

ン線維に配列変化を認め、これは筋内膜を構成する個々のコラーゲン線維の可動性減少を示唆する所見で、骨格筋の伸張性低下の一因と考えられる。しかし、筋内膜を構成するコラーゲン線維の可動性が減少する要因についてはこれまで明らかにできていない。加えて、臨床において拘縮の治療に頻繁に用いられる持続的他動運動 (Continuous passive motion ; 以下, CPM) や超音波などの効果についても先行研究では明らかとなっていない。

2. 研究の目的

前述のように、筋内膜を構成するコラーゲン線維は不動によってその可動性が減少することが示唆されており、その要因としては、①コラーゲン線維に強固な分子間架橋が形成されること、②I型コラーゲンとIII型コラーゲンの比率が変化すること、などが影響しているのではないかと仮説している。そこで、本研究の第一の目的をラット尖足拘縮モデルのヒラメ筋を材料にこの仮説を生化学的手法で検証することとした。また、不動の過程でCPMや超音波といった運動・物理療法を実施し、拘縮に対する効果を検証することを本研究の第二の目的とした。

3. 研究の方法

【実験1：拘縮の発生メカニズムに関する実験的アプローチ】

1) 実験動物

実験動物には、8週齢のWistar系雄性ラット20匹を用い、これらが無作為に9、11週齢時まで通常飼育する対照群 (各5匹、計10匹) と両側足関節を最大底屈位の状態で1、3週間ギプスで不動化する不動群 (各5匹、計10匹) に振り分けた。なお、本実験は星城大学が定める動物実験指針に基づいて行った。

2) 足関節背屈可動域の測定

各不動期間終了後は、ペントバルビタールナトリウム (40mg/kg) の腹腔内投与によって各ラットを麻酔し、以下の方法で両側足関節の背屈可動域を測定した。すなわち、ラットを側臥位とし、一人の検者が徒手にて股関節・膝関節を90°屈曲位に保持し、後肢筋群に筋収縮が惹起されないことを確認した。そして、この検者が強制的な力を加えないように注意しながら母指でラットの足関節を他動的に背屈させ、抵抗を感じた角度を最大背屈角度とした。この角度の測定に際しては、基本軸を膝関節裂隙中央と腓骨外果を結ぶ線、移動軸を腓骨外果と第5中足骨頭を結んだ線とし、もう一人の検者が腓骨外果に分度器の中心を合わせ、最大背屈角度を5°単位で測定した。

3) 筋試料の採取

各ラットの両側足関節の背屈可動域を測定した後、麻酔下で両側ヒラメ筋を採取した。採取したヒラメ筋は直ちに筋湿重量を測定し、その後、液体窒素で冷却したイソペンタン液内で急速凍結させ、以下に述べる生化学的検索まで-80°Cで保存した。

4) 不溶性コラーゲン含有量の測定

検索材料は各ラットから採取した左側ヒラメ筋とした。筋試料は細切後、まず1N塩化ナトリウム溶液内にて24時間、4°Cで攪拌し、遠心分離後の残渣を得、その後、0.5M酢酸溶液内にてこの残渣を24時間、4°Cで攪拌し、遠心分離後の残渣を得た。そして、ペプシン含有 (1mg/ml) 0.5M酢酸溶液内にてこの残渣を再度24時間、4°Cで攪拌し、遠心分離後の残渣を検索用試料として回収した。回収した試料は凍結乾燥した後、6N塩酸溶液内で15時間、110°Cで加水分解を行い、その後、試料内の塩酸を除去し、蒸留水に溶解して不溶性コラーゲン定量のための試料とした。

不溶性コラーゲンの定量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い、その概要は以下の通りである。すなわち、各試料はまず2時間、100°Cで加熱処理し、その後、4N水酸化ナトリウム溶液を加え、2時間、90°Cで再度加熱処理を行った。その後は、Chlrolamine T溶液にて酸化を行い、Ehrlich溶液と縮合させて試料を発色させた。そして、540nmの波長における各試料ならびに検量線を求めるためのヒドロキシプロリン標準溶液の吸光度を測定し、検量線を基に各試料のヒドロキシプロリン含有量を算出した。なお、算出したヒドロキシプロリン含有量は単位湿重量あたりに換算し ($\mu\text{g}/\text{mg wet weight}$)、これを不溶性コラーゲン含有量と定義した上で各不動期間で対照群と不動群を比較した。

5) I・III型コラーゲンの分析

検索材料は各ラットから採取した右側ヒラメ筋とした。筋試料は細切後、まず0.05Mトリス緩衝液 (pH7.4) で24時間、4°Cで攪拌・洗浄し、緩衝液除去後、ペプシン含有 (1mg/ml) 0.5M酢酸溶液を加え、24時間、4°Cで膨化させた。次に、同溶液内で試料をホモジネートし、24時間、4°Cで攪拌した後、遠心分離を行い、上清を回収した。また、残渣には再度、ペプシン含有 (1mg/ml) 0.5M酢酸溶液を加え、24時間、4°Cで攪拌し、遠心分離後の上清を先に回収した上清に加え、これを電気泳動用の試料とした。

各試料はそれぞれ泳動用緩衝液に1:1の比率で溶解し、熱処理後、3~10%濃度勾配

ポリアクリルアミドゲルの各スロットに 25 μ l 添加し、120mA の定電流で電気泳動を開始した。20 分後、一旦電気泳動を停止し、各スロットに 10 μ l の 20%メルカプトエタノール溶液を加え、60 分間放置し、途中還元を行った。その後は、20mA の定電流で 1 時間電気泳動を行い、ゲルを純水にて洗浄した後、Coomassie Brilliant Blue-R 染色液を用いて染色した。I・III型コラーゲンの分析としては、電気泳動像から α 1 (I) 鎖、 α 2 鎖、および α 1 (III) 鎖のバンドを確認し、 α 1 (I) 鎖と α 2 鎖のバンドの density に対する α 1 (III) 鎖のバンドの density、すなわち、 α 1 (III) / $\{\alpha$ 1 (I) + α 2 $\}$ \times 100 (%) を I 型コラーゲンに対する III 型コラーゲンの比率とし、各不動期間で対照群と不動群を比較した。

【実験 2：拘縮に対する運動・物理療法の効果検証に関する実験的アプローチ】

1) 実験動物

実験動物には、8 週齢の Wistar 系雄性ラット 26 匹を用い、これらが無作為に無処置の対照群 (5 匹) と両側足関節を最大底屈位の状態で 4 週間ギプスで不動化する実験群 (21 匹) に振り分けた。そして、実験群はさらに ①不動化のみの群 (不動群; 5 匹)、②不動化の過程で角速度 10° / 秒の CPM を 1 日 30 分間、週 5 日、麻酔下で実施する群 (CPM 群; 4 匹)、③不動化の過程で 1 MHz, 1 Watt/cm² の条件の超音波照射を 1 日 15 分間、週 5 日、麻酔下で実施する群 (超音波群; 6 匹)、④不動化の過程で超音波の疑似照射を超音波群と同時間・同頻度、麻酔下で実施する群 (プラセボ群; 6 匹) の 4 群に振り分けた。

なお、本実験は長崎大学が定める動物実験指針に基づいて行った。

2) 足関節背屈可動域の測定

4 週間の実験期間終了後はペントバルビタールナトリウム (40mg/kg) の腹腔内投与によって各ラットを麻酔し、前述と同様の方法で両側足関節の背屈可動域を測定した。

3) 筋試料の採取

各ラットの両側足関節の背屈可動域を測定した後、麻酔下で両側ヒラメ筋を採取した。採取したヒラメ筋は直ちに筋湿重量を測定し、その後、左側ヒラメ筋は病理学的検索に、右側ヒラメ筋は筋内膜コラーゲン線維網の形態学的検索に供した。

4) 病理学的検索

各ラットの左側ヒラメ筋はその中央部で 2 分割し、トラガントガムに包埋した。そして、液体窒素で冷却したイソペンタン液内で急速凍結させ、病理学的検索まで -80°C で保存

した。

包埋した筋試料はクリオスタットを用いて 7 μ m 厚の凍結横断切片を作製し、Hematoxyline and eosin (H&E) 染色を施した後、光学顕微鏡で検鏡した。

5) 筋内膜コラーゲン線維網の形態学的検索

各ラットの右側ヒラメ筋は滑車を介して 4g 重錘にて伸張し、この状態のまま 3% グルタルアルデヒド溶液に 24 時間、4°C で浸漬し、組織固定を行った。その後は、筋試料を細切し、10% 水酸化ナトリウム溶液内に約 2 週間浸漬し、3 日間の蒸留水処理を経て、筋細胞や基底膜を溶解した。そして、タンニン酸による導電染色、エタノール系列による脱水、t ブチルアルコールによる置換、凍結乾燥を行い、金蒸着処理の後に筋内膜コラーゲン線維網の形態を走査電子顕微鏡で検鏡した。

検鏡像の解析として、筋内膜を構成するコラーゲン線維の配列を定量化するため、筋線維の長軸方向に対するコラーゲン線維走行のなす角度を時計回り方向に 0~180° の範囲で測定した。そして、筋線維の長軸方向に対するコラーゲン線維走行のなす角度に関するヒストグラムを求め、各群で比較した。

4. 研究成果

【実験 1：拘縮の発生メカニズムに関する実験的アプローチ】

1) 足関節背屈可動域

対照群の足関節可動域は 9, 11 週齢時とも全例 160° であったが、不動群のそれは 1 週で 143.0 \pm 4.5°、3 週で 106.0 \pm 5.5° と対照群より有意に低値を示し、拘縮の発生が認められた。また、不動期間でみると 1 週より 3 週が低値であり、不動期間の延長に伴う拘縮の進行が確認された (図 1)。

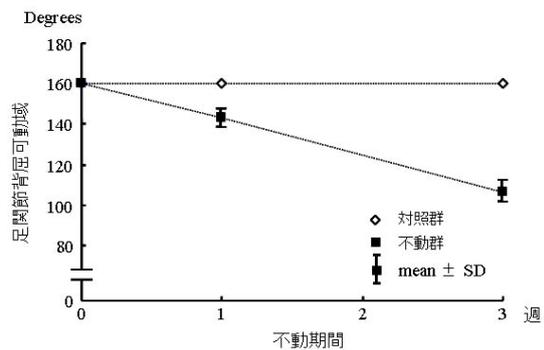


図 1. 足関節背屈可動域の変化

2) 不溶性コラーゲン含有量

対照群の不溶性コラーゲン含有量は 9 週齢時が 0.77 \pm 0.34 μ g/mg wet weight, 11 週齢時が 0.47 \pm 0.22 μ g/mg wet weight であるのに対し、不動群のそれは 1 週が 0.90 \pm 0.37 μ

g/mg wet weight, 3 週が $1.00 \pm 0.53 \mu\text{g/mg wet weight}$ であった. 各不動期間で対照群と不動群を比較すると 1 週では有意差は認められないものの, 3 週では不動群が対照群より有意に高値を示した (図 2).

今回算出した不溶性コラーゲンとは中性塩・酸・ペプシンによっても可溶化されないコラーゲンであり, その含有量の増加は分子間架橋結合が増加したコラーゲンが筋内において増加したことを示唆している. つまり, 「コラーゲン線維に強固な分子間架橋が形成される」という本研究の仮説の一つは 1 週程度の短期の不動では生じないものの, 不動期間を 3 週に延長すると認められることが明らかとなった. そして, 足関節背屈可動域の結果も併せて考えると, 筋内コラーゲンにおける分子間架橋結合の増加は拘縮の進行と関連していると推察され, 「不動によって筋内膜を構成するコラーゲン線維の可動性が減少する」といった先の自験例の結果にも影響していると考えられる.

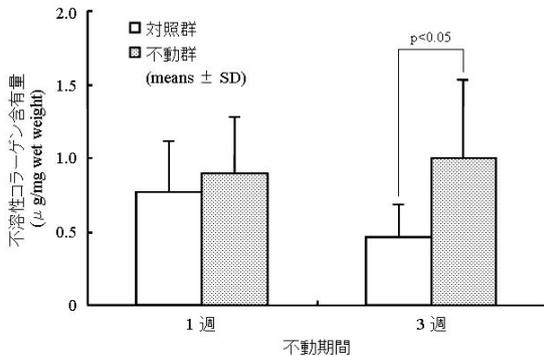


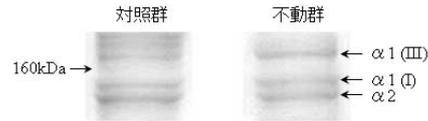
図 2. 不溶性コラーゲン含有量の比較

3) I 型コラーゲンに対する III 型コラーゲンの比率

I 型コラーゲンに対する III 型コラーゲンの比率をみると, 対照群は 9 週齢時が $68.7 \pm 8.1\%$, 11 週齢時が $70.4 \pm 14.6\%$ であるのに対し, 不動群のそれは 1 週が $92.1 \pm 17.1\%$, 3 週が $100.5 \pm 20.2\%$ であった. 各不動期間で対照群と不動群を比較すると 1・3 週とも不動群が対照群より有意に高値を示した (図 3).

以上の結果は, 1 週程度の短期の不動でも筋内は相対的に III 型コラーゲンが増加することを示唆しており, 「I 型コラーゲンと III 型コラーゲンの比率が変化する」とした本研究のもう一つの仮説も検証できたと考えられる. ただ, この変化は拘縮の進行とは関連性が低いことは明白である. 先行研究によれば不動は筋内のコラーゲン含有量の増加, すなわち線維化を惹起するとされており, このメカニズムに上記の結果が何らかの影響をおよぼしている可能性が推察され, 今後詳細な検討が必要である.

a: SDS-PAGE電気泳動法による I・III 型コラーゲンの同定



b. I 型コラーゲンに対する III 型コラーゲンの比率

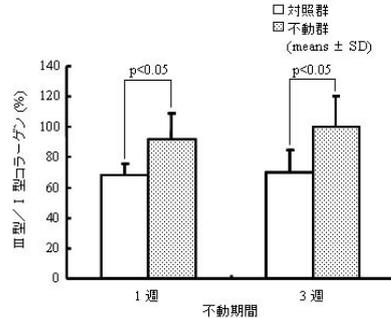


図 3. I・III 型コラーゲンの分析結果

【実験 2 : 拘縮に対する運動・物理療法の効果検証に関する実験的アプローチ】

1) 足関節背屈可動域

足関節背屈可動域は不動群, CPM 群, プラセボ群, 超音波群すべて対照群より有意に低値で, 拘縮の発生を認めたが, CPM 群と超音波群はともに不動群やプラセボ群より約 20° 高値を示し, 有意差を認めた (図 4). つまり, CPM や超音波といった運動・物理療法には拘縮の進行抑制効果があると推察される.

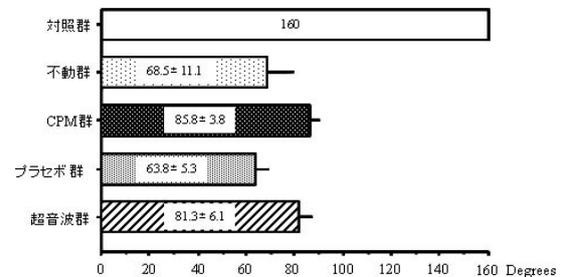


図 4. 足関節背屈可動域の比較

2) 病理学的変化

不動群, CPM 群, プラセボ群, 超音波群すべて対照群より筋線維径の縮小, すなわち筋線維萎縮の発生が認められたが, 壊死線維の存在など, 炎症を疑わせるような所見は観察されなかった.

3) 筋内膜コラーゲン線維網の形態学的変化

ヒラメ筋の筋内膜コラーゲン線維網の形態をみると, 不動群とプラセボ群は筋線維の長軸方向に対して横走るコラーゲン線維が多く認められ, 筋線維の長軸方向に対するコラーゲン線維走行のなす角度のヒストグラムをみても $0 \sim 50^\circ$ ならびに $130 \sim 180^\circ$ の分布が少なく, 90° 付近の分布が多い台形

様の分布状況であった。一方、CPM 群と超音波群は、筋線維の長軸方向に対して縦走するコラーゲン線維が多く認められ、対照群と類似した形態であった。また、筋線維の長軸方向に対するコラーゲン線維走行のなす角度のヒストグラムをみると 0~50° ならびに 130~180° 付近を頂点とする 2 峰性の分布状況で、これも対照群と同様であった(図 5)。

以上の結果から、4 週間の不動によってラットヒラメ筋の筋内膜は個々のコラーゲン線維の可動性減少が生起し、筋内膜の伸張性が低下すると考えられるが、この過程で CPM や超音波を実施するとコラーゲン線維の可動性減少をある程度予防できることが示唆された。そして、このことが拘縮の進行抑制につながっていると推測された。つまり、筋性拘縮の予防に CPM や超音波といった運動・物理療法は効果があると考えられる。

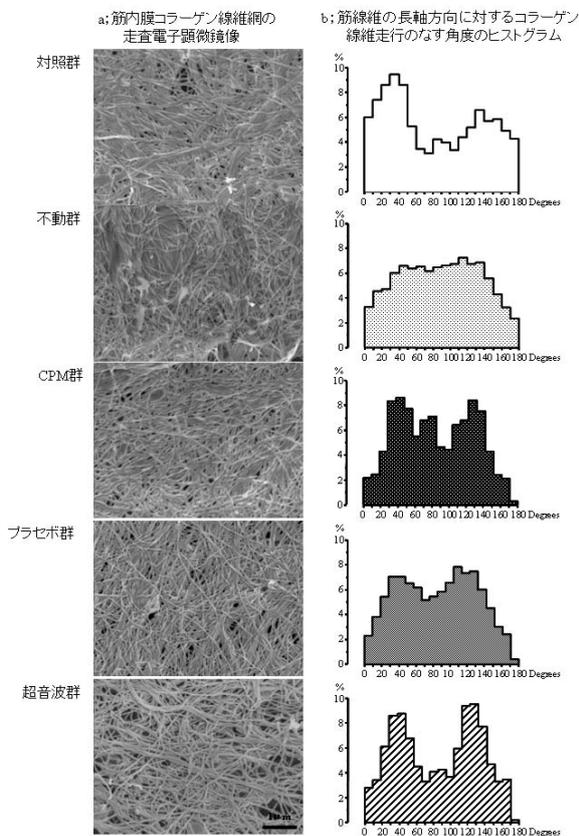


図 5. 筋内膜コラーゲン線維網の形態変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Inoue T, Banno Y (5 番目), Okita M (6 番目), 他 3 名: Effects of passive stretching on muscle injury and HSP expression during recovery after

immobilization in rats. Pathobiology 76, 2009 (in press). (査読有り)

2. Sakamoto J, Okita M (3 番目), Nakano J (4 番目), 他 9 名: Immobilization-induced cartilage degeneration mediated through expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and chondromodulin-I. Connect Tissue Res 50: 37-45, 2009. (査読有り)
3. Okita M (1 番目), Nakano J (2 番目), 他 4 名: Effects of therapeutic ultrasound on joint mobility and collagen fibril arrangement in the endomysium of immobilized rat soleus muscle. Ultrasound Med Biol 35: 237-244, 2009. (査読有り)
4. Hibino I, Okita M (2 番目), Banno Y (4 番目), 他 2 名: Effect of immobilization on insoluble collagen concentration and type I and type III collagen isoforms of rat soleus muscle. J Jpn Phys Ther Assoc 11: 1-6, 2008. (査読有り)
5. 井上貴行, 沖田 実 (2 番目), 他 3 名: 不動終了後のラットヒラメ筋に対する間歇的伸張運動が関節可動域と筋線維におよぼす影響. 理学療法学 34: 1-9, 2007. (査読有り)
6. 荒木景子, 沖田 実 (2 番目), 中野治郎 (9 番目), 他 6 名: 不動によるラット骨格筋の廃用性筋萎縮に対する持続的伸張運動と間歇的伸張運動の影響. 理学療法学 34: 88-94, 2007. (査読有り)
7. 片岡英樹, 中野治郎, 坂本淳哉, 沖田 実: 筋萎縮に対する熱刺激を利用した新たなトレーニング方法の提案—動物実験より—. 理学療法学 34: 163-166, 2007. (査読有り)
8. 沖田 実, 坂野裕洋: 筋力低下のメカニズム. 理学療法 24: 905-913, 2007. (査読無し)
9. 中野治郎, 沖田 実, 片岡英樹, 坂本淳哉: 温熱刺激による筋力増強. 理学療法 24: 954-959, 2007. (査読無し)
10. 沖田 実, 坂野裕洋, 中野治郎: 物理療法効果判定のための評価再考—動物実験による基礎研究を通して—. 物理療法学会誌 13: 13-17, 2006. (査読無し)
11. 吉川紗智, 中野治郎 (6 番目), 沖田 実 (7 番目), 他 4 名: ラットヒラメ筋の廃用性筋萎縮に対する低温刺激の効果. 理学療法学 33: 272-278, 2006. (査読有り)
12. 渡部由香, 中野治郎 (6 番目), 沖田 実 (7 番目), 他 4 名: 温熱負荷方法の違いがラットヒラメ筋の廃用性筋萎縮の進行抑制におよぼす影響—温水浴と電気

熱プレートの比較－. 理学療法学 33: 355-362, 2006. (査読有り)

13. 折口智樹, 沖田 実 (2 番目), 中野治郎 (5 番目), 他 5 名: 廃用性萎縮筋におけるタンパク分解酵素発現の持続的他動運動による抑制. 保健学研究 19: 7-11, 2006. (査読有り)

[学会発表] (計 11 件)

1. 坂井孝行: 不動に伴うラットヒラメ筋の筋線維萎縮の発生メカニズムと間歇的伸張運動の効果に関する検討. 第 43 回日本理学療法学会大会, 2008 年 5 月 15 日～17 日, 福岡県・福岡市.
2. 坂本淳哉: 不動に伴うラット関節軟骨の形態学的変化, ならびに持続的他動運動の影響. 第 43 回日本理学療法学会大会, 2008 年 5 月 15 日～17 日, 福岡県・福岡市.
3. 横山真吾: 微少重力環境や不動に伴うラットヒラメ筋のヒアルロン酸の変化が関節可動域制限におよぼす影響. 第 43 回日本理学療法学会大会, 2008 年 5 月 15 日～17 日, 福岡県・福岡市.
4. 近藤康隆: 筋性拘縮に対する持続的伸張運動の効果検証－関節可動域と不溶性コラーゲン含有量の変化から－. 第 43 回日本理学療法学会大会, 2008 年 5 月 15 日～17 日, 福岡県・福岡市.
5. 片岡英樹: 熱刺激によるラットヒラメ筋の廃用性筋萎縮の進行抑制効果－ミトコンドリアの酵素活性と Heat Shock Protein 60 の発現状況から－. 第 43 回日本理学療法学会大会, 2008 年 5 月 15 日～17 日, 福岡県・福岡市.
6. Okita M: Oral administration of geranylgeranylacetone induce expression of heat shock protein 70 in mice soleus muscle. 第 15 回世界理学療法連盟学会, 2007 年 6 月 2 日～6 日, カナダ・バンクーバー.
7. Banno Y: Effects of heat stress on muscle fibers damage in reloading after immobilized rat soleus muscle. 第 15 回世界理学療法連盟学会, 2007 年 6 月 2 日～6 日, カナダ・バンクーバー.
8. Inoue T: Effect of intermittent stretching on disuse muscle atrophy and muscle contracture in rat soleus muscle. 第 15 回世界理学療法連盟学会, 2007 年 6 月 2 日～6 日, カナダ・バンクーバー.
9. Hibino I: Effect of immobilization on collagen in rat soleus muscle. 第 15 回世界理学療法連盟学会, 2007 年 6 月 2 日～6 日, カナダ・バンクーバー.
10. Nakano J: Low-level laser irradiation

promotes the recovery from disuse muscle atrophy in rats. 第 15 回世界理学療法連盟学会, 2007 年 6 月 2 日～6 日, カナダ・バンクーバー.

11. Araki K: The effects of ultrasound irradiation on the inhibition of disuse muscle atrophy in the rat. 第 15 回世界理学療法連盟学会, 2007 年 6 月 2 日～6 日, カナダ・バンクーバー.

[図書] (計 7 件)

1. 沖田 実: 理学療法 MOOK 3 疼痛の理学療法－慢性痛の理解とエビデンス [第 2 版]. 三輪書店, PP269-283, 2008.
2. 沖田 実: 理学療法 MOOK 14 腰痛の理学療法. 三輪書店, PP96-105, 2008.
3. 沖田 実: 拘縮の予防と治療 第 2 版. 医学書院, PP39-54, 2008.
4. 沖田 実 (編): 関節可動域制限 病態の理解と治療の考え方. 三輪書店, 総ページ数 206, 2008.
5. 沖田 実: 筋機能改善の理学療法とそのメカニズム－理学療法の科学的基礎を求めて－ [第 2 版] (望月久・山田茂 編集). ナップ, PP119-137, 2007.
6. 沖田 実: 理学療法士のための物理療法臨床診断ガイドブック (木村貞治 編集). 文光堂, PP513-527, 2007.
7. 沖田 実: 概説理学療法 (嶋田智明 編集). 文光堂, PP122-133, 2007.

[その他]

ホームページ等

http://www.am.nagasaki-u.ac.jp/pt/basic_pt/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖田 実 (OKITA MINORU)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 50244091

(2) 研究分担者

坂野 裕洋 (BANNO YASUHIRO)
日本福祉大学・健康科学部・助教
研究者番号: 00351205
中野 治郎 (NAKANO JIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20380834