

〔原著〕

関節不動化による不活動モデルにおける疼痛発生 ならびに筋萎縮に対するトレッドミル走の効果

肥 田 朋 子¹, 沖 向 雄 也², 榊 原 拓 哉³
堀 田 昌 志⁴, 野 村 達 也⁵, 中 田 智 章⁶
井 筒 孝 憲⁷, 田 崎 洋 光⁸, 平 賀 慎一郎⁹

要 旨

ギプス固定や長期臥床のような不活動状態では、痛みや廃用性筋萎縮が生じることが知られている。しかし、不活動状態によって引き起こされる疼痛発生と筋萎縮の関係性や、疼痛発生に対する運動の効果は明らかにされていない。そこで関節不動化による不活動期間中にトレッドミル走を行い、疼痛発生や筋萎縮に影響を及ぼすか検討した。Wistar系雄性ラット13匹を無作為に健常群（N群, 3匹）、足関節を底屈位に4週間ギプス固定するコントロール群（C群, 4匹）、不活動期間中にトレッドミル走を行わせるトレッドミル群（T群, 6匹）に分けた。不活動前から不活動期間中、足底皮膚痛覚閾値を測定した。不活動4週間後、ヒラメ筋線維横断面積と壊死線維数を測定した。その結果、T群の皮膚痛覚閾値はC群に比べ有意に低下した（ $p < 0.05$ ）。またT群は筋萎縮を抑制できず、筋萎縮は疼痛発生の原因とは考えにくかった。T群では筋の壊死線維数が増加傾向にあり、不活動により脆弱化した筋に対する運動の実施は注意を要する。

キーワード：不活動、痛み、皮膚痛覚閾値、トレッドミル走、筋萎縮

-
- 1 名古屋学院大学 リハビリテーション学部
 - 2 岐阜県立下呂温泉病院 中央リハビリテーション部
 - 3 八千代病院 総合リハビリテーションセンター
 - 4 岩倉病院 リハビリテーションセンター
 - 5 安形医院 リハビリテーション科
 - 6 伊勢原協同病院 リハビリテーション科
 - 7 名古屋西病院 リハビリテーション科
 - 8 ラ・トロブ大学 健康科学部
 - 9 金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科

Correspondence to: Tomoko Koeda

E-mail: tomokoed@ngu.ac.jp

Received 22 December, 2015

Revised 20 January, 2016

Accepted 21 January 2016

はじめに

慢性痛の発生には、ギプス固定や長期臥床などによる不活動が原因の一つとされており、慢性痛に対する運動療法の有効性はガイドラインでも高いレベルで認められている。我々はギプスを用いて両側足関節を底屈位に固定した活動性の低い不活動モデルラットを作製し、足底皮膚への機械刺激に対する逃避反応を調べたところ、不活動2週目以降からアロディニアや痛覚過敏が生じること、またこの疼痛発生の程度は活動量と相関関係にあることを報告している[15]。さらに、このモデル動物に対して不活動状態である関節不動期間中にストレッチングを実施したところ、関節可動域制限や皮膚痛覚閾値の低下が抑制できたこと[8]や、不活動に陥る前にトレッドミル走による運動を行うことで不活動後の疼痛発生を部分的に抑制することが可能であったこと[10]を報告してきた。不活動が疼痛発生に影響しているならば、運動により不活動状態を回避でき疼痛が発生しない可能性が考えられるが、これまで不活動期間中の運動が疼痛発生に及ぼす影響については検討できていない。

一方、不活動状態は筋線維や筋膜の短縮とそれらの伸張性低下に基づく関節可動域制限を引き起こすばかりでなく、筋線維サイズの縮小にみられるような筋萎縮を惹起させることが分かっている[1, 4]。さらに、筋萎縮を惹起した骨格筋は、筋張力が低下することも報告されている[3]。筋萎縮に影響を与えるタンパク分解酵素の活性化にはマクロファージが関与している[2]が、マクロファージはTNF α やIL-1 β などの疼痛起因物質であるサイトカインを産生する。そのため筋萎縮は不活動時の疼痛発生にも影響を与えている可能性が考えられる。

このように不活動は、骨格筋に対して構造的にも機能的にも悪影響を及ぼすだけではなく、疼痛発生にも影響を及ぼしている可能性がある。そのため筋萎縮を予防することは疼痛発生を予防する一つの手段となり得ると考えられる。Kasperら[7]は後肢懸垂によってラットヒラメ筋の横断面積がコントロール群と比較しておよそ50%まで縮小するが、その後の走運動によって回復することを報告している。また、ラットの後肢懸垂後や後肢をギプス固定した後に再荷重を行うと筋線維が損傷し、炎症が生じることや壊死が生じることが報告されている[6, 13, 14]。つまり、廃用性筋萎縮を呈した骨格筋は極めて脆弱であり、このような骨格筋に対して運動療法を行うことで筋線維損傷が発生する可能性がある。しかし、これらは筋萎縮が生じた後の再荷重負荷に関する報告であり、不活動状態の初期から荷重した場合に関して調べられたものはない。

そこで本研究では、両側足関節を固定した不活動モデルラットに対し、不活動初期からトレッドミル走を行い、疼痛発生ならびに筋萎縮に及ぼす影響について検討した。

対象と方法

〈対象〉

対象は8週令のWistar系雄性ラット13匹とし、無作為に無処置の健常群3匹(以下N群)、ギプス固定のみを行うコントロール群4匹(以下C群)、ギプス固定による不活動期間中にトレッドミル走をさせたトレッドミル群6匹(以下T群)に振り分けた。N群は何も拘束のない状況でC群やT群と週令を合わせて飼育した。飼育室の照明は、12時間ごとに明暗をコントロールし、室温は一定条件下(23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C)とした。

また、餌と水は自由に摂取させた。

〈ギプス固定ならびにトレッドミル走の方法〉

C群とT群はエーテル麻酔を施行した後、ペントバルビタールナトリウム（以下、PBN）麻酔（40mg/kg, i. p.）下で両足関節を最大底屈位にし、膝関節付近までアンダーテープ（ニトリート, CBテープ）とギプス（アルケア株式会社, プラスランギプス）を用いて4週間固定した。浮腫や血流障害の確認と足底皮膚痛覚閾値測定が行えるように足指は露出させ、ギプスの緩みや浮腫, 血流障害が確認された場合には適宜巻き直しを行った。T群はトレッドミル走の際に一時的にギプスを除去したため, その都度ギプスを巻き直した。C群は目立った緩みがなくても週に2回はギプスを除去して再固定した。T群に対するトレッドミル走は, 動物用トレッドミル（室町機械株式会社 MK-680）を用い, 傾斜0度, 25 m/minの速度で15分間, 週6日の頻度で実施した。

〈皮膚痛覚閾値測定〉

皮膚痛覚閾値は, 機械刺激に対する逃避反応を利用した。C群とT群はギプス固定した両後肢が出た状態にタオルで吊り下げて保定し, 同一径のフィラメントで強度を長さによって調節した自作の von Frey Filament (vFF) を用いて把持した右側の足底部を刺激した。vFFの強度は8, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45 gとし, up down法を用いて, 刺激に対して後肢を動かすなどの逃避反応を示した値を記録した。各群とも1週間のうち3回測定し, その平均値をその週の代表値とした。また, 不活動前を100%とした痛覚閾値率も算出した。

〈ヒラメ筋摘出ならびに解析方法〉

4週間の不活動期間終了後, PBN麻酔下（50 mg/kg, i. p.）にて両側ヒラメ筋を採取した。ヒラメ筋は筋線維中央部で2分割し, 横断面が上になるようにトラガカントガム（Wako）を用いて木のブロックに立て, ドライアイスで冷却したイソペンタン内で急速凍結した。ヒラメ筋は, クリオスタット（Leica CM1850）にて10 μ mに薄切し, ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色ないしルーチンATPase染色（pH 10.4）した。

染色後のプレパラートは顕微鏡解析ソフト（OLYMPUS DP71）を用いて, 対物レンズ20倍で画像をPCに取り込んだ。HE染色画像からは, 1切片3〜5視野の筋線維中の壊死線維ならびに中心核線維の割合を算出した。壊死線維は, 単核細胞の浸潤が見られたものとし, 浸潤の様子から一つの筋線維と認識できるものはその数を, 線維の境界が不明なものにおいては周辺の筋線維の大きさから線維数を判断しカウントした。中心核線維は核が筋線維の中心近くに確認できるものをカウントとした。画像内で数えられる100本以上の筋線維数とこれらカウントできた壊死線維や中心核線維の数から出現率を算出した。ルーチンATPase染色画像は, タイプI線維は白, タイプII線維は黒に染色されるため, 画像解析ソフト（Scion Image）を用いてタイプ別に分け, 画像内で数えられる100本以上の筋線維の面積を算出し, その面積 $S = \pi r^2$ から直径となる $2r$ を算出した。同時にそれぞれのタイプ別筋線維数をカウントし, 各個体におけるカウントされた全筋線維に対するタイプI線維の割合を算出した。

〈統計処理〉

各群における皮膚痛覚閾値の経時的変化には

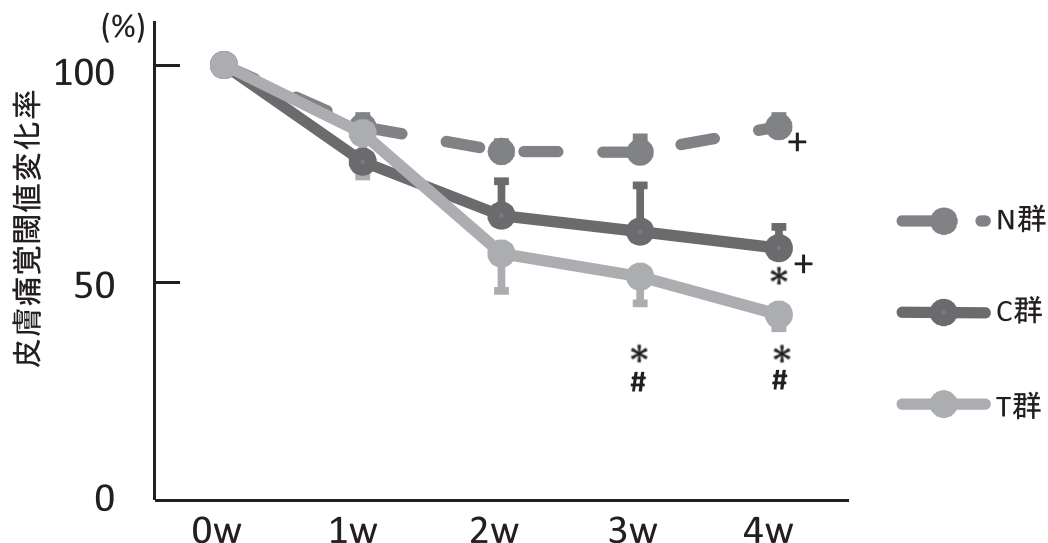


図1 足底皮膚痛覚閾値の経時的変化

縦軸は不活動前（0w）の痛覚閾値を100とした場合の皮膚痛覚閾値率，横軸はギブス固定による不活動期間を示す。N；健常群，C；コントロール群，T；トレッドミル群。

*；各群の不活動前との比較，#；各群の不活動1週目との比較，+；T群との比較，いずれも $p < 0.05$ 。

繰り返しのある一元配置分散分析法を用い，多重比較として Bonferroni の方法を用いた。また各時期における皮膚痛覚閾値や筋線維に関する3群比較には一元配置分散分析法を用い，多重比較には Tukey 法を用いた。すべてのデータは平均値±標準誤差で表し，有意水準は5%未満とした。

なお，本研究は名古屋学院大学動物実験委員会の承認（承認番号2007-004）を得て行った。

結果

〈皮膚痛覚閾値〉

不活動前の皮膚痛覚閾値は，N群 29.2 ± 0.8 g，C群 34.2 ± 0.9 g，T群 29.3 ± 1.9 g であり，3群間に有意差は認めなかった（図1）。N群にお

ける皮膚痛覚閾値は，4週間を通して有意差を認めなかった。C群の閾値は不活動1週目から順に 26.7 ± 3.0 g， 22.5 ± 3.3 g， 21.2 ± 3.8 g， 19.8 ± 1.8 g と徐々に低下し，不活動前と比較して不活動4週目では有意差を認めた。なお不活動前を100とした痛覚閾値率は4週目で $57.9 \pm 10.0\%$ だった。一方，T群では1週目から順に 24.0 ± 1.7 g， 15.8 ± 1.0 g， 14.5 ± 0.8 g， 12.4 ± 1.2 g であり，不活動前および不活動1週目に比べて3週目以降で有意差を認めた（ $p < 0.05$ ）。不活動4週目において3群を比較するとT群はN群，C群と有意差を認め，低値を示した（ $p < 0.05$ ）。

〈HE染色画像による解析〉

壊死線維の出現率は，N群 $0.0 \pm 0.0\%$ ，C群 1.1

表1 ヒラメ筋における壊死線維ならびに中心核線維の出現率

	健常群	コントロール群	トレッドミル群
壊死線維出現率 (%)	0.0±0.0	1.1±0.4	1.7±0.3 *
中心核線維出現率 (%)	0.0±0.0	0.7±0.3	0.5±0.2

*；健常群との比較， $p<0.05$

表2 ヒラメ筋における筋線維タイプ別直径ならびにType I線維の割合

	健常群	コントロール群	トレッドミル群
Type I 直径 (μm)	46.2±3.6	39.0±2.3	41.9±2.1
Type II 直径 (μm)	41.7±3.1	29.0±1.3 *	32.3±1.6 *
Type I線維割合 (%)	87.3±1.6	66.6±1.6 *+	78.3±2.7

*；健常群との比較，+；トレッドミル群との比較，共に $p<0.05$

±0.4%，T群1.7±0.3%であり，T群とN群の間に有意差を認めた（表1， $p<0.05$ ）。

一方，中心核線維の出現割合は順に，0.0±0.0%，0.7±0.3%，0.5±0.2%であり，各群間に有意差は認められなかった（表1）。

〈ルーチンATPase染色画像による解析〉

ヒラメ筋線維のタイプ別直径の結果は表2のとおりであり，N群に比べ固定した他群は低値を示したが，タイプI線維に有意差は認められず，タイプII線維においてN群と他の2群の間に有意差を認めた（表2， $p<0.05$ ）。

またヒラメ筋におけるタイプI線維割合はN群87.3±1.6%，T群78.3±2.7%であったが，C群では66.6±1.6%とN群，T群に比して有意に低値を示し（ $p<0.05$ ），T群は不活動による速筋化を抑制した。

考察

今回のC群における皮膚痛覚閾値は不活動により低値を示し，4週目には不活動前に比べ有

意差を認めた。固定4週目における痛覚閾値率は約58%であり，我々の先行研究[10]と差はなく，再現性が確認された。この痛覚閾値の低下はOkamotoら[11]の末梢神経の自発放電活動の報告と同様に痛みが引き起こされている結果と考えられた。

本研究では，関節不動化による不活動状態からの一時的な脱却手段としてトレッドミル走を実施したが，T群の皮膚痛覚閾値は他のN群，C群に比べ有意に低値を示す結果となった。T群はトレッドミル走を実施するために頻回のギプスの巻き直しを行う必要がありC群と巻き直し回数に差があった。また，それにより浮腫や血流障害による巻き直し機会の増加が影響した可能性が考えられるが，実際，このような巻き直しはほとんどなかった。また先行研究[10]におけるC群の巻き直し頻度は，今回のT群に近いものであったが，痛覚閾値の低下に再現性が認められており，巻き直し回数の差は痛覚閾値に影響を与えるものではなかった。これらのことから不活動期間中のトレッドミル走は逆に痛みを助長してしまうと考えられた。今回用

いたトレッドミル走のスピードは、先行研究 [3] を参考にして 25 m/min とした。しかし、この速度はラットにおける有酸素運動と無酸素運動の境界値に近い運動強度であるという報告 [12] や、ギプス除去後に生じる疼痛に対してトレッドミル走の有効性を報告している研究で用いられたスピードは 12 m/min であり [9]、我々の用いたスピードは高強度であった可能性がある。今後はさらに強度を下げる、あるいは長時間の自由運動で検討することが課題である。

今回、T 群において壊死線維出現割合が N 群と比較して有意に高かった。先行研究では、関節を不動化することで廃用性筋萎縮が惹起され、それによって脆弱した筋線維への荷重時の伸張ストレスが筋線維損傷を招くとの報告がある [6]。我々は不活動状態の初期から一時的に荷重刺激を与えていたものの、不活動状態を継続することで脆弱した筋にとっては高強度の負荷となり、筋損傷を惹起し、それによって疼痛閾値が低下したと考えられた。この点においてもトレッドミル走の走条件を再度検討する必要がある。

猪飼ら [5] は、ラット後肢の足関節を底屈位で固定したところ、ヒラメ筋の筋線維直径が減少したと報告している。本研究では、不活動期間終了後のヒラメ筋の特にタイプ II 線維において N 群に比べて、固定した他の 2 群は有意に低値を示した。これは不動化に伴い筋線維直径が減少するという先行研究と同様の結果であった。T 群は筋線維直径の低下を抑制する傾向が認められたものの有意差を認めず、運動による筋萎縮抑制の効果としては十分ではなかった。それにもかかわらず、T 群の皮膚痛覚閾値は C 群より低値を示し痛みは助長された。つまり、不活動期間中における高強度のトレッドミル走の効果は、筋萎縮ならびに皮膚痛覚閾値の低下

に異なる影響を与えたため、その作用機序は異なる可能性があり、さらに両者の発生機構に共通した経路が少ないことも考えられる。これらのことから、筋萎縮が疼痛発生に与える影響は少ないと考えられた。しかし、今回皮膚の痛覚閾値で検討したが、筋萎縮との関係を検索するには筋における痛覚閾値の変化も確認する必要があると考えられ、今後の検討課題である。また、筋萎縮と痛覚閾値の関係は検討したが、筋萎縮に関与する疼痛関連物質である $\text{TNF}\alpha$ や $\text{IL-1}\beta$ に関して検討できておらず、これらの物質の影響についても今後調べていく必要がある。

ヒラメ筋の筋線維組成は通常タイプ I 線維が 80~90% を占めるが、関節不動化によってタイプ I 線維の割合が減少し、速筋化することが知られている。本実験においても N 群に比べ C 群は有意にタイプ I 線維の割合が減少したが、T 群は C 群に比べてタイプ I 線維の割合が有意に多く、速筋化を抑制することができた。筋組成の点から見れば、T 群はより健常な状態に保つことが可能であり、不活動による疼痛以外の面での効果は認められた。

まとめ

足関節を底屈位に固定した不活動モデルラットを用い、不活動脱却のためのトレッドミル走の影響について検討した。その結果、筋線維組成変化の抑制と筋萎縮抑制傾向を認めたが、疼痛発生を抑制することはできず、むしろ痛みを助長させた。トレッドミル走の条件が高強度であった可能性があり、強度の検討が今後の課題である。

謝辞

本研究はJSPS科研費23500624ならびにJSPS科研費26350638の助成を受けて行った研究の一部である。

文献

- [1] Baker JH, Matsumoto DE (1988) Adaptation of skeletal muscle to immobilization in a shortened position. *Muscle Nerve* 11: 231-244
- [2] Bar-Shai M, Carmeli E, Coleman R, Rozen N, Perek S, Fuchs D, Reznick AZ (2005) The effect of hindlimb immobilization on acid phosphatase, metalloproteinases and nuclear factor-kappaB in muscle of young and old rats. *Mech Ageing Dev* 126(2): 289-297
- [3] 藤野英己, 上月久治, 武田 功, 田崎洋光, 近藤浩代, 石田寅夫, 梶谷文彦 (2005) ラット尾部懸垂前のプレコンディショニング運動が廃用性筋萎縮に及ぼす予防効果. *理学療法学* 32(7): 400-405
- [4] Ibebunjo C, Martyn JA (1999) Fiber atrophy, but not changes in acetylcholine receptor expression, contributes to the muscle dysfunction after immobilization. *Crit Care Med* 27(2): 275-285
- [5] 猪飼哲夫, 米本恭三 (2002) 筋肉の廃用症候群—筋力・筋耐久性低下. *Geriatric Medicine* 40 (2), 161-166
- [6] 井上貴行, 沖田 実, 高橋裕司, 原田裕司, 鈴木重行 (2007) 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): 1-9, 2007
- [7] Kasper CE, White TP, Maxwell LC (1990) Running during recovery from hindlimb suspension induces transient muscle injury. *J Appl Physiol* 68(2): 533-539
- [8] 肥田朋子, 榊原拓哉, 冲向雄也, 堀田昌志, 野村達也, 中田智章, 井筒孝憲, 田崎洋光 (2013) 関節不動化による関節可動域制限と疼痛発生に対するストレッチングの効果. *名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇* 1(2): 1-9
- [9] Morimoto A, Winaga H, Sakurai H, Ohmichi M, Yoshimoto T, Ohmichi Y, Matsui T, Ushida T, Okada T, Sato J (2013) Treadmill running and static stretching improve long-lasting hyperalgesia, joint limitation, and muscle atrophy induced by cast immobilization in rats. *Neurosci Lett* 534: 295-300
- [10] 中村浩輔, 酒井成輝, 水野奈緒 (2015) 不動化に陥る前の運動が疼痛発生に及ぼす影響—ラットを用いたトレッドミル走での検討—. *名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇* 3(2): 9-16
- [11] Okamoto T, Atsuta Y, Shimazaki S (2001) Sensory afferent properties of immobilized or inflamed rat knees during continuous passive movement. *J Bone Joint Surg Br* 81-B: 171-177
- [12] Pilis W, Zarzecny R, Langfort J, Kaciuba-Uściłko H, Nazar K, Wojtyna J (1993) Anaerobic threshold in rats. *Comp Biochem Physiol* 106(2): 285-289
- [13] St Pierre BA, Tidball JG (1994) Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J Appl physiol* 77(1): 290-297
- [14] Wanek LJ, Snow MH: Activity-induced fiber regeneration in rat soleus muscle. *Anat Rec* 258: 176-185, 2000
- [15] 山本 綾, 古島泰子, 長谷川多美子, 肥田朋子 (2009) ラット足関節不動化による活動制限は痛みを促進する. *理学療法学* 36(6): 305-311

[Original Article]

Effects of Treadmill Running to Inactivity-induced Pain and Atrophy in Disused Rats

Tomoko Koeda¹, Yuya Okimuko², Takuya Sakakibara³
Masashi Hotta⁴, Tatsuya Nomura⁵, Tomoaki Nakata⁶
Takanori Izutsu⁷, Hiromitsu Tasaki⁸, Shinichiro Hiraga⁹

Abstract

It has been known that a physical inactivity such as immobilization by casts or long-term bed rest induces pain and muscle atrophy. However, these relationship and the effect of treadmill running on the pain induced by inactivity are incompletely understood. The aim of this study is to investigate whether the effects of treadmill running can reduce pain and inhibit muscle atrophy.

Thirteen Wistar rats were used and randomly divided into three groups: the non-immobilization (N group, n=3); the bilateral immobilization that ankles of each rat were fixed in full plantar flexion with plaster casts for 4 weeks (C group, n=4); treadmill running for 15 min/day (6 days/week) during inactivity period (T group, n=6). Cutaneous plantar withdrawal threshold was tested before and during inactivity period. After 4 weeks of following inactivity period, the average myofiber cross-sectional area and the number of myonecrosis fiber of the soleus muscles were histologically measured in three groups.

It was seen that the withdrawal threshold in T group was significantly lower than C group ($p < 0.05$). Muscle atrophy was not inhibited by treadmill running. These results suggested that muscle atrophy might be not involved in the pain induced by inactivity. Myonecrosis fibers were on the increase in T group. Therefore, we require attention to physical exercise in disused weakness muscle.

Keywords: inactivity, pain, cutaneous withdrawal threshold, treadmill running, muscle atrophy

-
- 1 Faculty of Rehabilitation Sciences, Nagoya Gakuin University
 - 2 Department of Rehabilitation, Gifu Prefectural Gero Hot Spring Hospital
 - 3 Department of Rehabilitation, Yachiyo Hospital
 - 4 Department of Rehabilitation, Iwakura Hospital
 - 5 Department of Rehabilitation, Agata Clinic
 - 6 Department of Rehabilitation, Isehara Kyodo Hospital
 - 7 Department of Rehabilitation, Nagoyanishi Hospital
 - 8 Faculty of Health Sciences, La Trobe University
 - 9 Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University