

〔原著〕

筋損傷後の短期間の安静固定は痛覚過敏状態からの 回復を遅らせる

肥田 朋子¹, 高山 巧^{1,2}, 鈴木 輝^{1,3}, 落合 彩夏^{1,4},
佐藤 麻央^{1,5}, 渡邊 晶規¹, 伊東 佑太¹

要 旨

【目的】筋損傷後の短期間の安静固定が疼痛や組織損傷からの回復に影響を与えるか検討した。

【対象と方法】8週齢のWistar系雄性ラットの両側ないし一側腓腹筋（GC）をドロップマス法にて損傷させた。その後そのまま自由飼育する非固定群、損傷肢をギプスで固定する固定群を設けた。筋機械痛覚閾値と後根神経節（DRG）における神経成長因子（NGF）の発現割合を2群で比較し、一側GC損傷ラットの非損傷側も含めた3群でHE染色されたGCを観察した。

【結果】筋機械痛覚閾値は筋損傷6時間後には両群とも有意に低値を示し、差を認めなかったが、72時間後には有意差を認め、非固定群の方が回復傾向を示した（ $p<0.05$ ）。DRGにおけるNGF陽性率は両群間に有意差を認め、非固定群の方が有意に低値を示した（ $p<0.05$ ）。一方、筋損傷からの回復状況には両群で差を認めなかった。

【結論】筋損傷後の短期間の安静固定は組織の回復には影響しないが、疼痛緩和を遅らせる。

キーワード：筋損傷，安静固定，筋機械痛覚閾値，神経成長因子，不活動性疼痛

序文

ギプスなどによる関節の不動化や不活動状態の継続は、骨折などの外傷を伴っていなくても

痛覚神経の興奮性が高まったり [4]，機械アロディニアが生じる [16] など，疼痛が惹起されることが報告されている。骨格筋は筋出力する効果器であると共に感覚器でもある。その

1 名古屋学院大学リハビリテーション学部理学療法学科

2 西尾市民病院診療部門リハビリテーション室

3 トヨタ記念病院第三診療室リハビリテーション科

4 松阪市民病院医療技術部リハビリテーション室

5 名古屋大学医学部附属病院医療技術部リハビリ部門

Correspondence to: Tomoko Koeda

Email: tomokoed@ngu.ac.jp

Received 2 December, 2024

Revised 13 December, 2024

Accepted 10 January, 2025

ため、末梢組織が不活動にさらされると、感覚刺激の入力が減弱・消失し、結果的に神経系が何らかの変調をきたして痛みの発生につながっている可能性がある [17]。この不活動性疼痛には神経成長因子 (NGF) が関与していることが報告されている [13,15]。NGFは、神経の発達、生存、機能維持に必要な栄養因子であるが、神経損傷時には損傷部位で増加し、感覚神経に取り込まれた後、TRPV1受容体の透過性を増加させ、痛覚閾値の低下に関与することが知られている [6]。またNGFは軸索輸送により脊髄後根神経節 (DRG) まで運ばれた後、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) [11] や脳由来神経栄養因子 (BDNF) [1]、ブラジキニン受容体 [18] や酸感受性受容体 [12] などの遺伝子発現を誘導することも報告されており、種々のメカニズムで疼痛を惹起する可能性が指摘されている。

筋損傷は、日常生活の中で何かの拍子に四肢を障害物にぶつけたり、転倒時などに生じることが多いが、腫脹が認められていても、骨折時と比較して、外見的に異常な変形はなく、また歩行が可能であったりするため、すぐに医療機関を受診することが少ない。そのため自己判断で、いわゆる RICE (rest, ice, compression, elevation) 処置に従い安静固定を行うこともある。また、医療機関においてもテーピングや軟性装具などで固定する場合もある。この一時的な安静と疼痛回避を目的とした固定が、先述のような不活動性疼痛の発生を惹起する可能性やその影響も含めて筋損傷からの回復を妨げる可能性が考えられるが、これらの点について調べた報告は見当たらない。そこで今回は筋損傷直後の短期間の安静固定が疼痛ならびに筋損傷治癒におよぼす影響について明らかにすることを目的として実験を行った。

方法

本研究のすべての実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針」に従い、名古屋学院大学動物実験委員会の審査、学長の承認を得て行った (2019-002)。

実験には8週齢のWistar系雄性ラット16匹23肢を用いた。馴らし飼育終了後、先行研究 [8,9] に倣いドロップマス法にて両側ないし一側の合計20肢の腓腹筋を損傷させた。損傷後6時間ないし72時間ギブス固定を施した8匹10肢を固定群、損傷後何も施さなかった8匹10肢を非固定群、一側のみ筋損傷させたラットの非損傷側で固定もしなかった3肢をコントロール群とした。飼育期間中、給水・給餌は自由とした。

疼痛の行動学的評価 (両側筋損傷肢、各n=4)

疼痛の行動学的評価には、下腿三頭筋への機械刺激に対する逃避閾値を用いた。下腿三頭筋の機械痛覚閾値は、筋損傷前、筋損傷6・72時間後に圧鎮痛測定器 (37215, UgoBasile) を用いたRandall-Selitto法で測定した。また、圧子は直径2.6mmを用いた。5回の測定値から最大値と最小値を除いた3回の平均値を各時点の結果とした。

後根神経節 (DRG) における免疫組織学的解析 (各n=3)

筋損傷1週間前に、イソフルラン吸入深麻酔下で右腓腹筋に逆行性トレーサーであるFluoroGold (FG, 52-9400, Fujifilm) を注入した。筋注されたFGは逆行性に軸索輸送され、後根神経節 (DRG) 内の細胞質を標識する。これによりDRGでは腓腹筋由来の感覚神経を同定することが可能となる。両群とも筋損

傷72時間後に先の研究 [10] と同様に灌流固定を行い、DRGを採取して10 μ m厚の凍結縦断標本を作製した。さらに同研究のプロトコルに則りNGFを標識後、蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus) に付帯したカメラシステム (DP71, Olympus) で観察、撮影し、デジタルデータとしてPCに取り込んだ。画像は、画像解析ソフトPhotoshop (Adobe) ならびにImageJ (National Institute of Health) を用いてFG陽性細胞中のNGF陽性細胞数を百分率で算出した。

筋細胞の組織学的解析

本解析には先の行動評価に用いた8肢 (固定群4肢と非固定群4肢) と筋損傷6時間後まで飼育した9肢 (固定群3肢、非固定群3肢および非損傷で固定をしていないコントロール群3肢) を用いた。筋損傷6・72時間後にイソフルラン吸入深麻酔下で必要に応じて左右の腓腹筋を採取し、先の研究 [9] に倣ってヘマトキシリン-エオシン染色標本を作製し、画像を観察した。

統計解析

統計にはRコマンダー 2.8.0 [7] を用い、有意水準は5%未満とした。

行動学的評価には分割プロット解析を、DRGにおける陽性細胞率の比較にはWelchのt検定を用いた。結果は各群の平均 \pm 標準偏差で示した。

結果

行動学的評価

筋損傷前の筋機械痛覚閾値は固定群17.4 \pm 2.2 g、非固定群20.9 \pm 1.5 g、筋損傷6時間後

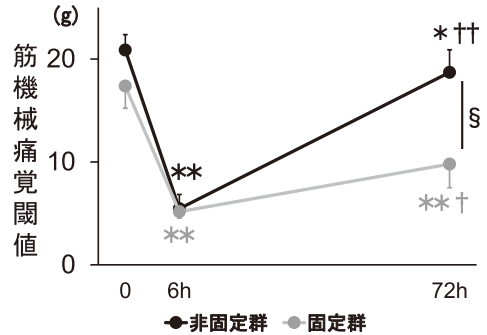


図1 筋機械痛覚閾値の経時的変化
黒線が非固定群でグレー線が固定群。筋損傷後両群ともに有意に閾値が低下したが、非固定群は筋損傷72時間後には固定群と有意差を認めた (分割プロット分散分析)。値は平均値と標準偏差。*: $p<0.05$, **: $p<0.01$ vs. 筋損傷前, †: $p<0.05$, ††: $p<0.01$ vs. 筋損傷6時間後, §: 群間の比較

の筋機械痛覚閾値は順に5.2 \pm 0.6 g, 5.5 \pm 1.4 g, 72時間後のそれらは順に9.8 \pm 2.3 g, 18.7 \pm 2.2 gであり、2群間と経時的な変化には有意差と交互作用を認めた (図1, すべて $p<0.05$)。両群とも筋損傷前の筋機械痛覚閾値に比べ6時間後に有意に低値を示した ($p<0.05$) が、2群間に差を認めなかった。両

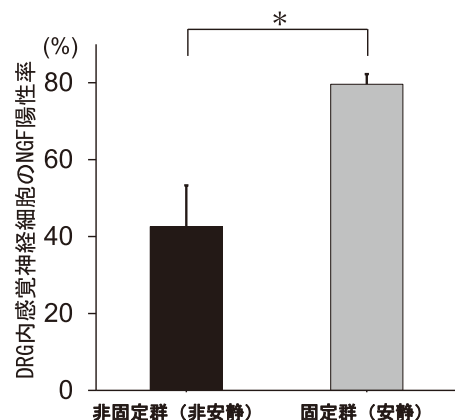


図2 後根神経節における腓腹筋からの神経成長因子 (NGF) 陽性細胞発現率
後根神経節における腓腹筋からの感覚神経に占めるNGF陽性細胞割合を平均値と標準偏差で示した。非固定群は固定群に比べ、有意に発現率が抑えられた ($p<0.05$, Welchのt検定)。

群の損傷72時間後の筋機械痛覚閾値は筋損傷前や損傷6時間後と有意差を認めた($p<0.05$)。しかし、非固定群は筋損傷前の値に戻りつつあり、固定群と有意差を認めた ($p<0.05$)。

DRGにおける組織学的解析

DRGにおける腓腹筋由来のNGF陽性細胞の発現率は、固定群で $79.6 \pm 2.7\%$ 、非固定群で $42.6 \pm 10.7\%$ と固定群で有意に高値を示した(図2, $p<0.05$)。

腓腹筋における組織学的解析

筋損傷6時間後と72時間後の2群の典型的なHE染色像をコントロール群の典型画像と共に図3に示す。筋損傷6時間後では両群とも円形形状が崩れたような筋細胞や浮腫を疑うような比較的大きな筋細胞が確認できた。しかし炎症性の円形細胞が浸潤している筋細胞は確認できなかった。また、固定群と非固定群を比較しても大きな差があるとはいえなかった(図3A,

B)。筋損傷72時間後ではどちらも炎症性の円形細胞の凝集が確認できた。多数の炎症性の円形細胞が損傷された筋細胞を貪食しており、損傷の具合も大きかった。しかし、筋損傷72時間後においても両群間に明らかな差を認めなかった(図3D, E)。

考察

本研究では、筋が損傷した場合に固定するなど安静にした場合と、そのまま様子をみていた場合を想定し、ギプス固定による不活動状態が、疼痛や損傷筋の治癒に影響をおよぼすかを明らかにすることを目的とした。

筋機械痛覚閾値は、固定群、非固定群ともに筋損傷6時間後に損傷前と比較して有意に低下した。しかし、筋損傷72時間後には非固定群で筋機械痛覚閾値の回復が認められ、筋損傷6時間後と有意差を認めた。一方、固定群では筋損傷72時間後においても筋機械痛覚閾値の低

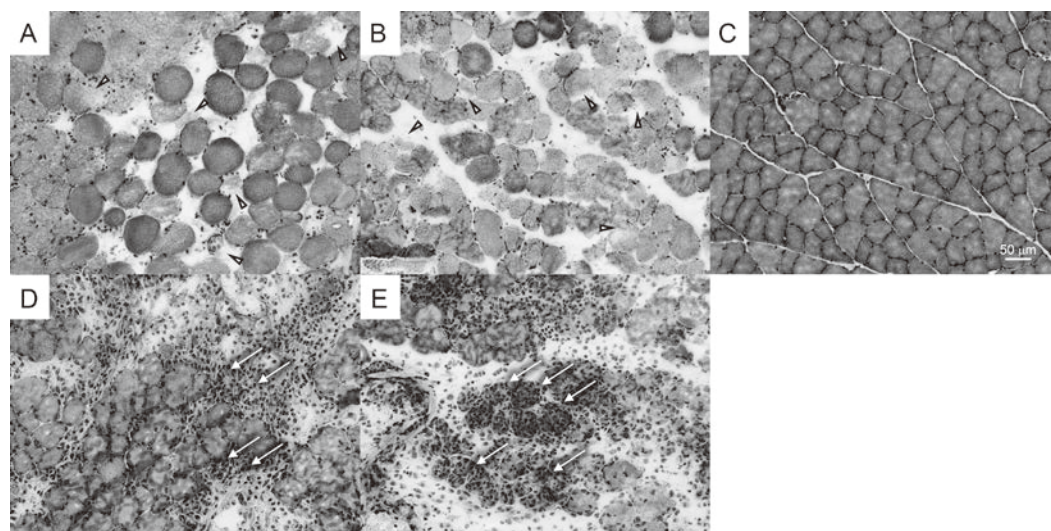


図3 腓腹筋の横断組織典型像

損傷6時間後のA非固定群, B固定群, Cコントロール群, D損傷72時間後の非固定群, E固定群の腓腹筋におけるヘマトキシリン-エオシン染色像である。スケールバーは $50\mu\text{m}$ 。淡色の筋細胞(A, B)は重錘によって円形形状が崩れた部分。多数の円形細胞の浸潤が認められた(D, E)。

下は十分改善しておらず、非固定群と有意差を認めた。筋損傷とは別の膝関節炎モデルラットでの報告 [21] においても、膝関節圧痛閾値は、不動群では起炎剤投与1日目から3週目まで対照群より有意に低下したのに対し、運動群は投与1週目から不動群より有意に圧痛閾値が上昇した。寺中らの報告 [21] は関節炎モデルを用いた研究であり、また積極的に運動を行っている群との比較であったが、関節を固定した不動状態と比べ運動することは閾値低下からの回復を促していることを示していた。これらのことから安静固定を行うことは痛覚閾値低下を引き起こしやすく、また損傷などによる炎症状態の改善を遅延させる可能性があると考えられた。

また、非固定群は自由に活動できる状況であったことから、運動によって炎症性サイトカインが産生されたことが筋機械痛覚閾値を回復させる一助となった可能性も考えられた。Ferretti ら [3] は、炎症の発生直後から持続的他動運動を実施すると、炎症発生直後からギプスで不動化した群と比べ、炎症性サイトカインであるインターロイキン-10の発現を認めたと報告している。このことから、本研究でもインターロイキン-10の発現程度を確認・比較することで、メカニズム検証を行える可能性があり今後の課題である。

DRGにおける腓腹筋由来のNGF陽性細胞率は、非固定群に比べ固定群において有意に高値を示した。Suzuki ら [20] は類似のドロップマス法による筋損傷モデルを用い、抗NGF抗体処置の効果を調べており、NGFによって誘発される活発な炎症が、筋損傷後の痛みに関与している可能性があることを報告している。また同研究室のSakuma ら [19] は、損傷24時間後までの損傷腓腹筋におけるNGF、腫瘍壊死因子 α およびインターロイキン-6の短時間の産

生増加が筋痛に関与していること、またこれらの増加がDRGにおけるカルシトニン遺伝子関連ペプチドの発現増加を誘導していると報告している。Sakuma らの報告 [19] ではDRGにおけるNGF陽性細胞率については確認されていなかったが、筋で確認されたNGFが一次求心性神経に速やかに取り込まれていたと考えれば、固定群で有意に高値を示していた今回の結果は妥当であると考ええる。

一方、不活動性疼痛発生時のDRGでNGF陽性細胞率を調べた研究は、Nishigami らの5週間の不動 [14] と我々のマクロファージ枯渇剤の影響を不動2～3週間で調べた報告 [9] のみであり、不動早期のDRGにおけるNGF発現の変化について捉えたものはない。Delcroix ら [2] の報告から、筋損傷時に産生されたNGFは速やかに感覚神経に取り込まれ、18～24時間以内にDRGまで逆行性輸送された可能性が考えられる。そのため、今回の固定群のDRGにおけるNGF陽性細胞率の増加には、損傷によるNGF発現増加と不活動によるNGF発現増加の双方の影響が考えられたが、この辺りを詳細に区別して調べるには至っておらず、今後の検討課題である。また今回は3例と対象数が少なかったことも影響していた可能性があるため、筋損傷72時間後についても対象数を増やして検討していく必要がある。さらに非損傷筋からのNGF陽性細胞率については調べておらず、この点も今回の研究の限界点である。今回の結果からは、少なくとも損傷によってNGF発現量が増加していた状態で、固定群ではさらに不動による影響が加わることでNGF陽性細胞率が有意に高値を示したのではないかと考察している。

筋の組織学的解析では、筋損傷6時間後には、筋が損傷された状態や浮腫様の細胞が確認

できたものの、まだ炎症反応はさほど生じていなかった。浮腫様の細胞は、細胞膜が破損し間質液が流入してきている可能性があり、この後貪食されていくものを示しているのではないかと考えた。実際、72時間後には円形細胞が多数集積しており、炎症が進行していた。しかし、安静固定を施した固定群と自由運動を行わせていた非固定群間に大きな差があるとはいえなかった。ドロップマス法による筋損傷モデル作製を最初に試みた我々の以前の報告 [9] では、筋損傷72時間後には損傷からの回復が認められており、また日常生活上においても長期の安静固定は想定されにくいため、短期間の安静固定による影響を観察することとして実験を計画した。しかし、本研究では、非固定群においても損傷72時間後はまだ炎症期であり、以前の報告よりも回復が遅れていた。ただ、以前の我々の報告は従来の他の報告 [8,19] よりも回復が早かったことから、むしろ今回の結果の方が通常の経過をたどっていたと判断できる。Sakumaら [19] は、損傷後ギプス固定をさせていないが、21日後までには、瘢痕組織が残っていたもののコントロールとは区別がつかないほどになっていたと報告している。Kamiら [8] も筋損傷後ギプス固定をしていないが、14日後の時点で再生中の筋線維は、一部の筋線維の中心に核がまだ残っていることを除いて明らかに正常であったと報告している。以前の我々の研究では、なぜ回復過程が早まっていたかについては判然とせず、保存していた凍結筋を再度調べても結果は変わらなかった。また Hayashiら [5] は、我々とは異なり、筋を損傷させずに足関節を底屈位で4週間ギプス固定した後、2週間はギプスを外しケージ内で飼育した群と、6週間通常飼育したコントロール群を組織学的に比較している。すなわち、ギプス解除後

の再荷重による筋損傷が観察され、再荷重開始時に筋が損傷したと仮定して、筋損傷2週間後の筋の様子は浸潤筋線維と中心核筋線維がみられたと報告しており、まだ回復過程にあったことを示している。これらを参考にとすると、本研究のように筋損傷後の回復過程に、ギプスによる安静固定の影響を調べる際には、筋損傷14日後や21日後までの様子を調査する必要があったと考えられた。そのため、損傷筋の回復過程に対する安静固定の影響については今後の課題である。少なくとも筋損傷後3日間という短期間の安静固定は筋損傷からの回復過程早期の変化に影響を与えなかった。

まとめ

筋損傷を生じさせ、安静固定の目的で短期間ギプス固定した固定群と何も処置をしなかった非固定群で疼痛や筋損傷からの回復を比較した。筋損傷72時間の固定は痛覚過敏状態からの回復を遅らせ、DRGにおけるNGF発現にも影響を与えたが、筋組織修復には影響を与えなかった。筋損傷後の不用意な固定は疼痛緩和を遅らせることから、日常生活レベルの活動が可能な筋損傷であれば、無理に安静・固定をしない方がよいと考えられた。

謝辞

本研究は名古屋学院大学研究助成（2020～2022年度）の成果の一部である。

利益相反に関する宣言

本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項は存在しない。

参考文献

- [1] Apfel SC, Wright DE, Wiideman AM, Dormia C, Snider WD, Kessler JA (1996) Nerve growth factor regulates the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the peripheral nervous system. *Mol Cell Neurosci* 7:134-142
- [2] Delcroix JD, Valletta JS, Wu C, Hunt S, Kowal AS, Mobley WC (2003) NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* 39(1):69-84
- [3] Ferretti M, Srinivasan A, Deschner J, Gassner R, Baliko F, Piesco N, Salter R, Agarwal S (2005) Anti-inflammatory effects of continuous passive motion on meniscal fibrocartilage. *J Orthop Res* 23(5): 1165-1171
- [4] Guo TZ, Offley SC, Boyd EA, Jacobs CR, Kingery WS (2004) Substance P signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. *Pain* 108: 95-107
- [5] Hayashi K, Fukuyasu-Matsuo S, Inoue T, Fujiwara M, Asai Y, Iwata M, Suzuki S (2020) Effects of cyclic stretching exercise on long-lasting hyperalgesia, joint contracture, and muscle injury following cast immobilization in rats. *Physiol Res* 69(5): 861-870
- [6] Hefti FF, Rosenthal A, Walicke PA, Wyatt S, Vergara G, Shelton DL, Davies AM (2006) Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. *Trends Pharmacol Sci* 27(2): 85-91
- [7] <https://home.hirosaki-u.ac.jp/pteiki/r/>
- [8] Kami A, Masuhara M, Kashiba Y, Kawai K, Noguchi K, Senba E (1993) Changes of vinculin and extracellular matrix components following blunt trauma to rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 25(7): 832-840
- [9] 肥田朋子, 久貝晃太, 矢野晃成, 吉満楓馬, 渡邊晶規, 伊東佑太 (2023) ドロップマス法による筋損傷モデル作製の試みと対側肢への影響. 名古屋大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇. 12(1): 1-10
- [10] 肥田朋子, 萩原光, 小柳リサ, 福井那奈, 渡邊晶規, 伊東佑太 (2022) マクロファージは神経成長因子を介したラット不活動性疼痛に影響を与えない. 名古屋大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇. 11(1): 1-11
- [11] Lindsay RM, Hargraves AJ (1989) Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature* 337(6205): 362-364
- [12] Mamet J, Lazdunski M, Voilley N (2003) How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *J Biol Chem* 278: 48907-48913
- [13] Nakagawa T, Hiraga S, Mizumura K, Hori K, Ozaki N, Koeda T (2018) Topical thermal therapy with hot packs suppresses physical inactivity-induced mechanical hyperalgesia and up-regulation of NGF. *J Physiol Sci* 68(5): 629-637
- [14] Nishigami T, Osako Y, Ikeuchi M, Yuri K, Ushida T (2013) Development of heat hyperalgesia and changes of TRPV1 and NGF expression in rat dorsal root ganglion following joint immobilization. *Physiol Res* 62(2):215-219
- [15] Oga S, Goto K, Sakamoto J, Honda Y, Sasaki R, Ishikawa K, Kataoka H, Nakano J, Origuchi T, Okita M (2020) Mechanisms underlying immobilization-induced muscle pain in rats. *Muscle Nerve* 61(5): 662-670
- [16] Okamoto T, Atsuta Y, Shimazaki S (1999) Sensory afferent properties of immobilised or inflamed rat knees during continuous

- passive movement. *J Bone Joints Surg Br* 81(1): 171-177
- [17] 沖田実 (2022) 不活動性疼痛の発生メカニズム ②神経系の変化. ペインリハビリテーション入門. 三輪書店, 東京, pp32
- [18] Petersen M, Segond von Banchet G, Heppelmann B, Koltzenburg M (1998) Nerve growth factor regulates the expression of bradykinin binding sites on adult sensory neurons via the neurotrophin receptor p75. *Neurosci* 83: 161-168
- [19] Sakuma Y, Miyagi M, Inoue G, Ishikawa T, Kamoda H, Yamauchi K, Orita S, Suzuki M, Oikawa Y, Inage K, Kubota G, Sainoh T, Sato J, Takahashi K, Ohtori S (2016) Muscle injury in rats induces upregulation of inflammatory cytokines in injured muscle and calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglia innervating the injured muscle. *Muscle Nerve* 54: 776-782
- [20] Suzuki M, Inage K, Sakuma Y, Orita S, Yamauchi K, Suzuki T, Suzuki M, Kubota G, Oikawa Y, Sainoh T, Sato J, Fujimoto K, Shiga Y, Abe K, Kanemoto H, Takahashi K, Ohtori S (2016) Effect of administration of antibodies against nerve growth factor in a rat model of muscle injury. *Injury, Int. J Care Injured* 47: 609-612
- [21] 寺中 香, 坂本淳哉, 近藤康隆, 濱上陽平, 関野有紀, 片岡英樹, 中野治郎, 沖田実 (2014) ラット膝関節炎モデルに対する患部の不動ならびに低強度の筋収縮運動が腫脹や痛覚閾値におよぼす影響. *Pain Res* 29: 151-160

[Original Article]

Short-term immobilization following muscle injury delays pain recovery.

Tomoko Koeda¹, Takumi Takayama^{1,2}, Hikaru Suzuki^{1,3}, Ayaka Ochiai^{1,4},
Mao Sato^{1,5}, Masanori Watanabe¹, Yuta Itoh¹

Abstract

Objective: This study aimed to examine the impact of short-term immobilization after muscle injury on pain and recovery from tissue damage.

Materials and Methods: Muscle injury was induced in the gastrocnemius muscle (GC) of 8-week-old male Wistar rats using the drop-mass method. One group of injured hind limbs was allowed to move freely, while the other had their knee and ankle joints immobilized for 72 hours with a plaster cast, keeping the knee and ankle joint in an extended position. We measured the muscular mechanical withdrawal threshold in rats with bilateral GC injury and performed immunohistochemistry for nerve growth factor (NGF) in the dorsal root ganglion (DRG) following fluorogold injection into the muscles of rats with unilateral GC injury. The injured GC tissue was stained with hematoxylin and eosin and examined under a microscope.

Results: The muscular mechanical withdrawal threshold significantly decreased in both groups 6 hours after the muscle injury, with no significant difference between them. However, 72 hours after the injury, the non-immobilized group showed a trend toward recovery ($p < 0.05$), while the immobilized group did not. The number of NGF-immunoreactive neurons in the DRG was significantly lower in the non-immobilized group than in the immobilized group ($p < 0.05$). There was no significant difference in tissue recovery between the two groups.

Conclusion: Short-term immobilization following muscle injury does not impact tissue recovery but delays pain relief.

Keywords: muscle injury, immobilization, muscular mechanical withdrawal threshold, nerve growth factor, inactive pain

1 Nagoya Gakuin University

2 Nishio Municipal Hospital

3 Toyota Memorial Hospital

4 Matsusaka City Hospital

5 Nagoya University Hospital