

不動の過程で実施する歩行運動と骨格筋電気刺激が ラットヒラメ筋の筋性拘縮におよぼす効果

岩本倫太郎・藤井遥大

本研究では、①既報の設定条件よりも実施時間を延長し、実施頻度を高めた条件で歩行運動を実施する場合と②歩行運動に骨格筋電気刺激を加えた場合を動物実験にてシミュレートし、それぞれの介入が筋性拘縮のパラメータとなる関節可動域制限ならびに線維化におよぼす効果を検証した。実験動物には7週齢のWistar系雄性ラット26匹を用い、無処置の対照群(n=6)と両側足関節を最大底屈位で2週間ギプスにて不動化する不動群(n=6)、不動の過程で小動物用トレッドミルによる歩行運動を負荷する歩行群(n=8)、同様の歩行運動に加えてベルト電極を活用した骨格筋電気刺激を負荷する電気刺激+歩行群(n=6)に振り分けた。なお、電気刺激+歩行群では骨格筋電気刺激の実施後に歩行運動を実施し、介入間には4時間以上のインターバルを設けた。結果として、歩行群ならびに電気刺激+歩行群には関節可動域制限と線維化の抑制効果が認められた。すなわち、不動の過程で行う歩行運動の単独実施ならびに歩行運動と骨格筋電気刺激の併用は筋性拘縮の予防戦略として有効である可能性が示唆された。

はじめに

運動器疾患の罹患後に施されるギプス・シーネ固定や安静期間の長期化などによって骨格筋が不動状態に曝されると、その器質的変化に由来した拘縮、すなわち、筋性拘縮が発生する。筋性拘縮が発生した骨格筋は「硬く、伸びにくい」と触知されるが、これにはその伸張性の低下が関与している¹⁾。そして、このような不動に伴う骨格筋の伸張性低下にはコラーゲンの過剰増生に伴う線維化が関わっており、その発生メカニズムの上流では筋核のアポトーシスを介したマクロファージの集積が重要事象として関与している^{2,3)}。つまり、筋核のアポトーシスを抑えることができれば線維化、ひいては、筋性拘縮の発生を予防できると仮説され、不動早期からの筋収縮運動は有効な介入戦略になり得ると考えられる。

筋収縮運動を誘発できる介入戦略としては歩行運動があげられ、実際に筋性拘縮に対する効果検証も報告されている⁴⁾。これによると、ラットの足関節を最大底屈位で2週間不動化する過程で10 m/分の速度で実施する歩行運動を1回あ

たり10分間、2日おきに1回の頻度で2週間実施すると、筋性拘縮のパラメータである足関節背屈可動域制限の発生を抑制できることが明らかになっている⁴⁾。しかし、この報告では歩行運動による足関節背屈可動域制限の改善は6.4°と小さく、実施時間を延長し、実施頻度を高めた条件で歩行運動を行えば、この効果がさらに高まる可能性がある。

さらに、筋収縮運動を促すための介入戦略には骨格筋電気刺激も挙げられ、特に下肢の広範囲の骨格筋に対して筋収縮運動を誘発できるベルト電極を活用した骨格筋電気刺激は有効な方策として期待できる。先行研究では、前述と同様の不動モデルラットを用い、2週間の不動の過程でベルト電極を活用した骨格筋電気刺激の効果検証が行われているが、この報告では足関節背屈可動域制限の発生予防効果が認められている⁵⁾。すなわち、歩行運動と骨格筋電気刺激を併用すれば、歩行運動の単独実施よりもさらに効果が高まるのではないかと仮説される。

そこで、本研究では①既報の設定条件よりも実施時間を延長し、実施頻度を高めた条件で歩

行運動を実施する場合と②歩行運動に骨格筋電気刺激を加えた場合を動物実験にてシミュレートし、それぞれの介入が筋性拘縮のパラメータとなる関節可動域制限ならびに線維化におよぼす効果を検証した。

材料と方法

1. 実験プロトコル

1) 実験動物

実験動物には7週齢のWistar系雄性ラット26匹(205.4±9.3 g)を用い、これらを無処置の通常飼育を行う対照群(n=6)と両側足関節を最大底屈位で2週間ギプスにて不動化する実験群(n=20)に無作為に振り分けた。実験群は不動処置のみを施す不動群(n=6)と不動の過程で小動物用トレッドミルによる歩行運動を負荷する歩行群(n=8)、同様の歩行運動に加えてベルト電極を活用した骨格筋電気刺激を負荷する電気刺激+歩行群(n=6)に振り分けた。そして、電気刺激+歩行群には骨格筋電気刺激の実施後に歩行運動を負荷し、介入間には4時間以上のインターバルを設けた。なお、本研究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:2401261917)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。

2) 足関節の不動方法

実験群の各ラットに3種混合麻酔薬(5 mg/kg)を腹腔内投与した。その後、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といった不動処置を行った。また、不動処置中は浮腫の発生を確認するために足指を露出させ、浮腫やギプスの緩みの発生を認めた場合には麻酔下で適宜巻き替えを行った。

3) 歩行運動の方法

歩行群ならびに電気刺激+歩行群のラットは覚醒下で一旦ギプスを除去し、小動物用トレッドミル(シナノ製作所)を用いた歩行運動を以下の設定条件で負荷した。具体的には、実施速度を10 m/分、実施時間を15分間に設定し、1日1回

の頻度で、週6日、延べ2週間実施した。

4) 骨格筋電気刺激の方法

電気刺激+歩行群は麻酔下で一旦ギプスを除去し、小動物用デバイス(ホーマーイオン株式会社)を用いた骨格筋電気刺激を以下の設定条件で負荷した。具体的には、ベルト電極は両側の大腿近位部と下腿遠位部に装着し、刺激周波数は強縮を誘発する目的で50 Hzに設定した。また、刺激強度は先行研究を参考に足関節の最大底屈筋力の60%(60%MVC)が発揮される4.7 mAとした⁶⁾。さらに、同条件で60%MVCが18分間維持されることが示されているため、刺激時間は15分間に設定した⁵⁾。そして、刺激サイクルは2秒通電、2秒休止の1:1サイクルとし、1日1回の頻度で、週6日、延べ2週間実施した。

2. 検索方法

1) 足関節背屈可動域の測定方法

実験開始前(Baseline)ならびに実験期間中は週ごとに足関節背屈可動域を以下の方法で測定した。具体的には、3種混合麻酔薬の腹腔内投与によってラットを麻酔し、側臥位とした後に股・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)の先端部をあて、0.3Nの張力で足関節を他動的に背屈させた。そして、膝関節裂隙中央部と腓骨外果を結ぶ線を基本軸、腓骨外果と第5中足骨を結ぶ線を移動軸とし、これらの2つの軸がなす外角を足関節背屈可動域として測定した。なお、測定は3回実施し、その最大値をデータとして採用した。

2) 試料採取および検索準備

実験期間終了後は各ラットに3種混合麻酔薬の腹腔内投与によって麻酔を行い、両側のヒラメ筋を採取した。ヒラメ筋の一部はトラガントゴム(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溶液内に浸漬し、凍結標本作製した。そして、クリオスタット(Leica社, CM1950)を用いて凍結試料から7 μm厚の凍結横断切片を作製し、後述の組織学的検索に供した。また、ヒラメ筋の一部はチューブに収集後に液体窒素による急速凍結を行い、後述する生化学的検索に供した。

3) 組織学的検索

凍結横断切片の一部には Hematoxylin & Eosin (以下, H&E) 染色を施し, オールインワン顕微鏡 (Keyence 社, BZ-X810) で検鏡することで病理学的所見の観察を行った. また, 一部の切片には筋周膜や筋内膜を構成するコラーゲンを可視化する目的で Picrosirius Red 染色を施し, 撮像結果から線維化の発生状況を評価した.

4) 生化学的検索

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を計測し, 線維化の指標となるコラーゲン含有量を評価した.

① サンプル溶液の作製

ヒラメ筋の一部を細切後, 凍結乾燥機器 (東京理化器械) で 24 時間処理し, 各筋試料の乾燥重量を計測した. 次に, 各筋試料に 6N-HCl を 1 ml 添加し, 110°C で 15 時間加水分解を行い, エバポレータ (スクラム社) にて 6N-HCl を除去後, 蒸留水 1 ml にて溶解した. そして, 溶解液を Millex-GV (Merck 社) で濾過し, これをサンプル溶液として使用した.

② ヒドロキシプロリン含有量の定量

サンプル溶液 10 μ l を 100°C で 2 時間加熱処理した後, 4N-NaOH を 50 μ l 添加し, 攪拌後に 90°C で 2 時間加熱処理を行った. 次に, Chloramine-T 溶液を 500 μ l 添加し, 室温にて 25 分間静置した. その後, Ehrlich 溶液を 500 μ l 添加し, 攪拌後に 90°C で 20 分間加熱処理し, サンプル溶液を発色させた. そして, 波長 540 nm にて吸光度を計測し, 検量線からサンプル溶液に

含まれるヒドロキシプロリン含有量を定量した. なお, 定量したデータは乾燥重量で除し, 単位乾燥重量あたりのヒドロキシプロリン含有量をデータとして採用した.

5) 統計処理

データはすべて平均値 \pm 標準偏差で示した. また, 足関節背屈可動域の結果には二元配置分散分析, ヒドロキシプロリン含有量の結果には一元配置分散分析を適用し, いずれも事後検定には Scheffe 法を用いた. 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. 足関節背屈可動域

実験開始前 (Baseline) の足関節背屈可動域はすべての群が 160° であり, いずれの実験期間とも対照群のそれは 160° であった. 一方, 実験開始 1 週後の足関節背屈可動域は, 不動群が 113.8 \pm 4.3°, 歩行群が 133.8 \pm 3.9°, 電気刺激 + 歩行群が 131.3 \pm 3.1° であった. また, 実験開始 2 週後の足関節背屈可動域は, 不動群が 104.6 \pm 4.0°, 歩行群が 123.1 \pm 4.0°, 電気刺激 + 歩行群が 122.1 \pm 5.0° であった. 上記の結果から, 不動群や歩行群, 電気刺激 + 歩行群は実験開始 1, 2 週後とも対照群より有意に低値を示した. しかし, 実験群間の比較では, 歩行群と電気刺激 + 歩行群は実験開始 1, 2 週後とも不動群より有意に高値を示した (図 1).

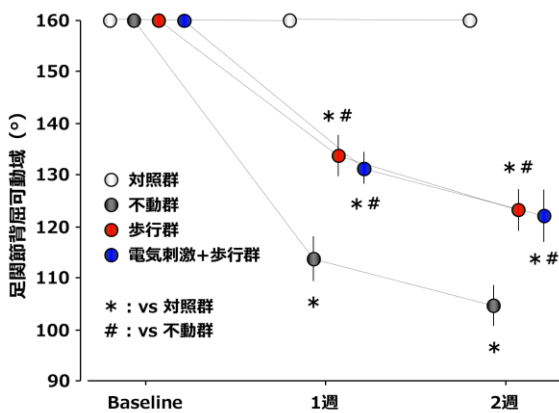


図 1 足関節背屈可動域の変化

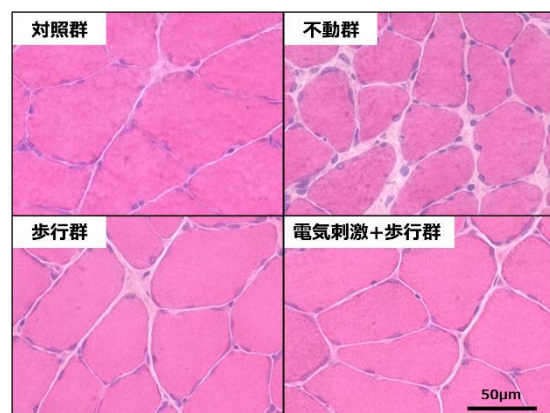
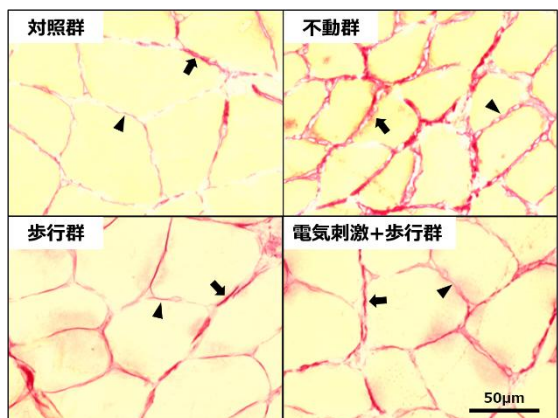


図 2 H&E 染色像



→ : 筋周膜 ▶ : 筋内膜

図3 Picosirius Red 染色像

2. H&E 染色像

H&E 染色像を顕鏡した結果、対照群と比較して不動群や歩行群、電気刺激+歩行群の筋線維サイズは縮小しており、実験群の3群に筋線維萎縮が発生していた。一方、歩行運動や骨格筋電気刺激を負荷した歩行群と電気刺激+歩行群の撮像結果では、すべての個体で炎症の発生を示唆するような細胞浸潤を認める筋線維は観察されなかった(図2)。

3. Picosirius Red 染色像

Picosirius Red 染色像を顕鏡した結果、対照群と比較して不動群の筋周膜や筋内膜は肥厚しており、コラーゲンの過剰増生、すなわち、線維化の発生を認めた。一方、不動群と比較すると、歩行群と電気刺激+歩行群では筋周膜や筋内膜の肥厚が抑えられており、線維化の発生が抑制されている所見が観察された(図3)。

4. ヒドロキシプロリン含有量

実験開始2週後のヒドロキシプロリン含有量は対照群が $2.8 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mg dry weight}$ 、不動群が $6.1 \pm 1.7 \mu\text{g}/\text{mg dry weight}$ 、歩行群が $3.7 \pm 1.2 \mu\text{g}/\text{mg dry weight}$ 、電気刺激+歩行群が $4.1 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{mg dry weight}$ であった。上記の結果から、不動群は対照群より有意に高値を示したが、歩行群と電気刺激+歩行群は不動群より有意に低値を示し、いずれも対照群との有意差を認めなかった(図4)。

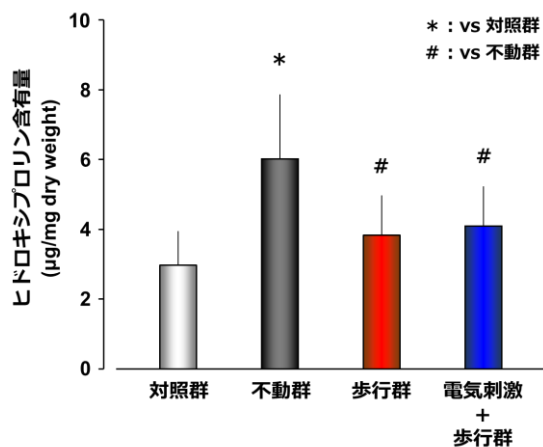


図4 ヒドロキシプロリン含有量の変化

考察

本研究の結果から、今回の設定条件で歩行運動を単独実施あるいは歩行運動と骨格筋電気刺激を併用すると、関節可動域制限と線維化を抑制できることが明らかになった。

1. 異なる設定条件で実施した歩行運動の効果

本研究と前述した先行研究⁴⁾の結果を照合すると、いずれの設定条件であっても歩行運動によって関節可動域制限を抑制する効果が認められた。そこで、これらの研究から実験開始2週後における不動群と歩行群の足関節背屈可動域の結果を抽出し、各研究における関節可動域制限の改善率(2群間の差を不動群のデータで除した割合)を算出した。その結果、先行研究では改善率が6.0%にとどまっていたのに対し、本研究では17.7%と大きな改善率が示され、関節可動域制限が大きく改善していたことが明らかとなった。すなわち、実施時間を延長し、実施頻度を高めた条件で歩行運動を実施すると、関節可動域制限の発生予防効果を高めることができる可能性が示唆された。

2. 歩行運動と骨格筋電気刺激の併用効果

次に、本研究における歩行群と電気刺激+歩行群の足関節背屈可動域ならびにヒドロキシプロリン含有量を比較すると、各パラメータともこの二群間に有意差を認めず、歩行運動に骨格筋電気刺激を併用しても、関節可動域制限や線維

化の発生予防効果を高めることはできなかった。先行研究によれば、歩行運動と骨格筋電気刺激はいずれも好気性代謝を亢進することでアポトーシスを制御するミトコンドリアなどの細胞小器官を活性化し、筋核のアポトーシスの発生予防に寄与することが報告されている⁷⁻⁹⁾。一方、他の先行研究では、歩行運動のような有酸素運動を単独実施する条件と有酸素運動と筋力増強運動を併せて実施する条件を設定し、両条件で実施される運動が好気性代謝におよぼす影響が検討されている。その結果、それぞれの条件で運動を実施しても、好気性代謝の亢進作用に大きな差は認められなかったと報告している^{10,11)}。つまり、本研究における歩行運動の単独実施ならびに歩行運動と骨格筋電気刺激の併用では、いずれの場合も同程度に好気性代謝が亢進された可能性があり、結果、関節可動域制限や線維化の発生予防効果に差が認められなかったと推察された。しかし、先行研究においても、有酸素運動を単独実施する条件と有酸素運動と筋力増強運動を併せて実施する条件で好気性代謝の亢進作用に差が生じない理由は明らかにされていない。そのため、今後はこの点を明らかにするために、線維化関連分子やその上流の分子機構の動態を検索していく必要があると考えている。

以上をまとめると、不動の過程で実施する歩行運動の単独実施ならびに歩行運動と骨格筋電気刺激の併用は関節可動域制限や線維化の発生予防に関して同程度に効果的であり、いずれの介入戦略とも筋性拘縮の発生予防に有効である可能性が示唆された。

謝辞

本研究に際し、ご指導、ご助言等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) Honda Y, Tanaka M, et al.: Relationship between extensibility and collagen expression in immobilized rat skeletal muscle. *Muscle Nerve*: 2018; 57: 672-678.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 中村早紀: 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. 長崎大学理学療法専攻卒業論文集: 2013; 9: 39-44.
- 5) 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.
- 6) Honda Y, Tanaka N, et al.: Effect of belt electrode-skeletal muscle electrical stimulation on immobilization-induced muscle fibrosis. *PLoS ONE*: 2021; 16: e0244120.
- 7) Kim HJ, Kwon O: Aerobic exercise prevents apoptosis in skeletal muscles of high-fat-fed ovariectomized rats. *Phys Act Nutr*: 2022; 26: 1-7.
- 8) Valladares D, Almarza G, et al.: Electrical stimuli are anti-apoptotic in skeletal muscle via extracellular ATP. Alteration of this signal in mdx mice is a likely cause of dystrophy. *PLoS ONE*: 2013; 8: e75340.
- 9) Honda Y, Yoshimura M, et al.: Frequent tetanic exercise through electrical muscle stimulation may reduce immobilization-induced muscle fibrosis by suppressing myonuclear apoptosis. *Muscle Nerve*: 2025; 71: 1104-1112.
- 10) Robinson MM, Dasari S, et al.: Enhanced protein translation underlies improved

metabolic and physical adaptations to different exercise training modes in young and old humans. *Cell Metab*: 2017; 25: 581-592.

- 11) Ruegsegger GN, Pataky MW, et al.: High-intensity aerobic, but not resistance or

combined, exercise training improves both cardiometabolic health and skeletal muscle mitochondrial dynamics. *J Appl Physiol*: 2023; 135: 763-774.

(指導教員 本田祐一郎)