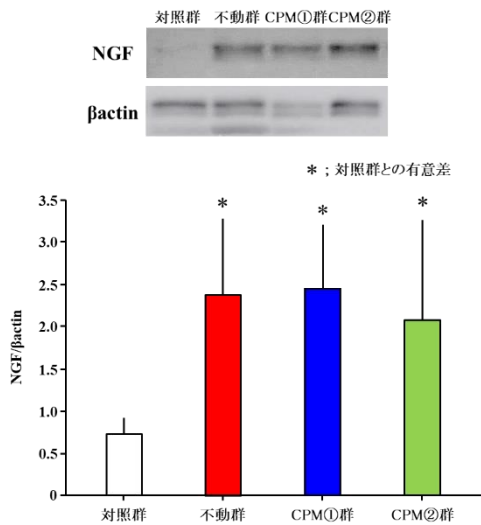


図 7 NGF 発現量の比較

上の画像は western blot 法のバンド像を示している。

2) NGF 発現量

western blot 法のバンド像をみると、不動群、CPM①群、CPM②群は対照群より明らかに濃染していた。そして、各群の NGF 発現量を比較すると、対照群に比べ不動群、CPM①群、CPM②群は有意に高値を示し、この 3 群間には有意差は認められなかった(図 7)。

考察

今回の結果から、筋萎縮の評価指標である筋湿重量や相対重量比ならびに浅層部、深層部のすべての筋線維タイプの筋線維横断面積は対照群に比べ不動群、CPM①群、CPM②群の 3

群は有意に低値を示し、しかもこの 3 群間には有意差は認められなかった。つまり、CPM による介入ではいずれの条件の角速度でも部位や筋線維タイプの違いに関係なく、筋萎縮の発生を予防することは困難であるといえる。

一方、筋性拘縮の評価指標である足関節背屈可動域は不動 1 週後では対照群に比べ不動群、CPM①群、CPM②群の 3 群は有意に低値を示し、しかもこの 3 群間には有意差は認められなかった。しかし、不動 2 週後では対照群に比べ不動群、CPM①群、CPM②群の 3 群は有意に低値を示すものの、この 3 群間を比較すると CPM①群と CPM②群は不動群より有意に高値を示した。加えて、ヒドロキシプロリン含有量に関して対照群に比べ不動群、CPM①群、CPM②群の 3 群は有意に低値を示すものの、この 3 群間を比較すると CPM①群と CPM②群は不動群より有意に低値を示した。つまり、CPM による介入ではいずれの条件の角速度でも筋性拘縮の発生そのものを予防することは困難であるが、その進行を抑制する効果があるといえる。しかし、電気刺激を用いた筋収縮運動を不動の過程で負荷している先行研究⁷⁾の結果と比較すると、今回の筋性拘縮に対する効果量は大きいものではなかった。

次に、筋痛の評価指標である筋圧痛閾値は、不動 1 週後、2 週後ともに対照群に比べ不動群、CPM①群、CPM②群は有意に低値を示し、しかもこの 3 群間に有意差は認められなかった。加えて、NGF 発現量に関して対照群に比べ不動群、CPM①群、CPM②群は有意に高値を示し、この 3 群間に有意差は認められなかった。つまり、CPM による介入ではいずれの条件の角速度でも筋痛の発生を予防することは困難であるといえる。

以上のように、角速度に関係なく不動の過程で CPM による介入を行っても筋萎縮や筋痛に対しては発生予防効果が認められず、筋性拘縮に対しては進行抑制効果を認めるものの、その効果量に関しては先行研究⁷⁾で検証されている筋収縮運動ほど高いものではなかった。つまり、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の上流に関わっている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いった事象¹⁾を持続的他動運動では抑止できな

いと考えられ、このことが今回の結果に影響をおよぼしていると推察される。

一方、前記の事象を持続的他動運動では抑止できないにも関わらず、筋性拘縮に対してはその進行を抑制する効果が認められた。つまり、筋性拘縮が進行する別のメカニズムに対して持続的他動運動が作用している可能性がある。具体的には、筋性拘縮が進行するメカニズムの一つとして不動によって惹起される骨格筋の低酸素化が指摘されており、この影響で線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化過程が賦活化し、線維化、すなわち筋性拘縮が進行すると考えられている³⁾。つまり、CPMによる頻回な関節運動によって骨格筋の低酸素化が緩和され、この影響で筋性拘縮の進行が抑制された可能性がある。しかし、この点を裏付けるデータは今回提示できておらず、今後の検討課題である。ただし、注目すべきは、15分間という短時間でも持続的他動運動は筋性拘縮の進行を抑制する効果があり、その効果は関節運動の頻度、すなわち骨格筋に対するメカニカルストレスの暴露頻度は影響しないという点である。これまでも、疾病や術後の急性期など、積極的な筋収縮運動が実施できない時期においては徒手や機械を用いて他動的な関節運動を行い、拘縮の発生予防に努めているが、これはエビデンスに裏付けされた介入といえ、臨床的にも意味のあることといえよう。

しかしながら、不動によって惹起される筋萎縮、筋性拘縮、筋痛を効果的かつ効率的に予防するためには、先行研究⁷⁾で報告されているように筋収縮運動が不可欠であることを改めて再認識した。つまり、急性期理学療法で実践されている早期離床や早期運動介入といった戦略は、筋萎縮、筋性拘縮、筋痛を予防する意味でも重要といえよう。

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, 本田祐一郎, 他: 慢性疼痛の病態形成における不動の影響—筋萎縮, 筋性拘縮, 筋痛のメカニズムも踏まえて. *Jpn J Rehabil Med.* 2021; 58(11): 1221-1228.
- 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; 65: 341-349.
- 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) 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.
- 5) Oga S, Goto K, et al.: Mechanisms underlying immobilization-induced muscle pain in rats. *Muscle Nerve.* 2020; 61: 662-670.
- 6) 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専攻卒業研究論文集. 2020;16: 20-25.
- 7) Honda Y, Tanaka N, et al.: Effects of belt electrode-skeletal muscle electrical stimulation on immobilization-induced muscle fibrosis. *PLoS One.* 2021; 16(5): e0244120

(指導教員: 沖田 実)