

ベルト電極式骨格筋電気刺激法による ラット腓腹筋の廃用性筋萎縮の進行抑制効果 — 1 日内介入頻度の影響 —

森田 沙歌

本研究の目的は、日内介入頻度を 2 回に増やし、不動によって惹起される廃用性筋萎縮に対する B-SES の効果を先行研究で報告されている日内介入頻度が 1 回の場合と比較することである。実験動物には 7 週齢の Wistar 系雄性ラット 21 匹を使用した。そして、これらのラットを 7 匹ずつ無処置の対照群、両側足関節を 2 週間不動化する不動群、不動化の過程で B-SES による介入を行う B-SES 群に振り分けた。なお、B-SES の刺激条件は日内介入頻度以外はすべて先行研究と同様である。結果、B-SES 群には浅層部のタイプ II b 線維ならびに深層部のタイプ I・II a・II b 線維のいずれにおいても筋線維萎縮の進行抑制効果が認められた。つまり、筋内深度あるいは筋線維タイプに関係なく、日内介入頻度を増やすことで廃用性筋萎縮の進行抑制効果が高まることが示唆された。

はじめに

臨床では、運動器疾患の罹患後に施されるギプス・シーネ固定や運動器疾患に対する外科処置後の痛み、あるいは医学的管理などによって生じる過度な安静指示などを理由に身体活動が低下し、身体局所ならびに全身の不動が惹起されることが頻繁にある。そして、このような不動によって骨格筋の活動が減少したり、重力も含めた力学的負荷が低下すると廃用性筋萎縮 (disuse atrophy) が惹起され、これを契機とした筋力低下はその後の機能的予後に影響をおよぼす¹⁾。つまり、廃用性筋萎縮の発生を予防することは、理学療法における重要な課題である。

一方、廃用性筋萎縮の発生メカニズムに関しては動物実験を通じて詳細に検討されている。具体的には、骨格筋が不動に曝されると、その 3 日目頃まで筋構成タンパク質の合成が低下するのに対し、筋構成タンパク質の分解は不動後 2 日目頃から亢進が始まり、その後は約 2 週間進行するといわれている。そして、筋構成タンパク質の分解亢進の推移に準拠するように筋構成タンパク質の損失も著しくなり、廃用性筋萎縮が発

生・進行するとされている²⁾。

したがって、理学療法においては筋収縮運動によって筋構成タンパク質の合成を促すとともに、筋構成タンパク質の分解を抑制することが重要である。そして、その方法論の一つに骨格筋電気刺激 (electrical muscle stimulation; 以下、EMS) があり、これは随意運動とは異なり、神経サイズが大きい運動単位、具体的にはタイプ II b を優先的に動員できるという特性を有している^{3,4)}。加えて、EMS 機器に関しても従来からある単極通電式の EMS に加え、最近では新しい EMS 機器も開発されており、中でも、大腿部と下腿に巻いたベルト電極で通電するベルト電極式骨格筋電気刺激法 (belt electrode skeletal muscle electrical stimulation; 以下、B-SES) は下肢全体の骨格筋の筋収縮運動が誘発できることから注目されている⁵⁾。

実際、所属研究室でもラット足関節不動モデルに対し、不動開始直後から B-SES を用いて筋収縮運動を実施し、腓腹筋の廃用性筋萎縮に対する効果が検討されている⁶⁾。なお、この実験における B-SES の刺激条件として、刺激周波数は後肢骨格筋に強縮を誘発する目的で 50Hz と

し、刺激強度はラット足関節の最大底屈筋力の60%が発揮できる4.7mAとしている。そして、刺激サイクルは2秒収縮、2秒休止の1:1サイクル、1回あたり刺激時間は15分とし、1回/日、6日/週、延べ2週間の介入が行われている。結果をみると、浅層部を構成するタイプIIb線維はB-SES介入による筋線維萎縮の進行抑制効果が認められているが、深層部を構成するタイプI・IIa・IIb線維に対しては上記の効果は認められていない。つまり、所属研究室の先行研究で実施されている条件でのB-SES介入では、筋線維萎縮の進行抑制効果に限界があるといえる。そして、その要因について検討した結果、日内介入頻度が1回と少ないことが影響しているのではないかと考えた。そこで、日内介入頻度を増やすことで廃用性筋萎縮の進行抑制効果も高まるのではないかと仮説を立てた。ただし、この効果は筋内深度あるいは筋線維タイプによっても違いが生じる可能性も想定される。

本研究の目的は、日内介入頻度を2回に増やし、不動によって惹起される廃用性筋萎縮に対するB-SESの効果を実験研究で報告されている日内介入頻度が1回の場合と比較し、上記の仮説を検証することである。

材料と方法

1. 実験プロトコル

1) 実験動物

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21匹(体重;202~226g, 平均体重;215.1±6.8g)を使用した。そして、これらのラットを7匹ずつ無処置の対照群、両側足関節を2週間不動化する不動群、不動化の過程でB-SESによる介入を行うB-SES群に振り分けた。

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る目的で数日間のハンドリングを行い、以下の実験処置は8週

齢になって以降から開始した。

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ギプス包帯を用いて2週間不動化した。不動化の際の留意点として、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。

なお、麻酔による成長不良などの影響を考慮し、対照群の各ラットに対しても同頻度で麻酔のみを行った。

3) B-SESの方法

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電極を巻いた。そして、刺激周波数はラット後肢骨格筋に強縮を誘発する目的で50Hzとした。

②刺激強度

所属研究室の先行研究⁶⁾によれば、正常ラットの足関節最大底屈筋力の60%をB-SESで誘発させるためには4.7mAの刺激強度が必要であるとされている。そこで、本研究における刺激強度も4.7mA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⁶⁾では、刺激強度を4.7mAとし、2秒収縮、2秒休止の1:1の刺激サイクル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、18分後から筋疲労による筋出力の低下が認められている。そこで、本研究ではこの結果ならびに今後の臨床適用を考慮し、刺激時間を15分に設定した。

④日内介入頻度

所属研究室の先行研究⁶⁾では、上記の①~③の条件でのB-SES介入を1回/日の日内介入頻度で実施し、不動によって惹起されるラット腓腹筋の廃用性筋萎縮に対する効果が検討されている。しかし、前述したように筋線維萎縮の進行抑制効果は浅層部を構成するタイプIIb線維に

しか認められなかった。本研究ではこの先行研究⁹⁾より日内介入頻度を増やせば浅層部のみならず、深層部にも筋線維萎縮の進行抑制効果が認められるのではないかと仮説し、実験計画した。具体的には、2回/日の日内介入頻度とし、実際の実施の際は1回目の介入から4時間以上のインターバルをあげ、2回目の介入を行うこととした。

なお、以上の刺激条件でのB-SESは6日/週の頻度で、延べ2週間実施した。

2. 検索方法

1) 検索試料

2週間の実験期間終了後、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。そして、腓腹筋外側頭を採取し、後述する組織学的検索に供した。

2) 組織学的検索

筋試料は腱に近い遠位端、近位端を切除し、トラガントゴム(ナカライテスク社)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(Leica社, CM1950)を用いて7µm厚の連続横断切片を作製し、一部

の切片に対してはヘマトキシリン・エオジン(以下、H&E)染色を施し、病理所見の観察を行った。また、一部の切片に対しては酸性前処理(pH 4.5)によるミオシン ATPase 染色を施し、筋線維をタイプ I・IIa・IIb 線維に分別した。

3) 筋線維横断面積の計測方法

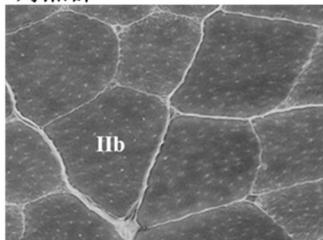
ラット腓腹筋外側頭は皮膚に近い浅層部はタイプ IIb 線維のみで構成されているのに対し、骨に近い深層部はタイプ I・IIa・IIb 線維が混在している⁹⁾。そこで、ミオシン ATPase 染色像は浅層部と深層部に分け、オールインワン蛍光顕微鏡(KEYENCE社, BZ-X810)を用いて400倍もしくは200倍の拡大像で全視野をパーソナルコンピュータに取り込み、Scion Image Software(W. Rasband, National Institutes of Health)を用いて浅層部を構成するタイプ IIb 線維、深層部を構成するタイプ I・IIa・IIb 線維の筋線維横断面積を1筋につき各々100本以上計測した。

3. 統計処理

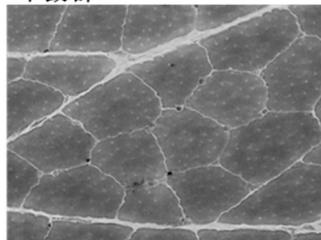
統計処理には、一元配置分散分析と Scheffe 法による事後検定を適用し、危険率 5%未満を

a) 浅層部

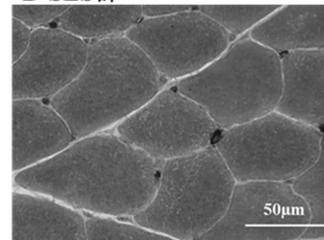
対照群



不動群

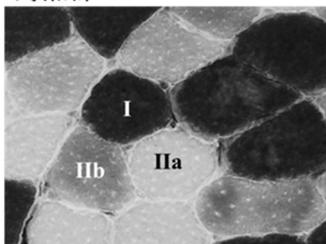


B-SES群

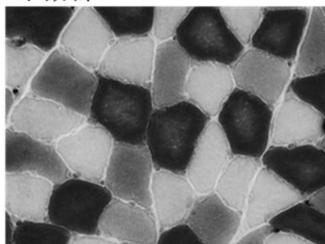


b) 深層部

対照群



不動群



B-SES群

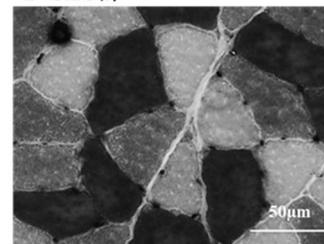


図1 ATPase 染色像

写真は酸性前処理(pH 4.5)による ATPase 染色像で、a)はタイプ IIb 線維のみで構成される浅層部、b)はタイプ I・IIa・IIb 線維が混在している深層部を示す。なお、スケールバーは 50µm を表す。

もって有意差を判定した。

結果

1. 病理所見

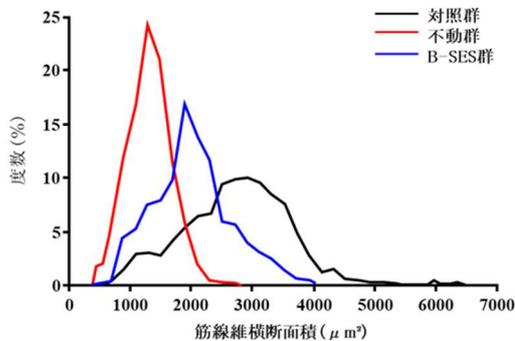
H&E 染色像を観察した結果、不動群と B-SES 群においては筋線維サイズの縮小が認められたが、マクロファージの浸潤が認められる筋線維や中心核を有する筋線維などは認められなかった。したがって、不動処置や B-SES 介入といった実験処置による筋線維損傷の発生はないと判断した。

2. 浅層部の筋線維横断面積

タイプ II b 線維のみからなる浅層部のミオシン ATPase 染色像をみると、対照群に比べ不動群や B-SES 群の筋線維は縮小していた。また、B-SES 群のそれは不動群に比べ大きい傾向にあった(図 1a)。

実際に筋線維横断面積の分布状況をみると、対照群に比べ不動群と B-SES 群は左方に偏位

a) 筋線維横断面積の分布状況



b) 平均筋線維横断面積の比較

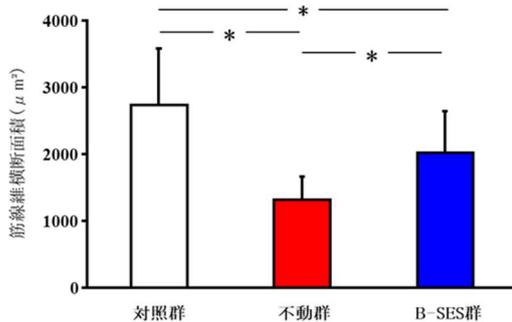


図 2 浅層部のタイプ II b 線維の筋線維横断面積

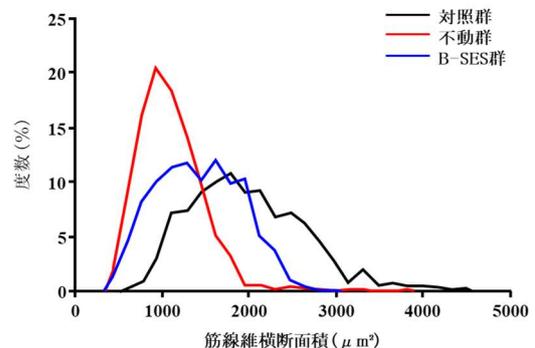
しており、筋線維横断面積が縮小していた。ただし、B-SES 群は不動群より右方に偏位しており、筋線維横断面積が大きい傾向にあった(図 2a)。そして、平均筋線維横断面積を比較すると、対照群に比べ不動群と B-SES 群は有意に低値を示し、B-SES 群は不動群より有意に高値を示した(図 2b)。

3. 深層部の筋線維横断面積

タイプ I・II a・II b 線維が混在する深層部のミオシン ATPase 染色像をみると、対照群に比べ不動群や B-SES 群の筋線維は縮小していた。また、B-SES 群のそれは不動群に比べ大きい傾向にあった(図 1b)。

実際に筋線維横断面積の分布状況をみると、タイプ I・II a・II b 線維とも同様の傾向を示し、対照群に比べ不動群と B-SES 群は左方に偏位しており、筋線維横断面積が縮小していた。ただし、B-SES 群は不動群より右方に偏位しており、筋線維横断面積が大きい傾向にあった(図 3-5a)。そして、平均筋線維横断面積を比較すると、タイ

a) 筋線維横断面積の分布状況



b) 平均筋線維横断面積の比較

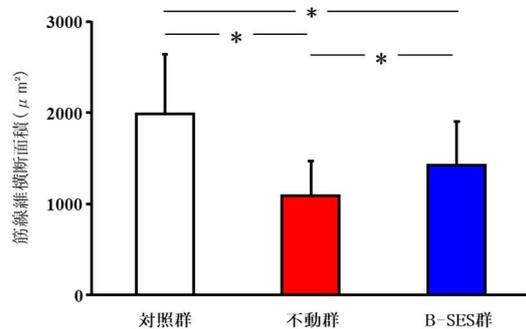
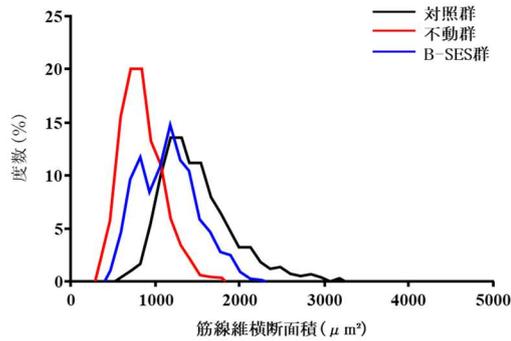


図 3 深層部のタイプ I 線維の筋線維横断面積

a) 筋線維横断面積の分布状況



b) 平均筋線維横断面積の比較

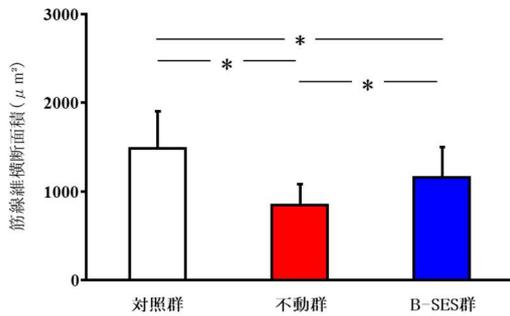


図4 深層部のタイプIIa線維の筋線維横断面積

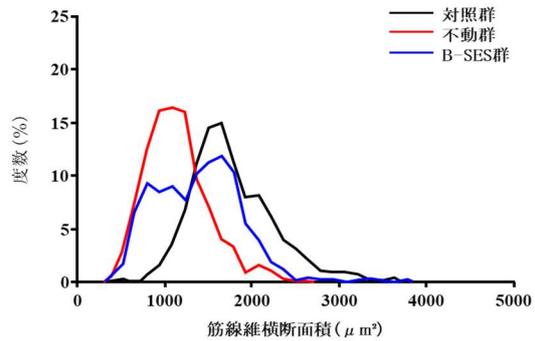
プI・IIa・IIb線維とも対照群に比べ不動群, B-SES群は有意に低値を示し, B-SES群は不動群より有意に高値を示した(図3-5b).

考察

今回の結果から, 本研究で設定した条件でのB-SESを2回/日の日内介入頻度で実施すると, 浅層部のタイプIIb線維ならびに深層部のタイプI・IIa・IIb線維のいずれにおいても筋線維萎縮の進行抑制効果が認められた. つまり, B-SESは廃用性筋萎縮の進行予防に有効な介入戦略といえ, その効果には日内介入頻度が影響することが示唆された.

具体的には, 本研究で設定した条件でのB-SESを1回/日の日内介入頻度で実施した先行研究⁶⁾でも, 浅層部のタイプIIb線維については筋線維萎縮の進行抑制効果が認められている. しかし, その効果量に関しては不動群に対して27.0%の増加, 対照群に対して30.6%の減少に留まっている⁶⁾. これに対し, 2回/日の日内介入頻度とした今回の浅層部のタイプIIb線維の結

a) 筋線維横断面積の分布状況



b) 平均筋線維横断面積の比較

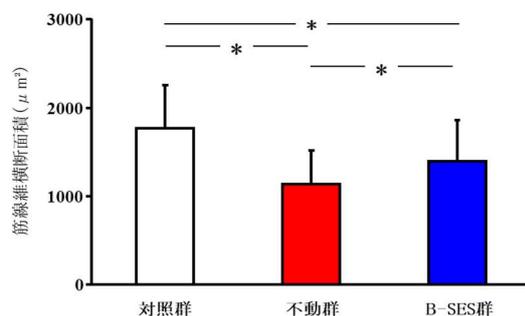


図5 深層部のタイプIIb線維の筋線維横断面積

果をみると, 不動群に対して53.4%の増加, 対照群に対して26.2%の減少であり, 明らかに効果量は大きいといえる. つまり, EMSによって優先的に動員されることが知られている浅層部のタイプIIb線維においても, 筋線維萎縮の進行抑制効果は日内介入頻度の多さが影響をおよぼすと推察される.

加えて, 深層部を構成するタイプI・IIa・IIb線維においては1回/日の日内介入頻度で実施した先行研究⁶⁾では, 筋線維萎縮の進行抑制効果は認められていない. しかし, 2回/日の日内介入頻度とした今回の結果では, 深層部のすべての筋線維タイプとも筋線維萎縮の進行抑制効果が認められ, 日内介入頻度の影響は大きいといえる. そして, ラット腓腹筋外側頭の深層部を構成するタイプI・IIa・IIb線維は浅層部を構成するタイプIIb線維より筋線維横断面積が小さく(図2-5の対照群のデータを参照), この点を踏まえると運動単位を構成する神経サイズも小さいと推測される. そのため, EMSでの動員は難しく, このことは先行研究⁶⁾の結果を反映している.

ただし、所属研究室で行われた予備実験の結果によれば、本研究で設定した条件での B-SES を行った直後には深層部を構成する筋線維にも水分量の増加によるパンプアップ現象が認められ、弱いながらも筋収縮が惹起されていることが確認されている。つまり、弱い筋収縮でも日内介入頻度を多くすることで筋線維萎縮の進行抑制効果が発揮される可能性があり、この点は EMS を臨床適用する際に留意すべきと思われる。

次に、本研究で設定した不動期間は 2 週間であり、先行研究²⁾を参考にすると、筋構成タンパク質の分解亢進が顕著で、それに準拠して生じる筋構成タンパク質の損失も著しい時期である。そして、筋構成タンパク質の分解亢進のメカニズムにはユビキチン・プロテアソーム系の活性化が強く関与しており、特に筋特異的ユビキチンリガーゼである Atrogin-1 や MuRF-1 といった分子の発現増加が関わっているといわれている¹⁾。したがって、今回の結果が生じたメカニズムにもこれらの分子の動態が関わっている可能性があるが、詳細は不明であり、この点は今後の検討課題である。

以上を総括すると、筋内深度あるいは筋線維タイプに関係なく、日内介入頻度を増やすことで B-SES による廃用性筋萎縮の進行抑制効果も高くなることが示唆された。

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) 片岡英樹: 筋力低下 Part 1, 運動器の傷害と機能障害—その病態とメカニズム. 沖田 実, 坂本淳哉(編), 三輪書店, 東京, 2021, pp.157-173.
- 2) Thomason DB, Booth FW: Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol.* 1990; 68: 1-12.
- 3) Kubiak RJ, Whitman KM, et al.: Changes in quadriceps femoris muscle strength using isometric exercise versus electrical stimulation. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1987; 8: 537-541.
- 4) Trimble MH, Enoka RM: Mechanisms underlying the training effects associated with neuromuscular electrical stimulation. *Phys Ther.* 1991; 71: 273-280.
- 5) Hasegawa S, Kobayashi M, et al.: Effect of early implementation of electrical muscle stimulation to prevent muscle atrophy and weakness in patients after anterior cruciate ligament reconstruction. *J Electromyogr Kinesiol.* 2011; 21: 622-630.
- 6) Honda Y, Takahashi A, et al.: Muscle contractile exercise through a belt electrode device prevents myofiber atrophy, muscle contracture, and muscular pain in immobilized rat gastrocnemius muscle. *PLoS One.* 2022; 17: e0275175.

(指導教員: 沖田 実)