

原著

摂食量の違いが持続的伸張運動による 廃用性筋萎縮からの回復効果に及ぼす影響

三宅沙知*¹ 瀬部真由*¹ 中村博範*¹

要 約

廃用性筋萎縮は、療養のための安静臥床やギプス固定などにより筋肉が痩せ衰える廃用症候群の一種である。廃用性筋萎縮に対する回復促進はリハビリテーションにおける主要な課題の一つである。本研究では、廃用性筋萎縮モデルマウスを作成し、萎縮からの回復時の持続的伸張運動と摂食量が骨格筋組織および炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響について検討した。雄 C57BL/6J マウス10週齢を用い、対照群 (Pre群) と2週間のギプス固定により廃用性筋萎縮を惹起させた群 (Cast群) を設けた。その結果、Cast群のヒラメ筋、腓腹筋、足底筋の湿重量は、Pre群と比較して有意に減少していた。Cast群の廃用性筋萎縮惹起の有無を確認後、さらに、回復実験群として自由摂食群 (F群)、自由摂食/運動負荷群 (FR群)、摂食制限群 (R群)、摂食制限/運動負荷群 (RR群) の4群に振り分け、1週間飼育を行った。回復実験群においては、ヒラメ筋湿重量はすべてにおいてCast群よりも増加傾向を示し、F群、RR群は有意 ($p<0.05$, $p<0.01$) に増加した。ヒラメ筋繊維横断面積はF群、FR群で顕著な増加が観察された。一方、炎症性サイトカイン産生量は、R群においてのみ増加傾向を示した。これらの結果から、廃用性筋萎縮の回復初期には、運動および摂食量に関係なく骨格筋重量は増加すること、十分な摂食量の確保は筋繊維の損傷回復を促進するが、摂食制限は体内での炎症反応を悪化させる可能性が示唆された。

1. 緒言

世界でも類をみないほどの急速な長寿社会を迎えつつある我が国において、寝たきりの患者は増加の一途をたどっている¹⁾。一旦病気や怪我などで治療のため安静状態を余儀なくされると、大幅かつ容易に身体能力は低下する。廃用性筋萎縮とは、長期間におけるギプス固定や寝たきりなど安静状態を継続することが原因で引き起こされる筋萎縮であり、結果として、筋肉量減少や筋力低下をもたらし、QOL低下に繋がる。廃用性筋萎縮の予防・改善に向けた支援として、リハビリテーション (以下、リハと略) と栄養療法の併用が強く求められている^{2,3)}。また、疾患やその治療によってもたらされる体内における慢性的な軽度の炎症も、TNF α や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を活性化し、筋萎縮を引き起こすことが知られている^{4,5)}。近年、廃用性筋

萎縮の回復過程に惹起する炎症反応と治療との関連性も注目されており⁶⁾、栄養不良はリハの転帰や身体機能の低下と関連していることから、廃用性筋萎縮の回復に対するアプローチとして、リハと栄養療法の併用が重要かつ必要であることが広く認知されつつある⁷⁾。令和2年度診療報酬改定においても、患者の栄養状態を踏まえたきめ細かなリハとリハに合わせた栄養管理の推進が望まれている⁸⁾。しかし、実際はリハを実施している患者の多くが栄養障害を認めている。10年間にわたる高齢者の栄養不良について調査した研究では、高齢者の低栄養の割合は地域社会5.8%、介護施設13.8%、病院38.7%、リハ施設50.5%とリハ施設でもっとも低栄養の割合が高いことを報告している⁹⁾。さらに、低栄養の場合ではリハの予後が悪いことも、既に廃用症候群、脳卒中、大腿骨近位部骨折などの症例で報告されている¹⁰⁻¹²⁾。

*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科
(連絡先) 三宅沙知 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学
E-mail : s-miyake@mw.kawasaki-m.ac.jp

しかしながら、廃用性筋萎縮の回復期に有効な対処法として確立しているのはリハのみである。飢餓の状態では機能改善を目標としたリハを実施すると、エネルギー消費をさらに亢進させ、低栄養を悪化させることは容易に想像ができる。それにも関わらず、栄養状態が廃用性筋萎縮の回復に及ぼす影響については観察研究がほとんどであり¹³⁻¹⁵⁾、栄養介入効果に対する根拠は弱いのが現状である。さらに、リハおよび摂食量が廃用性筋萎縮からの回復段階における炎症性サイトカイン産生に与える影響についての報告はこれまでにない。そこで本研究では、基礎的研究として、後肢ギプス固定により誘発した廃用性筋萎縮モデルマウスを用い、廃用性筋萎縮回復時の運動や摂食制限が、筋萎縮の回復に与える影響について、筋重量と筋横断面積、および血中サイトカイン量の面から明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1 倫理的配慮

本研究は、川崎医療福祉大学動物実験等の実施に関する規定に則って行われ、川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号：20-005）。

2.2 実験プロトコール

実験プロトコールを図1に示す。実験動物には10週齢の雄C57BL/6Jマウス（日本クレア株式会社）を用いた。飼料は、MF粉末飼料（オリエンタル酵母工業株式会社）を使用し、室温 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12時間明暗サイクル（明朝8：00～20：00）の環境下で、飼育用ケージにて個別に飼育した。飼育開始時を0

日とし、1週間の予備飼育後に脱血死させ、サンプル採取、測定した群をコントロール群（以下、Pre群：n=6）とした。1週間の予備飼育後に両足後肢を膝関節伸張、足関節背底屈位にてギプス固定を行い、2週間の通常飼育後に脱血死させ、サンプル採取、測定した群をギプス固定群（以下、Cast群：n=5）とした。1週間の予備飼育後にギプス固定を行い、2週間の通常飼育後にギプス固定を外し、1週間の回復期間を設けて脱血死させ、サンプル採取、測定を行った群を回復実験群とした。1週間の回復期間の飼育条件により、通常飼育を行う自由摂食群（以下、F群：n=6）、自由摂食/運動負荷群（以下、FR群：n=5）、摂食制限群（以下、R群：n=5）、摂食制限/運動負荷群（以下、RR群：n=5）の4群に群別した。すべての群において、1週間の予備飼育期間、2週間のギプス固定期間中の食餌と水は自由摂食とした。

体重ならびに摂食量の測定は、毎日決まった時間（9：00～10：00）に行い、その時に食餌と飲料水（水道水）をともに新鮮なものに取り換えた。摂食制限群（R群、RR群）の飼料は、自由摂食群（F群、FR群）の前日の平均摂食量の60%となるように量を調節した。摂食制限の設定は、ヒトにおいて、回復期リハ病棟入棟患者が栄養障害を引き起こしていると報告されている、推定エネルギー必要量に対する60%の摂食量を参考にした。さらに、摂食制限期間は1週間と短期間ではあるが、廃用性筋萎縮誘発後の摂食制限の影響を検討した先行研究はないことから、マウスに自由摂食の60%制限食を2カ月間与えても生命維持に問題ないと報告されている量とした^{13,16-19)}。各期間の体重ならびに摂食量は、期間の

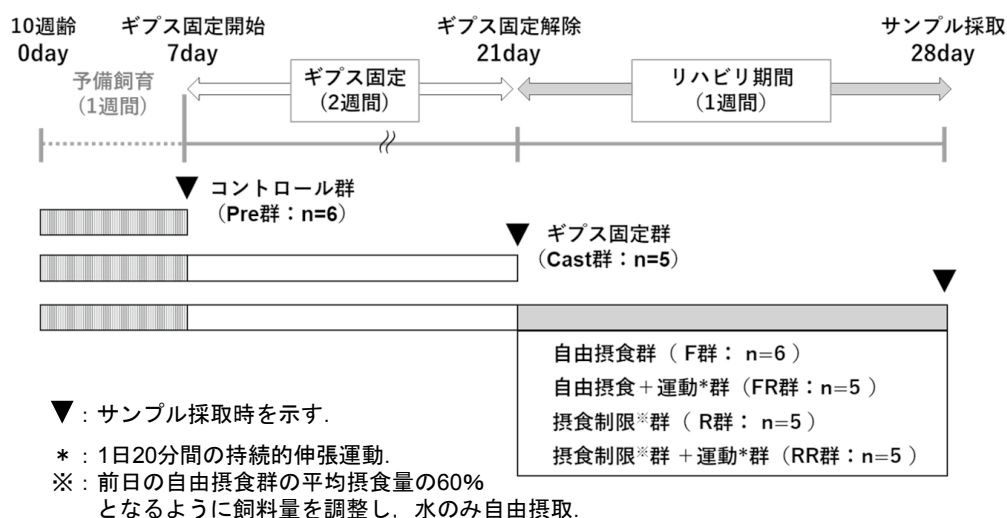


図1 実験プロトコール

初日から期間最終日までの毎日の体重の平均値を用いた。回復期間の体重変化率は、回復期の初日と最終日の体重の値を比較して得た。

2.3 ギプス固定

ギプスには1000 μ lチップを輪切りにした中央部分をさらに縦半分に切断した物（幅5~6mm×長さ2.5cm）を使用した。切断面はやすりで削り、痛みを感じさせないように、マウスの肢に触れる部分は特に丁寧に処理をした。その後、チップを粘着包帯（ニチバン株式会社）で二重にカバーした。粘着包帯を直接後肢に巻いた後、ギプスで挟み、粘着包帯で固定した上からさらに3Mテープ（スリーエムジャパン株式会社）で固定をした。ギプスは両足で約2g以内に収まるように調節し、イソフルラン吸入麻酔下にてギプス固定を行った（図2）。毎日固定部位を確認し、マウスに苦痛を与えないようにした。なお、ギプス固定中でもマウスは前肢にて飼育ケージ内を移動でき、食餌と水は自由に摂取できることを確認した。

2.4 持続的伸張運動

FR群とRR群においては、廃用性筋萎縮の回復期におけるリハとして進行抑制効果の認められている持続的伸張運動を行った^{20,22)}。ギプス固定解除後、3種混合麻酔薬（ドミツール・ドルミカム・ベトルファール）0.1mL/10g体重あたりを腹腔内に注入し、麻酔を行った。その後、非伸縮性のテープを用いて両側足関節をその日の最大背屈位に20分間保持し、持続的伸張運動とした。このようなりハを1週間毎日実施した（図3）。また、麻酔による全身状態への影響を考慮し、F群とR群のマウスにも同時間、同程度で麻酔のみの処理を行った。

2.5 試料採取

3種混合麻酔薬下（0.1mL/10g体重あたり）にて心臓直刺にて採血し、その後即座に脱血死させた。採血した血液は30分静置後、ハイブリット冷却遠心分離機G200（久保田商事株式会社）を用い、10分間遠心分離（3,000rpm）して血清を採取し、-80℃の冷凍庫に保存した。左足のヒラメ筋（Soleus：以下、SOL）、足底筋（Plantaris：以下、PLA）、腓腹筋（Gastrocnemius：以下、GAS）、肝臓、脾臓、腹腔内脂肪、皮下脂肪を摘出し、各湿重量の測定を行った。さらに、凍結ブロックを作製するために、右ふくらはぎを摘出し、コルク片の上に作成したトラガントゴム（ナカライテスク）の土台の上に垂直に固定し、液体窒素で冷却したイソペンタン中にて急速凍結を行い、骨格筋凍結検体とした。切片作製部位による誤差を無くすために、土台の上に固定する際に、アキレス腱の遠位端よりのおよそ3~5mm

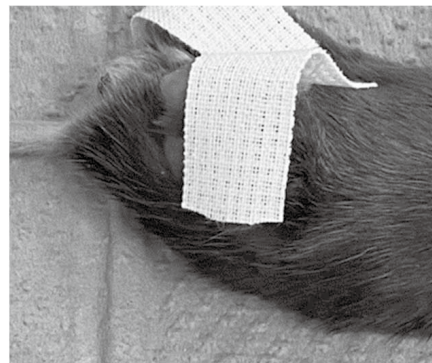
長の範囲に印をつけておいた。

2.6 筋組織測定

骨格筋凍結検体はクライオスタット（ライカバイオシステムズ）を用いて10 μ m厚で横断に薄切りにし切片を作成した。凍結切片は、ヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色を施し、倒立顕微鏡IX83（オリンパス）を用いて、筋線維の組織的観察を行った。さらに、20倍の拡大像でパーソナルコンピューターに取り込み、無作為に撮影した写真の1視野あたり100本の筋線維を数え、画像解析ソフトウェアImageJ（NIH）で筋線維の平均横断面積を測定した。



図2 ギプス固定時のマウス



非伸縮性テープを用い、足関節を最大背屈位に保持した。

図3 持続的伸張運動の方法

2.7 炎症性サイトカイン測定

ELISA法(Biolegend)を使用し、採取した血清を用いて指定の手順に従って、IL-6, IL-1 β , TNF α の血清中濃度を測定した。自動マイクロプレートリーダー(Bio-Rad)により、450nmと570nmのフィルターを用いて発色測定し、定量化した。

2.8 統計処理

結果は平均値 \pm SEM(標準誤差)で表した。得られたデータは統計ソフトIBM SPSS Statistics(ver. 23)を用いて1元配置分散分析(One-way ANOVA)後、有意差があった場合にはTukey-Kramer法を用いて群間で平均値を比較した。正規性を仮定できない場合は、ノンパラメトリック検定であるKruskal-Wallis testを用いた。いずれの結果も、有意水準は $p<0.05$, $p<0.01$ とした。

3. 研究結果

3.1 ギプス固定による影響

3.1.1 体重と摂食量

ギプス固定前のPre群と2週間のギプス固定を施したCast群の平均体重は、Pre群 25.07 ± 0.24 g, Cast群 25.22 ± 0.31 gとなり差はなかった。1日当たりの平均摂食量は、Pre群の 3.55 ± 0.05 gに対し、Cast群は 3.90 ± 0.06 gと高い傾向を示したが、2群間に有意な差はなかった。

3.1.2 骨格筋湿重量

Pre群およびCast群のSOL, PLA, GASの骨格筋湿重量(相対体重比)を図4に示す。Pre群と比較して、Cast群はSOL, PLA, GAS全ての骨格筋において湿重量が有意($p<0.01$)に減少していた。

3.1.3 筋線維横断面の観察および筋繊維平均横断面積

Pre群およびCast群のSOLの筋繊維切片の光学顕微鏡画像および筋繊維の平均横断面積を図5に示す。Pre群と比較してCast群において筋線維の萎縮が顕著であった。筋線維横断面積は、Pre群 $1466\pm 38\mu\text{m}^2$ と比較してCast群は $687\pm 34\mu\text{m}^2$ と、有意($p<0.01$)に減少していた。

3.2 回復期における持続的伸張運動と摂食量の影響

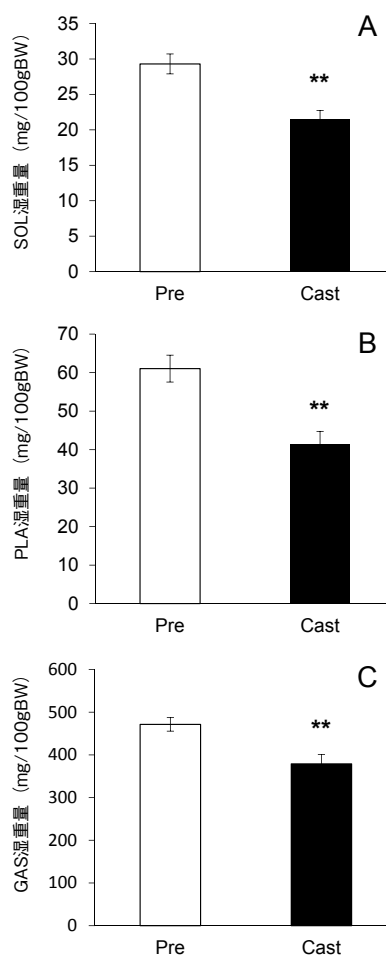
3.2.1 回復実験群の期間別の体重および摂食量

各回復実験群(F群, FR群, R群, RR群)の予備飼育期間(Pre期間), ギプス固定期間(Cast期間), 回復期間(リハ期間)の体重, 回復期間の体重変化率, および各期間の摂食量を表1に示す。Pre期間, Cast期間の体重および摂食量に有意差を認めなかった。回復期間では、自由摂食させたF群, FR群と比較して、摂食制限をしたR群, RR群において、体重

および摂食量ともに有意($p<0.05$, $p<0.01$)に低値であった。

3.2.2 骨格筋および臓器湿重量

実験終了時のPre群, Cast群と各回復実験群の骨格筋および臓器の相対湿重量を表2に示す。SOLはCast群に比べ、F群, RR群で有意($p<0.05$)に増加していた。PLA, GASの湿重量は、Cast群と比較して回復実験群では、いずれも維持または増加傾向を示したものの、Pre群のレベルまでの回復は認められなかった。臓器湿重量では、R群, RR群がCast群と比較して、肝臓が有意($p<0.01$)に減少していた。さらに、F群と比較して肝臓と皮下脂肪が、FR群と比較して肝臓, 腹腔内脂肪, 皮下脂肪が有意($p<0.05$)に減少していた。



A: SOL (ヒラメ筋), B: PLA (足底筋), C: GAS (腓腹筋)
平均値 \pm SEM
**: Preに対して有意差あり ($p<0.01$).

図4 ギプス固定による骨格筋湿重量への影響

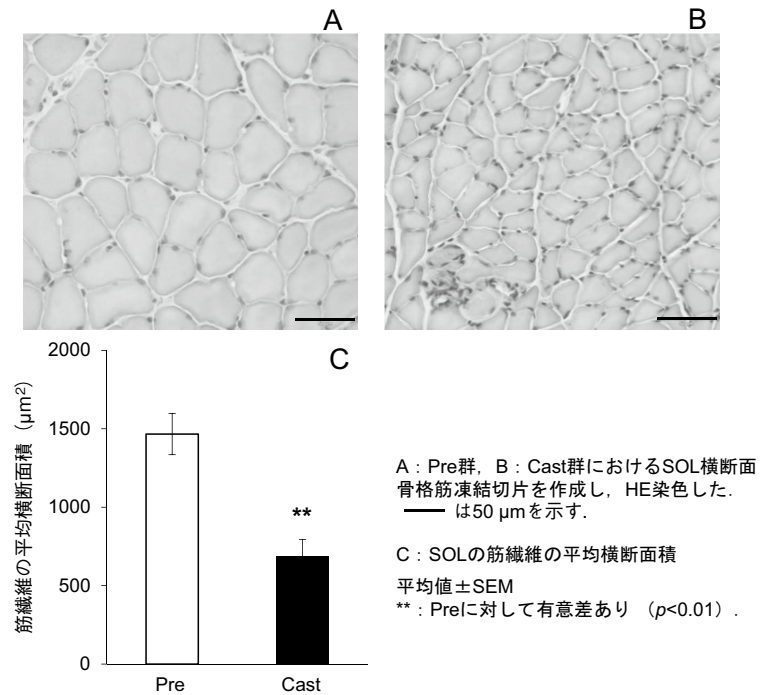


図5 SOLのHE染色画像および横断面積

表1 回復実験群における体重および摂食量

	F群	FR群	R群	RR群
Pre期間体重 (g)	25.3 ± 0.6	24.4 ± 0.8	24.5 ± 0.7	25.3 ± 0.5
Cast期間体重 (g)	24.9 ± 0.5	24.3 ± 0.6	24.3 ± 0.5	24.7 ± 0.1
リハ期間体重 (g)	24.5 ± 0.8 ^a	24.0 ± 0.7 ^{ab}	21.4 ± 0.6 ^c	21.6 ± 0.3 ^{cb}
体重変化率 (%)	4.3 ± 1.0 ^a	1.1 ± 1.8 ^a	-10.8 ± 2.6 ^b	-12.5 ± 1.6 ^b
Pre期間摂食量 (g)	3.5 ± 1.4	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.0	3.5 ± 0.1
Cast期間摂食量 (g)	4.1 ± 0.1	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.1	4.0 ± 0.1
リハ期間摂食量 (g)	3.6 ± 0.1 ^a	3.5 ± 0.1 ^a	2.5 ± 0.1 ^b	2.3 ± 0.1 ^b

平均値±SEM

abc: 異なる文字間で有意差あり (p<0.05).

各期間体重, 各期間摂食量: 1週間または2週間の1日当たりの平均値を示す.

体重変化率 (%): (リハ期間最終日体重-リハ期間初日体重)/リハ期間初日体重×100で求めた値を示す.

表2 各実験群における骨格筋と臓器湿重量

	Pre群	Cast群	F群	FR群	R群	RR群
SOL	29.3±1.4	21.5±1.2	32.4±2.0*	29.8±1.6	30.3±4.2	35.2±1.2**
PLA	61.0±3.5	41.4±3.4 [§]	46.7±2.8	56.6±5.9	47.4±3.6	43.5±4.8 [§]
GAS	471.4±15.8	379.0±22.0 [§]	421.7±14.6	400.9±16.7	368.9±18.1 [§]	356.5±17.6 [§]
肝臓	5.08±0.25	5.01±0.19	5.02±0.11	4.86±0.05	3.92±0.17** ^{§#†}	3.97±0.16** ^{§#†}
腹腔内脂肪	0.68±0.06	0.82±0.14	0.45±0.06*	0.59±0.08	0.20±0.07 ^{§†}	0.18±0.07 ^{§†}
皮下脂肪	0.64±0.03	0.49±0.06	0.57±0.04	0.54±0.03	0.32±0.07 ^{§#†}	0.29±0.04 ^{§#†}

平均値±SEM, 重量は全て相対重量値 (mg/100gBW) = 湿重量 (mg) / 体重 (g) × 100で表している.

*: Castに対して有意差あり (**p<0.01, *p<0.05).

§: Preに対して有意差あり (p<0.05), #: Fに対して有意差あり (p<0.05), †: FRに対して有意差あり (p<0.05).

3.2.3 筋線維横断面の観察および筋線維平均横断面積

SOLの筋線維横断面は、Cast群と比較してすべての回復実験群において拡大していることが観察された。各回復実験群のSOLの筋線維切片の光学顕微鏡画像および、Cast群と各回復実験群の筋線維の平均横断面積を図6に示す。筋線維横断面積は、Cast群と比較して、すべての実験群において有意 ($p<0.01$) に増加していた。さらに、R群、RR群と比較して、F群、FR群の筋線維横断面積が有意 ($p<0.01$) に大きいことが確認できた。RR群はCast群と比べ、筋線維が大きい個体もあったが、RR群の中でも間質の浮腫、細胞浸潤、内在核数が

増加している個体が認められた (図7)。

3.2.4 炎症性サイトカインの血清中濃度

炎症性サイトカインであるIL-6、IL-1 β 、TNF α の血清中濃度を図8に示す。IL-6は、摂食制限を行ったR群では6例中3例で検出限界 (7.8pg/ml) を超える値が測定されたが、他の群では測定限界を超える異常な高値を示したCast群の1例を除き、すべてが検出限界以下であった。IL-1 β でも、R群では3例で検出限界 (31.3pg/ml) を超える値が測定されたが、検出限界を超えた値が測定されたのは、他の群ではF群の5例中1例のみであった。TNF α は、すべての群で検出限界 (7.8pg/ml) 以下であった。

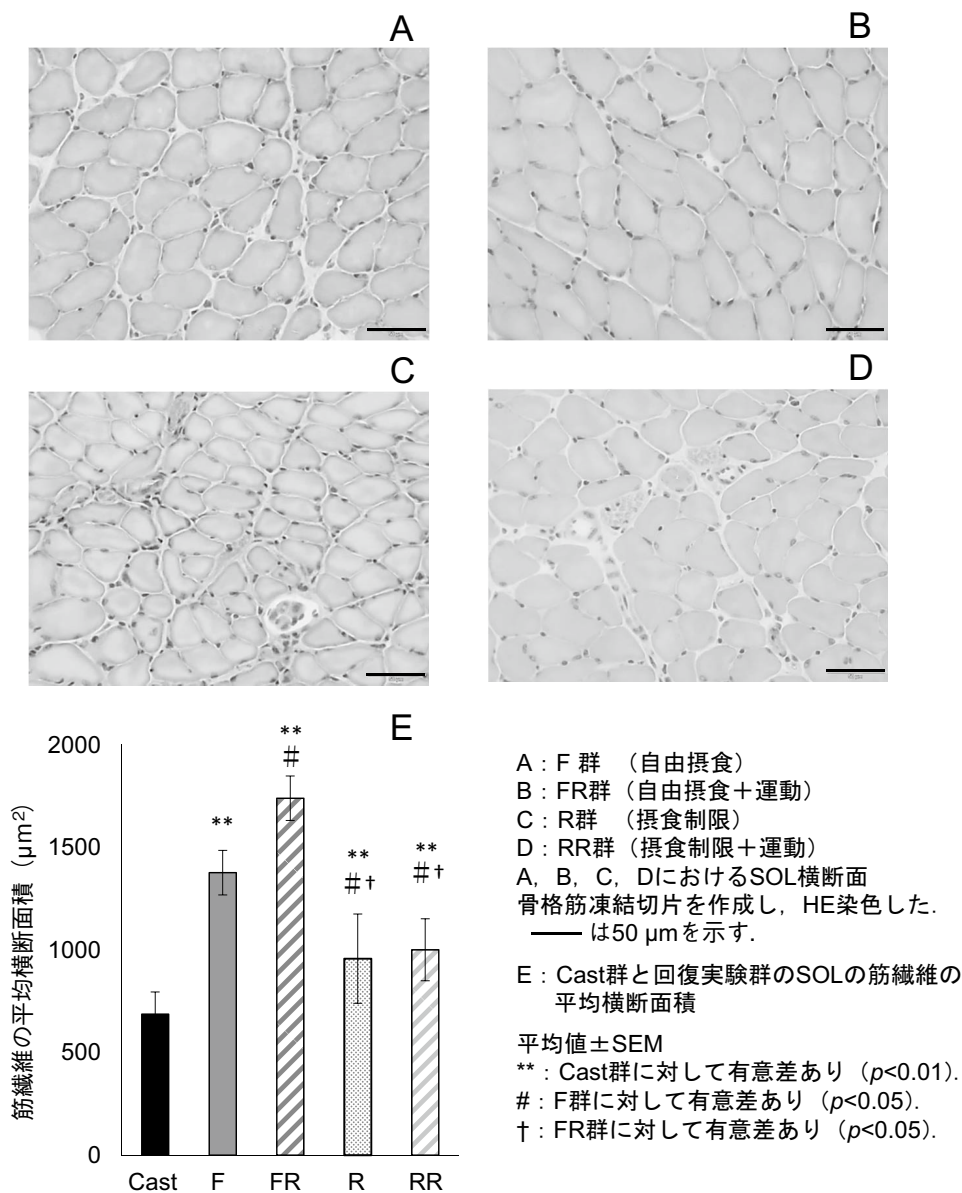
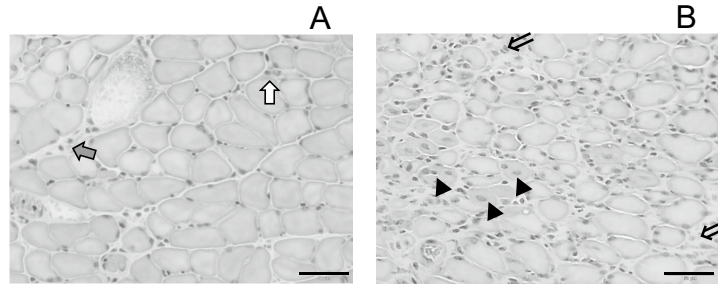


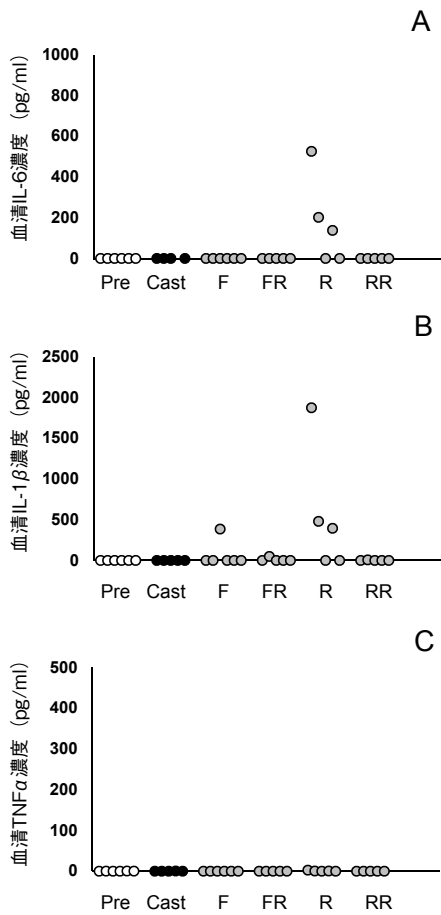
図6 各実験群におけるSOLのHE染色画像および横断面積



廃用性筋萎縮を惹起させ、摂食制限と運動を1週間実施した後、骨格筋凍結切片を作成し、HE染色したSOL横断面を撮影した。
 — は50 μmを示す。

A: 好中球や間質への浮腫が認められた画像, ↑ 好中球, ↑ 間質の浮腫
 B: 内在核や浸潤が認められた画像, ▲ 内在核, ↑ 浸潤

図7 RR群におけるSOLのHE染色画像



A: IL-6の血清濃度, B: IL-1βの血清濃度,
 C: TNFαの血清濃度

各サークルは個々の個体における値を示す。
 採取した血清を用いてELISA法にて測定した。
 X軸上のプロットは検出限界 (IL-6, TNFα: 7.8pg/ml,
 IL-1β: 31.3pg/ml) 以下であったことを示す。

図8 各実験群における炎症性サイトカイン血清濃度

4. 考察

4.1 ギプス固定による廃用性筋萎縮

廃用性筋萎縮の惹起について検討した結果、Pre群と比較して2週間のギプス固定を実施したCast群において、SOL、PLA、GASのすべての湿重量が有意に減少していた。また、SOL切片の組織学的観察においても筋線維の萎縮が確認され、筋線維横断面積は有意な減少を認めた。げっ歯類動物を対象とした骨格筋萎縮モデルの中でも、マウスを用いた両後肢ギプス固定の廃用性筋萎縮モデル作成は難しく、先行研究もまだ少ない^{23,24)}。本研究では、これまでげっ歯類でよく用いられてきた足関節のギプス固定法とは異なり、足関節を最大底屈位に固定するというギプス固定法を用いた。これによりギプス固定の技術的負担が軽減されるとともに、SOLを短縮させた状態で下肢を不動化することにより、SOL、PLA、GASの全てにおいて著しい筋萎縮を惹起させることができた。また、ギプス固定ストレスによる体重減少が懸念されたが²⁵⁾、本研究ではCast群の体重減少は見られず、本研究で用いたギプス固定の方法は摂食量に影響を与えず遅筋と速筋をともに萎縮させる適切な方法であると考えられた。

4.2 回復期における変化

Cast群と実験群の最終体重を比較すると、摂食制限を実施したR群、RR群において有意に減少していた。ギプス終了時から1週間のリハビリ期間終了時の体重増減率をみても、F群と比較して、R群、RR群は有意に減少したことから、摂食制限による体重減少は明らかであったと考える。臓器湿重量ではCast群と比較し、R群、RR群において、肝臓、腹腔内脂肪が有意に減少していた。さらに、F群、FR群と比較して肝臓と皮下脂肪が、FR群と比較して腹腔内脂肪が有意に減少していたことから、臓器

湿重量の減少はリハによる影響はほとんどなく、摂食量の減量によるものであることが示唆され、運動の有無にかかわらず1週間の60%への摂食制限が体重減少をもたらすことは明らかであった。

SOL湿重量はCast群と比較してすべての実験群で増加傾向を示し、F群とRR群においては有意に増加していた。PLA湿重量は個体差があるものの、Cast群と比べて実験群において維持または増加傾向であった。GAS湿重量は自由摂食群においてのみ増加傾向を示した。しかし、PLA、GASの湿重量は、いずれもPre群の湿重量までは回復しなかった。若年期に生じた廃用性筋萎縮は、運動負荷を行わなくてもギプス固定を解除することによって、速やかに回復するが、筋萎縮後の回復率は速筋であるPLAに比べて、遅筋であるSOLにおいて同化作用が高まる可能性があることが報告されている^{26,27}。楠間ら²⁶は、ギプス除去後4週間後の通常飼育で正常の90%程度に回復し、適切な運動負荷などの処置を行えば、遅筋のSOLだけでなく速筋のPLAやGASにおいても回復が促進される可能性があることが報告している。実際、本研究においても、摂食制限やリハの影響に関係なく、ギプス固定解除により速筋であるPLAやGASの湿重量はSOLの湿重量ほど増加していなかった。本研究では、ギプス解除後1週間という短期間の検討であったため、PLAやGASなどの速筋群への影響が小さかったと考えられた。

SOLの筋線維横断切片の光学顕微鏡像は、筋繊維面の縮小が著しかったCast群と比較し、すべての回復実験群において筋繊維面の拡大が観察できた。筋繊維横断面積を解析したところ、Cast群と比べてFR群が最も有意に増加しており、次にF群と続き、F群と比較してもFR群は有意に増加していた。R群、RR群においてもCast群と比べると有意な増加が認められたが、F群、FR群よりは有意に小さかった。また、R群、RR群の両群間に差は認められなかった。これは、骨格筋湿重量、臓器湿重量に及ぼすリハの影響とは異なることを示す。すなわち、十分な摂食量が確保されている条件下でのリハは、筋繊維サイズの回復を促進させることを示唆している。また、RR群の筋繊維横断切片画像には、好中球やマクロファージの浸潤、細胞間質の浮腫、中心核がみられたものがあり、筋萎縮の太さの回復が見られたものの、炎症の誘発も示唆された。この結果は、摂食制限のみを行ったR群には見られなかったものであり、炎症は筋萎縮の回復を遅らせるという報告²⁸もあることから、摂食制限下におけるリハが、萎縮した筋繊維の回復促進に必ずしも貢献するとは限らないことを示す結果であると考えた。

日常の場面における摂食制限が、自由摂食と比較して炎症の誘発を抑制することは、すでに様々な研究で明らかになっている^{19,29,30}。これに反して、本研究で検証を行った廃用性筋萎縮の回復過程における摂食制限は、炎症反応を誘発させる恐れが懸念された。さらに、摂食制限とリハを組み合わせたRR群は、SOL湿重量が有意に増加していたにも関わらず、筋線維横断面積は、自由摂食したF群、FR群ほどの回復は見られず、R群と同程度の回復に留まっていた。つまり、RR群におけるSOL湿重量増加は、筋横断切片の観察から浮腫によるものと推察され、筋湿重量と筋繊維横断面積は比例しないことが明らかとなった。一般的な筋損傷の回復は、筋障害後に浮腫が起き、次に好中球を主体とする細胞の浸潤が起きることによって組織障害が修復され、廃用性筋萎縮後の骨格筋は、適切な負荷をかけることで回復することも知られている³¹。それと同時に、萎縮後の骨格筋に対する自重の負荷は、かえって骨格筋損傷を引き起こすことも示唆されている³²。本研究で激しい廃用性筋萎縮を引き起こした後の組織障害の修復を遅延させた要因には、摂食制限下でリハを行ったことが影響している可能性が示唆された。よって、筋萎縮の回復を検討する際には、筋湿重量でなく筋繊維横断面積を指標とするとともに、筋損傷の程度や好中球およびマクロファージをはじめとする細胞浸潤など炎症の状況も把握する必要があると考えた。

炎症性サイトカインの産生量は、R群にのみ炎症性サイトカインであるIL-6、IL-1 β の上昇がみられ、摂食制限とリハを実施したRR群では炎症性サイトカインの上昇はみられなかった。Chungら²⁹の研究では、通常の老齢マウスに実施した摂食制限が、IL-6、IL-1 β 、TNF α などの慢性的な炎症性サイトカインを減少させることを明らかにしている。しかしながら、廃用性筋萎縮を惹起させた後の回復期における摂食制限は、炎症性サイトカインを抑制しなかった。すなわち、廃用性筋萎縮惹起後の回復期に摂食制限のみを施したR群の炎症性サイトカイン産生量の増加は、摂食制限に依存している可能性が高いと考えられた。一方、摂食制限と同時に持続的伸張運動を行ったRR群では炎症性サイトカインの増加がみられなかった。この結果は、筋萎縮が惹起した際の運動は、炎症性サイトカイン発現抑制効果をもたらすという報告と一致する³³。これは、タンパク質分解酵素や酸化ストレスの増大の緩和が廃用性筋萎縮の進行抑制効果をもたらすと推察している。これらのことより廃用性筋萎縮惹起後の回復期におけるリハの炎症性サイトカイン発現抑制効果は、摂食制限による炎症性サイトカイン上昇作用を打ち消

す効果を持つのではないかと考えられる。しかし、低栄養状態におけるリハの実施が予後を悪化させることは既に知られていることを鑑みると、炎症反応の度合いや廃用性筋萎縮の回復度合いとともに、栄養状態により治療方法を変えることが重要である。本研究でも筋繊維横断面積の結果から、摂食制限下におけるリハは回復を遅延させる恐れが懸念された。低栄養状態下において廃用性筋萎縮の回復リハを長期に実施することは、摂食制限によってもたらされる炎症性サイトカイン産生活性が、リハによる抑制効果を上回り、廃用性筋萎縮の回復に悪影響を生じさせることが懸念される。したがって、これらの疑問を解明するためには、廃用性筋萎縮の回復に

対するリハ介入時における摂食量の影響について、期間をさらに延長して検討をすると同時に、筋萎縮関連遺伝子群の発現検討および筋肉の組織学的解析を行う必要があると考える。

本研究では、廃用性筋萎縮の治療に焦点を当てた。ギプス除去後の廃用性筋萎縮に対するリハ介入による筋萎縮回復効果に、摂食量の違いがどのような影響を与えるかについて、動物モデルを用いて検討した。その結果、たとえ短期間であっても、リハ実施時の摂食制限は萎縮した筋繊維の修復効果を遅延させることが明らかとなり、リハの効果は栄養状態に依存する可能性が示唆された。

利益相反 (COI)

本研究に関連し、開示すべき利益相反 (COI) 関係にある企業等はない。

謝 辞

本研究にご協力いただいた、川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科27期生堀口詩織氏、永井碧海氏、桑村菜摘氏に深謝いたします。本研究は、令和元年度川崎医療福祉研究費の助成により実施いたしました研究成果の一部です。

文 献

- 1) World Health Organization : World Health Statistics 2020.
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332070/9789240005105-eng.pdf>, 2020.
(2021.3.22確認)
- 2) Nagano A, Nishioka S and Wakabayashi H : Rehabilitation nutrition for iatrogenic sarcopenia and sarcopenic dysphagia. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 23, 256-265, 2019.
- 3) Wakabayashi H, Takahashi R and Murakami T : The prevalence and prognosis of sarcopenic dysphagia in patients who require dysphagia rehabilitation. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 23, 84-88, 2019.
- 4) Judge AR, Koncarevic A, Hunter RB, Liou HC, Jackman RW and Kandarian SC : Role for $I\kappa B\alpha$, but not c-Rel, in skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1), C372-C382, 2007, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00293.2006>.
- 5) Shinozaki S, Chang K, Sakai M, Shimizu N, Yamada M, Tanaka T, Nakazawa H, Ichinose F, Yamada Y, ...Kaneki M : Inflammatory stimuli induce inhibitory S-nitrosylation of the deacetylase SIRT1 to increase acetylation and activation of p53 and p65. *Science Signaling*, 7(351), ra106, 2014, <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005375>.
- 6) Nguyen TTN, Choi H and Jun HS : Preventive effects of dulaglutide on disuse muscle atrophy through inhibition of inflammation and apoptosis by induction of Hsp72 expression. *Frontiers in Pharmacology*, 21, 2020, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00090>.
- 7) Hidetaka W and Kunihiro S : Rehabilitation nutrition for sarcopenia with disability: a combination of both rehabilitation and nutrition care management. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 5, 269-277, 2014.
- 8) 厚生労働省 : 令和2年度診療報酬改定の概要—入院医療—.
<https://www.mhlw.go.jp/content/12400000/000691039.pdf>, 2020. (2021.3.22確認)
- 9) Kaiser MJ, Bauer JM, R amsch C, Uter W, Guigoz Y, Cederholm T, Thomas DR, Anthony PS, Charlton KE, ...Sieber CC, for the Mini Nutritional Assessment International Group : Frequency of malnutrition in the older adults: A multinational perspective using the mini nutritional assessment. *Journal of the American Geriatrics Society*, 58, 1734-1738, 2010.
- 10) Hidetaka W and Hironobu S : A retrospective cohort study. *General Medicine*, 12, 69-74, 2011.
- 11) FOOD Trial Collaboration : Poor nutritional status on admission predicts poor outcomes after stroke:

- observational data from the FOOD trial. *Stroke*, 34, 1450-1456, 2003.
- 12) Avenell A and Handoll HH : Nutritional supplementation for hip fracture aftercare in older people. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11, CD001880, 2016, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001880.pub6>.
 - 13) 西岡心大, 高山仁子, 渡邊美鈴, 漆原真姫, 桐谷裕美子, 脇岡澄 : 本邦回復期リハビリテーション病棟入棟患者における栄養障害の実態と高齢脳卒中患者における転帰, ADL 帰結との関連. 日本静脈経腸栄養学会雑誌, 30, 1145-1151, 2015.
 - 14) Nishioka S, Okamoto T, Takayama M, Urushihara M, Watanabe M, Kiriya Y, Shintani K, Nakagomi H and Kageyama N : Malnutrition risk predicts recovery of full oral intake among older adult stroke patients undergoing enteral nutrition: Secondary analysis of a multicentre survey (the APPLE study). *Clinical Nutrition*, 36, 1089-1096, 2017.
 - 15) Nishioka S, Wakabayashi H and Momosaki R : Nutritional status changes and activities of daily living after hip fracture in convalescent rehabilitation units: A retrospective observational cohort study from the Japan Rehabilitation Nutrition Database. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 118, 1270-1276, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.jand.2018.02.012>.
 - 16) 中野長久 : 栄養素の摂取制限が生体機能に及ぼす影響に関する基礎的研究. 日本栄養・食糧学会誌, 58, 231-239, 2005.
 - 17) Albanes D : Caloric intake, body weight, and cancer: a review. *Nutrition and Cancer*, 9, 199-217, 1987.
 - 18) Duffy PH, Leakey JEA, Pipkin JL, Turturro A and Hart RW : The physiologic, neurologic, and behavioral effects of caloric restriction related to aging, disease, and environmental factors. *Environmental Research*, 73, 242-248, 1997.
 - 19) Klebanov S, Diais S, Stavinoha WB, Suh Y and Nelson JF : Hyperadrenocorticism, attenuated inflammation, and the life-prolonging action of food restriction in mice. *The Journals of Gerontology*, 50, B72-B82, 1995.
 - 20) 友利幸之介, 中野治郎, 沖田実, 中居和代, 大久保篤史, 吉村俊朗 : 間歇的伸張運動と持続的伸張運動によるマウスヒラメ筋の廃用性筋萎縮の進行抑制効果について. 理学療法科学, 19, 31-35, 2004.
 - 21) 中田彩, 沖田実, 中居和代, 中野治郎, 田崎洋光, 大久保篤史, 友利幸之介, 吉村俊朗 : 持続的伸張運動の実施時間の違いが関節拘縮の進行抑制効果におよぼす影響. 理学療法科学, 29, 1-5, 2002.
 - 22) 山崎俊明, 立野勝彦, 灰田信英, 武舎進 : 短時間筋伸張位保持が成熟ラットの廃用性筋萎縮予防に及ぼす効果. 理学療法科学, 23(6), 349-354, 1996.
 - 23) Frimel TN, Kapadia F, Gaidosh GS, Li Y, Walter GA and Vandenborne K : A model of muscle atrophy using cast immobilization in mice. *Muscle & Nerve*, 32, 672-674, 2005.
 - 24) 岡本武志 : 身体的不活動時における PGC-1 α の発現量維持が筋萎縮の進行に及ぼす影響. 東海大学短期大学紀要, 51, 11-17, 2018.
 - 25) 富賀裕貴, 須藤みず紀, 安藤創一, 江島弘晃, 松垣靖樹 : 研究上の問題提起マウス片側後肢ギプス固定モデルの非固定脚を対照脚として用いることの問題. 福岡大学スポーツ科学研究, 45, 53-58, 2015-03.
 - 26) 楠間春利, 甲斐悟, 小澤淳也, 川真田聖一 : ギプス固定によるラット下腿萎縮と回復. 理学療法科学, 27, 174-179, 2000.
 - 27) Childs TE, Spangenburg EE, Vyas DR and Booth FW : Temporal alterations in protein signaling cascades during recovery from muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 285, C391-C398, 2003.
 - 28) 後藤勝正 : 骨格筋の再生—筋損傷や筋萎縮からの回復—. 愛知県理学療法学会誌, 25(2), 43-47, 2016.
 - 29) Chung HY, Kim HJ, Kim JW, Jung KJ, Yoon JS and Yu BP : The inflammatory process in aging. *Reviews in Clinical Gerontology*, 10, 207-222, 2000.
 - 30) Chung HY, Kim HJ, Kim JW and Yu BP : The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, 327-335, 2001.
 - 31) Yasuhara K, Ohno Y, Kojima A, Uehara K, Beppu M, Sugiura T, Fujimoto M, Nakai A, Ohira Y and Katsumasa Goto : Absence of heat shock transcription factor 1 retards the regrowth of atrophied soleus muscle in mice. *Journal of Applied Physiology*, 111, 1142-1149, 2011.
 - 32) Tidball JG and Henricks MW : Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *The Journal of Physiology*, 578, 327-336, 2007.
 - 33) Saitou K and Suzuki K : The effects of exercise and massage on disuse muscle atrophy in special focus

on mechanical stress. *International Journal of Musculoskeletal Disorders*, 3, 115, 2019, <https://doi.org/10.29011/IJMD-115.1000015>.

(2021年5月26日受理)

Effects of Food Intake and Sustained Stretching Exercises During Recovery From Disuse Muscle Atrophy

Sachi MIYAKE, Mayu SEBE and Hironori NAKAMURA

(Accepted May 26, 2021)

Key words : disuse muscle atrophy, cast immobilization, sustained stretching exercise, food restrictions, inflammatory cytokines

Abstract

Disuse muscle atrophy (DMA) is a syndrome in which muscles become thin and weak while advised bed rest or cast fixation for medical treatment. Promoting recovery from DMA is a significant challenge. To uncover the effects of sustained stretching exercises and dietary intake on skeletal muscle tissues and inflammatory cytokine production during recovery, we employed a mouse DMA model. 10-week-old male C57BL/6J mice were raised for 1 week (Pre), then immobilized with cast for 2 weeks to induce DMA (Cast) and released. After cast removal, mice were randomly assigned to following 4 groups and analyzed their recovery after 1 week: 1) free-feeding (F), 2) free-feeding/exercise (FR), 3) food restrictions (R), or 4) food restrictions/exercise (RR). The mass of the soleus muscle decreased in Cast group showed significantly increase in all 4 groups, especially in F and RR. While cross-sectional area of the muscle increased in all 4 groups, recovery was more effective in F and FR than R and RR. Conversely, the production of inflammatory cytokines showed an increasing trend in group R. These results suggest that although exercises increase skeletal muscle weight during the early recovery phase, adequate food intake is also quite important to effective recovery from DMA.

Correspondence to : Sachi MIYAKE

Department of Clinical Nutrition
 Faculty of Health Science and Technology
 Kawasaki University of Medical Welfare
 288 Matsushima, Kurashiki, 701-0193, Japan
 E-mail : s-miyake@mw.kawasaki-m.ac.jp
 (Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.31, No.1, 2021 151 – 161)