

後肢懸垂前の運動負荷が廃用性萎縮筋に及ぼす影響

田崎 洋光, 藤野 英己, 武田 功

鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 理学療法学科

はじめに

不活動によって生じる骨格筋の最も顕著な変化は、筋線維径の減少などの量的変化および筋線維、筋タンパク質レベルでのタイプ移行といった質的变化である。長期間の安静臥床や骨折などによるギプス固定、微小重力暴露あるいはラットにおける後肢懸垂は萎縮を引き起こす¹⁾。長期安静に伴う廃用性筋萎縮は理学療法の治療対象となっており、その進行を出来る限り予防することが、その後の機能回復に非常に重要である。これまで、諸家^{2)~6)}によって、廃用性筋萎縮の進行を予防するための理学療法の治療法とその有効性については数多く報告されている。我々も後肢懸垂マウスを用いて、廃用性萎縮筋に対する等尺性収縮運動の効果を検討し、その有効性についても報告した⁷⁾。しかし、これらの先行研究は後肢懸垂中に理学療法を実施したものである。臨床では、術後の安静臥床状態になってから運動療法を施すことは多く見られるが、術前から積極的に行うケースは少ないといっても過言ではない。しかし、Thomason ら⁸⁾の報告では、筋細胞を構成するタンパク質の合成が後肢懸垂の直後より抑制されるとしている。このため、廃用性筋萎縮の進行をより効

率的に予防するためには、可能な限り早い段階での骨格筋への刺激を行うことが必要であり、その有効性について検討する必要があると考えた。そこで、本研究は廃用性筋萎縮を予防するための理学療法の治療法として、後肢懸垂前の運動負荷の有効性を調べる目的でラットヒラメ筋の変化を組織化学的に検討した。

材料および方法

1) 実験材料

本研究では、Wistar 系雄ラット(8週齢, 27匹)を使用し、これらを対照群(CONT群; n=7)と実験群(n=20)に振り分けた。また実験群は、2週間の後肢懸垂を実施した群(HS群; n=7)、25分間のトレッドミル走行を行った後、2週間の自由飼育をした群(Ex群; n=6)、25分間のトレッドミル走行の直後から2週間の後肢懸垂を行った群(Ex-HS群; n=7)の4群に分けた。

2) 筋萎縮モデルの作成法

Morey 法⁹⁾により後肢を懸垂し、廃用性筋萎縮を惹起させた。なお、後肢懸垂中は、ラットは前肢にて飼

育ケージ内を移動可能であり、水と餌は自由に摂取させた。

3) 運動方法

運動負荷は、Gillette ら¹⁰⁾ の報告を参考に小動物用トレッドミル(室町機械株式会社:MK-680 S)を用いて、傾斜 20 度、分速 20 m で 25 分間走行を実施した。

4) 光学顕微鏡による検索

実験終了後、ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) でヒラメ筋を摘出し、直ちに液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結した。そして、 -20°C のクリオスタット中で厚さ $7\mu\text{m}$ の凍結切片を作成し、スライドガラスに貼付した。次に、これらの試料にミオシン ATPase 染色を施し、淡染したタイプ I 線維と濃染したタイプ II 線維に分類して、光学顕微鏡にて観察した (図 1)。

5) 定量解析

筋横断切片の光学顕微鏡像を、画像解析ソフト (NIH-Image Ver1.62) を用いて、切片中の全筋線維の短径をタイプ I 線維、タイプ II 線維ごとに計測した。

また、各群ごとに筋線維タイプの構成比率を算出した。各群間において比較するために、統計処理には一元配置分散分析 (ANOVA) を行った。ANOVA によって有意差が認められた場合には、Scheffe の方法により 2 群間の差を検定した ($p < 0.05$)。

結 果

1) 筋線維径 (タイプ I 線維)

Ex 群の筋線維径は $43.1 \pm 7.2\mu\text{m}$ となり、CONT 群の $42.0 \pm 6.8\mu\text{m}$ と比較して有意差は認められなかった。また HS 群と Ex-HS 群はそれぞれ $25.7 \pm 5.2\mu\text{m}$, $27.0 \pm 6.2\mu\text{m}$ となり、CONT 群と比較して有意な減少がみられた。しかし、Ex-HS 群は HS 群と比較すると有意に大きかった (図 2, 表 1)。

2) 筋線維径 (タイプ II 線維)

Ex 群の筋線維径は $39.6 \pm 8.0\mu\text{m}$ となり、CONT 群の $36.2 \pm 6.3\mu\text{m}$ と比較して有意差は認められなかった。また HS 群と Ex-HS 群はそれぞれ $24.0 \pm 5.6\mu\text{m}$, $24.8 \pm 6.1\mu\text{m}$ となり、CONT 群と比較して有意な減少がみられた。また、Ex-HS 群は HS 群と比較す

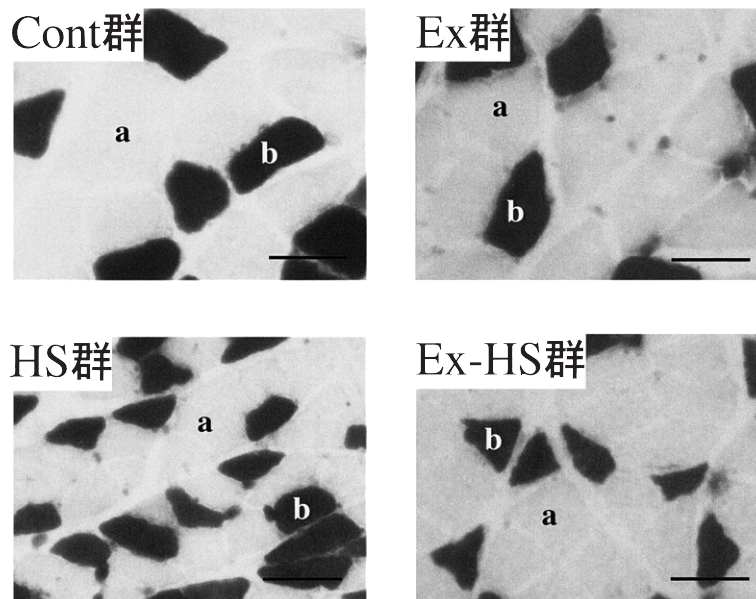


Fig. 1 Myofibrillar ATPase (pH 10.8) activity was used to discriminate type I (light stain; a) and II (dark stain; b) fibers. Bar= $50\mu\text{m}$.

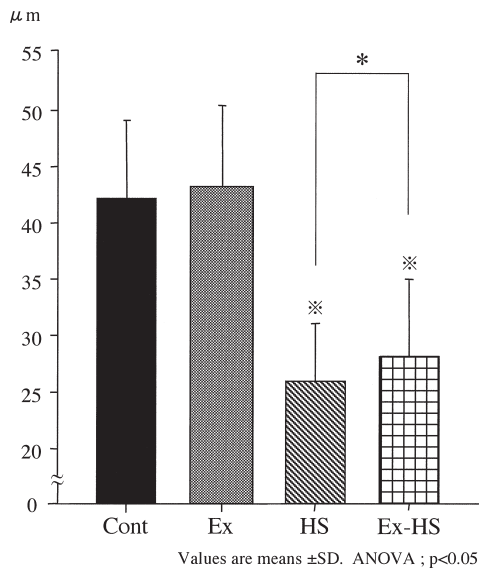


Fig. 2 The comparison of the mean of type I fiber diameter

The mean of type I fiber diameter in the HS and Ex-HS groups were decreased significantly compared with the Cont group. And there were difference between the HS and Ex-HS groups.

※ ; p<0.05 (compared with Cont),
 * ; p<0.05 (compared between HS and Ex-HS)

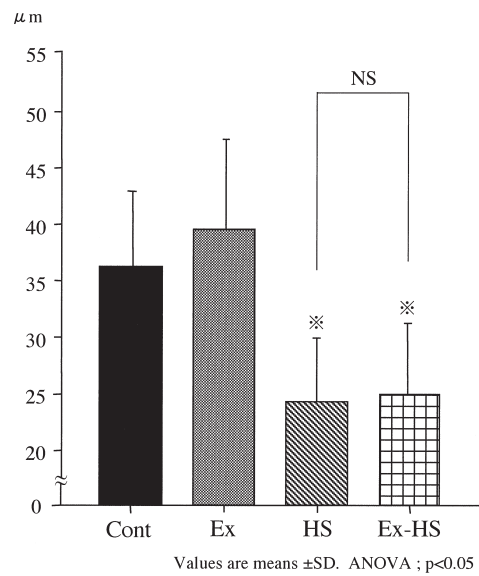


Fig. 3 The comparison of the mean of type II fiber diameter

The mean of type II fiber diameter in the HS and Ex-HS groups were decreased significantly compared with the Cont group. And there were no significant difference between the HS and Ex-HS groups.

※ ; p<0.05 (compared with Cont),
 NS ; Non Significant

Table 1. Muscle fiber diameter and fiber type composition

Groups	Cont	Ex	HS	Ex-HS
Fiber diameter by type (μm)				
Total	40.1±7.3	42.1±7.6	25.1±5.4*	26.2±6.2*
Type I	42.0±6.8	43.1±7.2	25.7±5.2*	27.0±6.2**
Type II	36.2±6.3	39.6±8.0	24.0±5.6*	24.8±6.1*
Fiber type composition (%)				
Type I	69.8±3.5	71.6±1.9	64.4±2.7*	69.5±3.3*
Type II	30.2±3.5	28.4±1.9	35.6±2.7*	30.5±3.3*

Values are means ±SD.

※ ; p<0.05 (compared with Cont), * ; p<0.05 (compared with HS)

ると有意差は認められなかった (図3, 表1)。

3) 筋線維の構成比率

HS群のタイプI線維の構成比率は64.4±2.7%となり、CONT群の69.8±3.5%と比較して有意に低下していた。また、Ex群とEx-HS群はそれぞれ71.6±

1.9%、69.5±3.3%となり、CONT群と比較して有意差は認められなかった (表1)。

考 察

安静状態の長期化に伴って起こる廃用性筋萎縮は、代表的な機能障害の一つであるといえる。しかし、一

度発生した萎縮を完全に回復させるまでには長期間の機能回復のための運動が必要であり、動物実験において4週間の不動化で起こった萎縮筋が完全に回復するには90日を要したとの報告もある¹¹⁾。そのため、すでに発生した廃用性筋萎縮の回復を目的としたリハビリテーションを行うのではなく、発生が予測される場合には、事前に発生を防止する手段を取ることが重要であると考えられる。しかし、臨床上、このような目的で早期のリハビリテーションを行っているケースは、ほとんど見受けられない。また、事前に行う理学療法の効果を示した臨床および動物の研究データは皆無である。これらのことから、本研究の目的は安静臥床前の運動療法の効果を検討することで、廃用性筋萎縮を予防するため理学療法を確立することにある。

廃用性筋萎縮の形態学的変化には、筋線維径の減少などの量的変化やアクチンおよびミオシンフィラメントの異常配列、筋線維タイプの速筋化といった質的变化が挙げられる。Robertら¹²⁾は、後肢懸垂したラットヒラメ筋では、タイプI線維からタイプII A線維へのタイプ移行がみられ、タイプII A線維比率が増加したと報告している。本研究では、筋線維の太さに関して、横断される角度の違いによる誤差が最も小さく、筋萎縮の程度を比較的忠実に反映しているという報告¹³⁾から筋線維径（短径）を廃用性筋萎縮の指標として用いた。

安静臥床モデルには、Morey⁹⁾によって開発された後肢懸垂法を用いた。これは後肢を無荷重負荷にしようとするものであり、筋の運動学的活用や代謝物質の動態から長期臥床あるいは安静状態に近似したモデルであると考えられている⁴⁾。骨格筋は、安静状態に陥ると形態学的には筋線維径は減少し、筋線維タイプの変化が見られ、タイプI線維からタイプII線維へ移行し、速筋化するといわれている。また、生化学的にはタンパク質分解速度の急激な増加と、合成速度の低下に伴うタンパク質含有量の減少が認められる^{8),14)}。本研究においても、2週間の後肢懸垂によってラットヒラメ筋はタイプI線維、タイプII線維ともに筋線維径が有意に縮小しており、タイプI線維の構成比率が有意に

減少し、タイプII線維の増加がみられた。

これまで多くの先行研究によって、廃用性萎縮筋に対する理学療法の効果について報告され、運動負荷^{2)~4)}や持続的筋伸張⁵⁾、荷重刺激⁶⁾の有効性が明らかになっている。Kannusら³⁾によると、3週間の固定後に傾斜30度を30 cm/sで20-45分間、7週間（2回/日）にわたってトレッドミル走行を行うと、毛細血管数や筋線維サイズが回復すると報告されている。荷重刺激の効果について、山崎ら⁶⁾は後肢懸垂中に毎日1時間の荷重を行うことで、完全とはいかないが萎縮の進行を抑制出来たと報告している。また我々も後肢懸垂マウスを用いて、2週間の後肢懸垂中に体重の50~75%の負荷量で等尺性収縮運動を行えば、廃用性筋萎縮の進行を抑制出来ることを報告した⁷⁾。これらの先行研究の結果を考慮に入れ、萎縮進行を抑制するため、さらに有効な理学療法の治療法を確立することから本研究の着想に至った。

本研究では、HS群と比較するとEx-HS群は、タイプI線維の線維径が有意に大きく、さらにはタイプI線維の構成比率が有意に上昇した。MuNultyら¹⁵⁾によると、28日間の後肢懸垂後に週5回の頻度で1ヶ月間トレッドミル走行を行うと、萎縮していたタイプI線維が有意に大きくなり、タイプI線維の構成比率が有意に上昇したとの報告がある。この結果から、本研究は後肢懸垂前に運動負荷を行ったことによって、その後のタイプI線維の萎縮が予防されており、さらには速筋化も予防されている可能性が示唆された。

骨格筋の萎縮および肥大は、筋細胞内のタンパク質の合成・分解の結果として起こる。また、タンパク質の合成および分解の遺伝子レベルでの調節に影響を及ぼす調節因子として、インスリン様増殖因子(IGF-I)や甲状腺ホルモン、線維芽細胞成長因子(FGF)、熱ショックタンパク質(HSP)などの関与が明らかになっている。先行研究によると、60分間のトレッドミル走行の24時間後にはラットヒラメ筋にHSP70の発現量が増加したという報告¹⁶⁾や、1回の低強度トレッドミル走行で4時間後には筋タンパク合成が26%上昇したという報告¹⁷⁾がある。これらの報告が

ら、今回の運動負荷量でも、筋タンパクの分解能の低下および合成能の上昇が促進され、このことが筋萎縮を予防した可能性が推察される。

これらの結果から、安静臥床前に運動負荷を行うことが、廃用性筋萎縮の予防に効果的であったと考えられる。臨床上、術後の長期臥床が必要な場合などに、事前に運動療法を実施することで早期の機能回復に役立つ可能性があり、術前リハビリテーションの有効性を示唆したものとする。

しかし、本研究による結果は組織化学的知見のみによるものであり、様々な観点から検討をしていく必要があると考えられる。今後は生化学的および免疫組織化学的な測定を加えることでさらに効果的な廃用性筋萎縮の予防法を検討し、術前リハビリテーションの有効性を確立していきたいと考える。

文献

- 1) 吉岡利忠, 後藤勝正, 石井直方: 筋力をデザインする。杏林書院: 94-107, 2003.
- 2) Herbert ME, Roy RR, Edgerton VR: Influence of one-week hindlimb suspension and intermittent high load exercise on rat muscles. *Exp Neurol* 102: 190-198, 1988.
- 3) Kannus P, Jozsa L, Jarvinen TL, et al: Free mobilization and low-to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol*, 84: 1418-1424, 1998.
- 4) 灰田信英: マウスヒラメ筋の廃用性萎縮の病態ならびに運動負荷効果に関する研究。十全医会誌 99: 1050-1067, 1990.
- 5) 山崎俊明, 立野勝彦, 塚越智: ラットヒラメ筋の廃用性萎縮予防に及ぼす筋伸張位保持時間の影響。PT ジャーナル 33: 834-835, 1999.
- 6) 山崎俊明, 灰田信英, 立野勝彦: 荷重がラット後肢筋の廃用性萎縮予防に及ぼす効果——週内頻度からの検討——。理学療法学 22, 108-113, 1995.
- 7) 田崎洋光, 中野治郎, 沖田実・他: マウスの廃用性萎縮筋に対する等尺性収縮運動の影響——その負荷量に着目して——。理学療法探究 2: 6-10, 1999.
- 8) Thomason DB, Booth FW: Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol*, 68: 1-12, 1990.
- 9) Morey ER: Spaceflight and bone turnover; correlation with a new rat model of weightlessness. *Bioscience* 29: 168-172, 1979.
- 10) Gillette CA, Zhu Z, westerlind KC, et al: Energy availability and mammary carcinogenesis: effect of calorie restriction and exercise. *Carcinogenesis* 18: 1183-1188, 1997.
- 11) Fitts RH, Brimmer CJ: Recovery in skeletal muscle contractile function after hindlimb immobilization. *J Appl Physiol*, 59: 916-923, 1985.
- 12) Robert J. Talmadge, Roland R. Roy, V. Reggie Edgerton: Distribution of myosin heavy chain isoforms in non-weight-bearing rat soleus muscle fibers. *J Appl Physiol*, 81: 2540-2546, 1996.
- 13) 堤恵理子, 日野真一郎, 江口幸孝・他: 実験的脊髄損傷における麻痺骨格筋の経時的, 形態学的変化。理学療法の医学的基礎 3: 20-26, 1999.
- 14) Goldspink DF: The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J Physiol* 264: 267-282, 1977.
- 15) McNulty AL, Otto AJ, Kasper CE, et al: Effect of recovery mode following hind-limb suspension on soleus muscle composition in the rat. *Int J Sports Med*, 13: 6-14, 1992.
- 16) Milne J, Npble EG: Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *J Appl Physiol*, 93: 561-568, 2002.
- 17) Carraro F, Stuart CA, Hartl WH, et al: Effect of exercise and recovery on muscle protein synthesis in human subject. *Am J Physiol*, 259: 470-476, 1990.

Influence of a bout exercise before hindlimb suspension on the disuse atrophy in skeletal muscle

Hiromitsu TASAKI, Hidemi FUJINO, Isao TAKEDA

Department of Physical Therapy, Faculty of Health Science, Suzuka University of Medical Science

Key Words: disuse atrophy, hindlimb suspension, treadmill running

Abstract

We investigated the effects of treadmill running before hindlimb suspension on muscle atrophy during disuse in rat soleus muscle. This study used 27 male Wistar rats (aged 8 wks). These rats were divided randomly into four groups; control (CONT, n=7), treadmill running alone (Ex, n=6), hindlimb suspension for 2 wks (HS, n=7) and treadmill running before hindlimb suspension for 2 wks (Ex-HS, n=7). The animals in Ex-Hs group were exercised by running on an incline (20° degree) treadmill at the speed of 20m/min for 25-minute period. After 2 wks, the soleus was isolated and frozen in isopentane precooled by liquid N₂. Soleus was cut on a cryostat and stained for mATPase activity. Significant atrophy, demonstrated by decreased mean of the muscle fiber diameter, occurred in HS and Ex-HS compared with CONT. However, Ex-HS produced a significant increase in the type I fiber size compared with HS. And HS demonstrated a significant decrease in the fiber type composition of type I fibers compared with CONT. Ex-HS and Ex demonstrated a no significant difference in the fiber type composition of type I compared with CONT. These finding suggested that the disuse atrophy of muscle fiber was effectively prevented by exercise before muscle atrophy in rat soleus muscle. In clinical practice, this suggest that exercise before the long-duration bed resting could prevent disuse atrophy in patients.