

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 10日現在

機関番号：	33912
研究種目：	挑戦的萌芽研究
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23650339
研究課題名（和文）	マウス用筋力測定装置の開発による筋萎縮に対する運動療法効果の科学的検証
研究課題名（英文）	The evaluation of exercise effect in muscle atrophy by development of muscular strength measuring device for mice
研究代表者	
	平野 孝行 (HIRANO TAKAYUKI)
	名古屋学院大学・リハビリテーション学部・教授
	研究者番号： 10440661

研究成果の概要（和文）： マウスの足関節最大底屈トルクを非観血的・経時的に測定できる装置を開発し、筋力増強運動による筋萎縮からの形態的な回復促進効果と機能的な回復促進効果を同時に検証した。その結果、ヒラメ筋の筋線維横断面積には筋力増強運動による筋萎縮からの回復促進効果が認められた一方、足関節最大底屈トルクの回復促進効果を評価することはできなかった。本結果はヒラメ筋以外の底屈筋に形態的な回復促進効果が小さかったことに起因すると考える。しかし、本装置を用いることにより、筋萎縮やその回復過程でのトルク変化を経時的に評価できた。

研究成果の概要（英文）： We developed the equipment which can noninvasively and sequentially measure the maximum Plantar-flexion torque of mouse, and investigated the relationship between histological effect and the functional effect of resistance exercise (RE) in facilitating recovery from the muscle atrophy. As a result, the histological effect from the muscle atrophy by RE was observed in the myofiber cross sectional area of the soleus muscle. However, the functional effect in plantar-flexion torque was not able to be observed, suggesting that the difference is due to the histological change of other plantar-flexor muscles were small. However, the torque change by muscle atrophy or its recovery process has been sequentially evaluated by using this equipment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
交付決定額	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード： 理学療法学・筋萎縮・筋力・マウス

## 1. 研究開始当初の背景

長期臥床やギプス固定などにより、廃用性筋萎縮が引き起こされる。筋が萎縮すると筋力低下を招き、その結果運動機能や日常生活動作に障害をもたらす。したがって早期の運動機能や動作の獲得を目指すリハビリテーション分野においては、できるだけ早く筋萎

縮から回復させ、筋力を維持することが重要である。この筋萎縮からの回復を促進させる方法として理学療法では筋力増強運動が用いられるが、その詳細な効果には不明な点が多い。これまでに我々は、筋萎縮を起こしたマウスに対して筋力増強運動を行わせると、筋萎縮からの形態的な回復促進が認められ

ることを明らかにしてきた。しかし筋力という機能的側面からの変化は明らかになっていない。すなわち、筋力増強運動によって形態的に筋線維の太さが回復促進しても、筋力の回復促進が伴うかどうか不明である。この理由として、いまだ非観血的・経時的に評価可能なマウスの筋力測定法が確立されていないことが挙げられる。これまでに報告されている筋力測定の方法は、生体外へ取り出した筋に電気刺激を与えた時の張力を測定する方法や、外科的手技により露出させた神経に直接電気刺激を与え、筋収縮時のトルクを測定する方法がある。これらの測定方法は生体に侵襲を加えるため、時間をあけて複数回繰り返し測定することができず、同一個体での経時変化を測定することが不可能である。

## 2. 研究の目的

非観血的にマウスの足関節最大底屈トルクを測定できる装置を開発し、筋力の経時変化を測定できるようにする。そしてこの装置を用いて、筋力増強運動による筋萎縮からの形態的な回復促進効果と機能的な回復促進効果を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) マウス用足関節トルク測定装置の機構と制御プログラムの作製

### ① 機構の作製

マウス用筋力測定装置として、足関節の底屈筋に電気刺激を加えた時の足関節のトルクを測定するための装置（マウス用足関節トルク測定装置；岩本製作所、Fig. 1A）を作製した。本装置は、ラット用に作られている小動物用足関節運動装置を改良して作製した。マウス用ベッド、下腿固定ベルト、足底板、微細な力も検出できる圧力センサを導入した。また、マウス下腿後面筋の収縮を得るのに適した直径1 mmの刺激用電極（バイオリサーチセンター、Fig. 1B）を作製した。

### ② 制御プログラムの作製

電気刺激時のトルクを測定するため、電気刺激開始直前から刺激終了直後までのトルクをリアルタイムに測定できるよう、圧力センサーと電気刺激装置を同時制御するプログラム（岩本製作所）を作製した。

### ③ マウス用筋力測定装置の作動検査

完成したマウス用足関節トルク測定装置を用いて、マウス下腿後面筋の収縮時の足関節トルクが安定して測定できるかどうかの作動確認を行った。まずマウスを Isoflurane 吸入麻酔下で側臥位に寝かせ、体幹と大腿部

をベッドに固定した (Fig. 1A)。マウス後肢は、膝関節 60° 屈曲位、足関節底背屈中間位、装置の回転中心が腓骨外果となるように足底を足底板に固定した。そして剃毛したマウス後肢の皮膚上でヒラメ筋の筋腱移行部とそこから 6 mm 近位の 2 か所に電極を貼り付けた。この電極を介し電気刺激装置

(SEN-3401、日本光電) から電気刺激を与え、下腿後面の筋を等尺性収縮させた。この収縮時に足底板にかかった力を装置の圧センサーによって測定し、PC に記録した。記録した力と腓骨外果 - 圧センサーの距離から足関節最大底屈トルクを算出した。

最大足関節底屈トルクを発揮させるのに最適な電気刺激の条件を確認するため、電気刺激の周波数を 40 から 140Hz の間で 10Hz 間隔で変化させ、発揮されるトルクとの関係を調べた。なお、electronic current 5 mA、duration 1 ms、train duration 650 ms に固定した。そして、安定した足関節最大底屈トルクの値が得られる条件を決定した。また、同じ電気刺激条件で、同一個体で日を変えて測定した時のトルク曲線の再現性を確認した。

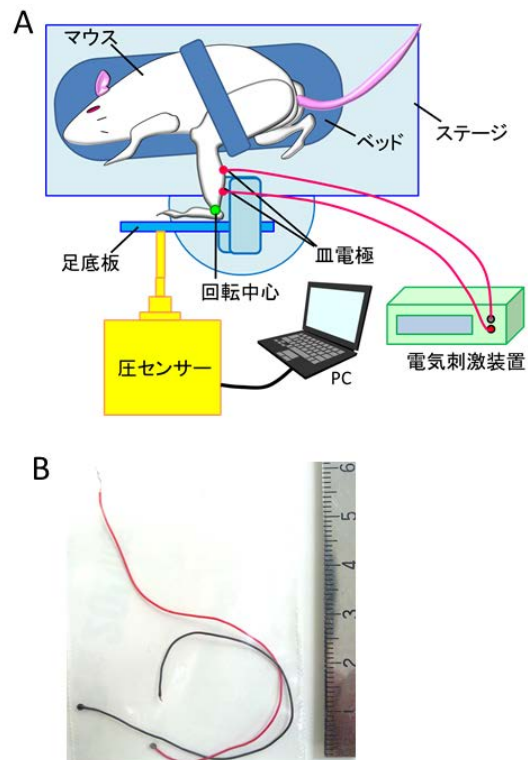


Fig. 1 マウス用足関節トルク測定装置と電極

A; マウス用足関節トルク測定装置の模式図を示す。電気刺激装置から電極を介して電気刺激し、その時の筋収縮により発揮される力を足底板を介して圧センサーで感知する。B; 特注した刺激用電極を示す。

(2)筋力増強運動による筋萎縮からの形態的な回復促進効果と機能的な回復促進効果の検証

① 動物

ICR系雄性マウス(10週齢)に対して、立ち上がり運動のオペラント学習を行った後、尾部懸垂により後肢筋を萎縮させた。その後、筋力増強運動として予め学習させた立ち上がり運動を行わせた(TS+RE群)。このマウスの機能的評価と形態的評価を行い、対照群と結果を比較した(Fig. 2)。対照群として、尾部懸垂後すぐに筋採取する群(TS群)と同週齢の尾部懸垂を行わない群(NTS群)、尾部懸垂後、筋力増強運動を行わない群(TS+NRE群)と同週齢の尾部懸垂も運動も行わない群(NTS+NRE群)を作製し、結果を比較した。

なお、実験期間中マウスは、12時間毎の明暗サイクルで飼育し、餌や水は自由に与えた。また、本研究は名古屋学院大学動物実験委員会の承認を得た後(承認番号:2007-007)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年文部科学省)に則って行った。

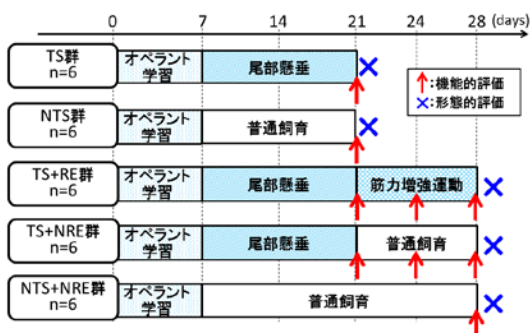


Fig. 2 群分けと実験スケジュール  
尾部懸垂および筋力増強運動の有無により、5群に分けた(各6匹)。

②オペラント学習による筋力増強運動

筋力増強運動には、自発的な立ち上がり運動を行わせた。この立ち上がり運動を行わせるために、尾部懸垂を施す前の7日間に、オペラントケージにマウスを入れ、3秒間の警告刺激後床から電気刺激が発生するプログラムを1日100回、7日間繰り返し行った(Fig. 2)。その結果、マウスは80%以上の確率で音・光刺激中に立ち上がり、電流刺激に曝される前にスイッチレバーを押すことを学習した。尾部懸垂から解放後、予め学習した立ち上がり運動を1セット25回、セット間を4時間以上空けて1日2セット、7日間毎日行った。立ち上がり運動時のスイッチレバーの高さは、マウスの足関節底屈筋に負荷がかかるように、マウスがスイッチレバーに触れたときに踵部がグリッドから離れる(大腿骨と下腿

骨がなす角度が約80°、下腿骨と第5中足骨がなす角度が約100°の肢位)高さに調節した。

③機能的評価：足関節最大底屈トルクの測定

開発したマウス用足関節底屈トルク測定装置を用いて、機能的評価として足関節最大底屈トルクを測定した。トルク測定は尾部懸垂終了後0、3、7日目に行った(Fig. 2)。

④形態的評価：筋腹横断面積および筋線維横断面積の測定

実験期間終了後、形態的評価としてマウス後肢筋の筋腹横断面積と筋線維横断面積を測定した(Fig. 2)。すべてのマウスから麻酔下にてヒラメ筋、足底筋、腓腹筋を剖出し、厚さ8μmの凍結横断切片を作製、Hematoxylin-Eosin染色を施した。この染色切片から、画像解析ソフトを用いてヒラメ筋、足底筋、腓腹筋の筋腹横断面積、ヒラメ筋の筋線維横断面積を測定した。

4. 研究成果

(1)最適な筋収縮を得られる電気刺激条件とマウス用足関節トルク測定装置の精度

最大足関節底屈トルクを発揮させるのに最適な電気刺激の条件を確認するため、電気刺激の周波数を変化させ、発揮されるトルクとの関係を調べた。その結果、100Hz以上の周波数で電気刺激した時に安定した底屈トルクが得られた(Fig. 3)。この結果は先行報告(Brooks, 1990)と一致する。そのため、以降電気刺激の周波数は100Hzを用いることとした。

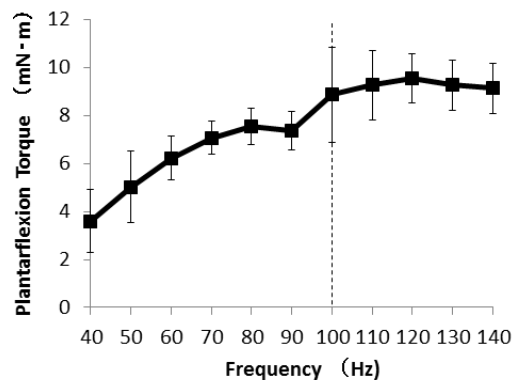


Fig. 3 電気刺激周波数と発揮トルクの関係

電気刺激の周波数を変えて筋収縮させた時の発揮足関節底屈トルクを示す。100Hz以上の周波数で安定した値が得られる。

この条件 (electronic current 5 mA、Frequency 100Hz、duration 1 ms、train duration 650 ms) で電気刺激したときの、正常なマウスの足関節底屈トルクを同一個体で複数回測定し、安定して測定値が得られるか確認した。その結果、標準偏差 1.07 mN・m、変動係数 11% で測定値が得られることを確認した。

## (2) 尾部懸垂や筋力増強運動による機能的変化

### ①足関節最大底屈トルク

TS 群の足関節最大底屈トルク ( $7.63 \pm 0.94$  mN・m) は、NTS 群のトルク ( $9.71 \pm 1.36$  mN・m) に比べて 20% 小さかった ( $p < 0.05$ , Fig. 4)。すなわち、筋萎縮に伴って足関節最大底屈トルクの減少が確認できた。尾部懸垂終了後 3 日目の足関節最大底屈トルク (TS+RE 群;  $8.21 \pm 0.97$  mN・m、TS+NRE 群;  $7.94 \pm 1.73$  mN・m) は、運動の有無にかかわらず TS 群のトルクとの間に有意な差はなかった。尾部懸垂終了後 7 日目で、TS+RE 群の足関節最大底屈トルク ( $9.40 \pm 1.02$  mN・m) は TS 群のトルクに比べて 17% 大きく ( $p < 0.05$ )、NTS+NRE 群のトルクとの間に有意な差はなかった。一方、TS+NRE 群の 7 日目トルクは、TS 群のトルクとの間に有意な差はなかった。ただ、TS+RE 群のトルクと TS+NRE 群のトルク (7 日目;  $8.21 \pm 1.33$  mN・m) との間に有意な差はなかった。このように尾部懸垂後の回復過程における足関節最大底屈トルクの回復は、経時的に評価することが可能となった。また、運動によって有意なトルク値の回復を捉えることができた。ただ、形態的評価のようにはっきりとした筋力増強運動による筋萎縮からの回復の促進効果は認められなかった。

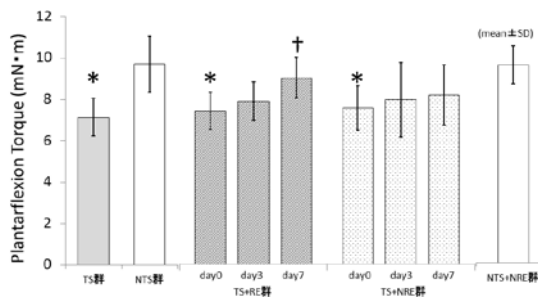


Fig. 4 尾部懸垂や筋力増強運動による足関節最大底屈トルクの変化

尾部懸垂により 26%減少した足関節最大底屈トルクは、筋力増強運動 7 日目には有意に大きくなり、NTS+NRE 群と比べ有意な差がなくなった。運動の有無の違いで有意な差はなかった。 $*p < 0.05$  vs NTS 群、 $\dagger p < 0.05$  vs TS+RE 群 0 日目。

## (3) 尾部懸垂や筋力増強運動による形態的变化

### ①ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋の筋腹横断面積

TS 群のヒラメ筋筋腹横断面積 ( $0.83 \pm 0.31$  mm<sup>2</sup>) は、NTS 群の面積 ( $1.24 \pm 0.32$  mm<sup>2</sup>) と比べて 33% 小さかった ( $p < 0.05$ , Fig. 5A)。しかし、TS 群の足底筋筋腹横断面積 ( $1.59 \pm 0.21$  mm<sup>2</sup>) は、NTS 群の面積 ( $1.90 \pm 0.10$  mm<sup>2</sup>) と比べて 17% 小さく (Fig. 5B)、腓腹筋筋腹横断面積 ( $17.36 \pm 0.50$  mm<sup>2</sup>) は NTS 群の面積 ( $18.95 \pm 1.59$  mm<sup>2</sup>) と比べて 8% 小さいのみであり (Fig. 5B)、どちらも有意な差がなかった。すなわち、代表的な遅筋であるヒラメ筋には尾部懸垂による萎縮変化が有意に認められたのに対し、速筋や両線維が混合する筋である足底筋や腓腹筋では尾部懸垂による萎縮性変化が小さかった。これら 3 筋は協同して足関節の底屈に働くため、ヒラメ筋以外の筋で筋サイズの変化が小さかったことが、これらの筋の機能を合わせた評価である

(2) の足関節最大底屈トルクに筋力増強運動の効果がはっきりと認められなかった一因かもしれない。

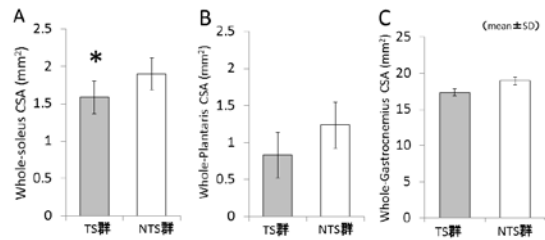


Fig. 5 尾部懸垂による筋腹横断面積の変化

ヒラメ筋 (A)、足底筋 (B)、腓腹筋 (C) の筋腹横断面積を示す。ヒラメ筋の TS 群の筋腹横断面積は NTS 群と比べて有意に小さかった。足底筋と腓腹筋の TS 群の筋腹横断面積は NTS 群と比べて有意な差はなかった。 $*p < 0.05$  vs NTS 群。

### ②ヒラメ筋の筋線維横断面積

TS 群のヒラメ筋筋線維横断面積 ( $976 \pm 37$  μm<sup>2</sup>) は、NTS 群の面積 ( $1712 \pm 190$  μm<sup>2</sup>) と比べて 43% 小さかった ( $p < 0.05$ , Fig. 6)。TS+NRE 群のヒラメ筋筋線維横断面積 ( $1209 \pm 79$  μm<sup>2</sup>) は、TS 群の面積との間に有意な差がなかったが、TS+RE 群の面積 ( $1551 \pm 374$  μm<sup>2</sup>) は TS 群の面積と比べて 34% 大きく ( $p < 0.05$ )、NTS 群の面積との間に有意な差はなかった。すなわち、ヒラメ筋の筋線維横断面積にはこれまでの研究と同様に、筋力増強運動による筋萎縮からの回復促進効果が認められた。

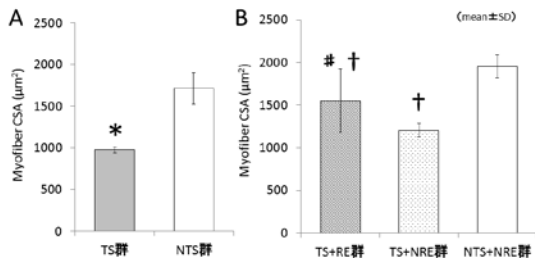


Fig. 6 尾部懸垂や筋力増強運動によるヒラメ筋筋線維横断面積の変化

A; TS 群のヒラメ筋筋線維横断面積は NTS 群に比べて有意に小さかった ( $p < 0.05$ )。B; TS+RE 群の筋線維横断面積は TS+NRE 群と比べて有意に大きく ( $p < 0.05$ )、NTS+NRE 群と比べ有意に小さかった ( $p < 0.05$ )。\* $p < 0.05$  vs NTS 群、† $p < 0.05$  vs NTS+NRE 群、# $p < 0.05$  vs TS+NRE 群。

以上をまとめると、尾部懸垂により筋萎縮を起こすと、筋線維横断面積は正常な大きさの約 50%の減少だったのに対し、足関節最大底屈トルクは約 20%しか減少しないことが分かった。また、筋力増強運動による筋萎縮からの回復過程においても、筋線維横断面積が約 30%回復したのに対し、足関節最大底屈トルクは約 17%の回復に留まった。速筋線維は遅筋線維と比べ廃用性筋萎縮を起こしにくいことが知られている。遅筋線維が 90%以上を占めるヒラメ筋が大きく大きさを変化させたのに対し、速筋線維の割合が大きい足底筋や遅筋・速筋線維が混合する腓腹筋では筋萎縮の程度が小さく、その後の回復の余地が小さかった可能性がある。本研究においてこの 3 筋中のヒラメ筋筋腹横断面積の占める割合は 5%前後と小さいため、ヒラメ筋の形態学的な変化が、直接筋力という機能的な変化に大きく結びつかなかったと考える。すなわち、我々の開発した装置により測定した足関節最大底屈トルクは、足関節底屈筋群すべての機能を総合的に評価する手段であり、単一の筋の形態学的な変化とは必ずしも直結しないことが分かった。組織学的解析から得られる筋萎縮からの回復促進過程の基礎的情報を、筋力回復変化という臨床的・包括的な情報に変換して捉えるのには、有用な手段であると考えられる。また、同一個体において、1 週間以上複数回にわたり足関節最大底屈トルクを測定することが可能であった。機能的な病態、回復の変化を、同一個体において非侵襲的に、かつ経時的に評価することが可能な装置が開発できたといえる。本装置を用いれば、本課題のみならず、同一個体における病態・回復変化を評価する研究にも発展すると考える。

## 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)

[学会発表] (計 3 件)

① 村田 奈緒子・伊東 佑太・吉岡 潔志・河上 敬介. 筋力増強運動による組織学的な回復促進効果は筋力の回復を伴うか?—独自に開発した足関節最大底屈トルク測定装置を用いて—, 第 48 回日本理学療法学会(日本理学療法士協会), 2013. 5. 25. 名古屋.

② 村田 奈緒子・吉岡 潔志・伊東 佑太・平野 孝行・河上 敬介. マウスの非観血的な足関節底屈トルク測定装置の開発, コ・メディカル形態機能学会 第 11 回学術集会(コ・メディカル形態機能学会), 2012. 9. 22. 東京.

③ 伊東佑太・縣信秀・宮津真寿美・平野孝行・河上敬介. 筋力増強運動の期間が萎縮筋の筋線維の太さや数、筋核数に与える影響, 第 46 回日本理学療法学会(日本理学療法士協会), 2011. 5. 28. 宮崎.

[その他]

ホームページ等

<http://www.maruron-ac.net/ngu-u/public/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 孝行 (HIRANO TAKAYUKI)

名古屋学院大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号: 10440661

### (2) 研究分担者

伊東 佑太 (ITO YUTA)

名古屋学院大学・リハビリテーション学部・助教

研究者番号: 30454383