

## Original Article

# ラット骨格筋に対する高頻度反復末梢性磁気刺激の安全性の検討 —筋組織学的検査と血液生化学検査を用いた検討—

鈴木啓太,<sup>1</sup> 平岡 崇,<sup>2</sup> 椿原彰夫,<sup>2</sup> 伊藤智崇,<sup>3</sup>  
出江紳一,<sup>4</sup> 八島建樹,<sup>5</sup> 岩知道伸久<sup>6</sup>

<sup>1</sup> 川崎医療福祉大学大学院医療技術学研究科リハビリテーション学専攻修士課程

<sup>2</sup> 川崎医科大学リハビリテーション医学教室

<sup>3</sup> 川崎医療福祉大学医療技術学部リハビリテーション学科

<sup>4</sup> 東北大学大学院医工学研究科リハビリテーション医工学分野

<sup>5</sup> 株式会社 IFG 研究開発部

<sup>6</sup> 川崎医科大学組織・電子顕微鏡センター

## 要旨

Suzuki K, Hiraoka T, Tsubahara A, Ito T, Izumi S, Yashima K, Iwachidou N. Considerations for safety of high-frequency repetitive peripheral magnetic stimulation of skeletal muscles in rats: Assessment by histological analysis of muscles and biochemical blood tests. Jpn J Compr Rehabil Sci 2015; 6: 56-63.

【目的】骨格筋に対する高頻度反復末梢性磁気刺激（以下、rpMS）の安全性を筋組織学的検査と血液生化学検査を用いて検討すること。

【方法】Wistar系雄ラット20匹をrpMSを施行するrpMS群と施行しないコントロール群（以下、CON群）に分けた。筋組織学的検査にはhematoxylin and eosin染色、modified Gomori trichrome染色、NADH-tetrazolium reductase染色、acid phosphatase染色、Periodic acid-Stiff（以下、PAS）染色を用いた。血液生化学検査ではクレアチンキナーゼ、アルドラーゼ、乳酸脱水素酵素（以下、LDH）を測定した。追加実験として、rpMS終了4時間後と12時間後の時点でそれぞれ2匹のラットについて筋組織学的検査を実施した。

【結果】rpMS群のPAS染色において、グリコーゲンの枯渇を示す組織像が観察されたが、rpMS4時間後のラットでは観察されなかった。rpMS群ではLDHがCON群より有意に低下していた。その他の染色法と血清酵素値においては特徴的な所見や有意な変化は認められなかった。

【結語】今回の結果から筋損傷の存在は示されず、骨格筋に対するrpMSの安全性が実証された。

**キーワード：**磁気刺激，骨格筋，安全性，筋組織学的検査，血液生化学検査

## はじめに

近年、磁気刺激（magnetic stimulation: MS）は経頭蓋磁気刺激（transcranial magnetic stimulation: TMS）として治療 [1] や研究分野 [2] で幅広く用いられているが、末梢神経や筋に対して直接的にMSを使用する方法はTMSのように普及していない。MSによる骨格筋の収縮機序は電磁誘導により生体内に渦電流を発生させ、末梢神経や骨格筋の細胞膜に脱分極を生じさせることで骨格筋が収縮するというものである。

従来、リハビリテーションの臨床場面では骨格筋の収縮を促すために電気刺激（electrical stimulation: ES）が広く用いられており、整形外科術後の不動や免荷によって生じる筋萎縮を予防する効果や健康人に対する筋力増強効果が報告されている [3-5]。また、脳卒中片麻痺患者の障害された機能の改善や代償を目的としたESの使用についても多くの研究がなされており、その有用性が証明されてきた [6-8]。しかしその一方で、Chaeら [6] は脳卒中片麻痺患者を対象にES施行による運動機能の回復を検討した結果、被験者46名のうち8名がESに伴う疼痛により実験の継続を断念したと報告している。ESに伴う疼痛は末梢神経や筋のみならず皮膚に存在する侵害受容器も刺激することで生じるとされており [9, 10]、ES施行時の避けることができない大きな問題の一つである。それに対してMSでは皮膚や脂肪といった高い電気抵抗を有する組織を透過することができ、皮膚に存在する侵害受容器を刺激することなく末梢神経や筋を興奮させることが可能であるとされている [11, 12]。また、MSとESで同程度の膝関節伸展トルクが発揮可能な刺激強度に統制して大腿四頭筋を刺激した結果、MSではESと比較して有意に疼痛が少なかったと報告されている [13]。つまり、疼痛が少ないという点はMS施行時の大きな利点である。

著者連絡先：平岡 崇  
川崎医科大学リハビリテーション医学教室  
〒701-0192 岡山県倉敷市松島577  
E-mail: hiraoka@med.kawasaki-m.ac.jp  
2015年2月9日受理

本研究において一切の利益相反や研究資金の提供はありません。

その他の利点として、Itoら [14] は腸腰筋のような深層筋の刺激にはMSの使用が有用であることを示唆している。さらに、MSは電極の貼付を必要とせず衣服の上から施行可能であるといった利点を有することからESへの代替を期待し、末梢神経や骨格筋に対する高頻度反復末梢性磁気刺激 (high frequency repetitive peripheral magnetic stimulation: rpMS) の効果や有用性の検証がなされている [14-19]。しかしながら、従来の磁気刺激装置は短時間の反復刺激により刺激コイルが高温に達するという問題点を抱えているため、前述した先行研究では刺激コイルの発熱を考慮した刺激プロトコールが設定されている [14-19]。それらのプロトコールでは刺激間に長いインターバルを設定しているが、実際には繰り返し刺激を行うことでコイルが熱を帯び、長時間の使用は困難となる。このことがrpMSの普及を妨げている一因であると考えられる。

そこで今回、刺激コイルの発熱を小さく抑えられる刺激装置が開発された。この刺激装置では発熱を抑制するために二つの対策が施されている。その一つが鉄心コイルを用いた点である。この利点として、Charlesら [20] は鉄心を用いることによりコイルの電気抵抗を減少させ、刺激に伴う発熱を抑制できるとしている。もう一つが空冷装置を設置し、rpMS施行中は常に送風しコイルを冷却できるようにした点である。これらの対策により本刺激装置は従来の刺激装置よりはるかに長い時間の連続使用が可能となったため、今後の臨床への普及が期待される。しかし、rpMSの安全な刺激強度や連続使用時間などに関する明確な基準は示されておらず不明な点が多い。そこで本研究では、ラットの骨格筋に対するrpMSの安全性を筋組織学的検査と血液生化学検査を用いて検討することを目的とした。

## 方法

### 1. 対象

対象は8週齢の体重185-215gのWistar系雄ラット24匹とした。これらをrpMSを与えないコントロール群 (以下、CON群) 10匹とrpMSを与えるrpMS群10匹に分けた。さらに追加実験として、筋組織学

的な変化を経時的に観察するため、rpMS施行後4時間経過した時点で2匹 (以下、rpMS4h群) から、また12時間経過した時点で2匹 (以下、rpMS12h群) から筋を採取した。すべてのラットは室温 $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度20-60%を保ち、7時から21時まで点灯する条件下にて飼育した。また、水および餌の摂取も自由に行える環境を整えた。なお、本研究は川崎医科大学の動物実験委員会の承認を受けて実施した (No.14-018)。

### 2. 実験手順

各群のラットは実験開始時にセボフルレンの吸入により麻酔を施行した。CON群とrpMS群の両群とも介入前の血液検体としてそれぞれ右大腿静脈から約2mlの採血を行った。続いてrpMS群には左大腿部前面に対して約1時間の磁気刺激プロトコール (後述) を施行し、CON群では磁気刺激プロトコールと同時間の安静を維持した。その後、介入後の血液検体として、両群ともに右大腿静脈から約2mlの採血を再度行った。採血後すぐに、被検筋である左大腿四頭筋を採取し筋標本を作成した。またrpMS4h群とrpMS12h群は磁気刺激プロトコール終了後、一旦ゲージ内に戻し麻酔から覚醒させ、それぞれ4時間と12時間経過した後、再度麻酔を導入して左大腿四頭筋を採取した。全実験行程完了後のラットは、セボフルレンの過剰投与により安楽死の処置をとった。実験行程を図1に示す。

### 3. 磁気刺激条件

株式会社IFG製の磁気刺激装置を使用した (図2)。刺激強度は本装置の最大出力電圧である600Vとし、磁束密度は0.9 Teslaであった。刺激周波数は40 Hzとした。磁気刺激プロトコールは前述の刺激強度で10秒間の刺激と30秒間の休息時間を計10回繰り返す、これを1セットとした。セット間には4分間の安静時間を設定し、合計6セット施行した (図3)。磁気刺激プロトコールの合計所要時間は約1時間であった。rpMS施行中はコイルの中心が左大腿部前面に密着するように検者が手で保持し、左膝関節が伸展するのを目視にて確認した。また、rpMS試行中のコイルの内部温度は、コイルに内蔵されている温度計を通して常に外設機にてモニタリングし、内部温度が $37^{\circ}\text{C}$

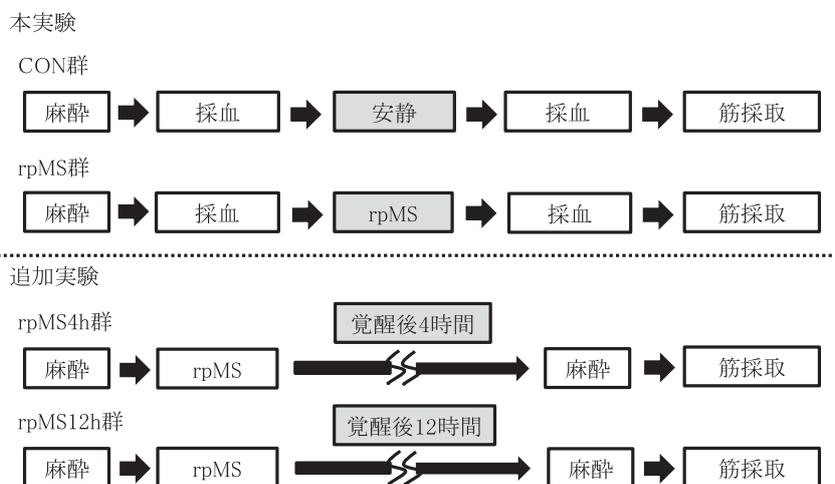


図1. 実験行程

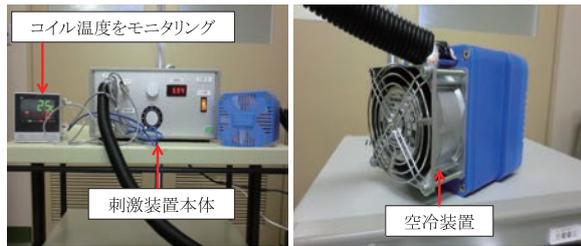


図2. 磁気刺激装置

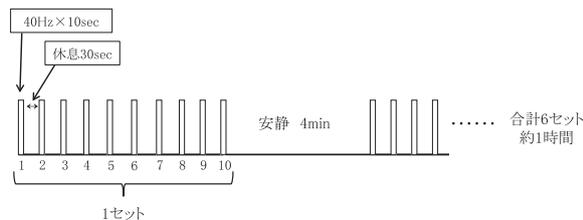


図3. 磁気刺激プロトコール

を超えないことを確認した。

#### 4. 筋組織学的検査

被検筋は左大腿四頭筋とした。まず、左大腿四頭筋を露出し、筋腹の長軸の midpoint に目印を付けてから筋を採取した。採取した筋は長さ 1 cm、直径 0.5 cm 程度にトリミングし、ドライアイスにより  $-80^{\circ}\text{C}$  以下にまで冷却されたノルマルヘキサン内で急速凍結した。凍結した筋標本は薄切を施行するまで  $-70^{\circ}\text{C}$  のデープフリーザー内で保管した。筋標本はクリオスタット Leica CM3050S (ライカマイクロシステムズ社製) を用いて、大腿四頭筋長軸 midpoint の部分を厚さ  $12\mu\text{m}$  に薄切し、スライドガラスに貼付後 2 時間以上風乾させた。風乾した筋切片は hematoxylin and eosin (以下, HE) 染色, modified Gomori trichrome (以下, Gomori) 染色, NADH-tetrazolium reductase (以下, NADH) 染色, acid phosphatase (以下, Acp) 染色, Periodic acid-Stiff (以下, PAS) 染色の 5 種類の染色を施行した。すべての検体について病理学者が光学顕微鏡での観察を行い、特徴的な筋組織学的所見の有無を確認した。

#### 5. 血液生化学検査

筋損傷マーカーとして測定する血清酵素はクレアチンキナーゼ (以下, CK), アルドラーゼ, 乳酸脱水素酵素 (以下, LDH) の 3 種類とした。採血を行うにあたり、まず右大腿部を切開し右大腿静脈を露出した。その後、プラスチックカニューレ型静脈内留置針 (テルモ株式会社製) を右大腿静脈内に刺入し、採血を行った。血液は CON 群と rpMS 群で介入前後ともに右大腿静脈から約 2 ml ずつ採取した。採取した血液は庫内温度が  $4^{\circ}\text{C}$  に設定された遠心分離機にて 3,000 rpm で 5 分間、遠心分離にかけ血清を抽出した。血清酵素値の測定は株式会社 SRL に委託した。

#### 6. 統計学的解析

統計処理には統計解析ソフトウェア SPSS Statistics 20 (IBM 社製) を使用した。介入前の血清酵素値の群間比較には対応のない  $t$ -検定を用い、血清酵素値の介入前後間の比較には対応のある  $t$ -検定を用いた。さらに CON 群と rpMS 群間で血清酵素値の変化に違いがあるかを検討するため、介入前後の変化率を算出し、対応のない  $t$ -検定を用いて比較検討した。有意水準は 5% 未満とした。

### 結果

#### 筋組織学的検査

それぞれの図は各群の代表的な筋組織学的所見を示す。筋標本の組織学的な観察では、PAS 染色において rpMS 群の 10 例中 8 例で広範囲にわたり染色濃度の薄い筋線維が観察された。しかし CON 群, rpMS4h 群, rpMS12h 群では染色濃度の薄い筋線維は観察されなかった (図 4)。また、rpMS 群の PAS 染色で染色濃度が薄い筋線維が rpMS 群の NADH 染色で薄く染色されたタイプ II 線維とほぼ一致していた (図 5)。すべての標本の HE 染色, Gomori 染色において特徴的な組織像は観察されなかった (図 6, 7)。また、Acp 染色でも貪食細胞の遊走を示すような組織像は確認されなかった (図 8)。

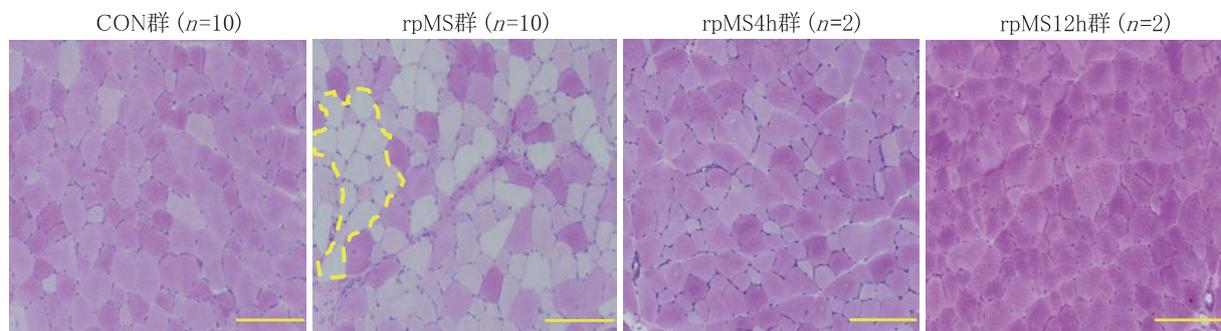


図4. PAS 染色

Bars: 200  $\mu\text{m}$ ;  $\times 200$ .

rpMS 群において染色濃度が薄い白く抜けた線維が広範囲に観察された。rpMS4h 群では rpMS 群でみられた白く抜けた筋線維が観察されなかった。

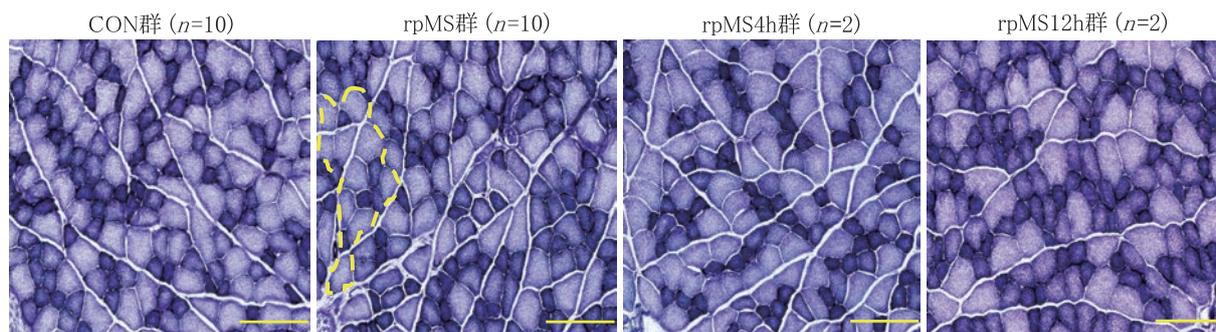


図5. NADH 染色

Bars: 200  $\mu$ m;  $\times$ 200.

rpMS 群のPAS 染色で白く抜けている筋線維（図4の黄色枠線）がNADH 染色で薄く染色されたタイプII 線維（黄色枠線）とほぼ一致していた。

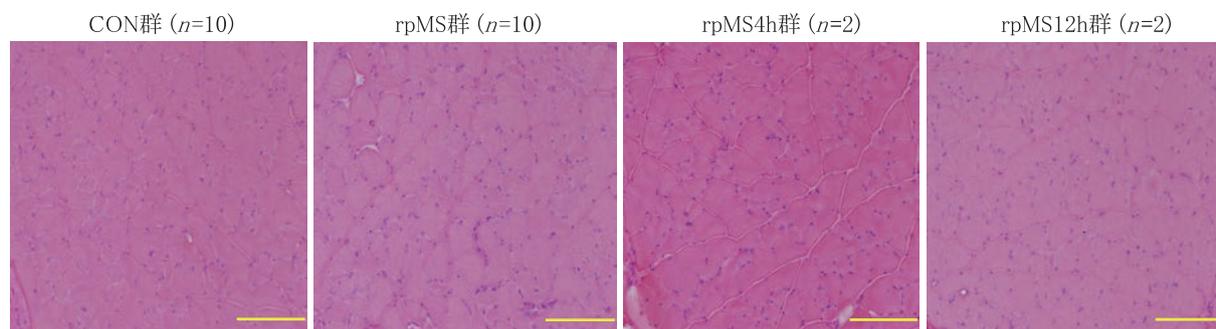


図6. HE 染色

Bars: 200  $\mu$ m;  $\times$ 200.

すべての検体において基本構造の乱れや、opaque 線維などの特徴的な所見は観察されなかった。

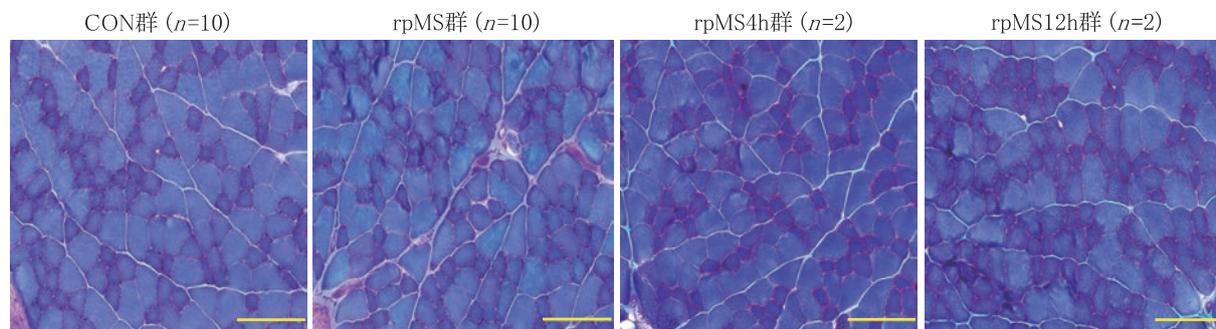


図7. Gomori 染色

Bars: 200  $\mu$ m;  $\times$ 200.

すべての検体において特徴的な所見は観察されなかった。

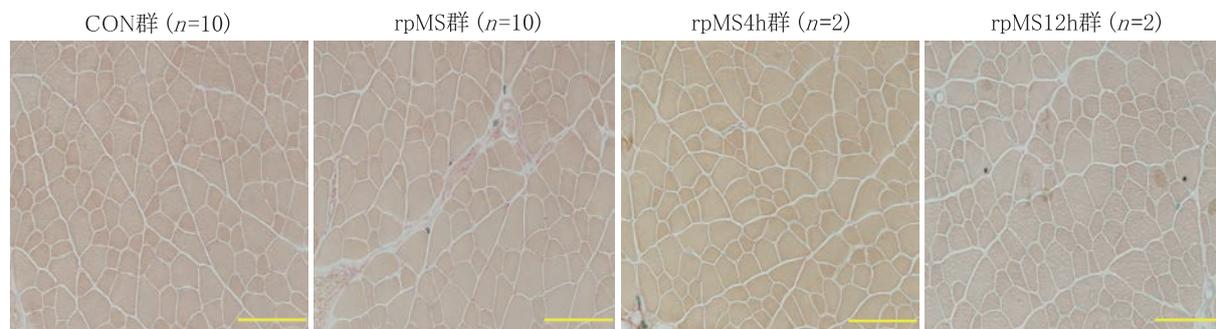


図8. Acp 染色

Bars: 200  $\mu$ m;  $\times$ 200.

すべての検体において貪食細胞の遊走を示す赤染されている所見は観察されなかった。

**血液生化学検査**

CON 群と rpMS 群の CK, アルドラーゼ, LDH の平均値と標準偏差を表 1 に示す。各血清酵素の介入前の測定値において 2 群間に統計学的な有意差は認められなかった。また、介入前後の各血清酵素値に有意な変化はみられなかった。両群の各血清酵素値の変化率を表 2 に示す。LDH の変化率において rpMS 群が CON 群より有意に小さい値となった。rpMS 群の PAS 染色で染色濃度の薄い筋線維が認められなかった 2 例では、LDH の変化率がそれぞれ 32% と -7% となり、rpMS 群の平均値ほどの低値を示さなかった。

**考察**

**筋組織学的検査**

筋組織学的検査では rpMS 群の 10 例中 8 例で PAS 染色において、染色濃度が薄い白く抜けた筋線維が広範囲に観察された。PAS 染色は筋線維の相対的なグリコーゲン濃度を組織学的に推定することができ [21, 22], この方法により直前の筋収縮の有無を確認することができる [21, 23]。無酸素条件下で筋収縮を誘発するために筋線維が反復して刺激された場合、筋線維はエネルギー源として選択的に細胞内のグリコーゲンを消費する。そのため、筋線維の嫌気的な代謝が起こると活動した筋線維のグリコーゲンは枯渇し、活動していない筋線維にはグリコーゲンが消費されずに残存する [24]。したがって、本研究において観察された PAS 染色で白く抜けた筋線維は、rpMS によって無酸素条件下での筋収縮が誘発され、解糖系により筋収縮に必要なアデノシン三リン酸 (以下、ATP) が供給されていたと考えられる。また、

Nakatani ら [25] はラットを用いて筋のグリコーゲンを枯渇させる運動を行った結果、4 時間後には運動前の数倍に及ぶグリコーゲンが蓄積されていたと報告している。本研究の追加実験として rpMS 終了後 4 時間が経過した時点でのグリコーゲンの変化を 2 匹のラットを用いて観察したが、rpMS4h 群の PAS 染色では rpMS 群のような白く抜けた筋線維は観察されなかった。したがって、rpMS 群における筋線維内のグリコーゲンの枯渇は一過性のものであることが確認された。

一般的に筋線維が壊死に陥る過程は、まず細胞膜の異常により細胞外液が細胞内に流入することに起因する。細胞外液中には高濃度のカルシウムイオンが存在するため、細胞内では筋原線維が過収縮を起こす。この過収縮を起こした筋線維は opaque 線維といわれ、HE 染色や Gomori 染色などにより濃染される [26]。しかし、本研究の rpMS を施行したすべての標本の HE 染色と Gomori 染色で opaque 線維と考えられる筋線維を確認できなかった。これらのことから rpMS の施行により筋線維が壊死に陥る可能性は低いものと考えられる。

また、筋線維が壊死に陥る過程において過収縮を起こした筋原線維辺縁では筋原線維が断裂し、カルシウム依存性中性プロテアーゼが断裂した筋原線維の分解を行う。その後に貪食細胞が壊死線維内に侵入し、壊死部を清掃することにより筋衛星細胞が筋芽細胞となり、増殖する空間が用意されるといわれている [26]。本研究では壊死線維の有無を確実に推定するために、貪食細胞を赤染する Acp 染色を施行した結果、CON 群と rpMS 群の Acp 染色ではすべての標本で貪食細胞の遊走を示す所見は観察されなかった。よって、磁気刺激プロトコル終了直後に壊死線維が存在していな

**表 1.** 介入前後の各血清酵素値の変化

血清酵素	群	介入前	介入後	t-検定
CK (IU/L)	CON	180.8±103.6	176.3±79.8	N.S.
	rpMS	198.7±94.2	186.3±61.5	N.S.
アルドラーゼ (IU/L)	CON	18.6±4.6	18.2±3.4	N.S.
	rpMS	20.1±5.3	19.3±2.9	N.S.
LDH (IU/L)	CON	200.3±184.3	213.1±127.4	N.S.
	rpMS	276.4±141.3	215.0±120.1	N.S.

平均値±SD で表示

CK, クレアチンキナーゼ; LDH, 乳酸脱水素酵素; CON, コントロール群; rpMS, 磁気刺激群; N.S., not significant.

**表 2.** 各血清酵素値の変化率

血清酵素	CON	rpMS	t-検定
CK (%)	13±53	2±32	N.S.
アルドラーゼ (%)	3±27	-1±16	N.S.
LDH (%)	55±95	-21±33	p<0.05

平均値±SD で表示

CK, クレアチンキナーゼ; LDH, 乳酸脱水素酵素; CON, コントロール群; rpMS, 磁気刺激群; N.S., not significant.

いことが確認された。貪食細胞の発現に関して、Nonakaら [26] はラットの骨格筋の壊死を誘発するために塩酸プピバカインを筋注し、12時間が経過した時点で壊死線維の周囲に貪食細胞の遊走を認めたと報告している。本研究のrpMS12h群のAcp染色においては、赤染されている組織像が観察されなかったことから、今回の磁気刺激プロトコールによって筋線維の壊死は誘発されないことが示されたと考える。

### 血液生化学検査

本研究ではCON群とrpMS群ともに介入前後のCK値とアルドラーゼ値に統計学的な有意差は認められなかった。さらにCKとアルドラーゼの変化率にも2群間で有意な差はなかった。CKは骨格筋細胞膜が障害されると、細胞外へ流出し血中CK値が上昇することから骨格筋損傷時の指標として利用されている [27-29]。また、アルドラーゼは骨格筋などのエネルギー代謝が多い組織に存在しており、血中のアルドラーゼを測定することでそれらの組織の障害を推定できる [30]。よって、今回の結果から、rpMSの施行により骨格筋をはじめとするCKやアルドラーゼを含む組織に損傷が生じていないことが推察される。

LDHに関してはrpMS群の変化率が負の値を示し、CON群より有意に小さい値となった。LDHはほとんどすべての細胞に存在し、細胞障害により血中LDH活性が上昇する。そのため、体内の異常を知らせるシグナルであるとされており [31]、筋損傷マーカーとしても多く使用されている [27, 32, 33]。また、LDHは解糖系の最終段階において、ピルビン酸と乳酸との転換を双方向に触媒する酵素である [31]。前述のとおり、rpMS群のPAS染色の組織像において、グリコーゲンが枯渇した状態を示していたことから、筋線維内で解糖系によるATPの供給が行われたことが推察された。解糖系は酸素供給がない場合に主として働くグルコースの嫌氣的分解経路であり、最終産物として乳酸が産生される。そのため、rpMSにより筋収縮が誘発された筋線維において、ピルビン酸から乳酸への化学反応が活発に生じたことがLDHの変化率に影響を及ぼしたと考えられる。つまり、rpMS群のLDHの変化は筋組織の損傷を示唆するものではないと推察される。また、rpMS群のPAS染色で染色濃度の低下がみられなかった2例に関しては、LDHの変化率がrpMS群の平均値ほどの低値を示さなかった。この結果から、rpMS群の2例では筋収縮時に解糖系の活発な働きが生じなかったと推察され、筋線維内のグリコーゲンが残存したことで、PAS染色において変化がみられなかったと考えられる。

今回、骨格筋に対するrpMSの安全性を筋組織学的検査と血液生化学検査を用いて検討した結果、rpMS後に筋組織の損傷を示すデータは確認されなかった。これらの結果から本研究で実施した刺激条件の範囲内であれば、筋損傷を生じない安全なrpMSの施行が可能であることが実証された。

### 謝辞

最後に、筋標本の作製から解釈まで終始懇切なご指導いただきました川崎医科大学病理学2教室森谷卓也

教授、筋標本の解釈につき有用なご助言をいただきました川崎医科大学病理学1教室西村広健先生に心より感謝申し上げます。また川崎医科大学医用実験センター・医用生物センター・組織・電子顕微鏡センターの職員の皆様に深謝いたします。

### 文献

1. Takeuchi N, Chuma T, Matsuo Y, Watanabe I, Ikoma K. Repetitive transcranial magnetic stimulation of contralesional primary motor cortex improves hand function after stroke. *Stroke* 2005; 36: 2681-6.
2. Pascual-Leone A, Nguyet D, Cohen LG, Brasil-Neto JP, Cammarota A, Hallett M. Modulation of muscle responses evoked by transcranial magnetic stimulation during the acquisition of new fine motor skills. *J Neurophysiol* 1995; 74: 1037-45.
3. Hasegawa S, Kobayashi M, Arai R, Tamaki A, Nakamura T, Moritani T. Effect of early implementation of electrical muscle stimulation to prevent muscle atrophy and weakness in patients after anterior cruciate ligament reconstruction. *J Electromyogr Kinesiol* 2011; 21: 622-30.
4. Laughman RK, Youdas JW, Garrett TR, Chao EY. Strength changes in normal quadriceps femoris muscle as a result of electrical stimulation. *Phys Ther* 1983; 63: 494-9.
5. Currier DP, Mann R. Muscular strength development by electrical stimulation in healthy individuals. *Phys Ther* 1983; 63: 915-21.
6. Chae J, Bethoux F, Bohine T, Dobos L, Davis T, Friedl A. Neuromuscular stimulation for upper extremity motor and functional recovery in acute hemiplegia. *Stroke* 1998; 29: 975-9.
7. Yan T, Hui-Chan CW, Li LS. Functional electrical stimulation improves motor recovery of the lower extremity and walking ability of subjects with first acute stroke: a randomized placebo-controlled trial. *Stroke* 2005; 36: 80-5.
8. Embrey DG, Holtz SL, Alon G, Brandsma BA, McCoy SW. Functional electrical stimulation to dorsiflexors and plantar flexors during gait to improve walking in adults with chronic hemiplegia. *Arch Phys Med Rehabil* 2010; 91: 687-96.
9. Adriaensen H, Gybels J, Handwerker HO, Van Hees J. Response properties of thin myelinated (A-delta) fibers in human skin nerves. *J Neurophysiol* 1983; 49: 111-22.
10. Chae J, Hart R. Comparison of discomfort associated with surface and percutaneous intramuscular electrical stimulation for persons with chronic hemiplegia. *Am J Phys Med Rehabil* 1998; 77: 516-22.
11. Barker AT, Freeston IL, Jalinous R, Jarratt JA. Magnetic stimulation of the human brain and peripheral nervous system: an introduction and the results of an initial clinical evaluation. *Neurosurgery* 1987; 20: 100-9.
12. Barker AT. An introduction to the basic principles of magnetic nerve stimulation. *J Clin Neurophysiol* 1991; 8: 26-37.
13. Han TR, Shin HI, Kim IS. Magnetic stimulation of the quadriceps femoris muscle: comparison of pain with electrical stimulation. *Am J Phys Med Rehabil* 2006; 85:

- 593–9.
14. Ito T, Tsubahara A, Watanabe S. Use of electrical or magnetic stimulation for generating hip flexion torque. *Am J Phys Med Rehabil* 2013; 92: 755–61.
  15. Smania N, Corato E, Fiaschi A, Pietropoli P, Aglioti SM, Tinazzi M. Therapeutic effects of peripheral repetitive magnetic stimulation on myofascial pain syndrome. *Clin Neurophysiol* 2003; 114: 350–8.
  16. Kremenec IJ, Ben-Avi SS, Leonhardt D, McHugh MP. Transcutaneous magnetic stimulation of the quadriceps via the femoral nerve. *Muscle Nerve* 2004; 30: 379–81.
  17. Smania N, Corato E, Fiaschi A, Pietropoli P, Aglioti SM, Tinazzi M. Repetitive magnetic stimulation: a novel therapeutic approach for myofascial pain syndrome. *J Neurol* 2005; 252: 307–14.
  18. Szecei J, Schiller M, Straube A, Gerling D. A comparison of functional electrical and magnetic stimulation for propelled cycling of paretic patients. *Arch Phys Med Rehabil* 2009; 90: 564–70.
  19. Krewer C, Hartl S, Müller F, Koenig E. Effects of repetitive peripheral magnetic stimulation on upper-limb spasticity and impairment in patients with spastic hemiparesis: a randomized, double-blind, sham-controlled study. *Arch Phys Med Rehabil* 2014; 95: 1039–47.
  20. Epstein CM, Davey KR. Iron-core coils for transcranial magnetic stimulation. *J Clin Neurophysiol* 2002; 19: 376–81.
  21. Gollnick PD, Piehl K, Saltin B. Selective glycogen depletion pattern in human muscle fibres after exercise of varying intensity and at varying pedalling rates. *J Physiol* 1974; 241: 45–57.
  22. Gollnick PD, Armstrong RB, Saubert CW 4th, Sembrowich WL, Shepherd RE, Saltin B. Glycogen depletion patterns in human skeletal muscle fibers during prolonged work. *Pflugers Arch* 1973; 344: 1–12.
  23. Kugelberg E, Edström L. Differential histochemical effects of muscle contractions on phosphorylase and glycogen in various types of fibres: relation to fatigue. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1968; 31: 415–23.
  24. Edström L, Kugelberg E. Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1968; 31: 424–33.
  25. Nakatani A, Han DH, Hansen PA, Nolte LA, Host HH, Hickner RC, et al. Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. *J Appl Physiol* 1997; 82: 711–5.
  26. Nonaka I, Takagi A, Ishiura S, Nakase H, Sugita H. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathol* 1983; 60: 167–74.
  27. Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 757–67.
  28. Gondin J, Giannesini B, Vilmen C, Le Fur Y, Cozzone PJ, Bendahan D. Effects of a single bout of isometric neuromuscular electrical stimulation on rat gastrocnemius muscle: a combined functional, biochemical and MRI investigation. *J Electromyogr Kinesiol* 2011; 21: 525–32.
  29. Itoh M, Shimokawa N, Tajika Y, Murakami T, Aotsuka N, Lesmana R, et al. Alterations of biochemical marker levels and myonuclear numbers in rat skeletal muscle after ischemia-reperfusion. *Mol Cell Biochem* 2013; 373: 11–8.
  30. Taguchi K, Takagi Y. Aldolase. *Rinsho Byori* 2001; Suppl 116: 117–24. Japanese.
  31. Maekawa M. Lactate dehydrogenase. *Rinsho Byori* 2001; Suppl 116: 81–9. Japanese.
  32. Priest JB, Oei TO, Moorehead WR. Exercise-induced changes in common laboratory tests. *Am J Clin Pathol* 1982; 77: 285–9.
  33. Nosaka K, Clarkson PM, Apple FS. Time course of serum protein changes after strenuous exercise of the forearm flexors. *J Lab Clin Med* 1992; 119: 183–8.