

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 1 日現在

機関番号：33918
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700645
 研究課題名（和文） 骨格筋加温と身体運動を併用した廃用性筋萎縮に対する介入効果に関する実験的研究
 研究課題名（英文） An experimental study about an intervention effect for the muscle atrophy that used exercise together with skeletal muscle warming
 研究代表者
 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

研究成果の概要（和文）：本研究では、筋萎縮に伴う筋損傷や筋痛に対して運動や骨格筋の加温が与える影響について、足関節をギプス固定したラットを用いて検討した。その結果、ギプス固定後の運動は筋損傷や筋痛、痛覚閾値低下を軽減させるが、骨格筋加温は筋損傷の発生を軽減するが、筋痛や痛覚閾値低下は軽減できないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：This study examined the leg joint using the rat which carried out cast immobilization about the influence which movement and warming of skeletal muscle have to the muscle damage and myalgia accompanying muscle atrophy. As a result, plaster cast fixation movement let you relieve muscle damage and a muscle ache, pain threshold fall, but skeletal muscle warming relieved outbreak of muscle damage, but, as for the muscle ache and the pain threshold fall, what we cannot relieve became clear.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：筋萎縮、筋痛、筋損傷、温熱、運動

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の報告によると、2010年における日本国民の平均寿命は男性79.6歳、女性86.3歳であり、65歳以上の高齢者人口は21%を超え、日本は超高齢化社会を迎えている。しかしながら、健康で日常的に介護を必要としないで、自立した生存期間を表す健康寿命をみると、男性70.4歳、女性73.6歳であることから、男性で9.2年間、女性で12.7年間は日常的に介護を必要とする不健康な期間があることが推察される。今後の平均寿命の延長に伴い、こうした健康寿命との差が拡大すれば、個人の生活の質の低下とともに、医療費や介護給付費の多くを消費する期間が増大することになる。平成22年度国民生活基礎調査によると、要支援・介護となった主な

原因の上位に骨・関節疾患や骨折・転倒などの運動器の疾患が挙げられており、このような疾患の特徴として、疾病自体から起こる一次障害に加え、臥床や身体活動の減少により二次的な廃用症候群を来し、障害が重度化することが挙げられる。そのため、リハビリテーション医療では、廃用症候群を如何にして予防・治療していくかが、介助量の軽減や自宅復帰など、高齢者の自立生活を大きく左右する。そして、廃用症候群の典型的な症状として挙げられるのが筋萎縮であり、これはすべての対象者に認められるといっても過言ではない。

筋萎縮は、臥床などの微少重力環への曝露やギプス固定などの関節の不動状態によって引き起こされ、筋容積の減少と筋力低下な

どの機能障害を引き起こし、その後の機能回復を遅延させる主要な阻害因子となる。そのため、筋萎縮の進行を抑制することや回復を促進することは、早期の機能回復を図る上で重要であり、臨床場面において最も効果的な方法は、重力環境下での身体運動といわれている。しかしながら、筋萎縮を呈した骨格筋は極めて脆弱であり、身体運動によって容易に筋損傷が発生し、熱感や腫脹、痛みなどの筋傷害を引き起こすことで機能回復を遅延させ、さらなる不活動を招来する危険がある。そのため、筋萎縮の治療では、身体運動によって起こる筋傷害を予防しつつ、筋萎縮の早期回復を図ることが求められるが、その効果的な介入方法については確立されていない。

一方、筋萎縮に関する近年の基礎研究を概観すると、骨格筋を加温することで筋肥大や筋萎縮の予防効果が得られる可能性が報告されている (Goto K, et al : J J Physiol 54 : 285-293, 2004. 沖田実・他 : 理学療法学 31 : 63-69, 2004. 片岡英樹・他 : 理学療法学 31 : 331-336, 2004.). また、我々は4週間のラット後肢のギプス固定モデルを用いて、プレコンディショニングとして骨格筋を加温することによって、再荷重によって発生する筋傷害が軽減できることを確認している (坂野裕洋・他 : 理学療法学 36 : 33-40, 2009.).

つまり、筋萎縮の治療においては、身体運動によって起こる筋痛を予防しつつ、低強度で効率的に筋萎縮を予防できる新しい運動方法の開発が求められており、その意味で骨格筋の加温と身体運動を併用した方法が有効である可能性が高い。

2. 研究の目的

そこで、本研究課題では、筋萎縮の治療における骨格筋加温や身体運動の有効性について、動物実験モデルを用いて検証した。また、前述した骨格筋加温によるギプス固定後の再荷重に伴う筋傷害の軽減効果が、実際の疼痛をどの程度軽減させているのかは不明である。そこで、今後の臨床応用に向けて、筋萎縮の発生に伴う筋痛の発現機序について検討するとともに、骨格筋加温や身体運動が筋痛に与える影響についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験1. 熱刺激による直腸温と筋温の変化に関する検討

今回の実験で用いる熱刺激が直腸温と筋温に与える影響を確認する目的で以下の実験を行った。

① 実験動物と熱刺激方法

実験動物には8週齢のWistar系雄性ラット5匹を用い、各ラットには腹腔内にペントバルビタールナトリウムを投与し、麻酔を行った。そして、Naitoら (Naito H, et al. : J Appl

Physiol 88: 359-363, 2000.) の報告を参考に約41°Cに設定した恒温槽内に60分間各ラットを挿入し、全身への熱刺激を行った。

② 直腸温と筋温の測定方法

直腸温プローブを各ラットの肛門より約3cm挿入し留置した。また、ニードルプローブを下腿後面の中央部に挿入し、脛骨の直上で留置した。そして、熱刺激開始前30分間と負荷中の60分間、ならびに終了後30分間の直腸温と下腿三頭筋の筋温を高精度熱電対温度計 (UNIQUE MEDICAL社, PTW-301) を用いて、2分30秒間隔で測定した。

(2) 実験2. ギプス固定による疼痛発生状況に関する検討

今回の実験で行うギプス固定が痛覚閾値に与える影響を確認する目的で以下の実験を行った。

① 実験動物

実験動物は8週齢のWistar系雄性ラット20匹を用い、これらが無作為に通常飼育の対照群10匹と4週間のギプス固定を行うギプス固定群10匹に振り分けた。

② 足関節のギプス固定方法

実験群の各ラットは、ペントバルビタールナトリウム (50mg/ml) の腹腔内投与によって麻酔を行い、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包帯にて固定し、ヒラメ筋を弛緩位で不動化した。その際、足指は浮腫の発生を確認するために露出させ、ギプスの緩みや浮腫の発生を確認した際には適宜巻き換えを行い、4週間継続してギプス固定を行った。なお、ギプス固定後もラットは前肢にて飼育ケージ内の移動は可能で、水と餌は自由に摂取させた。

③ 疼痛閾値の行動学的評価

腓腹筋に対する筋圧痛閾値

Randall-Selitto装置 (Ugo Basile, Italy) を用いて測定した。具体的には、先端径2.6mmのプローブを右腓腹筋外側の筋腹に当て漸増的に圧迫し、逃避反応が出現した際の圧力を記録した。足底および下腿皮膚への触刺激による逃避反応閾値は、先端径0.5mmのvon Frey hairフィラメントを足底中央部、もしくは右腓腹筋外側の筋腹に押し当ててup down法により測定した。

(3) 実験3. 伸張刺激がギプス固定後の疼痛に与える影響に関する検討

4週間のラット後肢のギプス固定モデルを用いて、ギプス固定後に行われる伸張刺激が疼痛や筋障害の発生に与える影響を検討する目的で以下の実験を行った。

① 実験動物

実験動物は8週齢のWistar系雄性ラット18匹で、これらが無作為に通常飼育の対照群6匹と両側足関節を4週間ギプス固定する実

験群 12 匹に振り分け、実験群はさらにギブス固定終了に 2 週間の通常飼育を行うギブス固定群 6 匹と通常飼育に加えて 2 週間の伸張刺激を行う伸張刺激群 6 匹に無作為に分けた。

②足関節のギブス固定方法

実験群の各ラットは、ペントバルビタールナトリウム (50mg/ml) の腹腔内投与によって麻酔を行い、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ブス包帯にて固定し、ヒラメ筋を弛緩位で不動化した。その際、足指は浮腫の発生を確認するために露出させ、ギブスの緩みや浮腫の発生を確認した際には適宜巻き換えを行い、4 週間継続してギブス固定を行った。なお、ギブス固定後もラットは前肢にて飼育ケージ内の移動は可能で、水と餌は自由に摂取させた。

③伸張刺激方法

伸張刺激は自作した他動運動装置を用いて 40° の可動範囲で足関節最大背屈位まで行い、30 分/日、6 日/週、固定除去直後から実施した。

④疼痛閾値の行動学的評価

腓腹筋に対する筋圧痛閾値は Randall-Selitto 装置 (Ugo Basile, Italy) を用いて測定した。具体的には、先端径 2.6 mm のプローブを右腓腹筋外側の筋腹に当て漸増的に圧迫し、逃避反応が出現した際の圧力を記録した。足底および下腿皮膚への触刺激による逃避反応閾値は、先端径 0.5 mm の von Frey hair フィラメントを足底中央部、もしくは右腓腹筋外側の筋腹に押し当てて up down 法で測定した。

⑤組織学的評価

実験期間終了後に腓腹筋外側頭とヒラメ筋を採取し、その中央部で二分割してトラガントガムに包埋後、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、クリオスタットを用いて 8 μm 厚の横断切片を作成し、組織病理学的観察のため Hematoxylin-eosin (以下、H&E) 染色を施し、光学顕微鏡で検鏡した。

また、以下の定量解析を行うため H&E 染色像は、顕微鏡用デジタルカメラ (OLYMPUS 社, CAMEDIA C-5060 Wide Zoom) にて 20 倍の拡大像で全視野に至るまで撮影を行い、その撮影画像をパソコン (Sony 社, VAIO VGN-TX90PS) に取り込んだ。取り込んだ画像より、筋傷害の指標として、壊死線維数を計測した。なお、今回検索対象とした壊死線維は、一試料内の全視野において確認できる全ての筋線維の総数と壊死線維の数を計測し、筋線維の総数に対する壊死線維の割合を求め、これを壊死線維の発生頻度とした。

(4) 実験 4. 骨格筋加温がギブス固定後の疼痛に与える影響に関する検討

4 週間のラット後肢のギブス固定モデルを

用いて、再荷重 2 日前より 48 時間毎に繰り返される熱刺激が再荷重後の疼痛や筋障害の発生に与える影響を検討する目的で以下の実験を行った。

①実験動物

実験動物は 8 週齢の Wistar 系雄性ラット 18 匹で、これらは無作為に通常飼育の対照群 6 匹と両側足関節を 4 週間ギブス固定する実験群 12 匹に振り分け、実験群はさらにギブス固定終了に 2 週間の通常飼育を行うギブス固定群 6 匹と通常飼育に加えてギブス固定終了の 2 日前より 48 時間毎に熱刺激を行う熱刺激群 6 匹に無作為に分けた。

②足関節のギブス固定方法

実験群の各ラットは、ペントバルビタールナトリウム (50mg/ml) の腹腔内投与によって麻酔を行い、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ブス包帯にて固定し、ヒラメ筋を弛緩位で不動化した。その際、足指は浮腫の発生を確認するために露出させ、ギブスの緩みや浮腫の発生を確認した際には適宜巻き換えを行い、4 週間継続してギブス固定を行った。なお、ギブス固定後もラットは前肢にて飼育ケージ内の移動は可能で、水と餌は自由に摂取させた。

③熱刺激方法

本研究では、ギブス固定が終了し再荷重を開始する時点において後肢骨格筋内に HSP70 を強く発現させておいた方が、再荷重後の筋線維損傷の発生を軽減できるのではないかと考えた。そして、この点に関して先行研究より、ラットヒラメ筋内の HSP70 含有量は温熱負荷後 48 時間が最も高値であること、熱刺激の間隔を 48 時間とすることで、恒常的に骨格筋内に HSP70 を発現出来ることを確認している。そこで、本研究ではこの結果を参考とし、4 週間のギブス固定期間終了の 48 時間前より熱刺激を行い、48 時間毎に繰り返し実施することとした。

熱刺激は、熱刺激群の各ラットに対して行った。熱刺激群は、4 週間のギブス固定期間終了の 48 時間前より、ペントバルビタールナトリウム (50mg/ml) の腹腔内投与によって麻酔を行い、実験 1 と同様の方法で約 41°C に設定した恒温槽内に 60 分間ラットを挿入し、全身温熱負荷を行った。なお、熱刺激は、両側足関節のギブスを除去した状態で行った。そして、熱刺激後は、前述した方法で再度両側足関節のギブス固定を行い、飼育した。一方、麻酔による成長不良などの影響を考慮し、対照群にも同様に麻酔を行った。

④疼痛閾値の行動学的評価

腓腹筋に対する筋圧痛閾値は Randall-Selitto 装置 (Ugo Basile, Italy) を用いて測定した。具体的には、先端径 2.6 mm のプローブを右腓腹筋外側の筋腹に当て漸増的に圧迫し、逃避反応が出現した際の圧力

を記録した。足底および下腿皮膚への触刺激による逃避反応閾値は、先端径 0.5 mm の von Frey hair フィラメントを足底中央部、もしくは右腓腹筋外側の筋腹に押し当てて up down 法により測定した。

⑤組織学的評価

実験期間終了後に腓腹筋外側頭とヒラメ筋を採取し、その中央部で二分割してトラガントガムに包埋後、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、クリオスタットを用いて 8 μm 厚の横断切片を作成し、組織病理学的観察のため Hematoxylin-eosin (以下、H&E) 染色を施し、光学顕微鏡で検鏡した。

また、以下の定量解析を行うため H&E 染色像は、顕微鏡用デジタルカメラ (OLYMPUS 社、CAMEDIA C-5060 Wide Zoom) にて 20 倍の拡大像で全視野に至るまで撮影を行い、その撮影画像をパソコン (Sony 社、VAIO VGN-TX90PS) に取り込んだ。取り込んだ画像より、筋傷害の指標として、壊死線維数を計測した。なお、今回検索対象とした壊死線維は、一試料内の全視野において確認できる全ての筋線維の総数と壊死線維の数を計測し、筋線維の総数に対する壊死線維の割合を求め、これを壊死線維の発生頻度とした。

4. 研究成果

(1) 実験 1. 熱刺激による直腸温と筋温の変化に関する検討

熱刺激前の直腸温は平均で 36.6°C、筋温は 35.3°C であったが、熱刺激を開始すると両温度とも上昇し、50 分以降には 40.0°C 以上となり、60 分後には直腸温が 40.7°C、筋温が 40.5°C まで達した。熱刺激終了後は両温度とも緩やかに下降したが、直腸温は約 12 分間、筋温は約 2 分間、40.0°C 以上の温度を維持していた。筋細胞内に HSP70 が発現するには通常 40°C 以上になることが必要とされるが、本法においても HSP70 を誘導するに足る筋細胞内の加温が得られるものと考えられる。以上のことから、今回の実験に用いる熱刺激方法は骨格筋における HSP70 の誘導が期待できると考える。

(2) 実験 2. ギプス固定による疼痛発生状況に関する検討

腓腹筋に対する筋圧痛閾値ならびに足底および下腿皮膚への触刺激による逃避反応閾値は固定 2 週目より有意な低下を認め、固定期間の延長に伴って固定終了 (4 週目) まで低下し続けた。固定除去後では、両群ともに腓腹筋に対する筋圧痛閾値ならびに足底および下腿皮膚への触刺激による逃避反応閾値が経過とともに上昇 (回復) する傾向を示したが、固定除去後 2 週が経過しても、固定前の状態まで回復しなかった。以上の結果か

ら、ラット足関節を 4 週間ギプス固定することで腓腹筋における逃避反応閾値の低下や足底における逃避反応回数が増加することが確認され、廃用性筋萎縮による筋痛の発生状況と実験モデルの有用性が明らかとなった。

(3) 実験 3. 伸張刺激がギプス固定後の疼痛に与える影響に関する検討

ギプス固定群では、対照群に比べ腓腹筋に対する筋圧痛閾値、ならびに足底における逃避反応閾値が低下し、壊死線維の割合は高値を示した。伸張刺激群ではギプス固定群に比べ腓腹筋に対する筋圧痛閾値、ならびに足底における逃避反応閾値の低下が抑制され、壊死線維の割合も低値であった。以上の結果から、固定除去直後より廃用性に萎縮した骨格筋に伸張刺激を実施することで逃避反応が抑制されるとともに、壊死線維の割合を減少させ、逃避反応の抑制に影響していることが推測された。

(4) 実験 4. 骨格筋加温がギプス固定後の疼痛に与える影響に関する検討

ギプス固定群では、対照群に比べ腓腹筋に対する筋圧痛閾値、ならびに足底における逃避反応閾値が低下し、壊死線維の割合は高値を示した。一方、熱刺激群はギプス固定群に比べて壊死線維の割合が低値を示したが、腓腹筋の筋圧痛閾値ならびに足底における逃避反応閾値には群間に差を認めなかった。以上の結果から、ギプス固定除去直後より廃用性に萎縮した骨格筋に骨格筋加温を実施することで筋損傷をある程度抑制できるが、筋痛については抑制できないことが明らかとなった。このことから、廃用性筋萎縮による筋痛は筋損傷に由来しておらず、不動に伴うその他の要因 (神経系の可塑的变化など) に由来していることが推測された。

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 4 件)

① 坂野裕洋, 骨格筋の収縮と局所循環動態. 理学療法, 査読無, 30 巻. 2013, 453-459.

② 坂野裕洋, 骨格筋の柔軟性とその要因. 理学療法, 査読無, 30 巻. 2013, 217-226.

③ 土田和可子, 岩田全広, 鈴木重行, 坂野裕洋, 井上貴行, 松尾真吾, 浅井友詞. 温熱刺激による筋萎縮の進行抑制効果の検討-グルココルチコイド誘導性筋萎縮の進行抑制効果と熱ショックタンパク質発現との関連性から-. 理学療法, 査読有, 29 巻. 2012, 795-802.

④ 豊田慎一, 唐沢延幸, 日比野至, 坂野裕洋, 古川公宣, 沖田実. 坐骨神経損傷の超音波療

法による神経再生. 理学療法科学, 査読有, 27 巻. 2012, 279-284.

〔学会発表〕(計 9 件)

①M Iwata, W Tsuchida, R Yuminamochi, Y Banno, T Inoue, M Fujiwara, K Hayashi, S Matsuo, Y Asai, S Suzuki. Mechanical Stretching Increases Glucose Transport into Skeletal Myocytes in Culture by Mechanism other than via Adenosine Triphosphate. 34th Annual Meeting International Gravitational Physiology, 2013 年 06 月 23-28 日, Aichi.

②小野瀬慎二, 柳澤卓也, 林和寛, 藤原光宏, 井上貴行, 福安紗織, 坂野裕洋, 岩田全広, 鈴木重行. ギプス固定後のラット後肢に生じる疼痛にストレッチングが及ぼす効果の検証. 第 48 回日本理学療法学会大会, 2013 年 05 月 24 日-26 日, 愛知.

③柳澤卓也, 小野瀬慎二, 林和寛, 藤原光宏, 井上貴行, 福安紗織, 坂野裕洋, 岩田全広, 鈴木重行. 後肢不動中のラットに生じる疼痛にストレッチングが及ぼす効果の検証. 第 48 回日本理学療法学会大会, 2013 年 05 月 24 日-26 日, 愛知.

④岩田全広, 弓納持里奈, 土田和可子, 坂野裕洋, 井上貴行, 浅井友詞, 鈴木重行. 熱ストレスによるデキサメタゾン誘導性筋萎縮の進行抑制における NF- κ B の関与. 第 67 回日本体力医学会大会, 2012 年 09 月 14 日-16 日, 岐阜

⑤K Hayashi, S Suzuki, N Inukai, T Inoue, S Imoto, Y Banno, M Iwata, M Fujiwara. TREADMILL EXERCISE REVERSES MECHANICAL HYPERALGESIA IN ACID-INJECTED RATS. 14th world congress on pain, 2012 年 08 月 27-31 日, Milan Italy.

⑥ Y Banno, T Matsubara, M Iwata. Relationship between gait and delayed onset muscle soreness following eccentric contraction of triceps surae muscle. 16th international WCPT congress, 2011 年 6 月 20 日-23 日, Amsterdam Holland.

⑦W Tsuchida, M Iwata, Y Banno. Effect of Heat Shock on Dexamethasone-induced Muscle Atrophy in Cultured Skeletal Muscle Cells. 16th international WCPT congress, 2011 年 6 月 20 日-23 日, Amsterdam Holland.

⑧井上貴行, 坂野裕洋, 鈴木重行, 林和寛, 犬飼菜海, 井本晶太, 杉浦一俊. ギプス固定モデルラットの腓腹筋における筋圧痛閾値の変化の検討. 第 46 回日本理学療法学会大会, 2011 年 5 月 27 日-29 日, 宮崎.

⑨林和寛, 井上貴行, 井本晶太, 坂野裕洋, 鈴木重行. 酸性食塩水投与によって作製される痛みモデル動物に対する運動介入の影響. 第 46 回日本理学療法学会大会, 2011 年 5 月

27 日-29 日, 宮崎.

〔図書〕(計 1 件)

①鈴木重行, 坂野裕洋, 岩田全広, 井上貴行, 松尾真吾, 波多野元貴. 三輪書店, ストレッチングの科学. 2013, 38-52.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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