

〔原著〕

周期的伸張刺激による老齡ラットに生じる筋萎縮の 進行予防効果

伊 東 佑 太¹, 佐々木 志 織²
西 尾 紗央里³, 鈴 木 惇 也⁴

要 旨

老化性筋萎縮の予防は重要な課題である。しかし、運動耐容能等が低下した高齢者に高強度トレーニングは困難であり、低強度でも筋萎縮の進行予防に有効な方法が求められる。一方、ラット廃用性筋萎縮の進行予防に周期的伸張刺激が有効であると報告される。本研究は老化性筋萎縮を起こす高齢ラットに対し定量的な周期的伸張刺激を与え筋萎縮の進行予防効果を検討した。繁殖リタイアしたWistar系雄性ラットの足関節底屈筋群に周期的伸張刺激として一定トルクの背屈運動を1日1回7日間行った。周期的伸張刺激は足関節底屈方向に加わるトルクが8 mNmに達するまで背屈させ5秒間保持、その後0 mNmに達するまで底屈させ5秒間保持する運動を15分間繰り返した。結果、周期的伸張刺激を行っても行わなかったラットの筋線維横断面積との間に有意差がなかった。つまり本条件の周期的伸張刺激は老化性筋萎縮の進行予防には不十分であった。

キーワード：サルコペニア，筋萎縮予防，周期的伸張刺激，高齢ラット

加齢に伴う退行性変化の一つとして骨格筋の萎縮がよく知られ[6, 11]，老化性筋萎縮と呼ばれており，定期的な筋力トレーニングを行っていない成人では，30歳から40歳にかけて年間200 g，50歳以上では年間400 g以上の筋量の減少が認められると報告されている。このような筋量の減少は身体活動量の低下を招き，そして身体活動量の低下がさらに筋量を減少させ

るといふ負の循環を招く。以上のことから，悪循環の根源となる老化性筋萎縮を予防することが，リハビリテーション分野において課題となっている。このための取り組みとして，高齢者を対象とした筋力トレーニングが行われている。例えば，Hakkinenら[10]は，60歳以上の高齢者を対象に週3回，10週間にわたりフリーウェイトでのスクワットトレーニングを

1 名古屋学院大学 リハビリテーション学部

2 三重県済生会 明和病院

3 藤田医科大学病院

4 三仁会 あさひ病院

Correspondence to: Yuta Itoh

E-mail: yuta.i@ngu.ac.jp

Received 19 November, 2018

Revised 14 December, 2018

Accepted 25 December, 2018

行った結果、膝伸展筋力、筋断面積が実施前と比較し有意に大きくなったと報告している。また、Grimbyら[9]は、高齢者に対して約8週間にわたり等尺性収縮と遠心性収縮を組み合わせ、トレーニングを行かせた結果、高齢者であっても筋量、筋力増強を起こすと報告している。

筋萎縮を持つ高齢者に対する筋力トレーニングについて、1-repetition maximum (RM) の60～70%以上の負荷で10～15回繰り返す条件の運動が推奨されている[8]。一方、健常な筋を肥大させるための筋力トレーニングの条件は1-RMの60～80%の運動強度で8～12回繰り返す方法が有効であるとの根拠がある[3]。このように、老化性筋萎縮に対する筋力トレーニングの方法は健常筋に対するものと同じ方法であり、独自に開発されたものではない。しかし高齢者はバランス機能や協調性の低下などを合併していることが多く[17]、前述のような高強度の筋力トレーニングは実施困難な可能性が高い。したがって、老化性筋萎縮の進行を軽減できるだけでなく、低強度でかつ安全に実施できる方法が求められる。

骨格筋の萎縮は加齢に伴う退行性変化だけでなく、無重力環境暴露や長期臥床、あるいはギプス固定などによる不動化、末梢神経障害の結果としても生じる。この廃用性筋萎縮の進行は筋線維を構成するタンパク質の合成促進、もしくは分解の抑制を促すことで、予防可能であることが報告されている。例えば、Agataら[2]は坐骨神経切除による廃用性筋萎縮モデルラットに対して、間歇的な伸張刺激を徒手で加えることで、タンパク質に関わる細胞内シグナルであるAkt-p70s6k-4EBP-1系が活性化し、筋萎縮が軽減することを報告している。さらに、同様の廃用性筋萎縮の進行予防には、8 mNmの

トルクで5秒のon/off同期の周期的伸張刺激が最も有効であったことを報告している[1]。もしこの周期的伸張刺激が老化性筋萎縮の進行予防に対して有効であれば、前述の筋力トレーニングよりも安全でかつ低負荷で実施でき、臨床的に有意義であると考えられる。しかし、老化性筋萎縮の進行予防に対して周期的伸張刺激の効果を検証した報告はない。本研究は、これまでの報告で廃用性筋萎縮の進行予防に効果的であった条件と同じ周期的伸張刺激を、老化性筋萎縮を起こしたラット下腿に加え、筋萎縮進行を予防できるかどうかを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

動物

52週齢以降の繁殖リタイアしたWistar系雄性ラット(450–620 g, n = 30)を実験に供した。ラットは実験期間中25°Cに設定した室内で飼育し、餌と水は自由に与えた。また、すべての実験は名古屋学院大学動物実験委員会に諮り、承諾を得た後に行った(承認番号:2007-007)。ラットは左足関節底屈筋群に周期的伸張刺激を与えるSt群と、対照群として伸張刺激を加えないNSt群に無作為に振り分けた(Fig. 1A)。

周期的伸張刺激

周期的伸張刺激には小動物用足関節運動装置(NDH-1: Bio Research Center)を用いた。吸入麻酔下(2.0% Isoflurane, Abbott)のラットを専用のベッドに右側臥位に寝かせ、装置の足底板に左足底を固定した。次いで、一定の角速度で背屈させて一定のトルクで保持、一定の角速度で底屈させて一定のトルクで保持する他

周期的伸張刺激による老齡ラットに生じる筋萎縮の進行予防効果

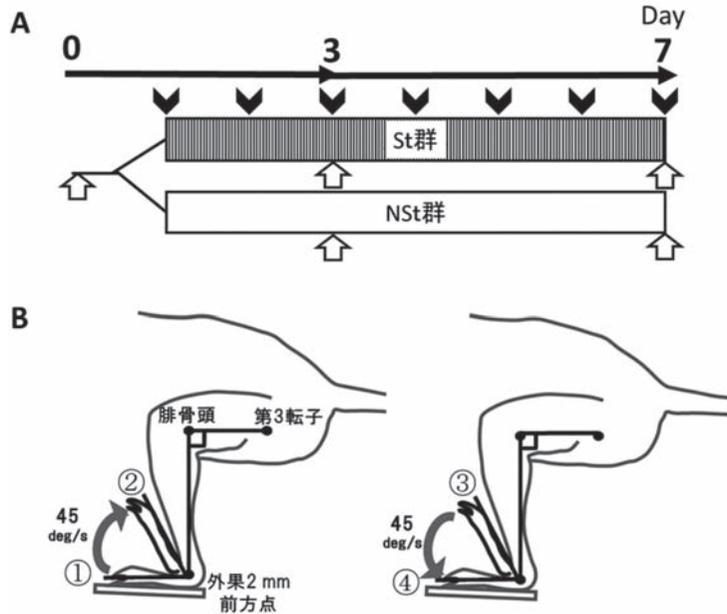


Fig. 1 実験方法

A 本実験の群分けを示す。St群には1日15分間の周期的伸張刺激（黒矢頭）を与え、NSt群は与えずに飼育した。両群とも伸張刺激前、伸張刺激開始3日目、7日目に左足底筋・左ヒラメ筋を採取し、組織学的評価を行った（白矢印、各n = 6ずつ）。**B** ラット後肢の模式図を示す。装置のトルクセンサーから足関節にかかるトルクをフィードバックしながらステッピングモーターを①角速度45 deg/sで背屈させ、②8 mNmのトルクがかかった状態で保持する運動と、③角速度45度/sで底屈させ、④0 mNmのトルクがかかった状態で保持する運動を交互に15分間繰り返した。

動運動を繰り返すことで周期的伸張刺激を左足関節底屈筋群に与えた（Fig. 1B）。周期的伸張刺激の開始肢位は左膝関節（大腿骨と脛骨の成す角度）90 deg，左足関節（脛骨と第5中足骨の成す角度）90 degに設定し，装置の回転軸が左外果の前方2 mmの位置になるように調整した。他動的な底背屈運動の角速度はどちらも45 deg/sに設定し，背屈保持時のトルクは8 mNm，底屈保持時のトルクは0 mNmで各々5秒間ずつ保持した。この周期的伸張刺激を15分間繰り返す，1日1回7日間行った。

組織学的評価

周期的伸張刺激前，周期的伸張刺激後3日目，

7日目のラット（n = 6ずつ）から左足底筋，左ヒラメ筋を採取した。採取した筋から筋腹長軸の中央1/3の高さの筋腹を切り出し，冷却したイソペンタン内で急速凍結した。凍結サンプルは-80℃で薄切まで保存した。凍結サンプルは，クリオスタッド（CM1850，Leica）を用いて10 μm厚に薄切した。薄切切片はヘマトキシリン-エオシン染色（H-E染色）を施し，顕微鏡下で組織学所見を撮影した。得られた筋腹の染色像を6区に分け，各区分から任意の1視野を測定対象とした。測定対象の画像から画像解析ソフト（ImageJ）を用いて，含まれる筋線維すべての横断面積を測定した。得られた筋線維横断面積は，6区分を合わせて平均値を

求め、各ラットの値とした。

統計処理

群間の比較には一元配置分散分析を用い、有意差を認めた場合、多群間比較に Tukey 法を用いた。いずれも有意水準は5%未満とした。

結果

結果は平均値±標準偏差 (mesn ± SD) で示した。NSt群の足底筋の筋線維横断面積は、周期的伸張刺激開始3日目で $808 \pm 128 \mu\text{m}^2$ 、7日目で $778 \pm 123 \mu\text{m}^2$ であり、伸張刺激前の足底筋の面積 ($1,026 \pm 61 \mu\text{m}^2$) に比べ、有意に小さかった (Fig. 2)。St群の足底筋の筋線維横断面積は、伸張刺激開始3日目で $856 \pm 64 \mu\text{m}^2$ 、7日目で $728 \pm 143 \mu\text{m}^2$ であり、伸張刺激開始前の足底筋の面積に比べ、有意に小さかった。伸張刺激開始3日目、7日目のいずれ

でも St群の足底筋の面積と NSt群の筋の面積との間に有意な差はなかった。

NSt群のヒラメ筋の筋線維横断面積は、伸張刺激開始3日目で $891 \pm 78 \mu\text{m}^2$ であり、伸張刺激開始前の筋の面積 ($768 \pm 88 \mu\text{m}^2$) に比べ、有意に大きかった (Fig. 3)。伸張刺激開始7日目の面積は $748 \pm 72 \mu\text{m}^2$ であり、伸張刺激前の筋の面積に比べ、有意に小さかった。St群のヒラメ筋の筋線維横断面積は、伸張刺激開始3日目で $1,033 \pm 28 \mu\text{m}^2$ であり、伸張刺激開始前の筋の面積に比べ、有意に大きかった。伸張刺激開始7日目の面積は $728 \pm 143 \mu\text{m}^2$ であり、伸張刺激開始前の筋の面積に比べ、有意に小さかった。伸張刺激開始3日目の面積は、同時期の NSt群の筋の面積との間に有意な差がなかった。伸張刺激開始7日目の面積は NSt群の面積と比べ、有意に小さかった。

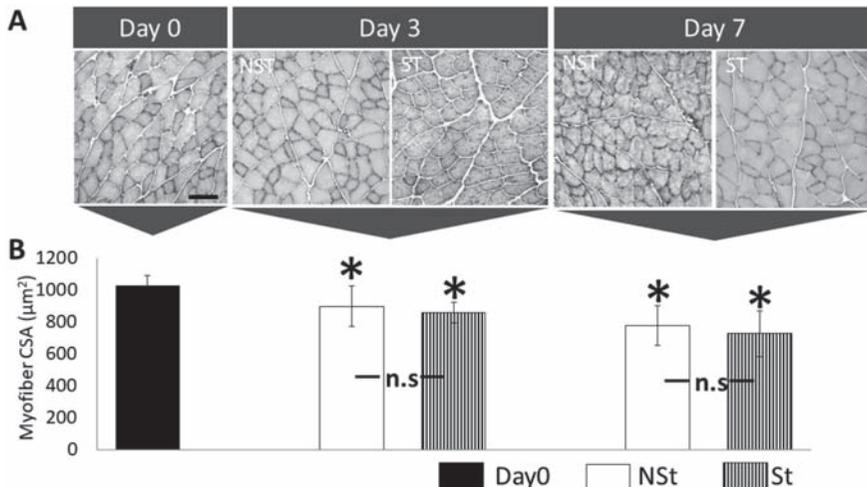


Fig. 2 足底筋 H-E 染色像と筋線維横断面積

A 各群の代表的な H-E 染色像を示す。左から周期的伸張刺激前、開始3日目の NSt 群、St 群、開始7日目の NSt 群、St 群。bar = 50 μm。B A の画像から測定した筋線維横断面積の平均値を示す。伸張刺激開始前に比べ他の4つの群はすべて有意に小さかった。各タイムポイントで NSt 群と St 群の面積の間に有意な差はなかった。*p < 0.05 vs. Day0。

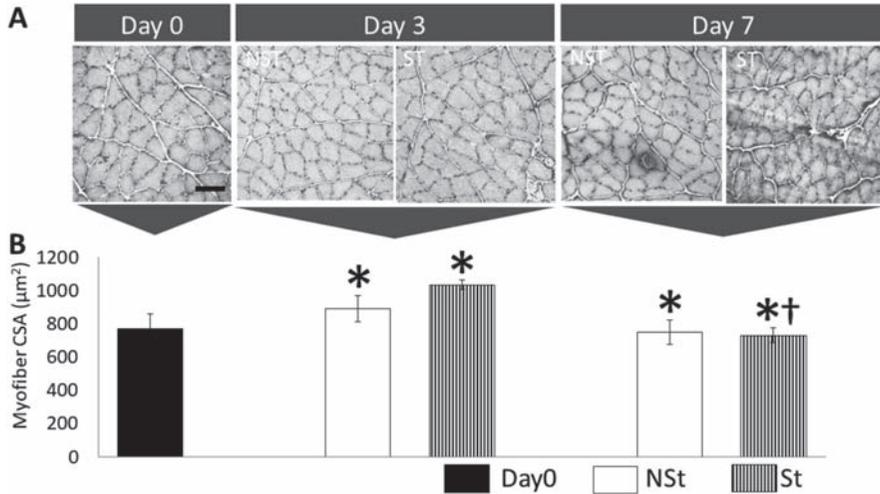


Fig. 3 ヒラメ筋H-E染色像と筋線維横断面積

A各群の代表的なH-E染色像を示す。左から周期的伸張刺激前、開始3日目のNSt群、St群、開始7日目のNSt群、St群。bar = 50 μm。B Aの画像から測定した筋線維横断面積の平均値を示す。伸張刺激開始前に比べ他の4つの群はすべて有意に小さかった。伸張刺激開始3日目のNSt群とSt群の面積の間に有意な差はなかった。伸張刺激開始7日目のSt群の面積はNSt群と比べ有意に小さかった。*p < 0.05 vs. Day0。† p < 0.05 vs. NSt群 at same time point。

考察

本研究結果より、周期的伸張刺激を与えたラットの筋線維横断面積は、普通飼育したのみであるにもかかわらず、周期的伸張刺激前に比べ有意に小さくなった。一方、予備実験において本研究のラットと同系統同性の8週齢ラットを本研究と同じ環境で1週間普通飼育し、普通飼育開始前のヒラメ筋および足底筋の筋線維横断面積と1週間後の面積とで、有意な差がないことを確認している。したがって、本研究に用いたラットは、1週間という短い期間であっても老化性筋萎縮が確認されたと考えられる。しかし、個々のラットの体重にばらつきが多く、本研究結果の個体差が影響した可能性は否めない。今後は、対象動物の選定が検討課題となるであろう。少なくとも1週間で筋線維横断面積の減少が観察された本老齡ラットに対して、廃

用性筋萎縮の進行予防に効果的であった周期的伸張刺激を同条件で与えたところ、与えない場合と比べて筋線維横断面積の減少に差がなかった。このことから、本条件の周期的伸張刺激を行っても、少なくとも7日間の期間では老化性筋萎縮の進行を抑制することができないと考えられた。しかし、周期的伸張刺激の廃用性筋萎縮進行予防効果をみた報告[1]では、伸張刺激開始7日目の筋線維横断面積と伸張刺激前の面積との間に有意な差はみられなかったが、タンパク質合成経路が活性化していたとされている。今回我々の研究では筋線維横断面積のみを指標としたが、今後、タンパク質合成や分解のシグナル経路の解析も考慮に入れる必要がある。本研究において周期的伸張刺激に老化性筋萎縮の進行予防効果を認めなかった要因として、廃用性と老化性として筋萎縮が起こるメカニズムが異なることが考えられる。廃用性筋萎縮の生

じる機序は、筋線維を構成するタンパク質の合成と分解の不均衡に基づくと考えられる[5]。廃用性筋萎縮に対する伸長刺激は、タンパク質転換の重要な因子であり、筋線維に負荷される純粋に機械的な作用によって原形質膜が伸展し、筋原線維が活性化することによって核内の遺伝子表現が影響を受ける[13]。そのため、廃用性筋萎縮の進行を軽減することができる。一方、老化性筋萎縮には筋線維の新生・肥大に関与する筋衛星細胞の機能低下が関わっているといわれている[14]。筋衛星細胞は筋基底膜上に局在する筋特異的幹細胞であり、運動や損傷などの刺激により、増殖、筋芽細胞まで分化する[12]。筋芽細胞は別の筋芽細胞と互いに融合し、筋線維を新生することで筋線維の再生が起こる。また、筋線維の損傷部位で筋芽細胞が融合し、筋線維自体の再生にも関与するといわれている。老化性筋萎縮ではこの筋衛星細胞の機能が低下することにより、筋の再生が起こらず、損傷部位が線維化、脂肪化することにより生じるとされている[16]。以上のことから老化性筋萎縮の進行予防には廃用性筋萎縮のようにタンパク質量の増加だけでなく、筋衛星細胞の増殖、分化機能の維持、増強を標的とした理学療法必要性を示唆しており、本研究で用いた周期的伸長刺激には、このような筋衛星細胞の機能に対する効果は期待できないと考えられる。

本実験開始3日目のヒラメ筋は足底筋と異なり、周期的伸長刺激の有無に関わらず、伸長刺激前と比較して面積が大きい筋線維が観察された。重本[15]によるとラットは加齢によりII型線維が減少し、I型線維の割合が増加するとされる。本研究において、ヒラメ筋の筋線維横断面積に一時的な肥大が観察された要因として、II型線維の割合が多い足底筋が早期から萎縮し、これを補うためI型線維の割合が多いヒ

ラメ筋でタンパク質合成経路が活性化され、代償的に筋線維が肥大したのではないかと考えられる。前述したように足底筋ヒラメ筋双方において、タンパク質合成経路などの生化学的解析が今後の課題である。高齢者の立ち上がり、歩行といった日常生活における身体活動能力は、筋力の有無によって大きく左右される[4, 7]。今後も老化性筋萎縮の進行予防が重要な課題であることは疑いようがない。本研究において、老化性筋萎縮の進行予防に効果的な刺激方法を見出すことはできなかったが、周期的伸長刺激の頻度や負荷量などの再検討もしくは他の刺激方法の開発が急がれる。

文献

- [1] Agata N, Kataoka A, Inoue-Miyazu M, et al. (2011) Passive stretch suppresses muscle atrophy in rats: effects of duration and frequency of stretch. *comparative physiology and biochemistry*. 28: 149.
- [2] Agata N, Sasai N, Inoue-Miyazu M, et al. (2009) Repetitive stretch suppresses denervation-induced atrophy of soleus muscle in rats. *Muscle & nerve*. 39: 456-462.
- [3] American College of Sports Medicine. ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription 9th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
- [4] Bassey EJ, Fiararone MA, O'Neill EF, et al. (1992) Leg extensor power and functional performance in very old men and women. *Clin Sci (Lond)*. 82: 321-327.
- [5] Bruusgaard JC, Egner IM, Larsen TK, et al. (2012) No change in myonuclear number during muscle unloading and reloading. *Journal of applied physiology*. 113: 290-296.

- [6] Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, et al. (2018) Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*.
- [7] Fiatarone MA, Marks EC, Ryan ND, et al. (1990) High-intensity strength training in nonagenarians. Effects on skeletal muscle. *JAMA*. 263: 3029-3034.
- [8] Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, et al. (2011) American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Medicine and science in sports and exercise*. 43: 1334-1359.
- [9] Grimby G, Aniansson A, Hedberg M, et al. (1992) Training can improve muscle strength and endurance in 78- to 84-yr-old men. *Journal of applied physiology*. 73: 2517-2523.
- [10] Hakkinen K, Newton RU, Gordon SE, et al. (1998) Changes in muscle morphology, electromyographic activity, and force production characteristics during progressive strength training in young and older men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 53: B415-423.
- [11] Marty E, Liu Y, Samuel A, et al. (2017) A review of sarcopenia: Enhancing awareness of an increasingly prevalent disease. *Bone*. 105: 276-286.
- [12] Snow MH. (1977) Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. *Anat Rec*. 188: 201-217.
- [13] 越智ありさ, 北畑香奈子, 二川健. (2014) 廃用性筋萎縮とアミノ酸. *生化学*. 86: 367-371.
- [14] 河上敬介, 縣信秀, 宮津真寿美. (2009) 運動, 荷重, 伸張が筋萎縮予防に与える効果とそのメカニズム *PT ジャーナル*. 43: 581-590.
- [15] 重本和宏. (2014) 筋萎縮 (サルコペニア) における代謝変換のメカニズムの役割. *実験医学*. 32: 1367-1368.
- [16] 上住聡芳, 中谷直史, 常陸圭介, et al. (2010) 老化や疾患における骨格筋の萎縮と治療への応用. *基礎老化研究*. 34: 5-11.
- [17] 猪飼哲夫. (2006) 高齢者・片麻痺患者の転倒とバランス機能. *リハ医学*. 43: 523-530.

[Original Article]

Effects of repetitive stretch on muscle atrophy in elderly rats

Yuta Itoh¹, Shiori Sasaki²
Saori Nishio³, Junya Suzuki⁴

Abstract

Prevention of sarcopenia is important in rehabilitation. However, high-intensity training is difficult for elderly people with a decreased physical capacity and/or coordination. Thus, an effective method for low intensity exercise to prevent aggravation of sarcopenia is required. It has been reported that repetitive stretch is effective for preventing aggravation of disuse muscle atrophy in rats. In this study, we performed quantitative repetitive stretch to elderly rats to cause sarcopenia, and examined the prophylactic effect of aggravation of muscle atrophy. The repeated stretch protocol involved passive dorsiflexion exercise under constant torque to the ankle plantar flexor muscles of the rat 15 min/day, 7 days. There was no significant difference in the myofiber cross-sectional area between rats who had repeated stretch and rats without repeated stretch. Therefore, repeated stretch in this condition was insufficient to preventing aggravation of sarcopenia. In the future, it is necessary to reexamine methods, such as loading and frequency, on similar protocols.

Keywords: sarcopenia; prevention; repetitive stretch; elderly rat

-
- 1 Faculty of Rehabilitation Sciences, Nagoya Gakuin University
 - 2 Mieken Saiseikai Meiwa Hospital
 - 3 Fujita Health University Hospital
 - 4 Sanjinkai Asahi Hospital