

不動後早期からの歩行運動と骨格筋電気刺激が ラット腓腹筋の廃用性筋萎縮におよぼす影響

木寺郁人・堀脇千愛

本研究の目的は、不動後早期からの歩行運動ならびに歩行運動と骨格筋電気刺激(EMS)の併用がラット腓腹筋の廃用性筋萎縮におよぼす影響を筋内深度別、筋線維タイプ別に検討することである。実験動物には7週齢のWistar系ラット26匹を使用し、これらに無処置の対照群(n=6)、両側足関節を2週間不動化する不動群(n=6)、不動化の過程で歩行運動を実施する歩行群(n=8)、不動化の過程でEMSと歩行運動を併用して実施するEMS+歩行群(n=6)に振り分けた。なお、歩行運動は10m/分の速度でのトレッドミル歩行とし、実施時間は15分/日(週6日)とした。また、EMSの刺激条件は先行研究と同様とし、午前にEMS、午後に歩行運動を実施した。結果、浅層のタイプIIb線維は歩行運動による筋線維萎縮の進行抑制効果は認められず、EMSを併用しても同様であった。一方、深層は全ての筋線維タイプで歩行運動による筋線維萎縮の進行抑制効果が認められ、タイプI・IIa線維に関してはEMS併用による相乗効果が認められた。したがって、歩行運動ならびに歩行運動とEMSの併用は深層を構成する筋線維の萎縮予防に有効であることが示唆された。

はじめに

臨床ではギプス固定や術後の免荷など、様々な場面で骨格筋の不動状態が強いられることがあり、廃用性筋萎縮が惹起される。加えて、今日のリハビリテーション医療の対象者の多くが高齢者であり、その場合、元々から身体活動量が少なく、不動を招いているため、上記のような状態に強いられると顕著な廃用性筋萎縮に発展する。そして、その結果として日常生活活動(activities of daily living; ADL)は著しく低下し、その改善には困難を極める。

廃用性筋萎縮に対する理学療法的介入としては、筋収縮運動が有効であることは周知の事実であり、これに関連した基礎研究も報告されている。例えば、Sakakimaら^{1,2)}のラットを用いた実験によれば、トレッドミルを用いた歩行運動は不動によって惹起された腓腹筋、ヒラメ筋の廃用性筋萎縮の回復に有効であることが明らかになっている。そして、この実験では介入頻度の影響も検討しており、高頻度の方がその効果は大きいとされている。しかし、これまで報告されている

先行研究のほとんどは不動によって生じた廃用性筋萎縮の回復に焦点をあてたものが多く、不動後早期から筋収縮運動を基盤とした理学療法的介入を行い、廃用性筋萎縮の予防効果を検討した報告は少ない³⁾。

一方、所属研究室の先行研究⁴⁾では不動後早期から骨格筋電気刺激(electrical muscle stimulation; EMS)を活用した筋収縮運動を実施し、ラット腓腹筋の廃用性筋萎縮におよぼす影響を検討している。なお、ラット腓腹筋の浅層部はタイプIIb線維のみで構成されているのに対し、深層部はタイプI・IIa・IIb線維が混在するとされている⁵⁾。つまり、筋内深度によって筋線維タイプの構成が異なることから、所属研究室の先行研究⁴⁾では筋内深度ならびに筋線維タイプにわけて検討されている。結果をみると、EMSを活用した筋収縮運動は、浅層部を構成するタイプIIb線維の筋線維萎縮の進行を抑制する効果はあるものの、深層部を構成するタイプI・IIa・IIb線維の筋線維萎縮に対しては効果を認めないことが明らかになっている。つまり、EMSは神経サイズの大きい運動単位を優先的に動員できる利点があ

り^{6,7)}, このことが影響し, 浅層部のタイプIIb 線維に対して効果が認められた可能性が高い⁴⁾.

一方, 随意運動の場合はサイズの原理に従い, 神経サイズの小さい運動単位, つまり, タイプI・IIa・IIb 線維の順に動員されるといわれている⁸⁾. したがって, ラット腓腹筋の深層部を構成するタイプI・IIa・IIb 線維の筋線維萎縮に対しては随意運動が有効ではないかと考えられ, 本研究ではこの点を検証するため随意運動の中でも歩行運動に着目した. 加えて, 歩行運動と EMS を併用すれば, 浅層部, 深層部を構成するすべての筋線維タイプの筋線維萎縮に対して有効ではないかと考えた.

以上の点を踏まえ, 本研究の目的は, 不動後早期からの歩行運動ならびに歩行運動と EMS の併用がラット腓腹筋の廃用性筋萎縮におよぼす影響を筋内深度別, 筋線維タイプ別に検討することとした.

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; 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.

実験動物には7週齢の Wistar 系雄性ラット 26 匹(体重; 188~222g, 平均体重; 205.4±9.3g)を使用した. そして, これらを実験の対照群 (n=6), 両側足関節を2週間不動化する不動群 (n=6), 不動化の過程で歩行運動を実施する歩行群 (n=8), 不動化の過程で EMS と歩行運動を併用して実施する EMS+歩行群 (n=6) 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, 歩行群, EMS+歩行群の各ラットに対

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) 歩行運動の方法

中村³⁾はラットに対し10m/分の速度でのトレッドミル歩行を行うとヒラメ筋の廃用性筋萎縮の進行が抑制されたと報告している. そして, Bedford ら⁹⁾の先行研究によれば, ラットにおける10m/分の速度でのトレッドミル歩行は最大酸素摂取量の29.8%の負荷になるとされており, この程度の負荷はヒトでの軽運動に合致する¹⁰⁾. そこで, 今回の歩行運動は10m/分の速度でのトレッドミル歩行とし, 実施時間は15分/日とした. そして, 介入頻度は週6日とし, 不動を開始した翌日から延べ2週間行った.

4) EMS の方法

①電極の設置と刺激周波数

EMS+歩行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ベルト電極を巻いた. 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⁴⁾によれば, 正常ラットの足関節最大底屈筋力の60%を本研究のEMS装置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⁴⁾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介入時間と介入頻度

EMS+歩行群の各ラットに対するEMS介入は9:00~12:00の時間帯に実施し、その頻度は1回/日とした。なお、同群に対する歩行運動は後肢骨格筋の筋疲労の影響などを考慮し、EMS介入から4時間以上の間隔をあけた午後の時間帯(概ね13:00~17:00)に実施した。

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7 μ m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置(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

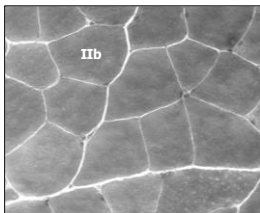
ラット腓腹筋外側頭は皮膚に近い浅層部はタイプIIb線維のみで構成されているのに対し、骨に近い深層部はタイプI・IIa・IIb線維が混在している⁵⁾。そこで、ミオシンATPase染色像は浅層部と深層部に分け、オールインワン蛍光顕微鏡(KEYENCE社, BZ-X810)を用いて200倍の拡大像で全視野をパーソナルコンピュータに取り込み、Scion Image Software(W. Rasband, National Institutes of Health)を用いて浅層部を構成するタイプIIb線維、深層部を構成するタイプI・IIa・IIb線維の筋線維横断面積を1筋につき各々100本以上計測した。

3. 統計処理

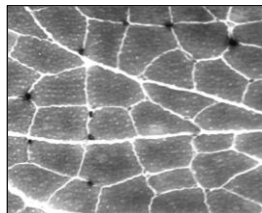
統計処理には、一元配置分散分析とScheffe法による事後検定を適用し、危険率5%未満をもって有意差を判定した。

a) 浅層部

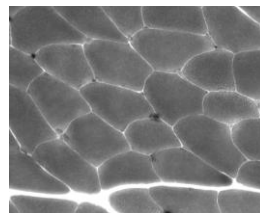
対照群



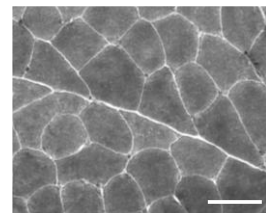
不動群



歩行群

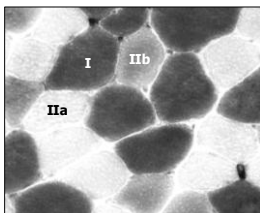


EMS+歩行群

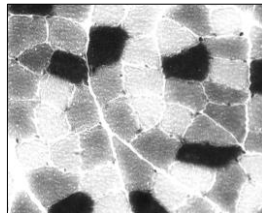


b) 深層部

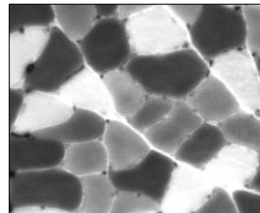
対照群



不動群



歩行群



EMS+歩行群

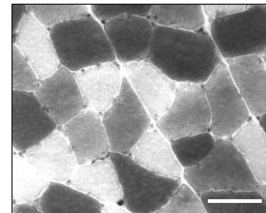


図1 ATPase染色像

Bar: 50 μ m

写真は酸性前処置(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線維が混在する深層部を示す。なお、スケールバーは50 μ mを表す。

結果

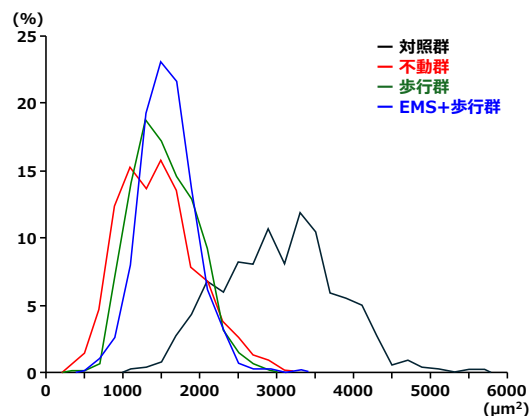
1. 病理所見

H&E 染色像を観察した結果、不動群、歩行群、EMS+歩行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、不動処置や歩行運動、EMS 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の変化

タイプ II b 線維のみで構成される浅層部の ATPase 染色像をみると、対照群に比べ不動群は筋線維サイズの縮小が認められ、歩行群と EMS+歩行群も不動群と大差はなかった(図 1a)。実際に筋線維横断面積の分布状況をみると、対

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

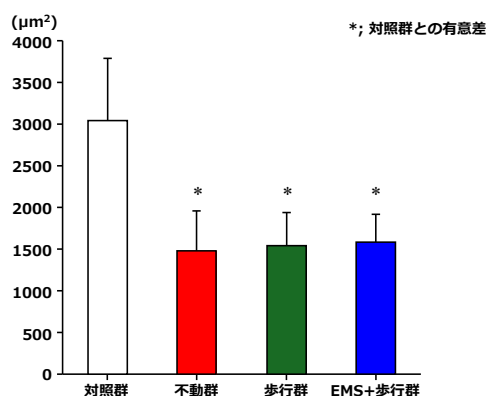


図 2 浅層部のタイプ II b 線維の筋線維横断面積の変化

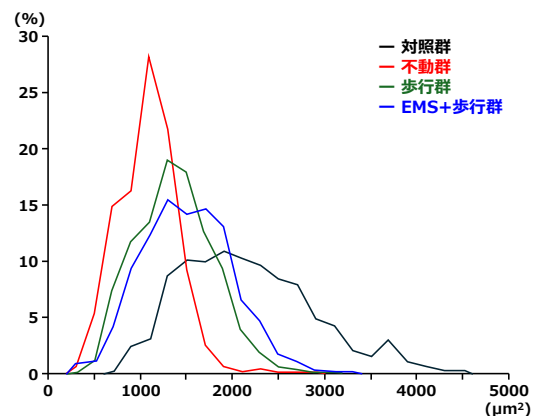
照群に比べ不動群は大きく左方に偏位しており、筋線維横断面積が縮小していた。そして、歩行群と EMS+歩行群も不動群とほぼ同位置に分布していた(図 2a)。そして、平均筋線維横断面積を比較すると、対照群に比べ不動群、歩行群、EMS+歩行群は有意に低値を示し、この 3 群間には有意差は認められなかった(図 2b)。

3. 深層部の筋線維横断面積の変化

タイプ I・IIa・IIb 線維が混在する深層部の ATPase 染色像をみると、不動群はすべてのタイプで筋線維サイズの縮小が認められた。これに対し、歩行群と EMS+歩行群はすべてのタイプとも不動群より筋線維サイズが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・IIa 線維は同様の傾向を示し、対照群に

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

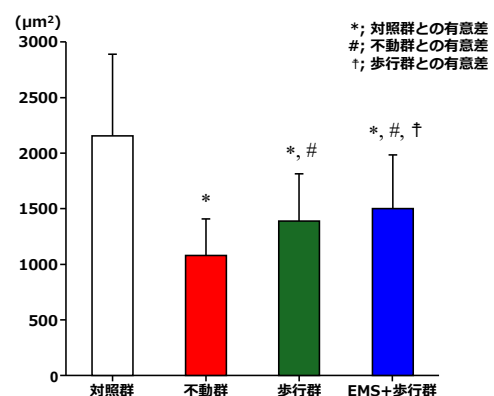
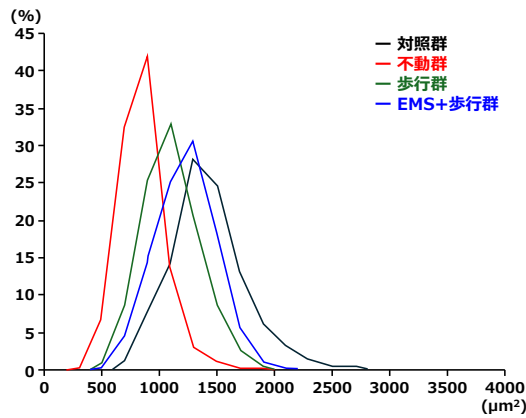


図 3 深層部のタイプ I 線維の筋線維横断面積の変化

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

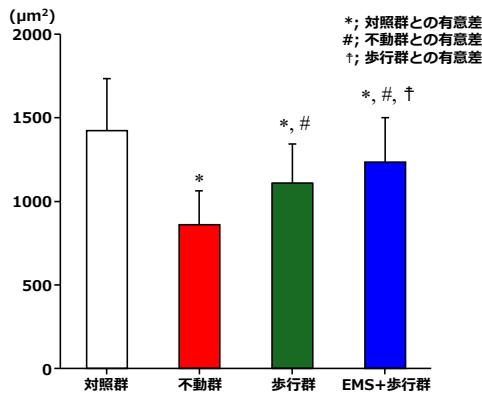
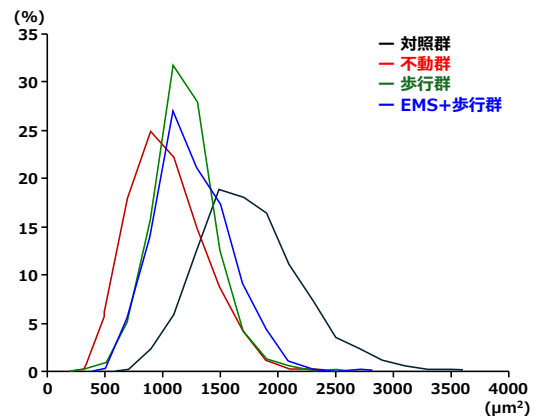


図 4 深層部のタイプ II a 線維の筋線維横断面積の変化

比べ不動群は大きく左方に偏位し、筋線維横断面積が顕著に縮小していた。一方、歩行群は不動群より右方に位置しており、EMS+歩行群は歩行群よりさらに右方に位置していた(図 3a, 4a)。そして、タイプ I・IIa 線維の平均筋線維横断面積を比較すると、対照群に比べ不動群、歩行群、EMS+歩行群は有意に低値を示し、この 3 群間を比較すると、歩行群と EMS+歩行群は不動群より有意に高値を示し、EMS+歩行群は歩行群より有意に高値を示した(図 3b, 4b)。

一方、タイプ II b 線維の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は大きく左方に偏位し、筋線維横断面積が顕著に縮小していた。一方、歩行群と EMS+歩行群は、不動群より右方に位置しているものの、この 2 群はほぼ同位置に分布していた(図 5a)。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

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

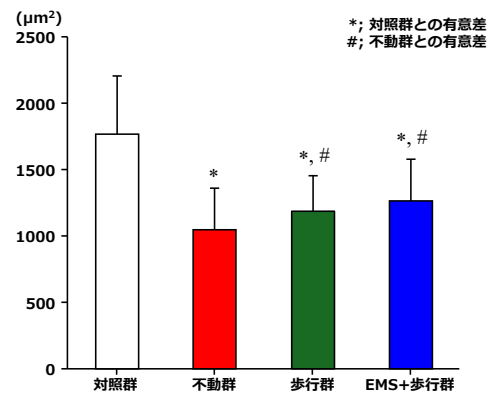


図 5 深層部のタイプ II b 線維の筋線維横断面積の変化

群、歩行群、EMS+歩行群は有意に低値を示し、この 3 群間を比較すると、歩行群と EMS+歩行群は不動群より有意に高値を示すものの、歩行群と EMS+歩行群には有意差は認められなかった(図 5b)。

考察

今回の結果から、浅層部を構成するタイプ II b 線維においては、歩行運動による筋線維萎縮の進行抑制効果は認められず、EMS を併用してもその効果には影響をおよぼさないことが明らかとなった。通常、歩行運動のような随意運動はサイズの原理に従い、神経サイズの小さい運動単位から動員されるといわれている⁸⁾。そして、浅層部を構成するタイプ II b 線維は深層部の全ての筋線維タイプも含めて筋線維サイズが最も大きいこ

とから、支配している神経サイズも最も大きいと推測される。そのため、今回の条件の歩行運動ではタイプ II b 線維は動員されていない可能性が高く、その影響で筋線維萎縮の進行抑制効果も認められなかったのではないかと考えられる。一方、先行研究⁴⁾の実験結果から想定された浅層部のタイプ II b 線維に対する EMS の効果も今回の結果では認められなかった。今回の刺激条件での EMS は正常ラットの足関節最大底屈筋力の 60% を発揮するほどの高強度刺激であることが先行研究⁴⁾で確かめられている。加えて、所属研究室ではその後追加実験を行い、今回の刺激条件で EMS を実施すると、浅層部のタイプ II b 線維にはグリコーゲンが枯渇するほどの強い筋収縮が得られることを確かめている。したがって、EMS による強い筋収縮の後に歩行運動といった有酸素運動を行うと EMS の効果が打ち消される可能性があり、これはコンバインドエフェクトが影響しているのではないかと推察される¹¹⁾。コンバインドエフェクトとは有酸素運動と筋力トレーニングを併用したときに起こる干渉作用のことで、結果、筋肥大が抑制される事象のことである¹¹⁾。メカニズムとしては、有酸素運動によって AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMP-activated protein kinase; AMPK) が活性化すると、タンパク質合成に関わる mammalian target of rapamycin (mTOR) という分子が不活性化することが関与するとされている¹¹⁾。したがって、EMS+歩行群における浅層部のタイプ II b 線維の結果もコンバインドエフェクトが影響している可能性があるが、詳細については不明であり、この点は今後の検討課題である。

一方、深層部の全ての筋線維タイプにおいては、歩行運動による筋線維萎縮の進行抑制効果が認められ、これは前述した随意運動による運動単位の動員様式が影響していると推察される。加えて、タイプ I・II a 線維においては EMS を併用すると筋線維萎縮の進行抑制効果が高まることが明らかとなった。所属研究室で行われた追加実験の結果によれば、今回の刺激条件で EMS を実施すると、深層部の全てのタイプの筋線維はパンプアップ現象が認められるものの、グリコーゲンが枯渇するほどの強い筋収縮は得られないとされている。そのため、コンバインドエフェクト

の影響は生じなかったのではないかと推察される¹¹⁾。したがって、全ての筋線維タイプが混在する深層部においては、不動後早期からの歩行運動といった随意運動による介入が廃用性筋萎縮の予防に有効であり、EMS を併用するとタイプ I・II a 線維に対してはその予防効果が高まる可能性があると推察される。しかし、この効果に関わるメカニズムに関しては本研究では明らかにできておらず、この点についても今後の検討課題である。

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) Sakakima H: Effect of immobilization and subsequent low and high frequency treadmill running on rat soleus muscle and ankle joint movement. *J Phys Ther Sci.* 2004, 16: 43-48.
- 2) Sakakima H, Yoshida Y, et al.: Different frequency treadmill running in immobilization-induced muscle atrophy and ankle joint contracture of rats. *Scand J Med Sci Sports.* 2004, 14: 186-192.
- 3) 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. 長崎大学医学部保健学科理学療法専攻卒業研究論文集. 2013, 9: 39-44.
- 4) 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(9): e0275175.
- 5) 坂本美喜, 内 昌之, 他: ラット骨格筋の筋線維タイプ分布特性—特に膝蓋腱切離による影響について—. *理学療法学.* 1996, 23: 430-433.

- 6) 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.
- 7) Trimble MH, Enoka RM: Mechanisms underlying the training effects associated with neuromuscular electrical stimulation. *Phys Ther.* 1991, 71: 273-280.
- 8) Sale DG: Influence of exercise and training on motor unit activation. *Exerc Sport Sci Rev.* 1987, 15: 95-151.
- 9) Bedford TG, Tipton CM, et al.: Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1979, 47: 1278-1283.
- 10) Fletcher GF, Balady GJ, et al.: Exercise standards for testing and training: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 2001, 104: 1694-1740.
- 11) Methenitis S: A brief review on concurrent training: From laboratory to the field. *Sports (Basel).* 2018, 6(4):127.

(指導教員: 沖田 実)