

関節拘縮発生におよぼす非荷重の影響に関する研究

県立広島大学大学院
総合学術研究科
生命システム科学専攻

博 士 論 文

平成 30 年 3 月
(2018 年)

佐 藤 勇 太

目次

第 1 章	緒言	1
1-1	関節拘縮に対する治療の重要性	2
1-2	関節拘縮に関する研究と倫理	2
1-3	関節拘縮を生じる不活動と動物実験モデル	3
1-4	関節拘縮の原因組織	4
1-5	関節拘縮の進行	5
1-6	非荷重による関節拘縮への影響	6
1-7	本研究の目的	8
第 2 章	非荷重を伴って生じる関節拘縮とヒラメ筋変化	10
2-1	小序	11
2-2	対象と方法	12
2-3	結果	15
2-4	考察	17
2-5	小括	21
第 3 章	非荷重を伴って生じた関節拘縮における皮膚や 靱帯の変化	30
3-1	小序	31
3-2	対象と方法	32
3-3	結果	35
3-4	考察	36
3-5	小括	40

第 4 章	電気刺激が非荷重を伴って生じる関節拘縮と ヒラメ筋変化に与える影響	48
4-1	小序	49
4-2	対象と方法	50
4-3	結果	54
4-4	考察	55
4-5	小括	61
第 5 章	総括	67
	謝辞	71
	引用文献	74

第 1 章

緒言

1-1 関節拘縮に対する治療の重要性

臨床において、患者は廃用症候群を合併することがある。廃用症候群は、不活動により生じる障害¹⁾である。廃用症候群の症状は、身体のほぼすべての臓器に生じ^{1,2)}、筋骨格系では筋萎縮や骨粗鬆症、関節拘縮などが起こる^{1,2)}。理学療法士を対象としたアンケート調査の結果、関節拘縮は筋力低下に次いで2番目に多い治療対象である³⁾。臨床において、関節拘縮は重要な機能障害の一つとして扱われている。関節拘縮が重要な機能障害とされる理由は、関節拘縮の発生により、日常生活に支障をきたす^{4,5)}ことや、転倒しやすくなる⁶⁾と報告されているためである。このように関節拘縮の治療は重要であり、臨床において多くの時間を費やされている。

1-2 関節拘縮に関する研究と倫理

関節拘縮に関する研究は多く、ヒト⁴⁻¹²⁾もしくはマウスやラットなどの実験動物¹³⁻⁵¹⁾を対象として行われている。ヒトを対象とした関節拘縮の研究は、発生頻度⁷⁻⁹⁾や治療効果の判定^{10,11)}などの疫学的な目的のものが多く、病態解明などが少ない。一方、実験動物を対象とした関節拘縮の研究は、治療効果の判定¹³⁻¹⁵⁾や病態解明²⁵⁻⁵¹⁾などの目的で行われている。文部科学省と厚生労働省によって策定された「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」⁵²⁾によると、研究は、研究対象者の生命、健康及び人権を尊重して実施しなければならないと記載されている。このため、実験動物に行うような骨格筋や皮膚、および靭帯などの採取^{14,16-22,24,25,27,29-51)}といった関節拘縮の病態解明に必要な実験手段は、ヒトに対して行うことが困難である。しかし、関節拘縮に対する効果的な治療を考える上で、関節拘縮の病態解明は不可欠である。このため、関節拘縮の病態解明

に関する実験は，動物実験にて行う必要がある。

1-3 関節拘縮を生じる不活動と動物実験モデル

関節拘縮は，ギプス・装具による関節固定や安静・臥床などによる関節運動の減少によって発生することが多い^{26,28,29)}。正常な実験動物の関節は，関節拘縮が生じない⁴⁹⁾ため，関節運動が減少しない。そこで，関節拘縮に関する動物実験では，関節拘縮を再現するために，非伸縮性テープなどを用いて実験動物の関節を固定して関節運動を減少させる関節固定^{13・50)}（図1-1）を行う必要がある。

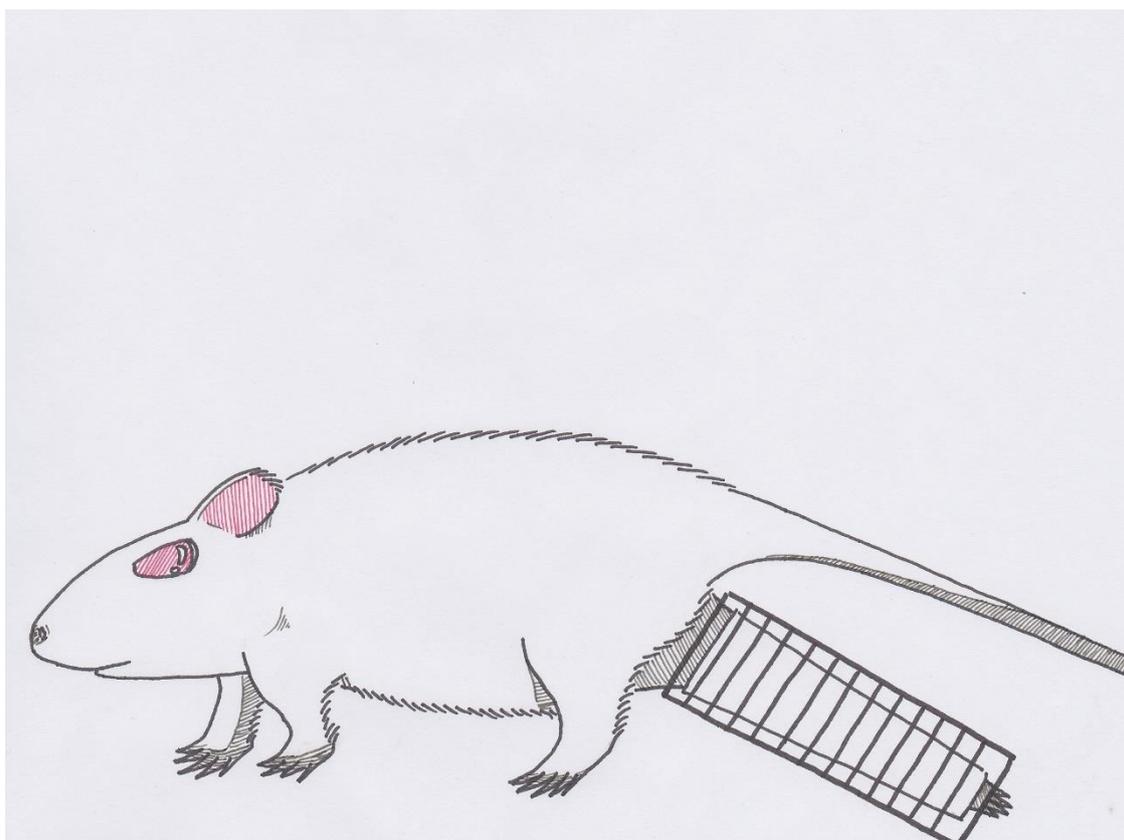


図 1-1 関節固定

ラットの足関節は最大底屈位で関節固定されている。

1-4 関節拘縮の原因組織

正常な関節は、年齢や性別、肢位、個体による差が大きい⁵³⁾ものの、関節ごとに十分な可動性を有しており、自身の力や他者などによる外力によって動かすことが可能である。一方、関節拘縮は、骨格筋や皮膚、靭帯などの関節周囲軟部組織(図 1-2)の器質的変化によって関節の可動範囲である関節可動域に制限が生じるものである⁵⁰⁾。岡本ら²⁵⁾は、ラットを対象とし、足関節を最大底屈位の状態で1, 2, 4, 8, 12週間固定し、固定解除直後、皮膚切開後、下腿三頭筋切除後に計3回足関節背屈角度を測定し、骨格筋や皮膚、その他の関節構成体が関節可動域制限に関与する割合を求めた。その結果、骨格筋の関与する割合は、1週間後が80.5%、2週間後が65.4%、4週間後が54.8%、8週間後が35.4%、12週間後が25.4%であった。皮膚が関与する割合は、1週間後が9.8%、2週間後が13.1%、4週間後が13.0%、8週間後が9.8%、12週間後が8.3%であった。靭帯などが関与する割合は、1週間後が9.7%、2週間後が21.5%、4週間後が32.2%、8週間後が54.8%、12週間後が66.3%であった。このように関節拘縮の原因組織は、関節固定の期間によって、関与する割合が変化する。しかし、いずれの固定期間においても、関節拘縮には、骨格筋や皮膚、および靭帯などが関与する。このため、関節拘縮の原因組織に関する調査は、それぞれの原因組織について実施する必要がある。

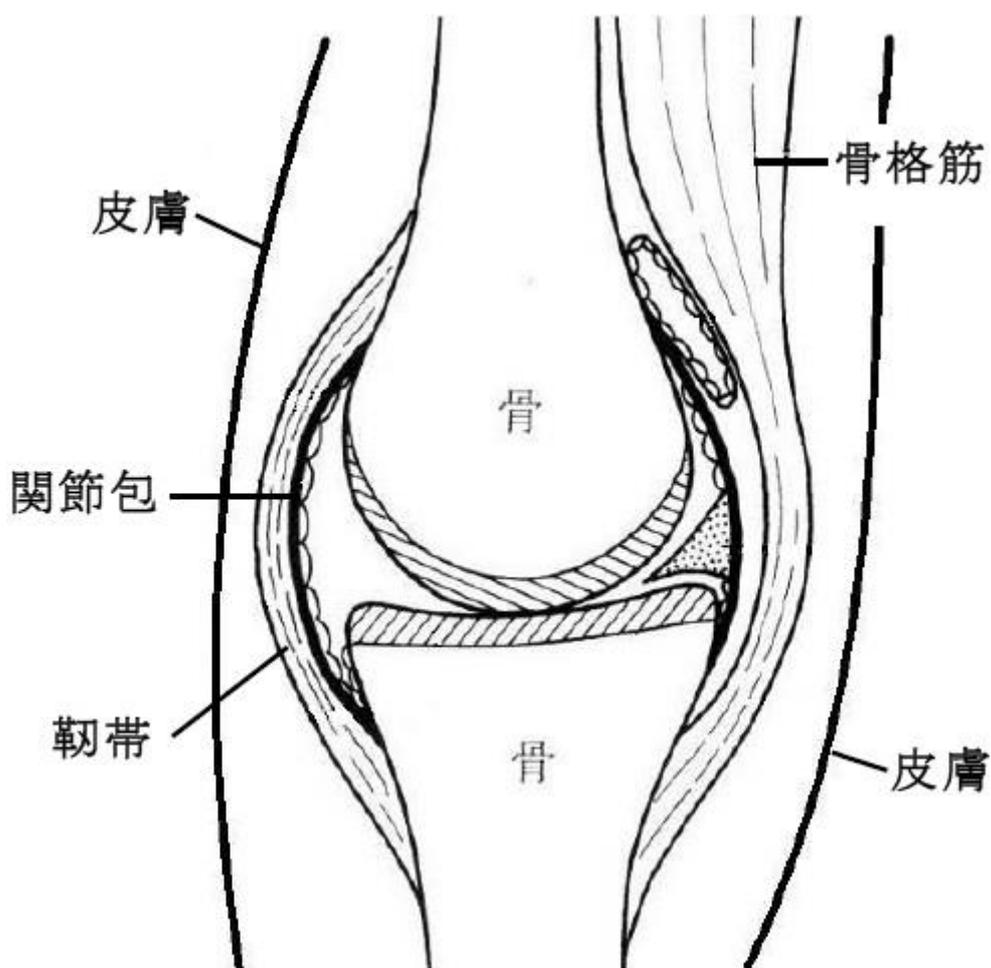


図 1-2 関節周囲軟部組織

(文献⁵⁴⁾より改変引用)

1-5 関節拘縮の進行

沖田ら⁵⁰⁾は、ラットの足関節を最大底屈位の状態で 1, 2, 4, 8, 12 週間固定し、足関節背屈角度を調査した。その結果、正常の足関節背屈角度が 160 度であるのに対し、関節固定後の足関節背屈角度は、1 週間後が 124 度、2 週間後が 108 度、4 週間後が 73 度、8 週間後が 59 度、12 週間後が 48 度であった。さらに沖田ら⁵⁰⁾は、ラットの膝関節を最大屈曲位の状態で 1, 2, 4, 8, 12 週間固定し、膝関節伸展角度を調査した。その結果、正常の膝関節伸展角度が -25 度であるのに対し、1 週間後

が-54度，2週間後が-79.5度，4週間後が-94度，8週間後が-93.5度，12週間後が-96度であった。このように，各関節において，関節拘縮は，1週間で生じ，その後進行していく。関節拘縮が発生した後に，関節拘縮の治療を行った先行研究はいくつかある¹³⁻¹⁵⁾。しかし，一度発生した関節拘縮が正常まで回復した治療は，我々が検索した限りあまりない¹⁵⁾。つまり，関節拘縮が一度発生すると，関節拘縮の改善は，非常に困難となる。このため，1週間の関節固定で生じる関節拘縮をいかに予防するかということが重要である。以上の点から，関節拘縮に関する検討は，特に1週間の関節固定で生じた関節拘縮について実施する必要がある。

1-6 非荷重による関節拘縮への影響

ヒトが宇宙に行く時代になって以来，微小重力環境⁵⁵⁾は，廃用症候群を生じる不活動の一つとして注目されるようになった。宇宙飛行士は，微小重力環境下にて特殊なトレッドミルなどで下肢に荷重して運動を行うことで廃用症候群の予防を図る⁵⁶⁾。

非荷重が生体へおよぼす影響に関して，山崎ら⁵⁷⁾は，ラットの尾部を吊り上げることで後肢を懸垂し，非荷重を再現する後肢懸垂^{23,24,49,57-71)}(図1-3)を2週間実施し，ヒラメ筋の相対体重比と筋横断面積を調査した。その結果，後肢懸垂を実施した群は，対照群と比較して相対体重比と筋横断面積ともに減少した。また，友利ら⁶⁶⁾は，マウスを対象として2週間の後肢懸垂を実施し，ヒラメ筋線維の直径を調査した。その結果，後肢懸垂を実施した群は，対照群と比較してヒラメ筋線維の直径が減少した。このように，非荷重は，廃用性筋萎縮を発症する。

類似，関連する一群の徴候や症状で形成される状態は，症候群⁷²⁾という。非荷重により廃用性筋萎縮が生じた場合，他の廃

用症候群も発生している可能性がある。

非荷重と関節拘縮の関連性について着目すると，山田⁵⁵⁾は，宇宙における微小重力下で関節可動域制限の発生が危惧されていると報告している。また，谷口ら⁹⁾は，入院後に関節拘縮が発生し，非荷重の状態が継続している患者において，関節拘縮の発生部位は，上肢に比べて股関節や膝関節が多いことを報告している。Riley DA et al.⁶¹⁾は，後肢懸垂を実施した場合，関節運動が減少することを報告している。以上の点から，非荷重は，関節拘縮を悪化させる因子となる可能性がある。

しかし現在のところ，非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮に関する病態解明や効果的な予防方法は，検討されていないのが現状である。

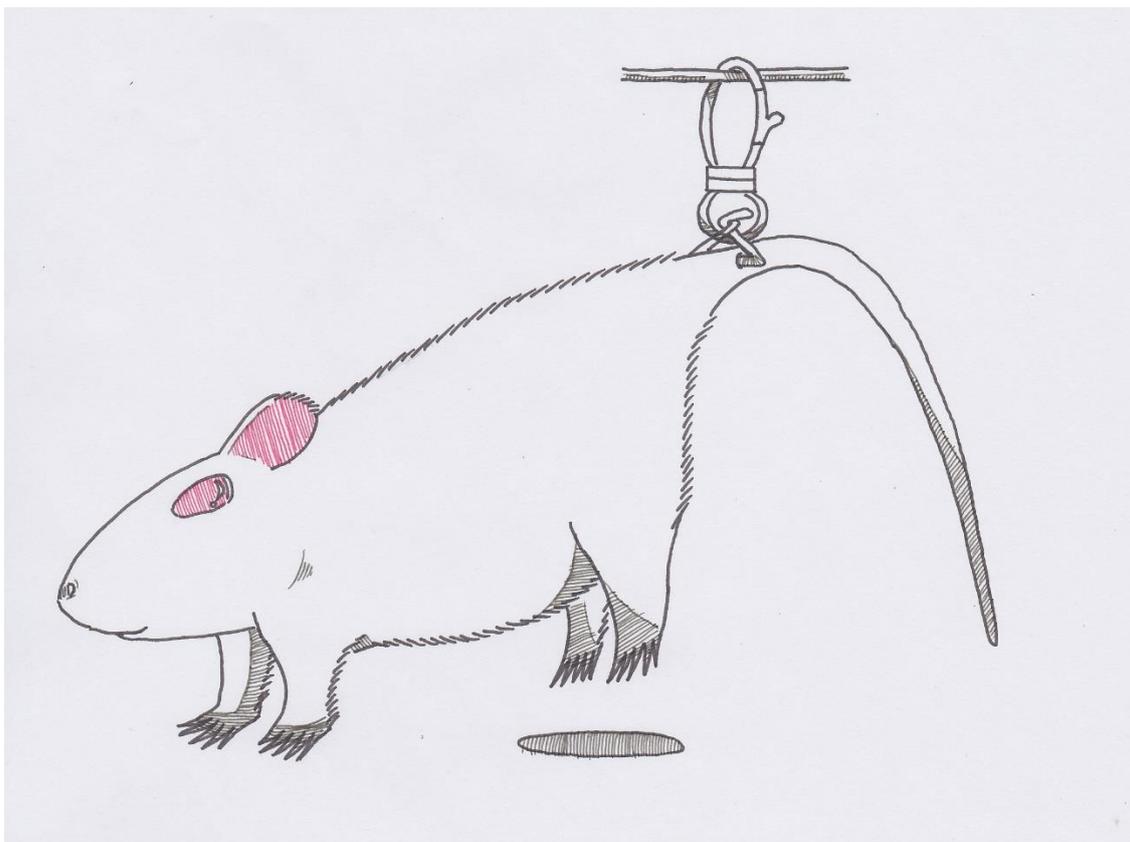


図 1-3 後肢懸垂

後肢懸垂により，後肢は非荷重状態となっている。

1-7 本研究の目的

臨床において，関節拘縮の治療は重要である。関節拘縮に対する効果的な治療方法を検討するためには，病態解明が不可欠である。しかし，病態解明に必要な各原因組織の採取を伴う評価は，倫理的な観点からヒトに対して行うことが困難であるため，実験動物で実施する必要がある。関節拘縮に関する動物実験は，実験動物の関節を固定することで関節拘縮を再現している。このため，本研究では，先行研究と同様に関節拘縮の再現モデルとして動物の関節固定を用いる必要がある。また，関節拘縮の原因組織は，骨格筋や皮膚，および靭帯などである。このため，原因組織ごとに評価は必要である。

さらに，関節固定による関節拘縮の進行は，固定1週間で生じ，その後悪化していく。一度発生した関節拘縮の改善は，非常に困難である。このため，関節拘縮の発生を可能な限り予防する必要がある。このためには，特に関節固定1週間についての検討が重要であり，関節拘縮を悪化させる因子があれば，その因子についての調査を行うべきである。非荷重は，関節拘縮を悪化させる因子である可能性があるが，あまり検討されていない。

以上の点から，本研究では，特に1週間の関節固定で生じる関節拘縮における各原因組織の変化に着目して，関節拘縮発生におよぼす非荷重の影響を明らかにし，効果的な予防方法を検討することを目的とする。

第 2 章

非荷重を伴って生じる 関節拘縮とヒラメ筋変化

2-1 小序

まず、関節拘縮とヒラメ筋変化について述べる。関節拘縮は、関節固定¹³⁻⁵⁰⁾によって骨格筋や皮膚、靭帯などの関節周囲組織が変化することで生じる⁵⁰⁾。特に関節固定1週間の時点において、骨格筋が関節拘縮に関与する割合は、80.5%である²⁵⁾。つまり、関節固定1週間の時点において、関節拘縮の原因組織は、主に骨格筋である。特に足関節を底屈位で固定した場合、1週間時点でのヒラメ筋は、正常と比較して筋膜の主成分であるコラーゲンが増加し^{47,48,50,51)}、伸張性が低下する^{29,49)}。ヒラメ筋の伸張性は関節固定期間の延長に伴い、さらに低下していく³¹⁾。この際、特にヒラメ筋のType Iコラーゲンは、関節固定期間の延長に伴い、さらに増加していく^{47,48,50)}ため、ヒラメ筋の伸張性低下を生じ、関節拘縮を進行する要因であると考えられている。このため、関節拘縮に関与する骨格筋の評価は、伸張性とType Iコラーゲン量を合わせて行うことが有用であると考えられる。

次に、関節拘縮と非荷重の関連について述べる。臨床において、下肢の整形外科的手術後には、関節固定と同時に免荷を必要とされた場合、松葉杖歩行や車椅子使用を余儀なくされ、非荷重を伴うことがある。従来の関節拘縮の動物実験モデルである関節固定は、関節固定期間における実験動物の荷重の有無を考慮した上で実施されていない。このため、中田ら²³⁾や西田ら²⁴⁾は、非荷重を伴って生じる関節拘縮を再現するために関節固定と非荷重の動物実験モデルである後肢懸垂^{23,24,49,57-72)}を組み合わせて実験を行っている。その結果、関節固定と後肢懸垂により発生した関節拘縮は先行研究での関節固定のみによって発生した関節拘縮と比較して重篤化する可能性があった。しかし、関節固定のみによって生じた関節拘縮と、関節固定と後肢

懸垂を組み合わせて生じた関節拘縮の比較はされていない。

そこで本実験の目的は、関節固定群と関節固定に後肢懸垂を加えた群を作り、実際に比較することで非荷重が関節拘縮発生やヒラメ筋の変化に与える影響を明らかにすることとした。

2-2 対象と方法

対象動物

対象の実験動物は、10週齢のWistar系雄ラット42匹（体重 333.1 ± 8.7 g）とした。すべてのラットは、ケージに1匹ずつ収容し、空調にて室温を 23°C にコントロールされた飼育室にて飼育し、市販の固定飼料（MF飼料、オリエンタル酵母工業、東京）と水道水を自由に摂取させた。ラットの飼育環境の明暗サイクルは、電灯を午前7時に点灯し、午後7時に消灯することで12時間ごとに行った。これにより、ラットの飼育環境は、人工的に昼と夜を設定した。すべてのラットは、実験開始までに事前に環境に慣れされる目的で1週間通常飼育した。

本実験は、県立広島大学研究倫理委員会の承認を受け、県立広島大学保健福祉学部附属実験施設を使用して実施した（承認番号13MA009）。

方法

ラットは、関節固定を行わない対照群（ $n = 14$ ）、右足関節を最大底屈位に固定する固定群（ $n = 14$ ）、関節固定と後肢懸垂を行う固定懸垂群（ $n = 14$ ）の3群に分けた。各群7匹は、足関節背屈角度とヒラメ筋の伸張性の評価を行い、各群残りの7匹はヒラメ筋の形態学的評価を実施した。実験期間は、1週間とした。ラットに対する実験中のすべての処置は、麻酔後、苦痛が伴わないように十分麻酔が効き、骨格筋が弛緩したことを確

認してから行った。

関節固定前，ラット右後肢や尾近位部の剃毛は，骨指標を体表上から容易に確認できるようにし，後肢懸垂の際の尾部への鋼線刺入時の妨げにならないようにするために行った。

関節固定は，固定群と固定懸垂群に対し，非伸縮性テープを足部から大腿部まで巻き付け，ラット右足関節を最大底屈位に保持して行った（図 2-1）。ラット足趾は，固定期間中に浮腫の有無を確認できるように露出した。関節固定に用いた非伸縮性テープは，破損や脱落から保護するために，ステンレス製の金網を使用して上から覆うようにカバーした。非伸縮性テープの巻き替えは，浮腫やテープの緩みを認めた場合に適宜行った。

後肢懸垂のための処置は，ラット尾部に直径 1.0 mm のキルシュナー鋼線を刺入して三角形を形成し，ナスカンフックを組み合わせて行った（図 2-2）。後肢懸垂は，ナスカンフックをケージの天井金網に掛け，ラット後肢を非荷重状態とすることで行った（図 2-2）。後肢懸垂のためのすべての処置は，固定懸垂群に対して行った。鋼線刺入は，対照群や固定群に対しても行い，後肢懸垂以外の条件を可能な限り統一した。

関節可動域測定の実験開始時と実験最終日（以下，1週間後）とした。関節可動域測定の方法は，田坂ら⁷³⁾や小野ら¹⁵⁾の方法を参考に実施した。関節可動域測定時のラットの測定肢位は，ラットを左側臥位とし，結束バンドを用いてラット右膝関節を最大屈曲位にて体幹とともに固定器に固定した。また股関節の内転を防止するために，ラット後肢は，アクリル板にて内側から保持した（図 2-3）。

関節可動域測定のため，ラットの腓骨頭と外果をマーキングした。関節可動域測定は，デジタルテンションメーター（KYOWA Co., LTS-1KA）を用いて，ラット足底面の中足骨部から足関節

を他動的に背屈し，その過程を動画としてデジタルカメラで撮影することで行った。撮影した動画は，コンピュータ上で 0.3 N の背屈力が加わった瞬間を画像として抽出した。0.3 N の背屈力は，正常なラット足関節を十分背屈させることができる力である¹⁹⁾。足関節背屈角度は，画像解析ソフト(Image J, ver. 1.48v, USA)を用いてコンピュータ上で 3 回測定し，平均値を測定値として採用した。測定時の基本軸は，腓骨頭と外果を結ぶ直線とし，移動軸は，踵骨底面とした(図 2-4)。

1 週間後の関節可動域測定後，ラット右脛骨と右踵骨は，0.7 mm のキルシュナー鋼線を刺入することで足関節最大底屈位に固定した。すべてのラットは，腹大動脈を切断することで脱血して屠殺した。屠殺後，ラット右後肢は，皮膚を切除して大腿骨を切断し，足根骨部にワイヤーを刺入して，大腿部とワイヤーを介して引張試験機(オートグラフ AG-50kNG, 島津製作所，京都)に取り付けた(図 2-5)。ラット右後肢は，ヒラメ筋以外の組織を切除した。ヒラメ筋の引張試験は，Ono et al.²⁹⁾の方法を参考に，10 mm/min の伸張速度で行った。正常ラットヒラメ筋は最大底屈位から最大背屈位までに約 10 mm 伸張される¹⁷⁾。そこで，引張試験の測定値は，10 mm 伸張時の抗張力とした。引張試験は，屠殺後 20 分以内に実施した。

足関節背屈角度やヒラメ筋の伸張性の評価を行わないラット各群 7 匹は，1 週間後に屠殺後，ヒラメ筋を摘出した。摘出したヒラメ筋は凍結してヒラメ筋組織の標本を作成した。ヒラメ筋組織の標本は，クリオスタットを用いて 10 μm 厚で薄切し，ヒラメ筋組織の横断切片を作成した。作成した横断切片は，Type I コラーゲンの蛍光免疫染色を実施した。蛍光免疫染色は，Honda et al.の方法⁴⁵⁾を参考に，抗 Type I コラーゲン抗体(Santa Cruz Biotechnology, USA)および蛍光標識を含ん

だ二次抗体（Life Technologies, USA）を用いて実施した。染色後，横断切片はオールインワン顕微鏡デジタルカメラを用いて200倍の拡大像で撮影した。撮影した写真は，無作為に5視野を選択し，その範囲の発光部分の面積を画像解析ソフト（BZ-X Analyzer, キーエンス, 大阪）を用いて測定し，コラーゲン線維量とした。

統計ソフトは，Excel統計（Bell curve for Excel, ver. 2.02, 社会情報サービス, 東京）を用いた。足関節背屈角度の比較のための統計処理は，測定時期（実験開始時，1週間後）と群（対照群，固定群，固定懸垂群）を独立変数とし，足関節背屈角度を従属変数とする対応のある二元配置分散分析を実施した。測定時期と群との間に交互作用が認められた場合は，それぞれの独立変数について単純主効果を検討した。多重比較は，Scheffe法を行った。ヒラメ筋の伸張性やType Iコラーゲンの面積の比較のための統計処理は，正規分布に従うかどうかを確認するためにShapiro-Wilk検定を実施した。正規分布に従う場合は，一元配置分散分析を行い，正規分布に従わない場合は，Kruskal-Wallis検定を実施することとした。多重比較は，一元配置分散分析を行う場合，Scheffe法を行い，Kruskal-Wallis検定を行う場合，Steel-Dwass法を実施することとした。危険率は，5%未満をもって有意差ありと判定した。

2-3 結果

各群の足関節背屈角度の結果は，図2-6に示した。足関節背屈角度は，実験開始時において対照群 130.0 ± 2.5 度，固定群 129.9 ± 2.5 度，固定懸垂群 131.0 ± 4.1 度であり，1週間後において対照群 129.2 ± 5.3 度，固定群 101.5 ± 10.0 度，固定懸垂群 74.6 ± 8.2 度であった。測定時期と群の間に交互作

用が認められたため、単純主効果を求めた。その結果、各群間における足関節背屈角度の有意差は、実験開始時になく、1週間後で認められた。1週間後において、固定群と固定懸垂群の足関節背屈角度は、対照群と比較して有意に減少した。固定懸垂群の足関節背屈角度は、固定群と比較しても有意に減少した。測定時期間の足関節背屈角度の有意差は、固定群と固定懸垂群に認められた。この2群における1週間後の足関節背屈角度は、実験開始時と比較して有意に減少した。

各群のヒラメ筋の引張試験の結果は、図 2-7 および図 2-8 に示した。ヒラメ筋の抗張力は、対照群 0.23 ± 0.13 N, 固定群 0.58 ± 0.32 N, 固定懸垂群 2.13 ± 0.44 Nであった。統計処理の結果、正規分布に従わないことが認められたため、Kruskal-Wallis 検定を行い、多重比較として Steel-Dwass 法を実施した。固定群と固定懸垂群のヒラメ筋の伸張性は、対照群と比較して有意に低下した。固定懸垂群のヒラメ筋の伸張性は、固定群と比較しても有意に低下したことが認められた。固定群と固定懸垂群の長さ-張力曲線は、対照群と比較して左方偏移した。固定懸垂群の長さ-張力曲線は、固定群と比較しても左方偏移した。

各群のヒラメ筋の Type I コラーゲン量の結果は、図 2-9 および図 2-10 に示した。ヒラメ筋の Type I コラーゲンの面積は、対照群 $908.2 \pm 336.5 \mu\text{m}^2$, 固定群 $2376.7 \pm 543.1 \mu\text{m}^2$, 固定懸垂群 $4588.2 \pm 1476.8 \mu\text{m}^2$ であった。統計処理の結果、正規分布に従うことが認められたため、一元配置分散分析を行い、多重比較として Scheffe 法を実施した。固定群と固定懸垂群のヒラメ筋の Type I コラーゲン量は、対照群と比較して有意に増加した。固定懸垂群のヒラメ筋の Type I コラーゲン量は、固定群と比較しても有意に増加したことが認められた。

2-4 考察

関節可動域の測定方法について

測定時に加える力が大きい程，関節可動域は増大する¹²⁾。力量計を用いて加える力を一定にした場合の関節可動域測定は，徒手で行う場合と比較して再現性が高くなる⁷⁴⁾。このため，我々は，デジタルテンションメーターを用いて定量的に関節可動域測定を実施した。沖ら¹⁹⁾は，背屈力 0.3 N が正常のラット足関節を十分背屈できる力であると報告している。そこで，本実験において，関節可動域測定は，ラット足関節を背屈させる力を 0.3 N とし，検者の主観を排除して定量的に実施することができたと考えられる。

また，田坂ら⁷³⁾は，アクリル板や結束バンドなどを組み合わせた固定器でラット後肢を固定および支持することで足関節背屈の関節可動域測定の信頼性が固定器を使用しない場合と比較して高くなることを報告している。このため，我々は，この固定器を採用し，可能な限り関節可動域測定の信頼性を高めることができたと考えられる。

足関節背屈角度について

ラット足関節背屈角度は，1週間の足関節最大底屈位固定によって減少する^{15,25-29,37,47-50)}。本実験においても，関節固定を実施した固定群や固定懸垂群の1週間後の足関節背屈角度は，実験開始時と比較して有意に減少した。このため，本実験における関節固定は，先行研究と同様に関節拘縮を生じさせたと言える。さらに1週間後における固定懸垂群の足関節背屈角度は，固定群と比較して有意に減少した。このことから本研究では，非荷重が関節固定によって生じる関節拘縮をさらに重篤化させることについて，対照群を設定して比較することで初めて証明

できた。

日本では、寝たきりの高齢者は多い。その多くに関節拘縮の合併がある。今回我々が証明したことは、関節拘縮発生または重篤化に関して新たな普遍的な要因を見出したことになる。これは、関節拘縮発生予防や関節拘縮の治療を考える上で極めて重要である。

ヒラメ筋の伸張性について

1 週間の関節固定によって生じる関節拘縮の主な原因は骨格筋の伸張性低下である^{29,49)}。Salter et al.⁷⁵⁾は、対象としている関節の可動域測定の結果が近接している関節の肢位によって二関節筋の影響を受けると報告した。日本リハビリテーション医学会や日本整形外科学会による足関節背屈の可動域測定は、二関節筋である腓腹筋を弛緩させるため⁷⁶⁾、膝関節屈曲位にて行う⁷⁷⁻⁷⁹⁾。本実験における足関節背屈の可動域測定は、膝関節最大屈曲位にて実施した。このため、測定された足関節背屈角度は、腓腹筋の影響が可能な限り除外されていたと推測される。固定群と固定懸垂群における足関節背屈角度の減少の原因が骨格筋であるとする、特にヒラメ筋の伸張性低下が影響していたと考えられる。

骨格筋は、加えられた外力に応じて変形し、力を除けば元の形状に戻る性質である弾性という性質と、加えられた外力の速度に比例して発生する抗力である粘性という性質を合わせた粘弾性という性質を持つ⁵⁰⁾。また、骨格筋の構造は、収縮力を生じさせる筋線維と筋線維を包む筋膜に大別される^{50,80,81)}。骨格筋の伸張性は、主に筋膜に由来する⁵⁰⁾。このため、本実験におけるヒラメ筋の伸張性は、主に筋膜の粘弾性の影響を反映しているものと推測される。

骨格筋の伸張性の評価は、引張試験機を使用して筋を他動的に伸張し、長さ—張力曲線を得ることで行う^{17,31,33,49)}。関節固定により伸張性の低下したヒラメ筋は、正常と比較して長さ—張力曲線が左方に偏移する^{17,31,33,49)}。本実験における固定群や固定懸垂群のヒラメ筋は、対照群と比較して長さ—張力曲線が左方に偏移し、伸張性が有意に低下した。また、固定懸垂群のヒラメ筋は、固定群と比較してもさらに長さ—張力曲線が左方偏移し、伸張性が有意に低下したことが明らかとなった。このため、非荷重は関節固定によって生じるヒラメ筋の伸張性低下を増悪させることが明らかとなった。非荷重を伴う関節固定によって生じる関節拘縮は、関節固定によって生じる関節拘縮と比較してヒラメ筋の伸張性がさらに低下することで生じたと考えられる。では関節固定に非荷重が加わることでヒラメ筋の伸張性がさらに低下するのは何故だろうか。関節固定期間中のヒラメ筋への電気刺激は、ヒラメ筋の伸張性低下を抑制する¹⁷⁾。骨格筋への電気刺激は、人工的に筋収縮を発生させる⁸²⁾。これらのことから、関節固定期間中、筋収縮が増加することは、ヒラメ筋の伸張性低下を抑制する効果を有すると考えられる。ヒラメ筋において、逆にとらえると、筋収縮の減少は、ヒラメ筋の伸張性低下を重篤化する可能性がある。報告によると後肢懸垂は、ヒラメ筋の筋収縮を減少させる^{58,59,61)}。本実験において、後肢懸垂を実施した固定懸垂群は、他群と比較して筋収縮が減少したことでヒラメ筋の伸張性が固定群と比較してさらに低下したと考えられる。

ヒラメ筋のコラーゲン量について

本実験におけるヒラメ筋の伸張性低下は、主に筋膜の影響によるものであると考えられる。筋膜は、主にコラーゲンによっ

て構成されている⁵⁰⁾。コラーゲンは、それ自体に伸張性がないが、筋膜内で網目状の構造を成すことで伸張性を発揮している⁵⁰⁾。ヒラメ筋は、関節固定を1週間実施することで、コラーゲン量が増加し^{47,48,50,51)}、伸張性が低下する^{29,49)}。つまり関節拘縮における骨格筋の伸張性低下は、主に筋膜におけるコラーゲン量の増加によるものと考えられる。特に、Type I コラーゲンは、関節拘縮の進行に伴い、増加する^{47,48,50)}ため、関節拘縮における骨格筋の伸張性低下に密接に関係していると考えられている。本実験において、固定群や固定懸垂群の Type I コラーゲン量は、対照群と比較して有意に増加した。このため、固定群や固定懸垂群におけるヒラメ筋の伸張性の低下は、筋膜でのコラーゲン量の増加によるものであると推測される。一方、後肢懸垂を実施した場合、コラーゲンの増加に関与する TGF- β が増加する⁶³⁾。本実験において、固定懸垂群の Type I コラーゲン量は、固定群と比較しても有意に増加した。このため、固定懸垂群は関節固定と後肢懸垂の両方の影響を受け、コラーゲンの増加がさらに生じたと推測される。これにより、固定懸垂群のヒラメ筋の伸張性は固定群と比較しても有意に低下したと考えられる。

2-5 小括

本実験の目的は、非荷重が関節拘縮発生やヒラメ筋の変化に与える影響について、実際に対照群と比較して検討することとした。対象はラットとした。群分けは、足関節の関節固定を行わない対照群，足関節最大底屈位固定を行う固定群，関節固定と後肢懸垂を行う固定懸垂群の3群とした。1週間の実験後，足関節背屈角度とヒラメ筋の伸張性は，対照群と比較し固定群と固定懸垂群において有意に低下した。固定懸垂群の足関節背屈角度とヒラメ筋の伸張性は，固定群と比較しても有意に低下した。また，固定群と固定懸垂群におけるヒラメ筋のコラーゲン量は，対照群と比較して有意に増加した。固定懸垂群におけるヒラメ筋のコラーゲン量は，固定群と比較しても有意に増加した。このコラーゲン量の増加は，各群の足関節背屈角度やヒラメ筋の伸張性低下を引き起こしていると推測される。以上のことから，非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮において，足関節背屈角度やヒラメ筋の伸張性は，関節固定によって生じた関節拘縮と比べてさらに低下することが明らかとなった。



足関節最大底屈位



非伸縮性テープによる関節固定
および金網による保護

図 2-1 関節固定の方法



尾部への鋼線刺入と
ナスカンフック



後肢懸垂

図 2-2 後肢懸垂の方法

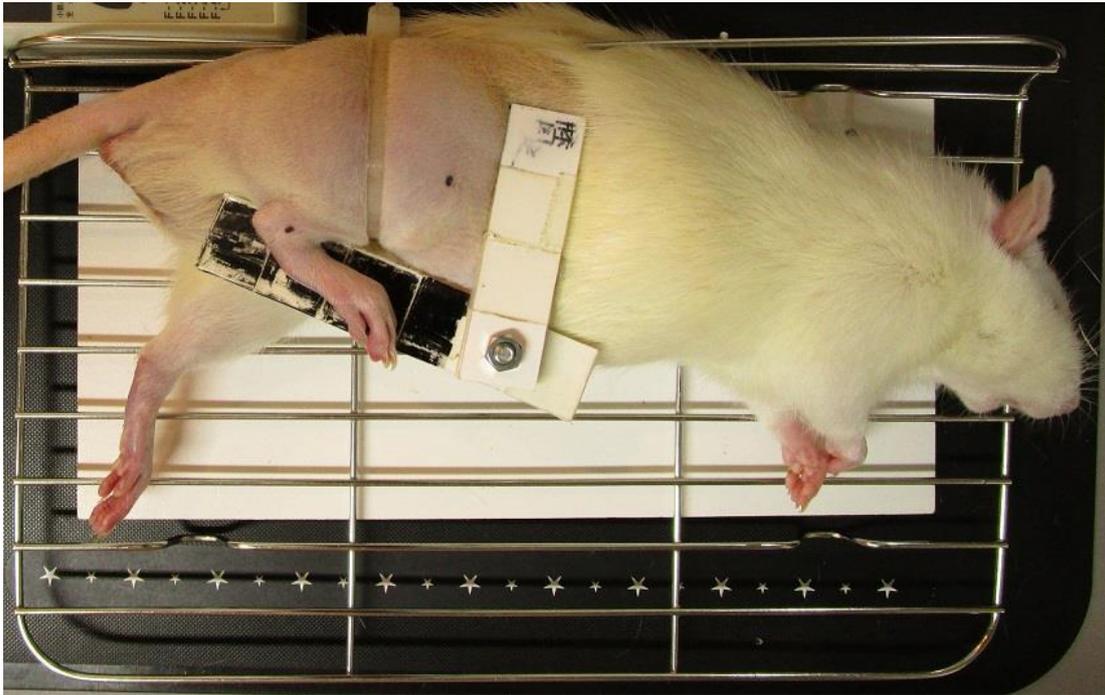


図 2-3 関節可動域測定時のラット固定器

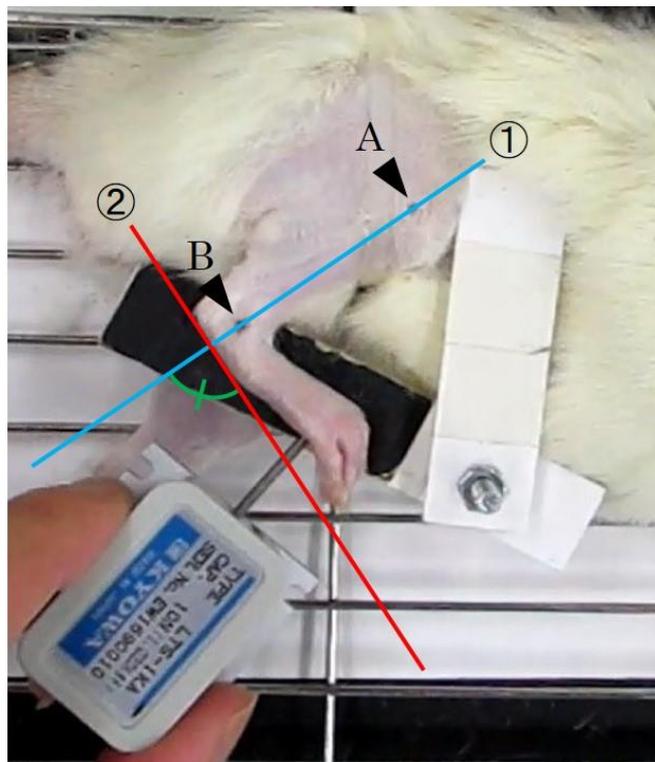


図 2-4 足関節背屈角度測定時の基本軸と移動軸

A：腓骨頭

B：外果

① 基本軸（青線）：腓骨頭と外果を結ぶ直線

② 移動軸（赤線）：踵骨底面

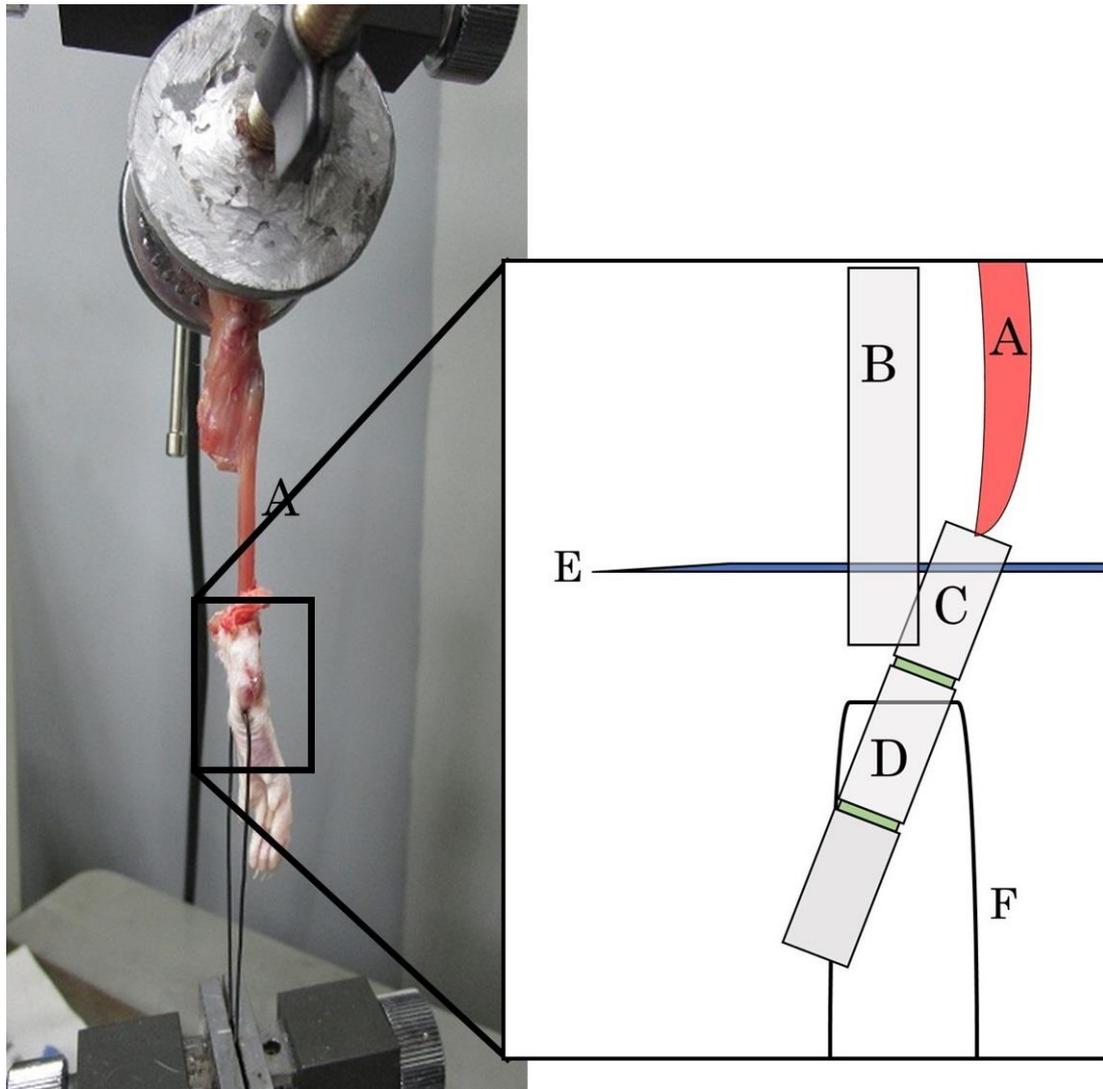


図 2-5 引張試験機への取付

A : ヒラメ筋

B : 脛骨

C : 踵骨

D : 足根骨

E : 直径 0.7 mm のキルシュナー鋼線

F : ワイヤー

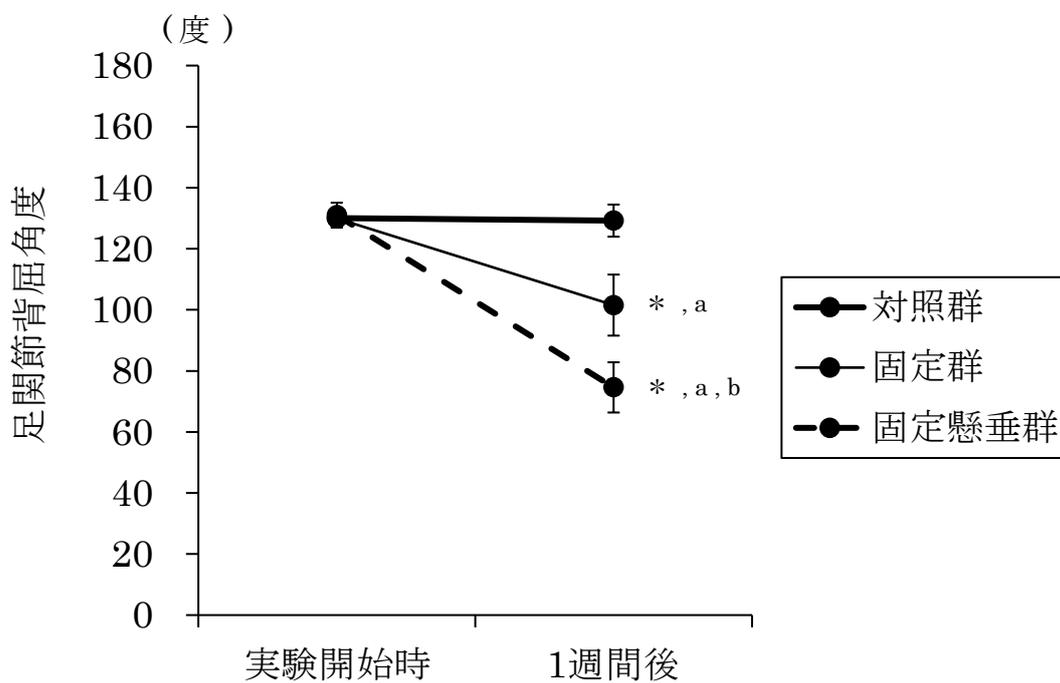


図 2-6 足関節背屈角度の結果

* 実験開始時との有意差 ($p < 0.05$)

a 対照群との有意差 ($p < 0.05$)

b 固定群との有意差 ($p < 0.05$)

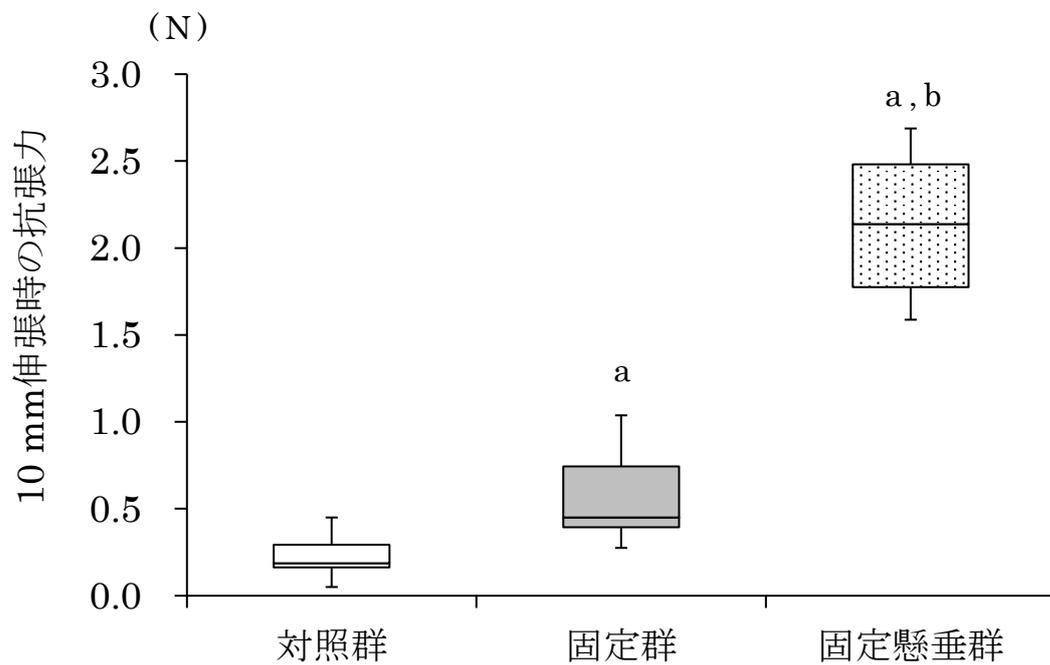


図 2-7 ヒラメ筋の伸張性の結果

a 対照群との有意差 ($p < 0.05$)

b 固定群との有意差 ($p < 0.05$)

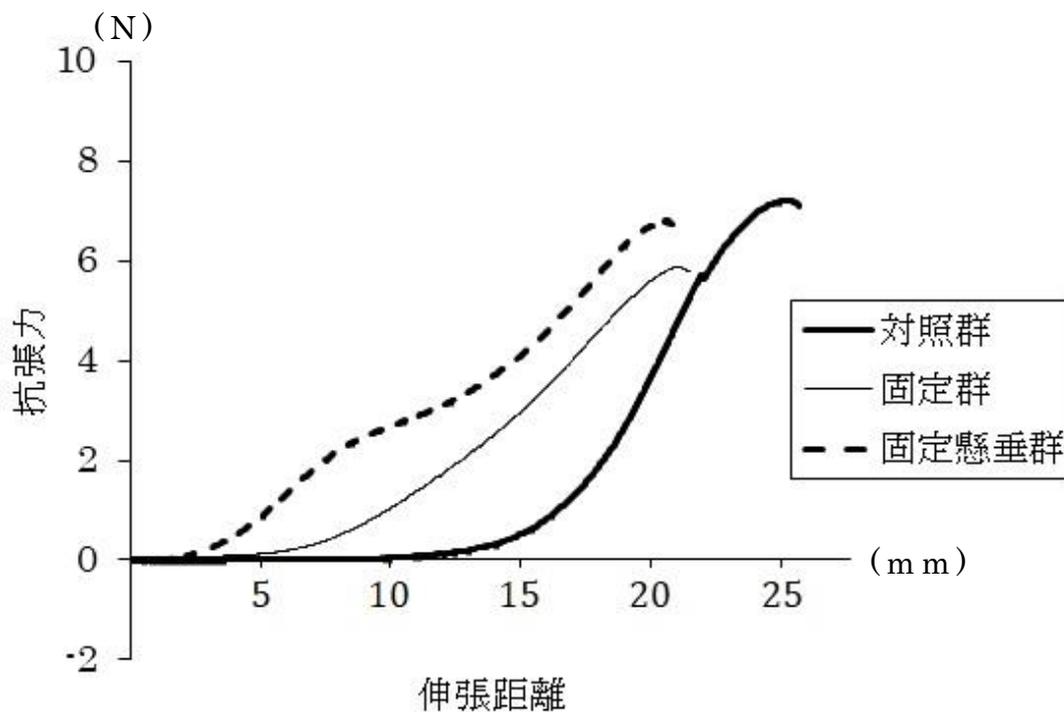


図 2-8 ヒラメ筋の引張試験の代表値（長さ—張力曲線）

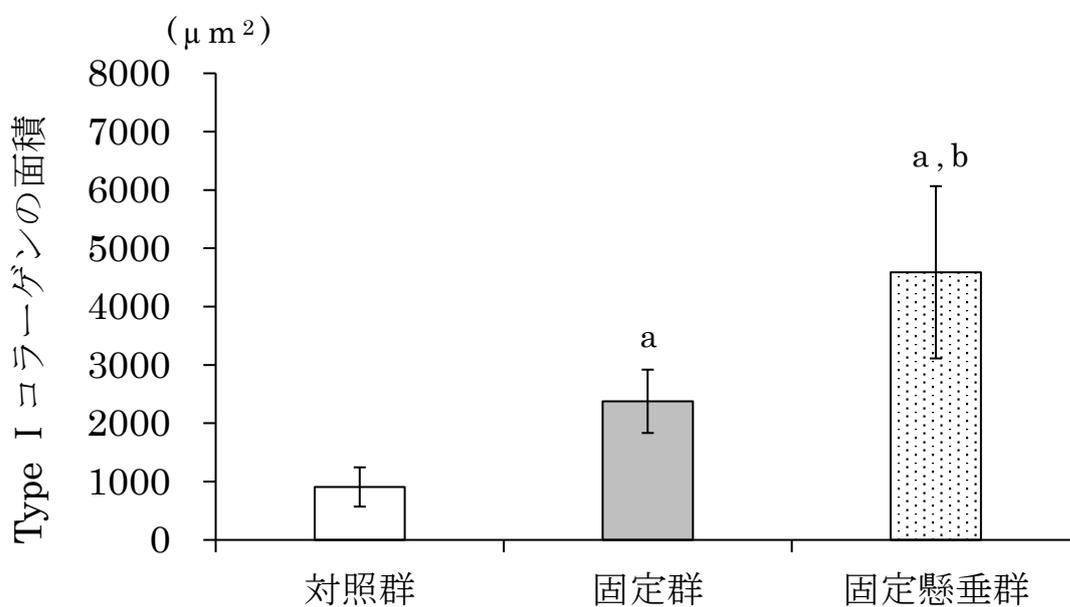


図 2-9 ヒラメ筋の Type I コラーゲン面積の結果

a 対照群との有意差 ($p < 0.05$)

b 固定群との有意差 ($p < 0.05$)

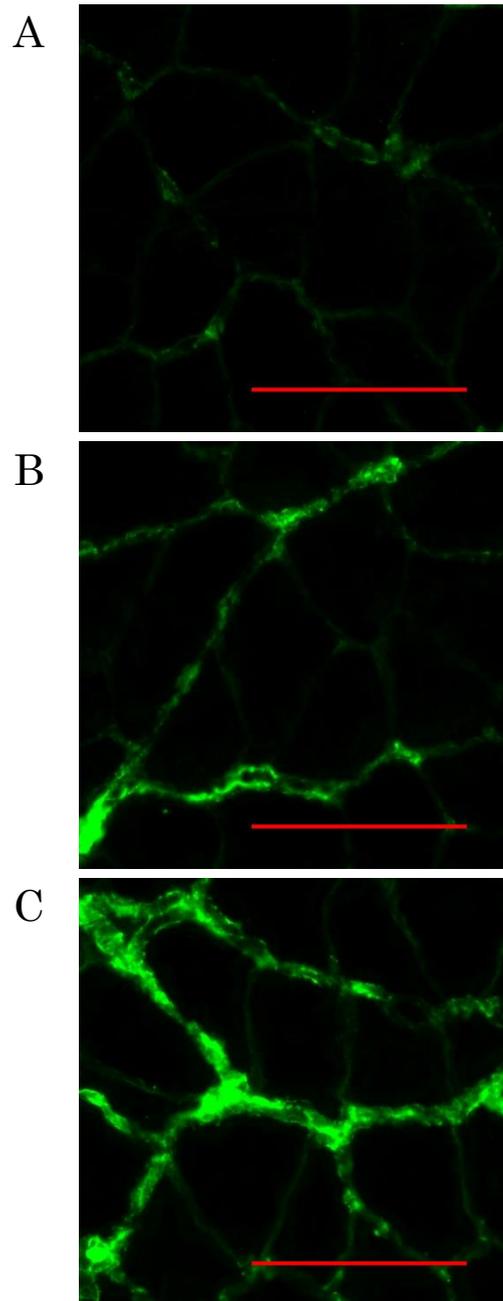


図 2-10 Type I コラーゲンの免疫染色像 (Bar100 μm)

A : 対照群

B : 固定群

C : 固定懸垂群

第 3 章

非荷重を伴って生じた関節拘縮における 皮膚や靭帯の変化

3-1 小序

関節拘縮は、骨格筋や皮膚、靭帯などの関節周囲の組織の変化によって生じる⁵⁰⁾。1週間の関節固定で発生した関節拘縮において、各組織が関節拘縮に関与する割合は、皮膚が9.8%、靭帯などが9.7%である²⁵⁾。関節固定によって生じた関節拘縮における各組織の伸張性の変化は、いくつかの先行研究によって報告されている^{31-33,35,39-42)}。骨格筋や皮膚は伸張性が低下し^{31-33,35)}、靭帯は、脆くなる³⁹⁻⁴²⁾ことが明らかにされている。

また、我々は非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮において、骨格筋は、関節固定のみを実施した場合と比較して、コラーゲン量がさらに増加し、伸張性がより低下することを明らかにした。非荷重が関節拘縮における骨格筋のコラーゲン量をさらに増加させるということは、コラーゲンを含む他の組織においても同様に増加する可能性があると考えられる。皮膚や靭帯はコラーゲンを含む組織である⁵⁰⁾。このため、非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮において、皮膚や靭帯の伸張性は、関節固定のみを実施した場合と比較してさらに変化する可能性があると考えられる。しかし、皮膚や靭帯の伸張性は非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮において、どのように変化するのか不明である。

そこで、本実験の目的は、非荷重を伴う関節固定によって生じる関節拘縮において、皮膚や靭帯の伸張性がどのように変化するかを明らかにすることとした。

3-2 対象と方法

対象動物

対象の実験動物は、10週齢のWistar系雄ラット39匹（体重 318.9 ± 14.5 g）とした。すべてのラットは、1匹ずつケージに収容し、室温を空調によって23℃にコントロールされた飼育室内で飼育し、水道水と市販の固形飼料（MF飼料、オリエンタル酵母工業、東京）を自由に摂取させた。ラットの飼育環境の明暗調整は、午前7時に電灯を点灯し、午後7時に消灯することで12時間ごとのサイクルで実施した。これにより、ラット飼育環境は、昼と夜を人工的に設定した。すべてのラットは、環境に慣れされる目的で実験開始までに1週間通常飼育した。

本実験は、県立広島大学保健福祉学部附属実験施設を使用し、県立広島大学研究倫理委員会の承認を受けて実施した（承認番号13MA009）。

方法

ラットは、関節固定を行わない対照群（ $n = 13$ ）、右足関節を最大底屈位に固定する固定群（ $n = 13$ ）、後肢懸垂と関節固定を行う固定懸垂群（ $n = 13$ ）の3群に分けた。各群7匹は、足関節背屈角度と皮膚伸張性の評価を行い、各群残りの6匹は靭帯伸張性の評価を実施した。実験期間は、1週間とした。ラットに対する実験中のすべての処置は、麻酔後、苦痛を伴わないように麻酔が十分効き、骨格筋が弛緩したことを確認してから行った。

関節固定の実施前、ラット右後肢や尾近位部の剃毛は、骨指標を体表上から容易に確認できるようにし、後肢懸垂の際の尾部への鋼線刺入の妨げとならないようにするために行った。

関節固定は、固定群と固定懸垂群に対し、足部から大腿部まで非伸縮性テープを巻き付け、ラット右足関節を最大底屈位に保持して実施した。ラットの足趾は、固定期間中に浮腫の有無を確認するために露出した。脱落や破損から関節固定を保護するため、非伸縮性テープの上から覆うようにステンレス製の金網でカバーした。非伸縮性テープの巻き替えは、テープの緩みや浮腫を認めた場合に適宜実施した。

後肢懸垂のための処置は、直径 1.0 mm のキルシュナー鋼線をラット尾部に刺入して三角形を形成し、ナスカンフックを組み合わせることで行った。後肢懸垂は、ケージの天井金網にナスカンフックを掛け、ラット後肢を非荷重状態とすることで実施した。後肢懸垂のためのすべての処置は、固定懸垂群に対して行った。鋼線刺入は、尾部への鋼線刺入による侵襲の影響を除外するため、対照群や固定群に対しても実施した。

関節可動域測定 of 測定時期は、実験開始時と 1 週間後とした。関節可動域測定の方法は、小野ら¹⁵⁾や田坂ら⁷³⁾の方法を参考に実施した。関節可動域測定時のラットの肢位は、ラットを左側臥位とし、結束バンドを用いて体幹とともに右膝関節を最大屈曲位にて固定器に固定した。また股関節内転の防止のために、ラット後肢は、アクリル板を用いてにて内側から保持した。

関節可動域測定のためのマーキングは、ラットの腓骨頭と外果に対して実施した。関節可動域測定は、デジタルテンションメーター (KYOWA Co., LTS-1KA) を用いて、ラット足底面の中足骨部から足関節を背屈方向へ他動的に動かし、その過程をデジタルカメラで動画として撮影することで行った。コンピュータ上において、撮影した動画は、0.3 N の背屈力が加わった瞬間を画像として抽出した。足関節背屈角度は、コンピュータ上で画像解析ソフト (Image J, ver. 1.48v, USA) を用いて 3 回

測定し、平均値を測定値として採用した。測定時の基本軸は、腓骨頭と外果を結ぶ直線とし、移動軸は、踵骨底面とした。

1週間後の関節可動域測定後、各群7匹のラットは、皮膚伸張性を評価するために、引張試験を行った。まず、Tasaka et al.³⁵⁾の方法を参考に、すべてのラットの右後肢には、踵周囲の皮膚に対してマーキングを行った。マーキングの位置は、ラット足関節を最大底屈位とし、踵部より遠位3mmの位置をA点とし、そこから10mm近位の位置をB点とした(図3-1)。皮膚をマーキング後、ラットは腹大動脈を切断することで脱血して屠殺し、皮膚を速やかに切離して採取した。採取する皮膚の範囲は、横幅を4mmとし、縦幅をA点から5mm遠位とB点から5mm近位までの20mmとした(図3-1)。採取した皮膚は、A点とB点に非伸縮性ワイヤーを刺入した。皮膚の引張試験機への取付は、非伸縮性ワイヤーの両端部を介して行い、A点とB点の2点の距離がマーキング時と同じ10mmとなるようにノギスを用いて調整した(図3-2)。皮膚の引張試験は、引張試験機(オートグラフAGS-X 5kN, 島津製作所, 京都)を用いて、10mm/minの伸張速度で実施した。測定値は、Tasaka et al.³⁵⁾の方法を参考に0.3Nの伸張力が加わった際の皮膚の伸張距離とした。

一方、各群残り6匹のラットは、靭帯の伸張性を評価するために、引張試験を実施した。まず、すべてのラットは腹大動脈を切断して脱血することで屠殺した。屠殺後、ラットの右後肢は皮膚を切除し、下腿および足部の筋や靭帯を切離して脛骨や腓骨、および距骨を露出した。この際、脛骨と距骨、腓骨と距骨をそれぞれ結ぶ靭帯(以下、距腿靭帯)のみは、連続性を保持した(図3-3)。脛骨と腓骨は、下腿中央で切断した。これにより、脛骨と腓骨—距腿靭帯—距骨の複合体を作成した(図

3-4)。作成した複合体は，脛骨と距骨にワイヤーを刺入し，ワイヤーを介して引張試験機へ取り付けた（図 3-4）。引張試験は引張試験機（オートグラフ AGS-X 5kN，島津製作所，京都）を用いて，10 mm/min の伸張速度で実施した。測定値は，先行研究³⁹⁻⁴²⁾を参考に距腿靭帯が破断した瞬間の抗張力とした。

統計ソフトは，Excel 統計（Bell curve for Excel, ver. 2.02, 社会情報サービス，東京）を用いた。足関節背屈角度を比較するための統計処理は，群（対照群，固定群，固定懸垂群）と測定時期（実験開始時，1週間後）を独立変数し，足関節背屈角度を従属変数とする対応のある二元配置分散分析を実施した。群と測定時期との間に交互作用を認めた場合は，それぞれの独立変数について単純主効果を検討した。多重比較は，Scheffe 法を実施した。皮膚や靭帯の伸張性を比較するための統計処理は，正規分布に従うかどうかを確認するために Shapiro-Wilk 検定を行った。正規分布に従う場合は，一元配置分散分析を実施し，正規分布に従わない場合は，Kruskal-Wallis 検定を行った。多重比較は，一元配置分散分析を行う場合，Scheffe 法を実施し，Kruskal-Wallis 検定を行う場合，Steel-Dwass 法を行うこととした。危険率は，5%未満をもって有意差ありと判定した。

3-3 結果

各群の足関節背屈角度の結果は，図 3-5 に示した。足関節背屈角度は，実験開始時において対照群 133.5 ± 5.3 度，固定群 137.4 ± 4.5 度，固定懸垂群 136.0 ± 2.5 度であり，1週間後において対照群 135.2 ± 4.0 度，固定群 99.3 ± 6.4 度，固定懸垂群 69.1 ± 8.3 度であった。群と測定時期の間に交互作用を認めたため，単純主効果を求めた。その結果，各群間におけ

る足関節背屈角度の有意差は、実験開始時になく、1週間後で認められた。1週間後において、固定群と固定懸垂群の足関節背屈角度は、対照群と比べて有意に減少した。固定懸垂群の足関節背屈角度は、固定群と比べても有意に減少した。測定時期の間の足関節背屈角度の有意差は、固定群と固定懸垂群に認められた。この2群における1週間後の足関節背屈角度は、実験開始時と比べて有意に減少した。

各群の皮膚の引張試験の結果は、図3-6に示した。皮膚の伸張距離は、対照群 4.78 ± 0.79 mm, 固定群 5.18 ± 0.89 mm, 固定懸垂群 4.24 ± 0.37 mmであった。統計処理の結果、正規分布に従うことが認められたため、一元配置分散分析を行い、多重比較として Scheffe 法を実施した。すべての群間に有意差は認められなかった。

各群の靭帯の引張試験の結果は、図3-7および図3-8に示した。各群の長さ-張力曲線は、抗張力が上昇や下降を繰り返しながら増加していった。靭帯の破断時の抗張力は、対照群 22.46 ± 2.30 N, 固定群 19.74 ± 2.25 N, 固定懸垂群 18.85 ± 2.53 Nであった。統計処理の結果、正規分布に従うことが認められたため、一元配置分散分析を行い、多重比較として Scheffe 法を行った。すべての群間に有意差は認められなかった。

3-4 考察

足関節背屈角度について

先に我々は、関節拘縮発生に非荷重が与える影響についての調査を行った。その結果、非荷重は関節固定によって生じる関節拘縮を重篤化することが明らかとなった。本実験においても、関節固定と後肢懸垂を組み合わせ実施した固定懸垂群の足関節背屈角度は、関節固定を行った固定群と比較して有意に低下

した。このため、本実験における関節固定や後肢懸垂は、適切に実施されており、非荷重を伴う関節固定によって生じる関節拘縮を再現し得たと言える。

皮膚の伸張性について

関節拘縮の原因組織の一つは皮膚である^{25,35,36,50}。皮膚は表層から深層にかけて表皮、真皮、および皮下組織に大別される^{50,80,83}。真皮は筋膜と同様に主にコラーゲンによって構成されている⁵⁰。皮下組織は、脂肪組織を包むようにコラーゲンが存在する⁵⁰。これらのコラーゲンは可動性があり、外力などに対して伸張性を有していると考えられている⁵⁰。皮膚の伸張性は特に真皮と皮下組織に由来する⁵⁰。このため、本実験においても、皮膚の伸張性は、特に真皮や皮下組織の影響を反映していたと考えられる。

関節固定を2週間実施した場合、皮膚は、真皮や皮下組織においてコラーゲンの増加に関与する筋線維芽細胞のマーカーである α -SMAが増加し³⁷、伸張性が低下する³⁶。また、表皮は、皮膚の伸張性への関与が少ない可能性があるが、関節固定2週間で厚さが薄くなるという報告もある³⁸。このように関節固定による皮膚の変化は、表皮から皮下組織までおよび、関節固定2週間で生じる。本実験において、固定群や固定懸垂群の皮膚の伸張性は、対照群と有意差が認められなかった。この理由は皮膚が影響を受ける関節固定期間でなかったためであると考えられる。

一方、後肢懸垂による皮膚への影響についての報告によると、表皮の厚さは後肢懸垂を4週間実施しても変化しない⁶⁴。つまり皮膚の変化は後肢懸垂では生じない。このため、非荷重が真皮や皮下組織のコラーゲンや伸張性に与える影響は少ないと考

えられるが、実際に調査した先行研究がなく、不明である。しかし、今回本実験において、固定群と固定懸垂群における皮膚の伸張性は、有意差が認められなかった。本実験結果は、非荷重が皮膚の伸張性に影響を与えないことを示したものである。

靭帯の伸張性について

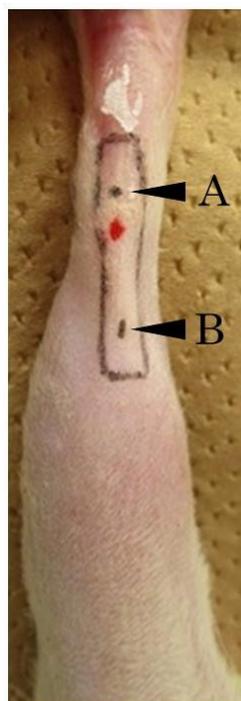
関節拘縮の原因組織の一つは、靭帯である⁵⁰⁾。靭帯は、主に水分とコラーゲンによって構成されている⁵⁰⁾。コラーゲンの占める割合は乾燥重量の約80%である。コラーゲンは、それ自体に伸張性がないが、網目構造を成すことで伸張性を発揮する⁵⁰⁾。網目状に走行している筋膜⁵⁰⁾や真皮⁵⁰⁾とは異なり、靭帯のコラーゲンの走行は、長軸方向に対してほとんどが平行である⁵⁰⁾。このため、靭帯の伸張性は乏しい⁵⁰⁾。

靭帯の伸張性は、主に膝関節周囲における靭帯に対して引張試験を実施し、長さ—張力曲線を得て、破断時の張力を調査することで実施されている³⁹⁻⁴²⁾。引張試験の開始初期には、波状のコラーゲンはまっすぐ伸びる⁵⁰⁾。つまり、伸張に対して、最初からまっすぐなコラーゲンは遊びが少なく、波状のコラーゲンは遊びがある。伸張時、靭帯のコラーゲンは、遊びがより少ないものから外力が加わっていき、伸張や損傷を繰り返しながら抗張力を増していき、最終的に破断すると考えられる。本実験にて得られた各群の距腿靭帯の長さ—張力曲線は、先行研究⁴⁰⁾と同様に抗張力が上昇や下降を繰り返しながら最大張力に至り、破断した。このため、距腿靭帯においてもより早く外力が加わったコラーゲンから伸張されていったことが推測される。靭帯は、関節固定によって破断時の張力が低下し、脆くなる場合³⁹⁻⁴²⁾と、不変の場合⁴²⁾がある。この差は何故生じるのだろうか。関節拘縮は、靭帯が伸張位にて固定されると生じに

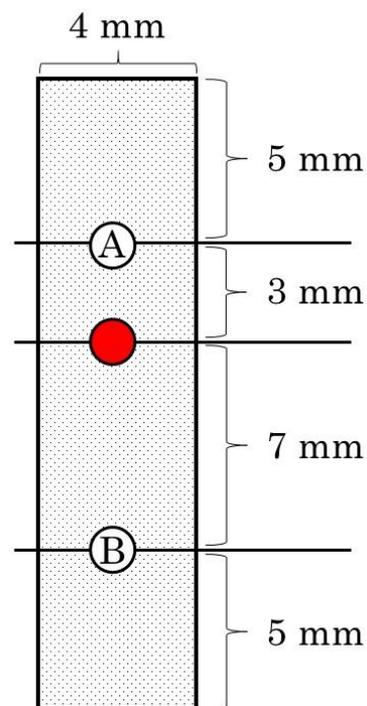
くい⁸⁴⁾。このことから、関節固定による靭帯の変化は、伸張位で固定された場合に少ないと考えられる。本実験において、固定群や固定懸垂群における距腿靭帯の破断時の張力は、対照群と比較して有意差が認められなかった。この理由は、足関節最大底屈位固定によって距腿靭帯が伸張位となっていたためであると考えられる。一方、後肢懸垂を2週間実施した場合、靭帯は脆くなる⁷⁰⁾。このため、後肢懸垂による靭帯の影響は、2週間で生じることが推測される。固定懸垂群における距腿靭帯の破断時の張力は、固定群と比較しても有意差を認めなかった。本実験結果は、1週間の時点において、非荷重が距腿靭帯の伸張性に影響を与えないことを示したものである。

3-5 小括

本実験の目的は、非荷重を伴う関節固定によって生じる関節拘縮において、皮膚や靭帯の伸張性がどのように変化するかを明らかにすることとした。対象はラットとした。群分けは、足関節の関節固定を行わない対照群、足関節最大底屈位固定を行う固定群、後肢懸垂と関節固定を行う固定懸垂群の3群とした。1週間の実験後、固定群と固定懸垂群における足関節背屈角度は、対照群と比較して有意に低下した。固定懸垂群の足関節背屈角度は、固定群と比較しても有意に低下した。一方、皮膚や靭帯の伸張性は、3群間に有意差を認めなかった。以上のことから、1週間の非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮において、皮膚や靭帯の伸張性は、変化しないことが明らかとなった。



ラット右後肢後面の皮膚



ラット右後肢後面の皮膚の
採取範囲

赤印：腫

A点：腫より遠位 3 mm の位置

B点：腫より近位 7 mm の位置

赤印：腫

A点よりさらに 5 mm 遠位，B
点よりさらに 5 mm 近位を含
む長さ計 20 mm，幅 4 mm の
範囲を採取

図 3-1 皮膚のマーキングおよび採取範囲

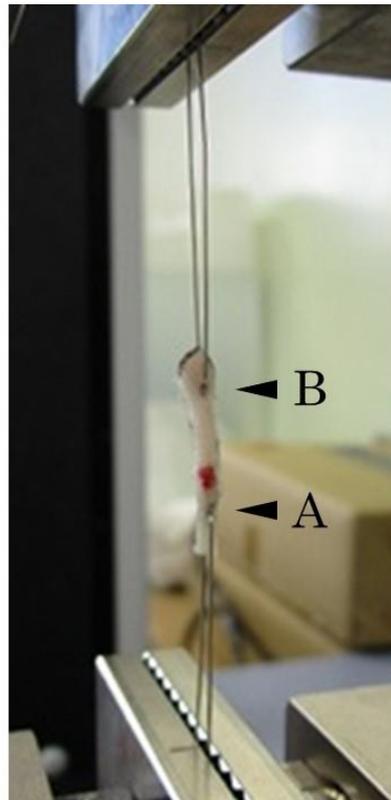


図 3-2 引張試験機への皮膚の取付

赤印：踵

A点とB点の間の距離が10mmとなるように調整

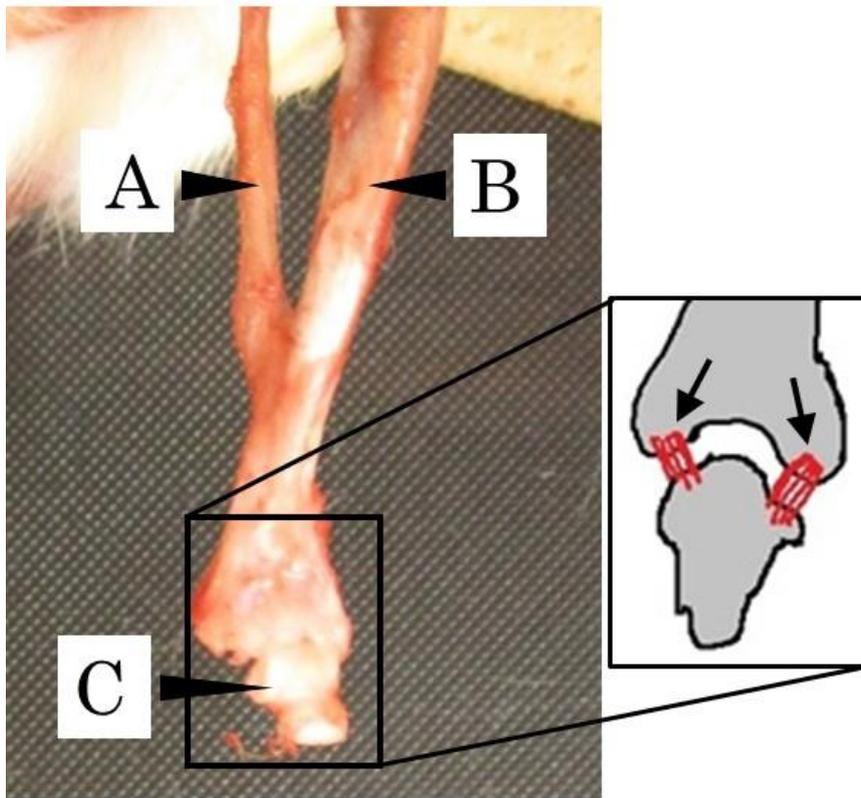


図 3-3 距腿靭帯

A : 腓骨 , B : 脛骨 , C : 距骨 , ← : 距腿靭帯



図 3-4 引張試験機への距腿靭帯の取付

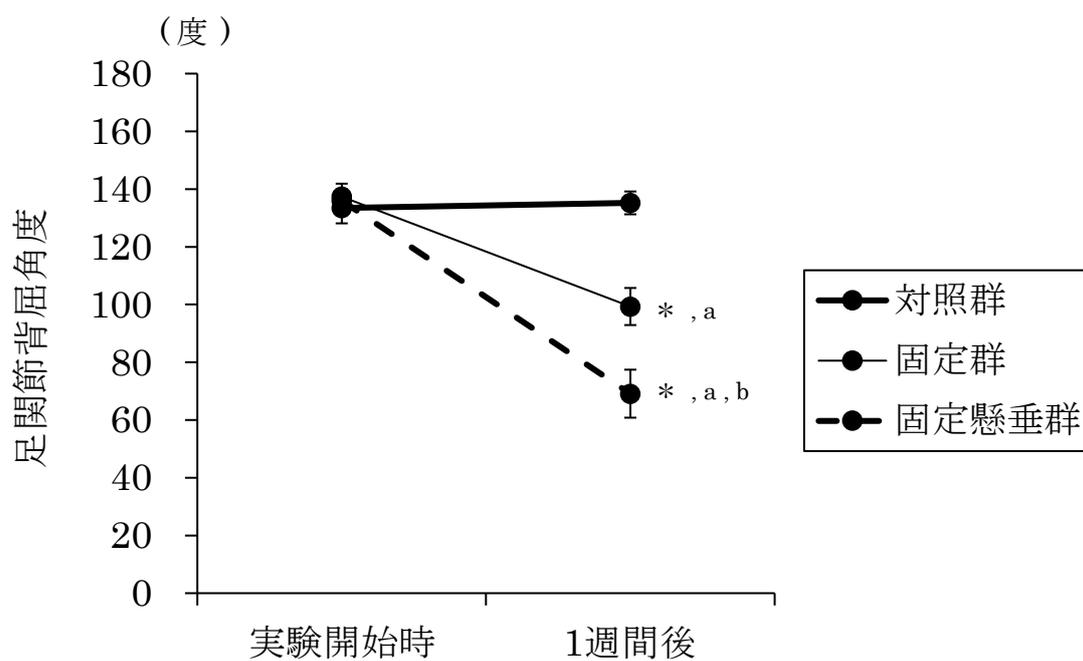


図 3-5 足関節背屈角度の結果

* 実験開始時との有意差 ($p < 0.05$)

a 対照群との有意差 ($p < 0.05$)

b 固定群との有意差 ($p < 0.05$)

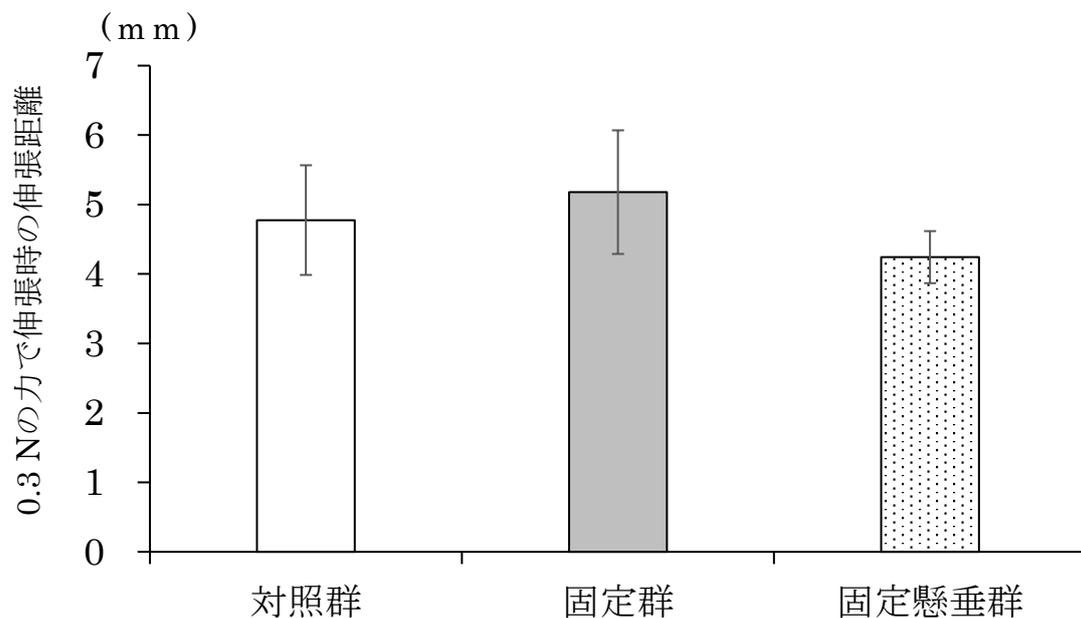


図 3-6 皮膚伸張性の結果

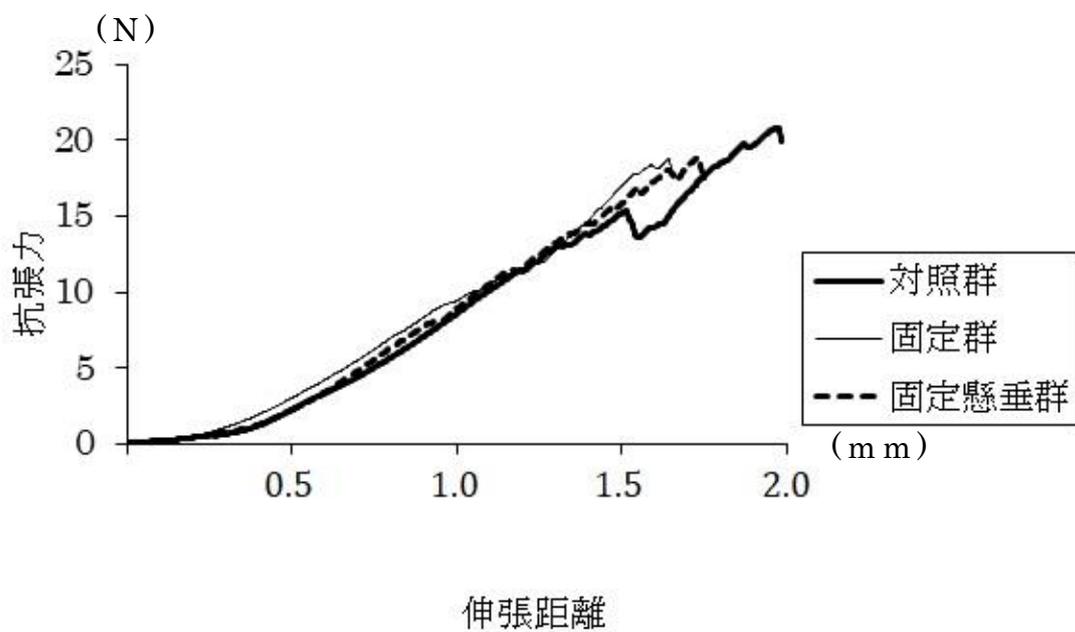


図 3-7 距腿靭帯の長さ—張力曲線 (代表値)

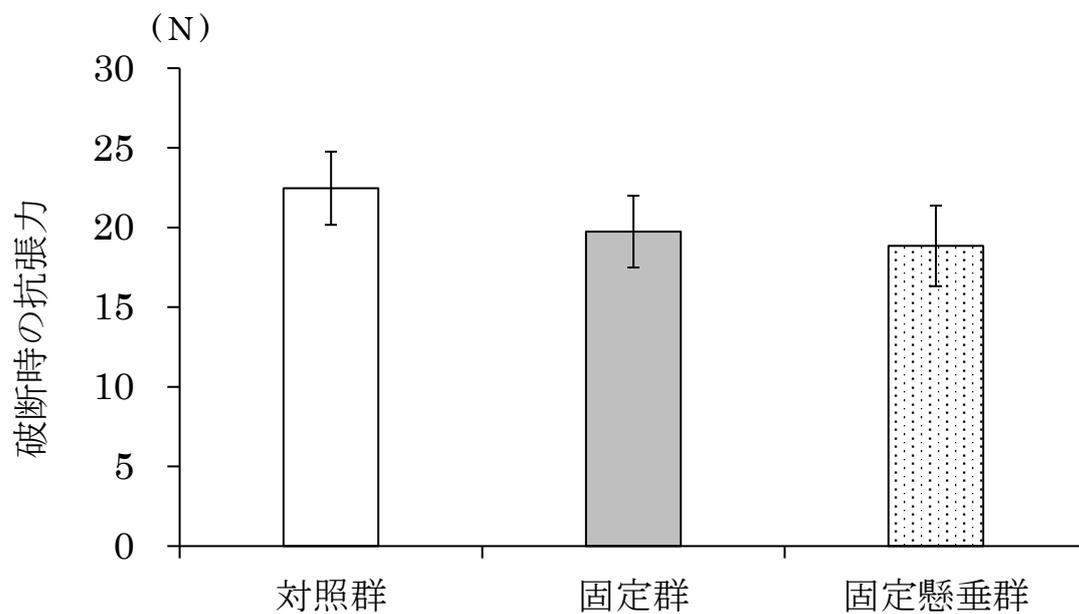


図 3-8 靭帯伸張性の結果

第 4 章

電気刺激が非荷重を伴って生じる 関節拘縮とヒラメ筋変化に与える影響

4-1 小序

関節拘縮は，関節固定^{13,50)}によって，骨格筋や靭帯，皮膚などの関節周囲にある組織が変化することで発生する⁵⁰⁾。足関節を最大底屈位に1週間固定した場合，関節拘縮の主な原因組織は骨格筋である²⁵⁾。関節拘縮における骨格筋の変化は，ヒラメ筋について調査されている^{14,16,17,20-22,24,29-34,45-51)}。ヒラメ筋は，1週間の関節固定を実施することで筋膜を構成する主成分であるコラーゲンが増加し^{47,48,50,51)}，伸張性が低下する^{29,49)}。我々は前章までに，非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮において，関節固定のみによって生じた関節拘縮と比較してヒラメ筋のコラーゲン量がさらに増加し，より伸張性が低下することを明らかにした。このヒラメ筋の変化は，非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮が関節固定によって生じた関節拘縮より重篤化した原因であると推測された。では何故非荷重を伴うことで関節拘縮における骨格筋の変化にはこのような差が生じるのだろうか。骨格筋の筋収縮について着目すると，後肢懸垂ではヒラメ筋の筋収縮が減少し，筋萎縮が生じることが報告されている^{58,59,61)}。関節固定でもヒラメ筋の筋萎縮が生じる^{24,71)}が，筋収縮の減少が原因と推測される。このことから，関節固定と後肢懸垂を組み合わせた場合，ヒラメ筋の筋収縮は，それぞれを単独で実施した場合と比較してさらに減少すると考えられる。先行研究によると，筋収縮を電気刺激により人工的に増加した場合，ヒラメ筋の伸張性低下が抑制され¹⁷⁾，関節拘縮発生を軽減した²⁰⁻²²⁾という報告がある。非荷重が関節拘縮を重篤化させる要因が骨格筋の筋収縮減少であるとすると，電気刺激は，骨格筋の伸張性低下を抑制し，非荷重を伴う関節固定によって生じる関節拘縮の発生を軽減する効果を有すると推測されるが，不明である。

そこで本実験の目的は、電気刺激が非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮発生やヒラメ筋変化に与える影響を明らかにすることとした。

4.2 対象と方法

対象動物

対象は、10週齢のWistar系雄ラット26匹（体重 332.5 ± 12.8 g）とした。室温を空調にて 23°C にコントロールされた飼育室において、すべてのラットは、1匹ずつケージに収容して飼育し、市販の固定飼料（MF飼料、オリエンタル酵母工業、東京）と水道水を自由に摂取させた。ラットの飼育環境の明暗調整は、電灯を午前7時に点灯し、午後7時に消灯することで12時間ごとに実施した。これによって、ラットの飼育環境は、人工的に昼と夜を設定した。すべてのラットは、実験開始までに1週間通常飼育することで事前に環境に慣れさせた。

本実験は、県立広島大学研究倫理委員会の承認を受け、県立広島大学保健福祉学部附属実験施設を使用して行った（承認番号13MA009）。

方法

すべてのラットは、右足関節を最大底屈位に固定し、後肢懸垂を実施した。群分けは、電気刺激を行わない刺激なし群（ $n = 13$ ）と電気刺激を行う刺激あり群（ $n = 13$ ）とした。各群6匹は、足関節背屈角度とヒラメ筋の伸張性の評価を実施し、各群の残り7匹はヒラメ筋の形態学的評価を行った。実験期間は、1週間とした。すべての実験中のラットに対する処置は、麻酔後、苦痛が伴わないように十分麻酔が効き、骨格筋が弛緩したことを確認してから実施した。

関節固定前，尾近位部やラット右後肢の剃毛は，体表上から骨指標を容易に確認できるようにし，後肢懸垂における尾部への鋼線刺入の妨げにならないようにするために実施した。

関節固定は，すべてのラットに対し，非伸縮性テープを足部から大腿部まで巻き付け，ラット右足関節を最大底屈位に保持することで行った。浮腫の有無を固定期間中に確認できるように，ラット足趾は露出した。ステンレス製の金網は，関節固定を破損や脱落から保護するため，非伸縮性テープを覆うように上からカバーした。浮腫やテープの緩みを認めた場合，非伸縮性テープの巻き替えは適宜行った。

後肢懸垂のための尾部への処置は，直径 1.0 mm のキルシュナー鋼線をラット尾部に刺入して三角形を形成し，ナスカンフックと組み合わせることで実施した。後肢懸垂は，ケージの天井金網にナスカンフックを掛け，ラット後肢を非荷重状態とすることで行った。後肢懸垂のためのすべての処置は，すべてのラットに対して行った。

関節可動域測定の実験開始時と1週間後とした。関節可動域測定の方法は，小野ら¹⁵⁾や田坂ら⁷³⁾の方法を参考に行った。関節可動域測定時のラットの測定肢位は，ラットを左側臥位とし，ラット右膝関節を最大屈曲位にて体幹とともに結束バンドを用いて固定器に固定した。またラット後肢は，股関節の内転を防止するためにアクリル板にて内側から保持した。

関節可動域測定の際のマーキングは，ラットの腓骨頭と外果に対して実施した。関節可動域測定は，デジタルテンションメーター（KYOWA Co., LTS-1KA）を用いて，ラット足底面の中足骨部より足関節を他動的に背屈し，その過程をデジタルカメラで動画として撮影することで行った。撮影した動画は，0.3 Nの背屈力が加わった瞬間をコンピュータ上で画像として抽出し

た。コンピュータ上において、足関節背屈角度は、画像解析ソフト（Image J, ver. 1.48v, USA）を用いて3回測定し、平均値を測定値として採用した。測定時の基本軸は腓骨頭と外果を結ぶ直線とし、移動軸は踵骨底面とした。

電気刺激は、実験初日より1日1回、計7日間行った。麻酔後、ラットは後肢懸垂を解除し、関節固定をした状態で電極を固定する台（以下、固定台）に載せ、左側臥位とした（図4-1）。電気刺激装置は、PULSECURE-PRO（KR-7, OG技研株式会社、岡山）を使用した。電極は、固定台に固定し、ラットの右大腿部より経皮的に右坐骨神経に当てた。電気刺激の対象は、右坐骨神経を介して右ヒラメ筋とした。電気刺激の条件は、刺激強度30V、周波数10Hz、刺激・休止時間各1秒、刺激時間30分/回とした。足趾屈曲筋群は、ヒラメ筋より末梢にて坐骨神経からの分枝の支配を受ける^{80,81}。このため電気刺激によって坐骨神経が刺激をされると、ヒラメ筋とともに足趾屈曲筋群は収縮する。電気刺激が適切に実施されていることは、右足趾の屈曲により確認した。

1週間後の関節可動域測定後、各群6匹のラット右脛骨と右踵骨は、0.7mmのキルシュナー鋼線を刺入し、足関節最大底屈位に固定した。ラットの屠殺は、腹大動脈を切断し、脱血することで行った。屠殺後、ラット右後肢は、皮膚を切除して大腿骨を切断し、足根骨部にワイヤーを刺入した。右後肢の引張試験機への取付は、大腿部とワイヤーを介して実施した。ラット右後肢は、ヒラメ筋以外を切除した。ヒラメ筋の引張試験は、引張試験機（オートグラフAGS-X 5kN, 島津製作所, 京都）を用いてOno et al.²⁹⁾の方法を参考に、10mm/minの伸張速度で行った。引張試験の測定値は、10mm伸張時の抗張力を採用した。引張試験は、屠殺後20分以内に実施した。

足関節背屈角度やヒラメ筋の伸張性の評価を実施しないラット各群 7 匹は，1 週間後に屠殺後，ヒラメ筋を摘出した。摘出したヒラメ筋は凍結することでヒラメ筋組織の標本を作成した。ヒラメ筋組織の標本は，クリオスタットを使用して 10 μm 厚に薄切し，ヒラメ筋組織の横断切片を作成した。作成した横断切片は，Type I コラーゲンの蛍光免疫染色を行った。Honda et al.⁴⁵⁾の方法を参考に，蛍光免疫染色は，抗 Type I コラーゲン抗体（Santa Cruz Biotechnology, USA）および蛍光標識を含んだ二次抗体（Life Technologies, USA）を使用して実施した。染色した横断切片は，オールインワン顕微鏡デジタルカメラを用いて 200 倍の拡大像として撮影した。撮影した写真は，無作為に 5 視野を選択し，画像解析ソフト（BZ-X Analyzer, キーエンス，大阪）を用いて選択した範囲の発光部分の面積を測定し，コラーゲン線維量として採用した。

統計ソフトは，Excel 統計（Bell curve for Excel, ver. 2.02, 社会情報サービス，東京）を使用した。足関節背屈角度の比較のための統計処理は，測定時期（実験開始時，1 週間後）と群（刺激なし群，刺激あり群）を独立変数とし，足関節背屈角度を従属変数とする対応のある二元配置分散分析を行った。群と測定時期の間に交互作用が認められた場合は，それぞれの独立変数について単純主効果を検討した。多重比較は，Scheffe 法を実施した。ヒラメ筋の伸張性や Type I コラーゲンの面積の比較のための統計処理は，正規分布に従うかどうかを確認するために Shapiro-Wilk 検定を行った。正規分布に従う場合は，対応のない t 検定を行い，正規分布に従わない場合は，Mann-Whitney の U 検定を実施することとした。危険率は，5% 未満をもって有意差ありと判定した。

4-3 結果

各群の足関節背屈角度の結果は、図 4-2 に示した。足関節背屈角度は、実験開始時において刺激なし群 132.3 ± 5.1 度、刺激あり群 131.6 ± 4.5 度であり、1週間後において刺激なし群 76.3 ± 10.2 度、刺激あり群 109.5 ± 6.6 度であった。群と測定時期の間に交互作用が認められたため、単純主効果を検討した。その結果、両群間における足関節背屈角度の有意差は、実験開始時になく、1週間後で認めた。1週間後において、刺激なし群の足関節背屈角度は、刺激あり群と比較して有意に減少した。測定時期間の足関節背屈角度の有意差は、両群に認められた。この両群における1週間後の足関節背屈角度は、実験開始時と比較して有意に減少した。

各群のヒラメ筋の引張試験の結果は、図 4-3 および図 4-4 に示した。ヒラメ筋の抗張力は、刺激なし群 2.07 ± 0.51 N、刺激あり群 0.28 ± 0.23 Nであった。統計処理の結果、正規分布に従わないことが認められたため、Mann-Whitney の U 検定を実施した。刺激なし群のヒラメ筋の伸張性は、刺激あり群と比較して有意に低下した。刺激あり群の長さ-張力曲線は、刺激なし群と比較して右方偏移した。

各群のヒラメ筋の Type I コラーゲン量の結果は、図 4-5 および図 4-6 に示した。ヒラメ筋の Type I コラーゲンの面積は、刺激なし群 $5328.4 \pm 1429.0 \mu\text{m}^2$ 、刺激あり群 $3540.7 \pm 874.2 \mu\text{m}^2$ であった。統計処理の結果、正規分布に従うことが認められたため、対応のない t 検定を実施した。刺激なし群のヒラメ筋の Type I コラーゲン量は、刺激あり群と比較して有意に増加した。

4-4 考察

電気刺激について

電気刺激は、物理療法の一つである。電気刺激の実施目的は様々なものがあり、骨格筋に対するものでは筋肥大^{85,88)}や関節拘縮の予防^{17,20,22)}などが挙げられる。この際、骨格筋は、自身の意思と関係なく収縮することとなる。電気刺激による筋力増強効果は、周波数によって異なり、刺激したい筋線維の種類に応じて変える必要がある^{86,88)}。筋線維の種類は、収縮速度が遅く、持久力のある遅筋線維と収縮速度が速く、強い収縮を生じる速筋線維に大別される⁸⁹⁾。先行研究は、ラット前脛骨筋に対して10 Hzおよび50 Hzの周波数での電気刺激を実施した場合における各筋線維の種類ごとの筋線維直径を調査した^{86,88)}。その結果、速筋線維は、両周波数で筋線維直径が増加し、遅筋線維は、10 Hzの周波数でのみ筋線維直径が増加した。このため、筋肥大について、遅筋線維に対する電気刺激は、10 Hzの方が50 Hzと比較してより効果的であると推測される。ヒラメ筋は主に遅筋線維によって構成されている⁶⁷⁾。このことから、ヒラメ筋の筋肥大に対する効果は、10 Hzでの電気刺激が適していると考えられる。

一方、関節拘縮に対する電気刺激においても、用いる周波数によって治療効果が異なる²⁰⁾。ラットヒラメ筋に対して10 Hzでの電気刺激を実施した場合、関節拘縮の抑制効果は、50 Hzにて行った場合と比較してより高い²⁰⁾。このため、本実験における電気刺激の条件は、より効果が期待される10 Hzを周波数として採用した。

足関節背屈角度について

足関節最大底屈位での関節固定を1週間実施した場合，足関節背屈角度は，正常と比較して減少する^{15,25-29,37,47-50}。先に我々は非荷重が関節固定によって生じる関節拘縮に与える影響を調査するための実験を行った。その結果，非荷重は，関節固定によって生じる骨格筋のコラーゲン量の増加や伸張性低下に悪影響を与え，関節拘縮を重篤化した。本実験において，両群は関節固定と後肢懸垂を実施した。このことから，特に電気刺激を実施していない刺激なし群は，関節固定と後肢懸垂の影響を受け，骨格筋の変化に由来した関節拘縮を生じたと推測される。

一方，電気刺激は，関節固定によって生じる関節拘縮の発生を抑制する²⁰⁻²²。本実験において，1週間後の刺激あり群の足関節背屈角度の低下は，刺激なし群と比較して軽度であった。本実験結果は，電気刺激が非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮に対しても効果があることを初めて示すものである。また，本実験における電気刺激の使用目的は，骨格筋を標的組織とし，筋収縮を促すことであった。このため，電気刺激により関節拘縮発生を軽減できた要因は，筋収縮が促されたことで非荷重を伴う関節固定で生じる骨格筋への悪影響を抑制したためであると推測される。

関節拘縮に対する介入として，動物実験では，電気刺激の他にトレッドミル歩行による自動運動¹⁵や，他動的なストレッチング^{13,14,23,24,27}などが用いられている。これらの介入方法による関節拘縮への効果に関する報告は，統一した見解が得られておらず，強い運動負荷では回復を妨げるというものもある^{13,15}。後肢懸垂によって生じた廃用性筋萎縮に対するトレッドミル歩行では，筋損傷を生じる可能性がある^{68,69}。このため非

荷重によって重篤化した関節拘縮に対する介入は、少ない運動負荷によっても過負荷となり得る可能性がある。一方、電気刺激に関する先行研究では、一様に関節拘縮の予防効果を示している²⁰⁻²²⁾。このため、臨床において、電気刺激の禁忌事項⁸²⁾に対象者が該当しなければ、電気刺激による関節拘縮への介入は、関節拘縮を悪化させるリスクなく行えるとともに、寝たきり高齢者の関節拘縮にも非常に有用であると思われる。

ヒラメ筋の伸張性について

足関節最大底屈位での関節固定を1週間実施した場合、ヒラメ筋は、伸張性が低下し^{29,49)}、関節拘縮の主な原因組織となる²⁵⁾。骨格筋の構造は、筋収縮を発生する筋線維と筋線維を包む筋膜に大別される^{50,80,81)}。骨格筋の伸張性は、筋膜に由来する⁵⁰⁾。このため、本実験におけるヒラメ筋の伸張性は、特に筋膜の影響を反映したものであったと考えられる。

骨格筋伸張性の評価は、引張試験機を用いて他動的に筋を伸張し、長さ—張力曲線を得ることで行う^{17,31,33,49)}。関節固定によって伸張性が低下したヒラメ筋は、正常と比較して長さ—張力曲線が左方偏移する^{17,31,33,49)}。先に我々は非荷重が関節固定によって生じるヒラメ筋の伸張性低下に与える影響を調査するための実験を行った。その結果、非荷重は、関節固定によって生じるヒラメ筋の長さ—張力曲線をさらに左方偏移することが明らかとなった。本実験において、両群は関節固定と後肢懸垂を実施した。このため、特に電気刺激をしていない刺激なし群のヒラメ筋は、関節固定を実施した場合と比較して、長さ—張力曲線が左方偏移し、伸張性が低下した。一方、電気刺激は、ヒラメ筋の伸張性低下を抑制する¹⁷⁾。本実験においても、刺激あり群のヒラメ筋は、刺激なし群と比較して長さ—張力曲線が

右方に位置し、伸張性低下が抑制された。本実験結果は、電気刺激が非荷重を伴う関節固定によって生じる関節拘縮においてもヒラメ筋の伸張性低下を抑制する効果があることを示すものである。

では何故、電気刺激はヒラメ筋の伸張性低下を抑制する効果を有するのだろうか。本実験におけるヒラメ筋の伸張性は、筋膜の影響によるものであると推測した。筋膜は、筋線維を包む膜であるため、筋線維の収縮や弛緩、および伸張に伴う筋線維の長さ変化に対応することが求められる⁵⁰⁾。正常の骨格筋は伸張性が低下しない。つまり、骨格筋、特に筋膜の伸張性を正常に保つためには、筋線維の収縮や弛緩、伸張といった刺激により筋膜を不動状態にしないことが必要であると推測される。しかし、本実験において、ヒラメ筋は、足関節底屈位固定により短縮位となる⁴⁶⁾。骨格筋の筋萎縮と関節拘縮は関連がない³¹⁾。しかし、筋萎縮と筋収縮の減少は関連があると考えられている⁵⁹⁾。ヒラメ筋の筋萎縮は、関節固定によって生じ、関節固定と後肢懸垂を組み合わせた場合により強く発生する⁷¹⁾。このことから、ヒラメ筋の筋収縮は、関節固定により減少し、関節固定と後肢懸垂を組み合わせた場合にさらに減少することが推測される。関節固定と後肢懸垂を実施した刺激なし群のヒラメ筋の伸張性は、筋収縮の減少に伴う筋膜の不動によって低下したと考えられる。一方、刺激あり群において、電気刺激は、人工的にヒラメ筋の筋収縮を生じさせた。これにより、関節固定期間中の筋膜の不動状態が軽減され、ヒラメ筋の伸張性は低下が抑制されたと考えられる。以上の点から、我々は、非荷重が関節拘縮を重篤化させる要因が筋収縮減少によるものであることを証明した。

ヒラメ筋のコラーゲン量について

本実験におけるヒラメ筋の伸張性は、筋膜の影響を反映したものであると推測した。筋膜は主にコラーゲンによって構成されている。特に Type I コラーゲン量は、関節固定によって増加し、関節固定期間を延長することでさらに増加していくことから、関節拘縮との関連性があると考えられている^{47,48,50}。先に我々は、非荷重が関節固定によって生じた関節拘縮における Type I コラーゲン量に与える影響を調査した。その結果、非荷重は、関節固定によって生じる Type I コラーゲン量の増加をさらに促進した。本実験において、両群は、関節固定と後肢懸垂を実施した。このため、特に電気刺激をしていない刺激なし群の Type I コラーゲン量は、関節固定を実施した場合と比較して、さらに増加したと推測される。

では何故、骨格筋のコラーゲン量は、関節固定によって増加し、非荷重と関節固定が組み合わさるとさらに増加するのだろうか。コラーゲン量の増加は、骨格筋の低酸素状態が関与していると考えられている⁵⁰。骨格筋は収縮することで筋ポンプ作用を生じ、静脈還流を促している⁸⁹。心臓から全身に送り出される血液量は、心臓に流入する血液量に依存する⁸⁹。これらのことから、筋収縮が少なくなり、静脈還流が低下した場合、心臓から骨格筋へ送られる血液量が少なくなり、低酸素状態を惹起すると推測される。筋萎縮と筋収縮の関係性より、ヒラメ筋の筋収縮は、関節固定によって減少し、関節固定と後肢懸垂を組み合わせた場合にさらに減少することが推測される。このため、本実験の刺激なし群におけるヒラメ筋のコラーゲン量の増加は、筋収縮の減少が生じ、低酸素状態が強く発生したこと由来すると考えられる。また、ヒラメ筋の毛細血管数は、後肢懸垂により減少する⁶⁵。このことも刺激なし群におけるヒラメ

筋の低酸素状態を惹起し、骨格筋のコラーゲン量を増加させた原因の一つであると考えられる。

一方、電気刺激は、骨格筋の収縮によって筋ポンプ作用を生じ、静脈還流を促す効果がある⁸²⁾。また、後肢懸垂によって発生するヒラメ筋の毛細血管数の減少を抑制する⁶⁵⁾。Type I コラーゲン量やコラーゲンの増加に関与する TGF- β の増加は、電気刺激により抑制される²⁰⁻²²⁾。本実験における刺激あり群のヒラメ筋のコラーゲン量は、刺激なし群と比較して有意に少なかった。以上のことから、刺激あり群のヒラメ筋は、電気刺激によりヒラメ筋の低酸素状態や毛細血管数の減少を緩和し、コラーゲンの増加が抑制されたと考えられる。

4-5 小括

本実験の目的は、電気刺激が非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮発生やヒラメ筋変化に与える影響を明らかにすることとした。対象はラットとした。足関節最大底屈位での関節固定と後肢懸垂はすべてのラットに実施した。群分けは、電気刺激を実施しない刺激なし群、電気刺激を実施する刺激あり群の2群とした。1週間の実験後、刺激あり群における足関節背屈角度とヒラメ筋の伸張性は、刺激なし群と比較して有意に低下が抑制された。また、刺激あり群におけるヒラメ筋のコラーゲン量は、刺激なし群と比較して増加が抑制された。この刺激あり群におけるコラーゲン量の増加の抑制は、足関節背屈角度やヒラメ筋の伸張性低下を抑制していると推測される。以上のことから、非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮において、電気刺激は、非荷重を伴う関節固定によって生じるヒラメ筋変化を抑制し、関節拘縮発生を軽減する効果を有することが明らかとなった。また我々は、非荷重が関節拘縮を重篤化させる要因が筋収縮減少によるものであることを証明した。

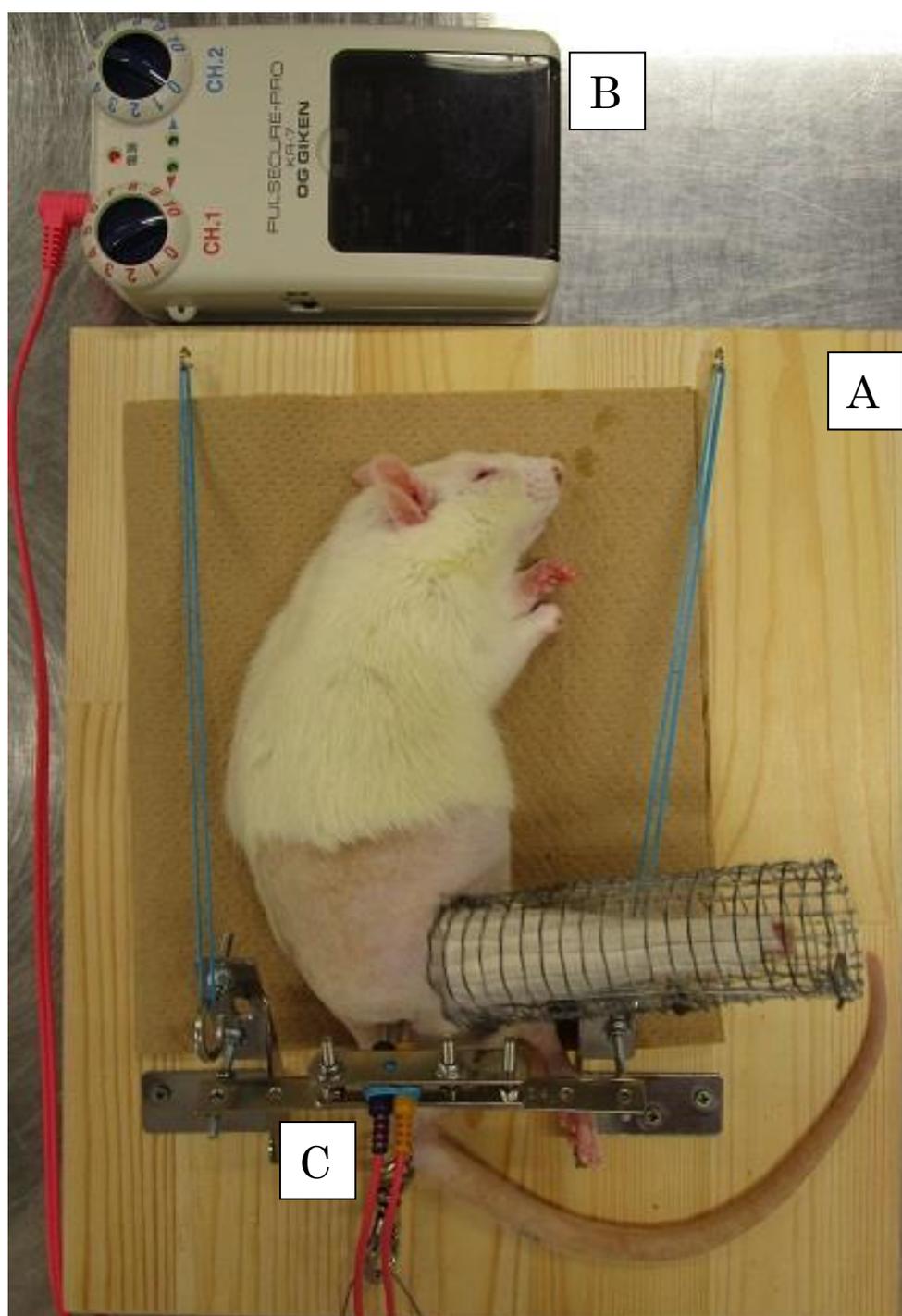


図 4-1 電気刺激の様子

A : 固定台

B : 電気刺激装置

C : 電極

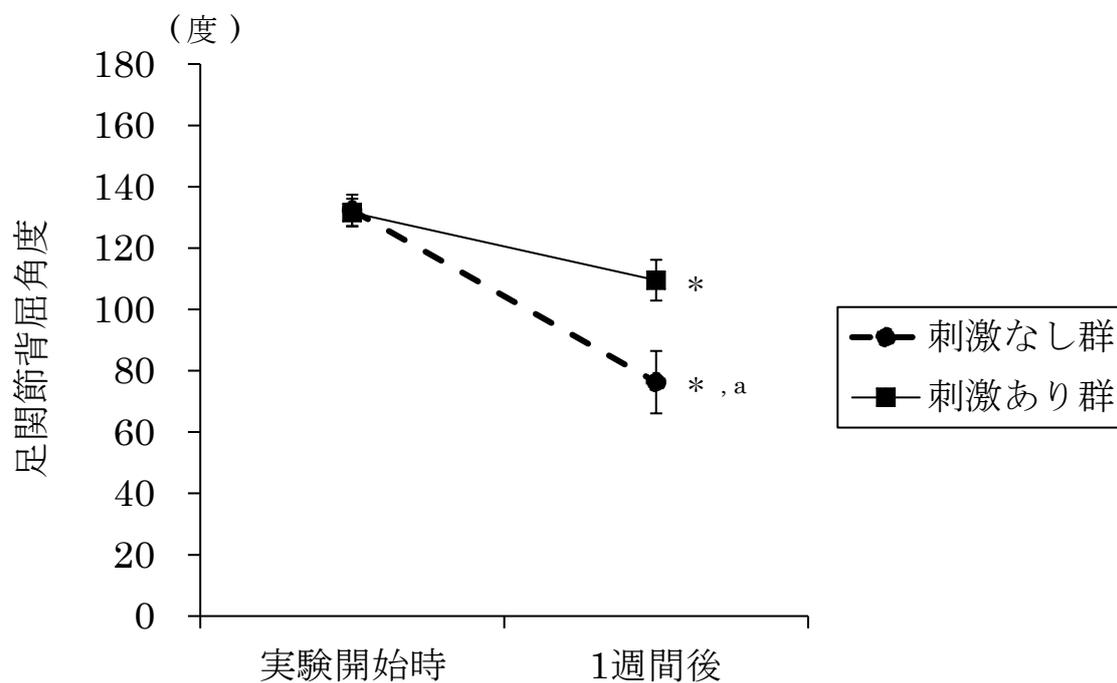


図 4-2 足関節背屈角度の結果

* 実験開始時との有意差 ($p < 0.05$)

a 刺激あり群との有意差 ($p < 0.05$)

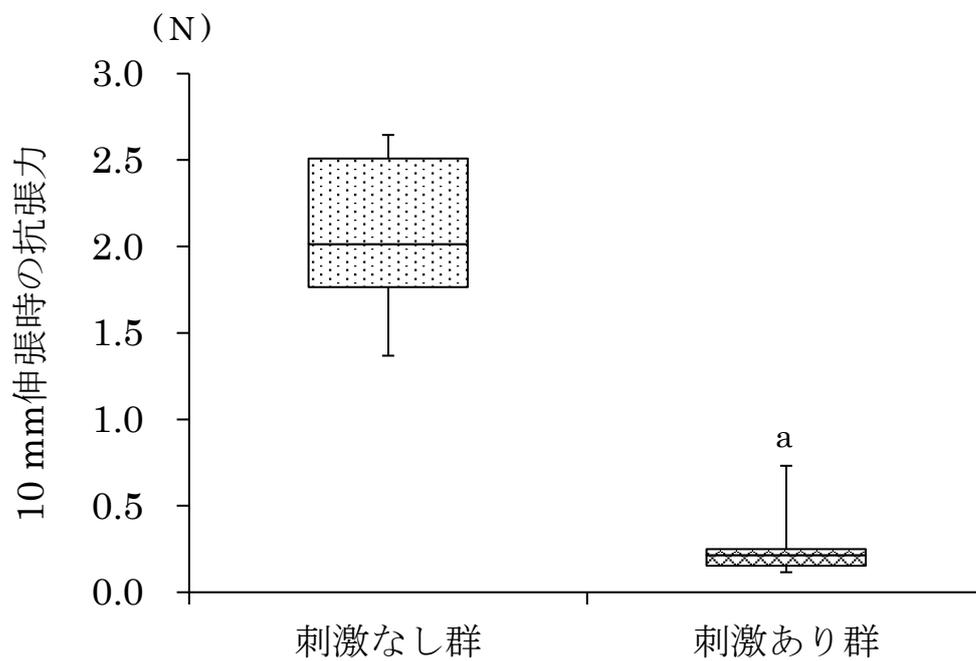


図 4-3 ヒラメ筋の伸張性の結果

a 刺激なし群との有意差 ($p < 0.05$)

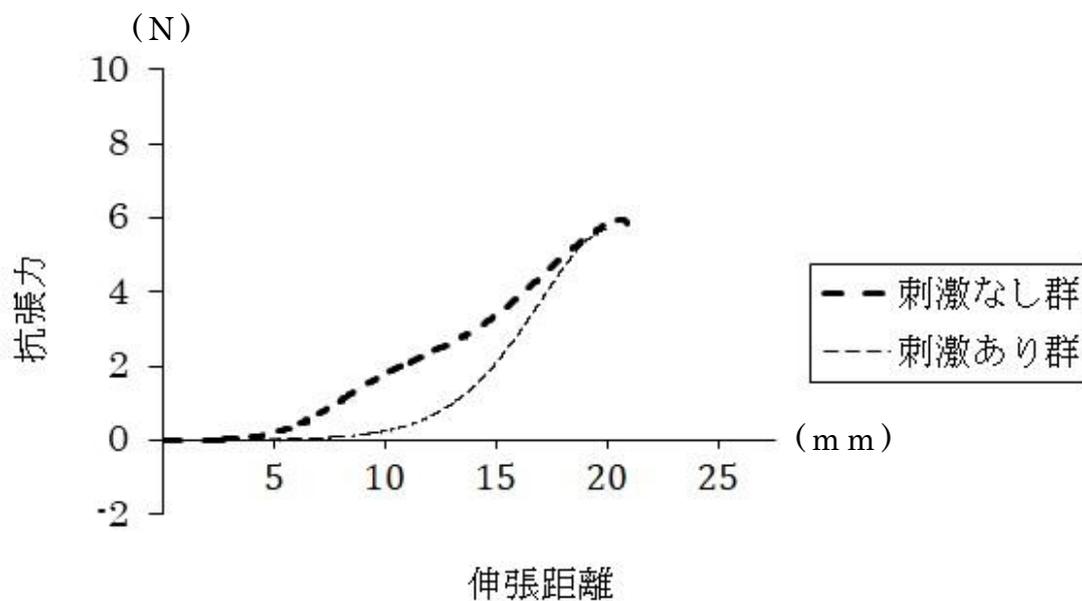


図 4-4 ヒラメ筋の引張試験の代表値（長さ—張力曲線）

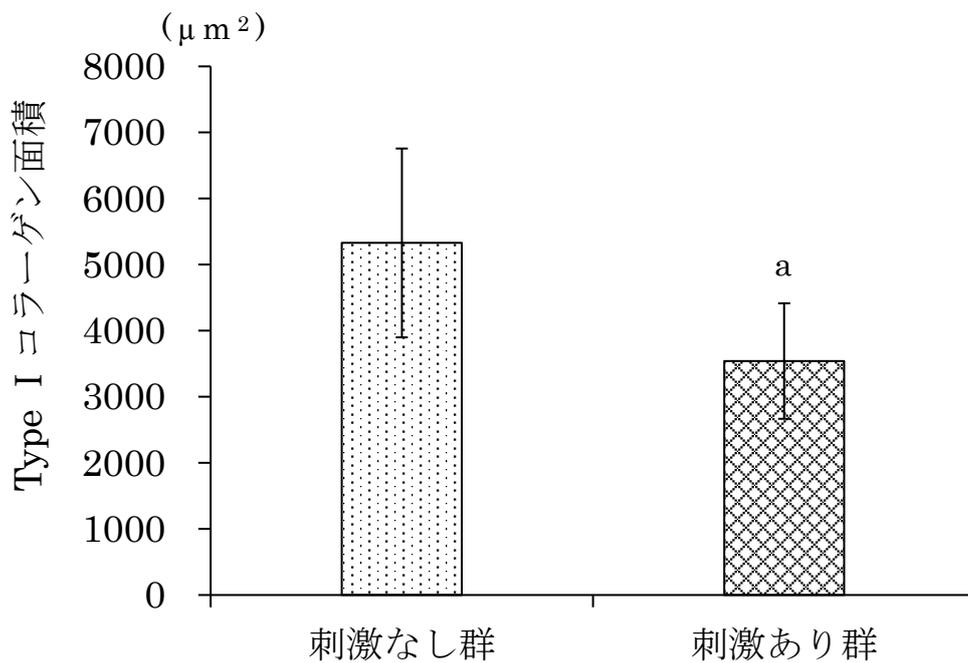


図 4-5 ヒラメ筋の Type I コラーゲン面積の結果

^a 刺激なし群との有意差 ($p < 0.05$)

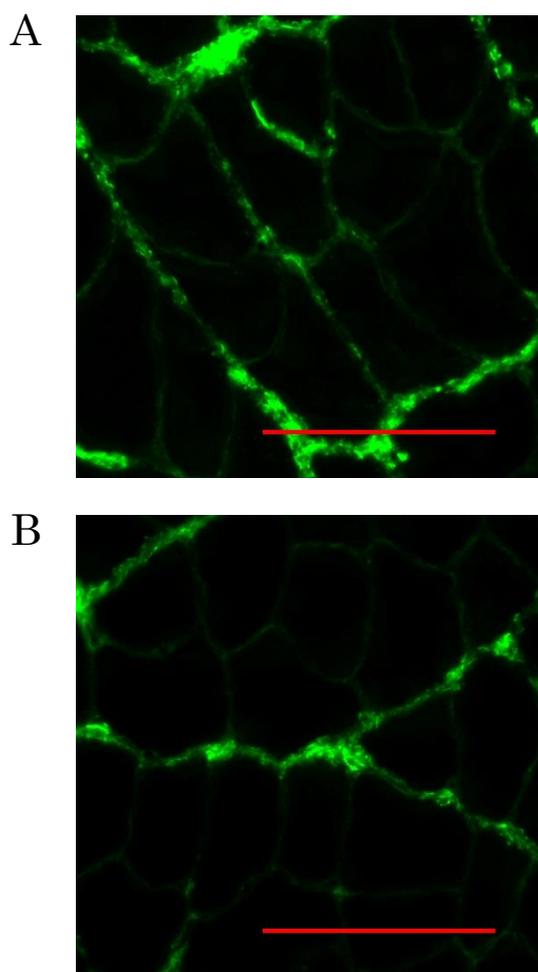


図 4-6 Type I コラーゲンの免疫染色像 (Bar100 μm)

A : 刺激なし群

B : 刺激あり群

第5章

総括

第1章では、本論文の緒言として関節拘縮と非荷重についての概要を述べた。関節拘縮は、骨格筋や皮膚、および靭帯などの変化によって関節可動域に制限が生じるものであり、日常生活に支障をきたすため、重要な機能障害の一つとして扱われている。関節拘縮の原因は、関節運動が減少することであり、臨床ではベッド上での安静臥床や関節固定などが挙げられる。関節拘縮の発生は、関節運動の減少のみならず、非荷重の影響を受けている可能性が危惧されている。しかし、非荷重が関節拘縮に与える影響については不明な点が多い。関節拘縮の病態を理解することは、効果的な関節拘縮の予防を考える上で重要と言える。そこで本研究では、関節拘縮発生におよぼす非荷重の影響を証明し、効果的な予防方法を検討した。

第2章では、非荷重が関節拘縮発生やヒラメ筋の変化に与える影響について対照群を実際に設定して検討した。ラットは、足関節の関節固定を行わない対照群、足関節を最大底屈位に固定する固定群、関節固定と後肢懸垂を実施する固定懸垂群の3群に分けた。評価項目は、足関節背屈角度やヒラメ筋の伸張性、およびヒラメ筋の Type I コラーゲン量とした。その結果、非荷重は、関節固定によって生じる足関節背屈角度やヒラメ筋の伸張性低下、およびコラーゲン量の増加をさらに増悪することを発見した。このことから非荷重は、関節拘縮の発生に悪影響を与えること、その原因がコラーゲン量の増加に起因する骨格筋の伸張性低下に由来するものであることを明らかにした。

第3章では、非荷重を伴う関節固定によって生じる関節拘縮において、皮膚や靭帯の伸張性がどのように変化するかを検討した。ラットは、対照群と固定群、および固定懸垂群の3群に分けた。評価項目は、足関節背屈角度と皮膚や靭帯の伸張性とした。その結果、非荷重は、関節固定により生じる足関節背屈

角度の低下をさらに増悪した。一方、皮膚や靭帯の伸張性は、3群間に差がなかった。以上のことから、非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮において、皮膚や靭帯の伸張性は、1週間では変化しないことを発見した。

第4章では、電気刺激が非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮発生やヒラメ筋変化に与える影響を検討した。すべてのラットは、関節固定と後肢懸垂を行い、電気刺激を実施しない刺激なし群、電気刺激を実施する刺激あり群の2群に分けた。評価項目は足関節背屈角度とヒラメ筋の伸張性、およびヒラメ筋の Type I コラーゲン量とした。その結果、電気刺激は、非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮における足関節背屈角度やヒラメ筋の伸張性低下、ヒラメ筋のコラーゲン量増加を抑制することを発見した。末梢神経に対する電気刺激は、活動電位を生じて神経筋接合部に達し、神経伝達物質を介して筋線維にも活動電位を発生させ、筋収縮が惹起される⁸²⁾。つまり、刺激あり群では、電気刺激によりヒラメ筋の筋収縮が惹起された。このことから、非荷重が関節拘縮発生に悪影響を与える原因は、非荷重によって筋収縮が減少することでコラーゲンが増加し、ヒラメ筋の伸張性を低下させるためであることが示唆された。

臨床において、ギプス固定の目的は、関節固定や下肢骨への免荷などである⁹⁰⁾。これまで関節拘縮に関する先行研究^{13-22,25-48,50)}は、ギプス固定などの関節固定の影響について検討されており、免荷という要素の影響について考慮されていなかった。整形外科術後の患者は、関節固定の他に免荷が治療の一環として実施されることがある。このような状況は、整形外科術後の患者のみならず、非荷重状態で関節運動が減少している寝たきり高齢者にも当てはまるものである。このため、関節

拘縮に関する検討は、関節固定と非荷重の影響を合わせて考慮すべきである。そこで、我々は、関節拘縮発生におよぼす非荷重の影響を調査した。本研究は、非荷重が関節固定によって生じる関節拘縮に悪影響を与えること、また非荷重に伴う筋収縮減少に起因した骨格筋の伸張性低下が関節拘縮を重篤化する原因であることを初めて証明した研究である。

本研究成果により、従来の関節拘縮に対する介入によって得られた予防や治療効果は、非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮に対しても有効であるか懸念される。我々は、非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮に対する有効な予防方法として電気刺激が適していることを初めて証明し、関節拘縮の予防研究を一步先に推し進めることに成功した。電気刺激は、関節拘縮を重篤化させる因子である筋収縮の減少に直接介入できる方法であるため、非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮の予防方法として最適であると考えられる。

以上の結果は、臨床において、整形外科術後に関節固定と免荷を余儀なくされた症例や、臥床状態にある症例の関節拘縮が筋収縮の減少に伴う骨格筋の伸張性低下によって生じるため、電気刺激で筋収縮を起こすことで関節拘縮の発生が抑制される可能性を示唆している。

謝辭

本研究を学位論文としてまとめるにあたり、長きにわたり多大なるご指導を賜りました公立大学法人県立広島大学大学院総合学術研究科生命システム科学専攻、公立大学法人県立広島大学大学院総合学術研究科保健福祉学専攻兼務 小野武也教授に厚く御礼申し上げます。

また、大変お忙しい中、副査として本学位論文へのご高見を賜るとともに、ご教示を頂きました公立大学法人県立広島大学大学院総合学術研究科生命システム科学専攻、公立大学法人県立広島大学大学院総合学術研究科保健福祉学専攻兼務 沖貞明教授、公立大学法人県立広島大学大学院生命システム科学専攻 堀内俊孝教授、公立大学法人県立広島大学大学院総合学術研究科生命システム科学専攻 齋藤靖和教授に心より御礼申し上げます。

また、本研究の遂行に際し、多くのご支援やご助言、および実験への協力をしていただきました公立大学法人県立広島大学大学院総合学術研究科保健福祉学専攻 津森登志子教授、公立大学法人県立広島大学大学院総合学術研究科保健福祉学専攻 梅井凡子准教授、公立大学法人県立広島大学保健福祉学部 積山和加子先生、学校法人古沢学園広島都市学園大学健康科学部 石倉英樹先生、学校法人福田学園大阪保健医療大学保健医療学部 相原一貴先生、神戸大学大学院保健学研究科 松本智博氏、小野ゼミの学生の皆様に心より感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 草野修輔：高齢者のリハビリテーション．理学療法科学，2004，19(3)：175-181.
- 2) 上田 敏：廃用症候群とリハビリテーション医学．総合リハ，1991，19(8)：773-774.
- 3) 仙波浩幸，青木菜摘，久留利菜菜・他：理学療法士実態調査報告—2010年1月実施—. 理学療法学，2010，37(3)：188-217.
- 4) 小泉幸毅，小川 彰，村山謙治・他：拘縮の予防と治療，医学書院，東京，2003，pp1-17.
- 5) 福屋靖子：成人中枢神経障害者の在宅における生活動作と関節拘縮の関係について．理学療法学，1994，21(2)：90-93.
- 6) 村田 伸，津田 彰，稲谷ふみ枝・他：在宅障害高齢者の転倒に影響を及ぼす身体及び認知的要因．理学療法学，2005，32(2)：88-95.
- 7) Shimada T, Takemasa S, Hidaka M, et al. : Factors affecting development of contracture in hemiplegic patients. Bulletin of Allied Medical Sciences, Kobe, 1994, 10 : 37-44.
- 8) 武政誠一，嶋田智明，日高正巳・他：在宅高齢脳卒中片麻痺者の関節可動域制限とその関連要因．神戸大学医学部保健学科紀要，1996，12：9-15.
- 9) 谷口由美子，前川厚子，黒柳いつ子・他：寝たきり療養者の関節拘縮発症状況と関連要因に関する研究．日本褥瘡学会誌，2015，17(2)：110-116.

- 10) Moseley AM, Herbert RD, Nightingale EJ, et al.: Passive stretching does not enhance outcomes in patients with plantarflexion contracture after cast immobilization for ankle fracture : a randomized controlled trial. Arch Phys Med Rehabil, 2005, 86(6) : 1118-1126.
- 11) Harvey LA, Herbert RD, Glinsky J, et al. : Effects of 6 months of regular passive movements on ankle joint mobility in people with spinal cord injury: a randomized controlled trial. Spinal Cord, 2009, 47(1) : 62-66.
- 12) Flowers KR, Pheasant SD : The use of torque angle curves in the assessment of digital joint stiffness. Journal of Hand Therapy, 1988, 1(2) : 69-74.
- 13) 松本智博, 小野武也, 沖 貞明・他 : 関節拘縮に対するストレッチの力の違いが関節可動域に与える影響. 第49回日本理学療法学会大会抄録集, 横浜, 2014 : 0773.
- 14) Ishikura H, Ono T, Oki S, et al.: Effect of stretch on improvement of muscular contractures in rats. J Phys Ther Sci, 2015, 27(9) : 2821-2823.
- 15) 小野武也, 梅井凡子, 積山和加子・他 : 関節拘縮の自然回復と運動の効果に関するラットによる実験的研究. ヘルスプロモーション理学療法研究, 2014, 4(3) : 133-135.
- 16) Williams PE : Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle. Ann Rheum Dis, 1990, 49 : 316-317.
- 17) 沖 貞明, 柴田大法, 奥村秀雄・他 : 不動性萎縮筋に対する電気刺激の効果 : 筋性拘縮の発生を抑制できるか? . 運動療法と物理療法, 1997, 8(1) : 53-57.

- 18) 八百板沙：長期固定による膝関節拘縮の発生と修復に関する実験的研究．日本整形外科学会雑誌，1966，40(4)：431-453.
- 19) 沖 貞明，大塚 彰，金井秀作・他：関節可動域維持に必要な関節可動域運動の検討—ラットにおける実験的検討—．運動療法と物理療法，2004，15(4)：312-316.
- 20) 吉村彩菜，田中美帆，原槇希世子・他：電気刺激を用いた筋収縮運動の収縮様式の違いがラットヒラメ筋の線維化ならびに拘縮におよぼす影響．第49回日本理学療法学会大会抄録集，横浜，2014：1487.
- 21) 吉村彩菜，原槇希世子，坂本淳哉・他：電気刺激を用いて不動の過程で骨格筋に周期的な筋収縮を負荷すると線維化ならびに拘縮の発生が軽減する．第48回日本理学療法学会大会抄録集，名古屋，2013：S-A基礎-044.
- 22) Yoshimura A, Sakamoto J, Honda Y, et al.: Cyclic muscle twitch contraction inhibits immobilization-induced muscle contracture and fibrosis in rats. *Connect Tissue Res*, 2017, 58(5)：487-495.
- 23) 中田 彩，沖田 実，中居和代・他：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—マウスにおける実験的研究—．理学療法学，2002，29(1)：1-5.
- 24) 西田まどか，沖田 実，福田幸子・他：持続的伸張運動と間歇的伸張運動が拘縮と筋線維におよぼす影響—関節固定法と後肢懸垂法を組み合わせたラットの実験モデルによる検討—．理学療法学，2004，31(5)：304-311.

- 25) 岡本真須美, 沖田 実, 加須屋茜・他: 不動期間の延長に伴うラット足関節可動域の制限因子の変化: 軟部組織(皮膚・筋)と関節構成体由来の制限因子について. 理学療法学, 2004, 31(1): 36-42.
- 26) 小野武也, 沖 貞明, 井上かおり・他: 関節可動域制限の発生を予防するために必要な関節運動時間の検討. 理学療法科学, 2012, 27(4): 489-491.
- 27) 陳之内将志, 小野武也, 沖 貞明・他: 関節可動域制限の発生時期に関する検討. 人間と科学: 県立広島大学保健福祉学部誌, 2007, 7(1): 181-185.
- 28) 吉永龍史, 小野武也, 沖 貞明・他: 一日 12 時間の関節固定がラット足関節拘縮発生に与える影響. 理学療法科学, 2011, 26(2): 283-286.
- 29) Ono T, Oki S, Umei N, et al.: Effect of an intermittent eight-hour joint fixation period on joint contractures in rats. J Phys Ther Sci, 2014, 26(1): 53-55.
- 30) 石倉英樹, 小野武也, 沖 貞明・他: 筋性拘縮を起こしたラットヒラメ筋に対する過伸張が筋の破断位置に与える影響. 理学療法科学, 2014, 29(2): 173-175.
- 31) 沖 貞明, 柴田大法, 松田芳郎・他: 不動性萎縮筋における筋性拘縮の発生と進行. 運動療法と物理療法, 1998, 9(1): 38-41.
- 32) 小野武也, 沖 貞明, 越智淳子・他: 脊髄損傷に伴う痙縮がラットヒラメ筋の筋性拘縮に与える影響. 理学療法科学, 2004, 19(3): 251-254.
- 33) 小野武也, 沖 貞明, 越智淳子・他: 末梢神経損傷がラットの関節可動域制限およびヒラメ筋の伸長性に与える影響. 理学療法科学, 2004, 19(2): 127-130.

- 34) Okita M, Yoshimura T, Nakano J, et al.: Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat soleus muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 2004, 25(2): 159-166.
- 35) Tasaka A, Ono T, Oki S, et al.: Study on changes in skin extensibility during the development of joint contracture due to joint immobilization in rats. *J Phys Ther Sci*, 2015, 27(9): 2683-2685.
- 36) Tasaka A, Ono T, Oki S, et al.: Effect of skin resection on the improvement of joint contractures in rats. *J Phys Ther Sci*, 2014, 26(1): 11-13.
- 37) 後藤 響, 坂本 淳哉, 佐々部 陵・他: 膝関節屈曲拘縮モデルラットの皮膚の線維化の発生状況ならびに筋線維芽細胞の変化. 第48日本理学療法学会大会抄録集, 名古屋, 2013: O-A 基礎-225.
- 38) 松原 貴子, 沖田 実, 森岡 周: ペインリハビリテーション. 三輪書店, 東京, 2011, pp133-177.
- 39) 渡辺 進: 関節固定の靭帯に及ぼす早期の影響—生体力学的特性および横断面積の変化の検討—. *川崎医学会誌*, 1993, 19(3): 187-197.
- 40) Noyes FR.: Functional properties of knee ligaments and alterations induced by immobilization: a correlative biomechanical and histological study in primates. *Clin Orthop Relat Res*, 1977, 123: 210-242.
- 41) 林 一宏, 小野 武也, 沖 貞明・他: 関節固定後早期における前十字靭帯破断強度の検討. *人間と科学: 県立広島大学保健福祉学部誌*, 2012, 12(1): 59-67.

- 42) Larsen NP, Forwood MR, Parker AW. : Immobilization and retraining of cruciate ligaments in the rat. *Acta Orthop Scand*, 1987, 58(3) : 260-264.
- 43) Akesson WH, Amiel D, Woo SL. : Immobility effects on synovial joints the pathomechanics of joint contracture. *Biorheology*, 1980, 17(1-2) : 95-110.
- 44) 吉田大輔, 沖田 実, 坂本淳哉・他 : 関節不動化がラット膝関節の靭帯におよぼす影響. *長崎理学療法*, 2004, 5 : 1-8.
- 45) Honda Y, Sakamoto J, Nakano J, et al. : Upregulation of interleukin-1 β /transforming growth factor- β 1 and hypoxia relate to molecular mechanisms underlying immobilization-induced muscle contracture. *Muscle Nerve*, 2015, 52(3) : 419-427.
- 46) 佐伯 彩, 沖田 実, 吉村俊明・他 : 弛緩位ならびに伸張位での固定がラットヒラメ筋におよぼす影響. *理学療法学*, 2000, 27(3) : 63-68.
- 47) 本田祐一郎, 近藤康隆, 横山真吾・他 : 不動期間の延長に伴うラットヒラメ筋の筋周膜ならびに筋内膜におけるタイプ I・III コラーゲンの変化. 第 46 日本理学療法学会大会抄録集, 宮崎, 2011 : PF2-016.
- 48) 沖田 実, 中野治郎, 坂本淳哉・他 : 痛みと拘縮—骨格筋の変化からみた拘縮の病態—. *日本運動器疼痛研究会誌*, 2010, 2(1) : 31-38.
- 49) Sato Y, Ono T, Ishikura H, et al. : Study on change of rat soleus extensibility caused by reduction in joint movement with unweighting of the hind limbs. *J Phys Ther Sci*, 2018, 30(1) : 53-57.

- 50) 沖田 実, 坂本淳哉, 本田祐一郎・他: 関節可動域制限 第2版—病態の理解と治療の考え方. 三輪書店, 東京, 2013, pp1-149,173-226.
- 51) 岡野昭夫, 沖田 実, 奥埜博之・他: 機能障害科学入門. 九州神陵文庫, 福岡, 2010, pp230-240.
- 52) 文部科学省, 厚生労働省: 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針. 2014: 2-31.
- 53) 赤居正美, 天草万里, 伊藤 修・他: 入門リハビリテーション医学 第3版. 医歯薬出版, 東京, 2007, pp229-234.
- 54) 寺山和雄, 広畑和志: 標準整形外科学 第6版. 医学書院, 東京, 1996, pp28-39.
- 55) 山田 深: 宇宙医学とリハビリテーション医学. 総合リハ, 2015, 43(7): 601-606.
- 56) 神山慶人, 金子祐樹, 川島紫乃・他: 宇宙飛行士の生理的対策. 総合リハ, 2015, 43(7): 607-613.
- 57) 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, 1995, 22(3): 108-113.
- 58) De-Doncker L, Kasri M, Picquet F, et al.: Physiologically adaptive changes of the L5 afferent neurogram and of the rat soleus EMG activity during 14 days of hindlimb unloading and recovery. J Exp Biol, 2005, 208: 4585-4592.
- 59) 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. 金沢大学十全医学会雑誌, 1990, 99(6): 1050-1067.

- 60) 殷 祥洙, 益子詔次, 山内秀樹・他: 大腿骨骨萎縮の予防に関する実験的研究. リハビリテーション医学, 2001, 38(3): 203-210.
- 61) Riley DA, Slocum GR, Bain JL, et al.: Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. J Appl Physiol, 1990, 69(1): 58-66.
- 62) Miller TA, Lesniewski LA, Muller-Delp JM, et al.: Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001, 281(5): 1710-1717.
- 63) Hirose T, Nakazato K, Song H, et al.: TGF- β 1 and TNF- α are involved in the transcription of type I collagen α 2 gene in soleus muscle atrophied by mechanical unloading. J Appl Physiol, 2008, 104(1): 170-177.
- 64) Tanaka Y, Nakano J, Hamaue Y, et al.: Hindlimb suspension does not influence mechanical sensitivity, epidermal thickness, and peripheral nerve density in the glabrous skin of the rat hind paw. Physiol Res, 2013, 62(1): 119-123.
- 65) 平山祐介, 田中 稔, 藤田直人・他: 後肢非荷重によるヒラメ筋毛細血管の退行性変化に対する中周波および低周波電気刺激の予防効果. 第47回日本理学療法学会大会抄録集, 兵庫, 2012: 0807.
- 66) 友利幸之介, 中野治郎, 沖田 実・他: 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, 2004, 19(1): 31-35.

- 67) 上野勝也, 久保あずさ, 宮地 諒・他: ラットヒラメ筋廃用性萎縮に及ぼす間歇的伸張運動の効果—筋線維タイプおよび長軸部位別の検討—. 理学療法科学, 2015, 30(1): 15-20.
- 68) 宮田卓也, 田中正二, 山崎俊明: 歩行刺激と荷重刺激による廃用性筋萎縮抑制効果の比較. 第46回日本理学療法学会大会抄録集, 宮崎, 2011: OS2-002.
- 69) 山崎俊明, 立野勝彦, 灰田信英・他: 運動負荷時間の違いがラット廃用性筋萎縮の回復過程に及ぼす影響. 理学療法科学, 1998, 25(6): 381-387.
- 70) 金村尚彦, 森山英樹, 石川翔大・他: 膝前十字靭帯に対する荷重除去と振動刺激の影響. 第46回日本理学療法学会大会抄録集, 宮崎, 2011: PI2-067.
- 71) 岩石悟稔, 小野武也, 石倉英樹・他: 関節固定に後肢懸垂を加えることにより発生した筋萎縮に対する歩行訓練の影響. 第50回日本理学療法学会大会抄録集, 東京, 2015: P3-B-0924.
- 72) 上田 敏, 大川弥生: リハビリテーション医学大辞典. 医歯薬出版, 東京, 1996, pp271.
- 73) 田坂厚志, 小野武也, 沖 貞明・他: ラット足関節背屈可動域測定法の信頼性に関する検討. 理学療法科学, 2014, 29(1): 143-145.
- 74) 宮前珠子, 小川恵子: 関節可動域テストの信頼性. 理学療法と作業療法, 1978, 12(2): 139-144.
- 75) Salter N: Methods of measurement of muscle and joint function. The journal of bone and joint surgery, 1955, 37(3): 474-491.

- 76) 坂井建雄, 由利和也, 樋田一徳・他: カラーイラストで学ぶ 集中講義 解剖学. メジカルビュー社, 東京, 2012, pp410-439.
- 77) 日本整形外科学会: 関節可動域表示ならびに測定法. 日本整形外科学会雑誌, 1995, 69(4): 240-250.
- 78) 日本リハビリテーション医学会: 関節可動域表示ならびに測定法. リハビリテーション医学, 1995, 32(4): 207-217.
- 79) 網本 和, 新井光男, 池田 誠・他: 理学療法ハンドブック 改訂第4版 第1巻 理学療法の基礎と評価. 協同医学出版社, 東京, 2010, pp165-228.
- 80) 野村 巖, 山田重人, 井上 馨・他: 解剖学 第4版. 医学書院, 東京, 2015, pp87-238,327-338.
- 81) 五味敏昭, 金村尚彦, 鈴木陽介・他: 運動器系解剖学テキスト. 南江堂, 東京, 2015, pp70-192.
- 82) 安孫子幸子, 井ノ上修一, 大西秀明・他: 物理療法 第2版. 九州神陵文庫, 福岡, 2009, pp1-20,241-294.
- 83) 石橋隆治, 伊藤誠二, 伊藤正裕・他: トートラ人体解剖生理学 原書8版. 丸善出版, 東京, 2011, pp100-117.
- 84) 酒井昭典, 善家雄吉, 目貫邦隆・他: 手の外傷後のリハビリテーション. リハビリテーション医学, 2017, 54(8): 601-608.
- 85) 原田義昭, 藤原 誠, 中野恭一: 除神経筋に対する電気刺激の影響に関する実験的研究—特に刺激頻度に関して—. リハビリテーション医学, 1983, 20(1): 43-45.
- 86) 中居和代, 沖田 実, 豊田紀香・他: ラット前脛骨筋に対する異なる周波数での経皮的電気刺激が筋線維肥大効果におよぼす影響. 長崎理学療法, 2003, 4: 18-23.

- 87) 畑野栄治, Kanaujia RR, 長谷好記・他：電気刺激が健全骨格筋に及ぼす影響に関する影響について. リハビリテーション医学, 1985, 22(1): 25-29.
- 88) 岡本真須美, 中居和代, 友利幸之介・他：経皮的電気刺激の周波数の違いがラット前脛骨筋の筋線維肥大効果におよぼす影響. 第38回日本理学療法学会大会抄録集, 長野, 2003: 運動・神経生理-112.
- 89) 石澤光郎, 富永 淳: 生理学 第3版. 医学書院, 東京, 2007, pp34-46,110-132.
- 90) 麻生邦一, 赤松俊浩, 新井貞男・他: 運動器スペシャリストのための整形外科外来診療の実際. 中山書店, 東京, 2014, pp102-104.