

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700539

研究課題名(和文)磁気刺激を利用した拘縮の新たな治療法の確立のための実験的研究

研究課題名(英文) Experimental study for establishment a new therapeutic approach for immobilized-induced joint contracture

研究代表者

坂本 淳哉 (SAKAMOTO, Junya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・准教授

研究者番号：20584080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、不動によって惹起される拘縮の新たな治療法の確立を目的に、磁気刺激や電気刺激により誘発する筋収縮運動が拘縮の発生・進行ならびにその病態の一つである線維化の発生・進行におよぼす影響についてラット足関節拘縮モデルを用いて検討した。その結果、不動状態に曝したラットヒラメ筋に磁気刺激や電気刺激により周期的な単収縮を負荷すると、線維化の発生が軽減されて拘縮の進行が抑制されるが、強縮を負荷しても線維化は軽減されず、収縮様式の違いにより拘縮の進行抑制効果が異なることが示唆され、骨格筋への周期的な単収縮の負荷は拘縮の新たな治療方法の一つになり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish a new therapeutic approach for patients being treated with immobilization and orthosis through investigation that the effects of muscle contraction induced by lumbar magnetic stimulation and neuromuscular electric stimulation on immobilization-induced limited ROM and skeletal muscle fibrosis in rat soleus muscle. As results, isometric twitch contraction via lumbar magnetic stimulation and neuromuscular electric stimulation decreased skeletal fibrosis and reduced the progression of ROM loss. By contrast, the effect of tetanic contraction for fibrosis and progression of ROM loss was insufficient. We believe that isometric twitch contraction via lumbar magnetic stimulation and neuromuscular electric stimulation holds potential as a new therapeutic approach for immobilization-induced loss of ROM.

研究分野：理学療法学

キーワード：不動 拘縮 骨格筋 線維化 磁気刺激

1. 研究開始当初の背景

理学療法の実情についてまとめられた理学療法白書では、理学療法の対象障害が調査されており、1985年から2005年までの調査においては拘縮を含む関節可動域制限が上位3位以内に位置している。また、拘縮の発生状況を調査した報告によると、高齢障害者の約70%が拘縮を有している事実が明らかにされている。つまり、これらの結果は拘縮を有する臨床症例が非常に多く、その発生頻度もきわめて高い状況であることを示していると同時に、拘縮に対する有効な治療法が確立されていないことも示しており、リハビリテーション医療における拘縮に対する効果的な治療法の開発は急務であるといえる。臨床では、拘縮の予防・治療には伸張運動が幅広く用いられており、この点に関する基礎的研究も数多く行われている。これらの研究では伸張刺激を負荷する毎にギプス固定を解除することになるが、実際の臨床では患部の安静を保持するために施されているギプス固定や創外固定を解除して伸張運動を負荷することはきわめて難しい。したがって、新たに拘縮の発生・進行抑制のための効果的な治療方法を確立するためには、前述の点を考慮して臨床応用が容易な手段を用いて効果検証を行う必要があるといえる。

2. 研究の目的

申請者らは骨格筋を不動状態に曝らすと筋周膜・筋内膜におけるタイプIコラーゲンが増加するといった骨格筋の線維化が生じることを認めている。そして、このような線維化の発生・進行には形質転換成長因子 (Transforming growth factor; TGF)- β 1の発現亢進と低酸素状態が惹起されることで、高いコラーゲン産生能を有する筋線維芽細胞が増加することが関与している (Honda Y, et al. Muscle Nerve. 2014. doi: 10.1002/mus.24558.)。

一方、BlaauboerらはTGF- β 1非存在下においてヒト肺線維芽細胞にヒトの呼吸サイクルを再現した条件での伸張刺激を負荷しつつ培養すると、伸張刺激を負荷しない場合と比べてタイプIコラーゲン mRNA と筋線維芽細胞のマーカーである α -smooth muscle actin (SMA)の mRNA 発現量が減少することを認めている (Blaauboer ME. et al. Biochem Biophys Res Commun. 404:23-27 2011.)。つまり、この結果は機械刺激の有無が組織の線維化に直接的に関与する可能性を示唆しているものと考えられる。また、この結果は、組織が正常状態の生体内で受ける機械刺激は線維化を抑制する効果をもつ可能性を示しており、このことを骨格筋に当てはめると上記の機械刺激は筋収縮に該当し、これは不動による骨格筋の線維化を抑制すると仮説できる。加えて、周期的な筋収縮は

骨格筋内の血流量を増加させることが知られており、これは前述した線維化のキープクターの一つである骨格筋の低酸素状態を抑制することができるのではないかと推察される。

近年、磁気刺激の臨床応用が積極的に進められており、具体的には、うつやパーキンソン病の治療や脳卒中後のリハビリテーションにおいて利用されている。磁気刺激は刺激時に不快感がなく、脂肪組織や骨組織に干渉されることがないため深部に存在する骨格筋に対しても筋収縮を効率よく誘発することが可能である。実際、Shimadaらは、後肢懸垂とギプス固定を併用することで筋萎縮を惹起したラット骨格筋に対して磁気刺激 (705V, 20Hz, 60分間持続刺激) を10日間負荷すると、筋線維萎縮の抑制が認められたと報告している (Shimada Y, et al. Biomed Res. 27:23-27, 2006.)。つまり、上記の仮説と併せて考えると磁気刺激を用いて筋収縮を誘発し機械刺激を負荷することで不動による拘縮の発生を抑制できる可能性が考えられる。そこで、本研究では、1) 不動によって惹起される拘縮の発生・進行に対する磁気刺激の効果について検討する、2) 上記方法の効果に関するメカニズムについて検討する、3) 上記の結果の照合から不動による拘縮に対する効果的な治療方法を提示する、といった3点を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 磁気刺激による周期的な筋収縮が不動により惹起される骨格筋の線維化と拘縮の発生・進行におよぼす影響に関する検討

実験動物には8週齢のWistar系雄性ラット16匹を用いて、これを無処置の対照群と実験群に振り分け、さらに実験群は両側足関節を最大底屈位で4週間ギプス固定する不動群と不動の過程でギプスを装着した状態で磁気刺激により両側ヒラメ筋に周期的な筋収縮運動を負荷する磁気刺激群に振り分けた。磁気刺激の負荷は、Sakurabaらの先行研究に準じて行なった。具体的には、ペントバルビタルナトリウム (40mg/kg) の腹腔内投与により麻酔したラットを腹臥位として、その第3-5腰椎の棘突起を触察にて確認して、磁気刺激装置 (Magstim200, ミユキ技研) のコイルヘッドの中心をあて、70%出力 (立ち上がり時間 100 μ s, 最大頂点磁場強度 2.0T, パルス幅 1ms の単一位相波形) にて、刺激間隔を20秒毎、刺激時間は1日60分とし、週5回の頻度

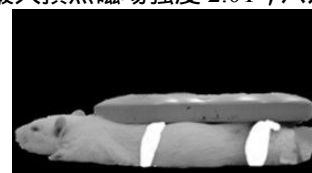


図1. 磁気刺激の負荷方法

でL3からL5の前角細胞を経皮的に刺激し、

両側ヒラメ筋の周期的な筋収縮を誘発した(図1). 実験期間終了後は、両側ヒラメ筋を摘出して、筋湿重量を測定した後、右側試料についてはその凍結横断切片に対して Hematoxylin & Eosin 染色を施し、病理組織学的検索に供するとともに筋線維直径を計測した。一方、左側試料については Reverse transcription PCR 法による分子生物学的検索に供し、低酸素特異的転写因子である hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , TGF- β 1, 筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA ならびにタイプ I・III コラーゲンそれぞれの mRNA 発現量を定量化した。

(2) 電気刺激による誘発する筋収縮運動の違いが不動により惹起される骨格筋の線維化と拘縮の発生・進行におよぼす影響に関する検討

研究開始当初は、磁気刺激により誘発する筋収縮運動の様式の違いが骨格筋の線維化と拘縮の発生・進行におよぼす影響について検討する予定であったが、保有している刺激装置では条件設定が困難であり、実験2では刺激装置を電気刺激に変更して上記の点について検討した。

実験動物には 8 週齢の Wistar 系雄性ラット 35 匹を用い、1) 無処置の対照群 (n=10), 2) ギプス包帯を用いて両側足関節を最大底屈位で 4 週間不動化する不動群 (n=8), 3) 不動状態のまま周波数 10Hz の電気刺激により単収縮を負荷する単収縮群 (n=8), 4) 同様に周波数 50Hz の電気刺激により強収縮を負荷する強収縮群 (n=9) に振り分けた。そして、単収縮群と強収縮群のラットに対しては、リード線付きの表面電極を貼付した状態で不動化を行い、電気刺激を行う際にはこのリード線に trio-300 (伊藤超短波株式会社製) を接続した。そして、刺激強度 4mA, 1日1回30分、週6回の頻度で電気刺激を行った。実験期間終了後は麻酔下で全てのラットの足関節背屈可動域 (ROM) を測定した後、両側ヒラメ筋を摘出し、右側試料についてはその凍結横断切片に対して Hematoxylin & Eosin 染色を施し、組織学的検索に供するとともに筋線維直径を計測した。一方、左側試料については Real Time PCR 法による分子生物学的検索に供し、実験1と同様に HIF-1 α , TGF- β 1, α -SMA ならびにタイプ I・III コラーゲンそれぞれの mRNA 発現量を定量化した。

4. 研究成果

(1) 実験1の結果

足関節背屈可動域については、不動群と磁気刺激群は対照群に比べて有意に低値を示し、また、磁気刺激群は不動群と比べて有意に高値を示した(図2)。つまり、磁気刺激により周期的な筋収縮運動を負荷すると拘縮の進行が抑制されるといえる。次に、組織病理学的観察では、各群ともに炎症を示す病理

所見は認めず、また、Picrosirius red 染色像をみると、不動群は対照群と比べて筋周膜や筋内膜の肥厚が顕著であったが、これは磁気刺激群では軽度であった(図3)。そして、筋線維横断面面積の結果を見ると、不動群と磁気刺激群は対照群と比べて有意に低値を示し、この2群間には有意差は認められなかった。一方、線維関連分子の動態についてみると、すべての指標において、不動群は対照群に比べて有意に高値を示した。一方、刺激群においては TGF- β 1 mRNA を除く全ての指標において不動群と比べて有意に低値を示した(図4)。すなわち、磁気刺激群では周期的な筋収縮が負荷されることで、骨格筋の低酸素状態が緩和され、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化誘導が抑制されることで、タイプ I・III コラーゲンの産生も抑制されたものと推察され、これが拘縮の進行抑制に関与していると考えられる。ただ、磁気刺激群の TGF- β 1 mRNA 発現量は不動群のそれとの間に有意差を認めておらず、これには刺激強度や刺激周波数といった磁気刺激の条件が影響していると思われ、この点については今後の検討課題である。そして、筋線維横断面面積の結果と合わせて考えると、今回の磁気刺激は不動に伴う筋線維萎縮を抑制するものではないことから、低強度の筋収縮運動であるといえる。そして、今回の線維化関連分子の動態と筋線維横断面面積の結果から、同程度の筋線維萎縮が生じていても線維化発生の程度は異なっており、筋線維萎縮と線維化の発生には直接的な関係はないと推察される。

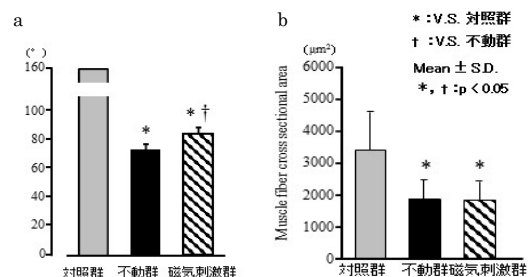


図2. 足関節背屈可動域と筋線維横断面面積の比較

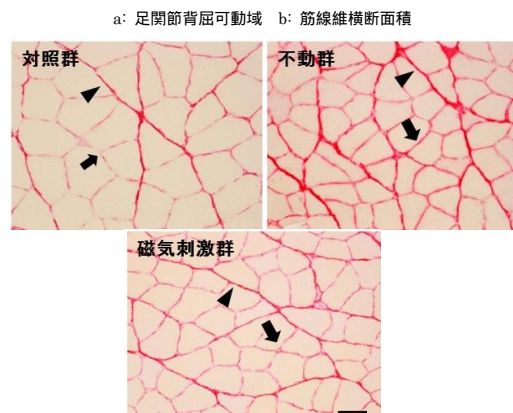


図3. Picrosirius red 染色像

矢頭は筋周膜を示し、矢印は筋内膜を示す

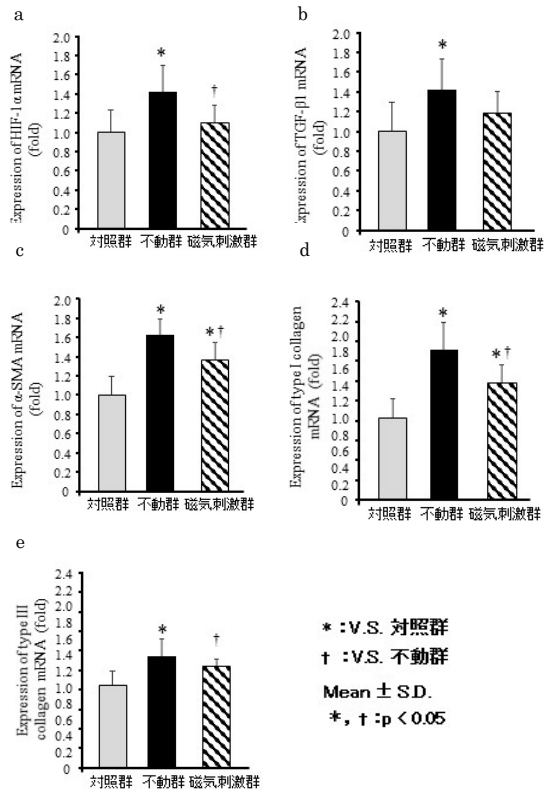


図 4. 線維化関連分子の発現状況

a: HIF-1α b: TGF-β1
c: α-SMA d: タイプ I コラーゲン
e: タイプ III コラーゲン

(2) 実験 2 の結果

実験期間終了後の足関節背屈可動域は対照群が最も高値で、次いで、単収縮群、強縮群、不動群の順に有意に高値であった(図 5)。病理組織学的検索では各群において筋線維壊死などの炎症を疑わせる所見は認めなかった。また、平均筋線維直径の結果では、対照群と比べて不動群、単収縮群、強縮群の 3 群は有意に低値を示し、この 3 群で比較すると強縮群は不動群、単収縮群より有意に高値を示した。つまり、今回の単収縮群と強縮群の刺激条件では炎症は惹起されず、強縮条件でのみ不動による筋線維萎縮の進行抑制効果が認められた。一方、HIF-1α の mRNA 発現量は、不動群、強縮群ともに対照群に比べて有意に高値であったが、単収縮群と対照群の間に有意差は認めなかった。また、TGF-β1 および α-SMA、タイプ I コラーゲンの mRNA 発現量は、不動群、強縮群ともに対照群と比べて有意に高値であり、単収縮群は不動群と比べて有意に低値で、対照群との間に有意差は認めなかった。一方、タイプ III コラーゲンの mRNA 発現量は、対照群と単収縮群、強縮群は不動群に比べて有意に低値であり、この 3 群間に有意差は認めなかった(図 6)。

今回の結果から、不動状態に曝された骨格筋に単収縮を負荷すると、骨格筋の低酸素状態の惹起や TGF-β1 の発現が抑制され、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化やコラーゲ

ンの産生が軽減されることが明らかとなり、不動によって惹起される線維化が軽減されることが示唆された。一方、骨格筋に強縮を負荷しても不動によって惹起される線維化は軽減されず、収縮様式の違いにより拘縮の進行抑制効果が異なることが示唆された。一般に、筋収縮運動の際の筋内の血流増加は弛緩期に生じ、これは強縮運動より単収縮運動において顕著になるとされている。したがって、収縮様式による筋内の血流量の違いが、骨格筋の線維化と拘縮の進行抑制効果に影響したと推察され、拘縮の治療手段としては単収縮が有用であると考えられる。

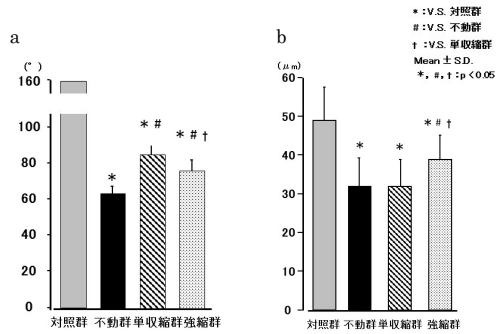


図 5. 足関節背屈可動域と平均筋線維直径の比較

a: 足関節背屈可動域 b: 平均筋線維直径

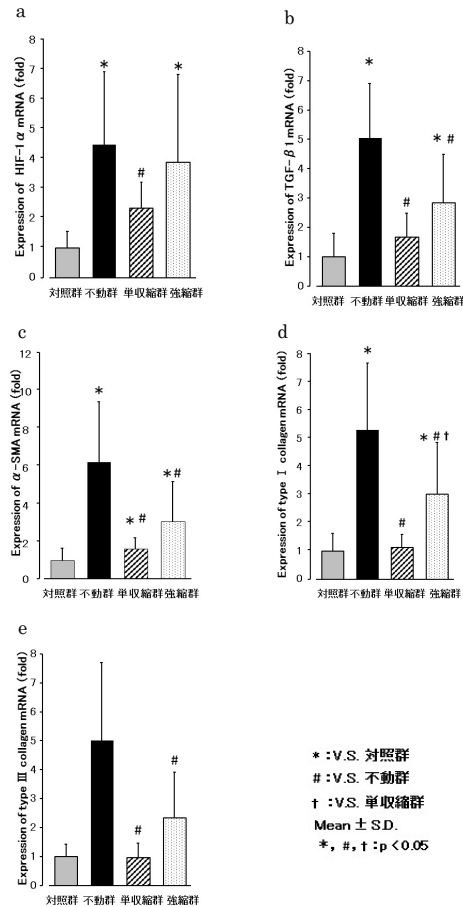


図 6. 線維化関連分子の発現状況

a: HIF-1α b: TGF-β1 c: α-SMA
d: タイプ I コラーゲン e: タイプ III コラーゲン

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本研究において、不動状態に曝したラットヒラメ筋に対して、ギプス固定下にて磁気刺激または電気刺激により周期的な筋収縮運動を誘発すると、骨格筋の線維化の抑制と拘縮の進行抑制が可能であることが明らかとなっている。本研究では、ラットの後肢にギプスを装着した状態で筋収縮を誘発しており、これは臨床場面への応用を考慮したものである。したがって、今回得られた前述の成果は臨床応用が容易であり、しかも効果が高い新たな拘縮に対するリハビリテーションプログラムの開発に結びつくものといえる。また、本研究では治療効果のメカニズムにまで掘り下げて明らかにしており、国内外でも先駆的な研究に位置づけられ、リハビリテーションの生物学的効果を提示できると思われる。

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)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1) 沖田 実, 坂本淳哉, 本田祐一郎, 後藤 響, 佐々部陵, 田中美帆: 関節拘縮—最新のトピックス—. *Locomotive Pain Frontier* 3(2):52-54, 2014. 査読無
- 2) Kondo Y, Nakano J, Sakamoto J, Kataoka H, Yokoyama S, Honda Y, Origuchi T, Yoshimura T, Okita M: Effects of prolonged stretching and thermotherapy on muscle contracture of immobilized rat soleus muscle. *J Phys Ther Sci* 24(6): 541-547, 2012. 査読有
- 3) Nakano J, Sekino Y, Hamaue Y, Sakamoto J, Yoshimura T, Origuchi T, Okita M: Changes in hind paw epidermal thickness, peripheral nerve distribution and mechanical sensitivity after immobilization in rats. *Physiol Res* 61: 643-647, 2012. 査読有
- 4) Sakamoto J, Nakano J, Kataoka H, Origuchi T, Yoshimura T, Okita M: Continuous therapeutic ultrasound reduces progression of disuse atrophy in rat gastrocnemius muscle. *J Phys Ther Sci* 24: 443-447, 2012. 査読有
- 5) 沖田 実, 坂本淳哉, 本田祐一郎, 佐々部陵, 後藤 響: 関節可動域制限の発生メカニズム. *理学療法* 29:9-16, 2012. 査読無

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) 原槇希世子, 吉村彩菜, 片岡英樹, 山下潤一郎, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動の過程で電気刺激を用いて骨格筋に単収縮を誘発すると痛覚閾値の低下と拘縮の進行が抑制される. 第 19 回ペインリハビリテーション学会学術大会,

2014 年 9 月 6 日~7 日, 大阪産業創造会館(大阪府大阪市).

- 2) 吉村彩菜, 田中美帆, 原槇希世子, 坂本淳哉, 本田祐一郎, 中野治郎, 片岡英樹, 山下潤一郎, 沖田 実: 電気刺激を用いた筋収縮運動の収縮様式の違いがラットヒラメ筋の線維化ならびに拘縮におよぼす影響. 第 49 回日本理学療法学会学術大会, 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 3) Honda Y, Kondo Y, Sasabe R, Sekino Y, Morimoto Y, Kataoka H, Sakamoto J, Nakano J, Yoshimura T, Okita M: The up-regulation of IL-1b/TGF-b and hypoxia induced in immobilization are related to the molecular mechanisms underlying muscle contracture. *World congress of Nuerology*, 2013 年 9 月 21 日~9 月 26 日, Vienna, Austria
- 4) 田中美帆, 川寄真理子, 本田祐一郎, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 不動の過程における周期的な単収縮の誘発が骨格筋の線維化に及ぼす影響. 第 3 回日本基礎理学療法学会学術大会, 2013 年 10 月 27 日, 名古屋大学保健学科大幸キャンパス(愛知県名古屋市)
- 5) 原槇希世子, 岡村千紘, 本田祐一郎, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: ギプス固定下でも磁気刺激によって周期的な筋収縮を誘発すると筋性拘縮の発生が軽減する. 第 48 回日本理学療法学会学術大会, 2013 年 5 月 24 日~26 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
- 6) 沖田 実, 本田祐一郎, 坂本淳哉, 中野治郎: 不動によって発生する筋性拘縮のメカニズム 骨格筋の線維化関連分子の探索. 第 90 回日本生理学会(招待講演), 2013 年 3 月 27 日~29 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)
- 7) 原槇希世子, 岡村千紘, 本田祐一郎, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: ギプス固定下でも磁気刺激によって周期的な筋収縮を誘発すると筋性拘縮の発生が軽減する. 第 2 回日本基礎理学療法学会学術集会, 2012 年 5 月 24 日, 兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 坂本淳哉: 関節の構造と機能. *運動療法学* 第 2 版, 市橋則明(編), 文光堂, 2014, pp55-68.
- 2) 坂本淳哉: 関節の機能と構造, 関節可動域制限 第 2 版 病態の理解と治療の考え方. 沖田 実(編), 三輪書店, 2013, pp21-49.

〔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

坂本 淳哉 (SAKAMOTO, Junya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (保健学
科) ・ 准教授

研究者番号 : 20584080