

JAPANESE JOURNAL OF

PHYSICAL

THERAPY

FUNDAMENTALS

日本基礎理学療法学雑誌

Volume 16 No 2 2012

総説 「移植・再生医療と理学療法」

| | |
|------------------------|---------|
| 心不全治療における心臓移植の役割 | 松田 暉 |
| 細胞移植による損傷骨格筋再生と運動機能の回復 | 蛭川 菜々・他 |
| デュシェンヌ型筋ジストロフィー症への治療戦略 | 櫻井 英俊 |
| 肺移植の現状と理学療法の役割 | 玉木 彰 |

原著

| | |
|--|---------|
| 足関節背屈制限と歩行速度の変化が歩行時の下肢関節角度と筋活動に与える影響 | 北谷 亮輔・他 |
| 廃用性筋萎縮による骨格筋毛細血管退行に対するアスタキサンチンの予防効果 | 金指 美帆・他 |
| デトレーニング期間中のメンタルプラクティスが未経験運動の短期的練習効果の維持に及ぼす影響 | 岡和田愛実・他 |

日本基礎理学療法学会

Japanese Association of Physical Therapy Fundamentals

<http://square.umin.ac.jp/mbpt/>

日本基礎理学療法学雑誌

第16巻2号 2012年

目 次

総 説 「移植・再生医療と理学療法」

| | | |
|---------------------------------|--------------|----|
| 心不全治療における心臓移植の役割 | 松田 暉..... | 3 |
| 細胞移植による損傷骨格筋再生と運動機能の回復 | 蜷川 菜々・他..... | 9 |
| デュシェンヌ型筋ジストロフィー症への治療戦略 | 櫻井 英俊..... | 17 |
| 肺移植の現状と理学療法の役割 | 玉木 彰..... | 23 |

原 著

| | | |
|---|--------------|----|
| 足関節背屈制限と歩行速度の変化が歩行時の下肢関節角度と筋活動に与える影響 | 北谷 亮輔・他..... | 29 |
| 廃用性筋萎縮による骨格筋毛細血管退行に対するアスタキサンチンの予防効果 | 金指 美帆・他..... | 39 |
| デトレーニング期間中のメンタルプラクティスが未経験運動の短期的練習効果の維持に及ぼす影響 | 岡和田愛実・他..... | 47 |

総 説

「移植・再生医療と理学療法」

心不全治療における心臓移植の役割

松田 暉¹⁾

1. はじめに

近年、慢性心不全患者の増加とともに、その治療体系にも変化が見られている。特に、重症心不全の外科治療には種々の新たな展開が見られている。本邦で長年懸案であった心臓移植も徐々に定着しつつあり、左室形成術や僧房弁形成術に加えて、補助人工心臓 (VAD) 治療が加わり、さらには再生医療も始まっている¹⁾。心不全のなかでも慢性心不全への multidisciplinary approach が最近の話題で、多職種によるチーム医療が求められ、リハビリテーションの関与が急速に進み、理学療法士による心臓リハビリテーション (心臓リハ) への期待度は高くなっている²⁾。本稿では、心臓移植の現状とその課題を紹介し、さらに植込み型 VAD の役割、心臓リハへの期待、等について概説する。

2. 心臓移植の歴史的背景

心不全が進行し従来の治療法では延命ないし QOL の維持が困難な場合、最終的な治療手段として心臓移植がある。心臓移植の臨床は1967年の南ア連邦でのバーナード医師による脳死ドナーからの同所性移植で始まった。1980年代に入って免疫抑制剤シクロスポリンの導入により成績が向上した結果、実施数は飛躍的に増加し、1990年代には世界で毎年4,000例を超えるようになり、現在も3,500例を超える状況が続いている³⁾。このように世界的には心臓移植は末期的心不全の最終的な治療として定着しているが、我が国では1968年の札幌医科大での移植に端を発する社会の脳死臓器移植への不信感、脳死を人の死とすることへの抵抗感等があり、長らく心臓移植は海外に依存していた。

1) 兵庫医療大学 学長
(〒650-8530 兵庫県神戸市中央区港島1丁目3-6)

我が国の心臓移植は1997年の臓器移植法の制定で門が開かれ、1999年2月に高知赤十字病院での法的脳死判定による初めての臓器提供が実現し、心臓移植は大阪大学で行われた^{4,5)}。再開までに31年を要したわけである。しかし、この法律では臓器提供の条件が厳しく、10年近く年間せいぜい10例程度の脳死からの提供に留まっていたが、世界移植学会のイスタンブール宣言もあり我が国では2009年に法改正が実現し、この2年ほどで年間40例前後まで増加するに至った⁶⁾。

3. 心臓移植の適応基準と移植までの手順

心臓移植の適応基準は日本循環器学会 (日循) が中心となって策定し、平成9年の厚労省移植関係学会合同委員会承認のものが基本である (表1)。適応疾患としては、拡張型および虚血性心筋症が主体であるが、先天性心疾患や弁膜症、その他関係学会で承認したもの、となっている。重要なことは疾患というより病態であり、現状での最善の治療を行っても予後が不良なもの、ということが基本である。欧米では当初は生命予後6か月という基準もあったが、心不全では悪性腫瘍のような予後判定は困難であり、また極端に進行し臓器不全が進行した場合は移植の予後も不良となるこ

表1. 心臓移植の適応基準

| | |
|------|--|
| 適応疾患 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 拡張型心筋症、および拡張相の肥大型心筋症 2. 虚血性心筋疾患 3. その他 学会で承認したもの |
| 適応条件 | 不治の末期的状態+以下の要件を満たす場合 <ol style="list-style-type: none"> 1. 長期間またはくり返し入院治療を必要とする心不全 2. β 遮断薬およびACE阻害薬を含む従来の治療法ではNYHA3度ないし4度から改善しない心不全 3. 現存するいかなる治療法でも無効な致死的重症不整脈を有する症例 4. 年齢は60歳未満が望ましい 5. 本人および家族の心臓移植に対する十分な理解と協力が得られること |

とから、現在では余命期間については示されていない。ただ、日本臓器移植ネットワーク（以下ネットワーク）登録時の緊急度では予後の厳しいStatus-1と比較的安定しているStatus-2に分けられている。基本は、繰り返す心不全で予後不良と判断される状態、NYHA4度の既往がある、ベーター遮断薬療法を行っているか試みた経緯があるなどであるが、実際の状況ではカテコールアミン依存状態とかVAD装着例などが適応となってくる。検査項目では、心機能の評価とともに、心筋生検、運動耐容能などがある。後者では最大酸素摂取量（p-VO₂）が14 ml/kg/min以下が一つ目安になる。加えて、家族の支援が得られること、成人では本人が心臓移植のことをよく理解していること、が重要である。

現在のところ適応年齢は60歳未満が望ましいとなっていて、適応判定申請時で60歳以上の患者は日循適応委員会では現実的には受け付けられていない。なお、現在、この年齢制限を65歳に引き上げる作業が進んでいる。適応基準以外に、除外条件が絶対と相対に分けて細かく決められている。適応の判断は各施設での適応委員会で検討後、日循心臓移植適応検討委員会で審査され、承認されて初めてネットワークの登録が可能となり、待機リストへ入ることになる。

因みに、これまで日循適応検討委員会での審査状況を紹介します⁷⁾、1997年以降2012年7月末まで、総数850例の審査を行い、適応と判断された症例が729例であり（86%）、その内ネットワーク登録が545例、75%であった。15歳未満では107例中登録は27例と成人に比べかなり少ない状況である。成人例でのネットワーク登録後の経緯では、待機中が204例、移植済が

128例、待機中死亡が172例であった。待機中死亡が移植数を上回っているという、ドナー不足の深刻な状況が明らかである。

4. これまでの我が国における心臓移植

我が国の心臓移植は2009年の法改正（2010年8月施行）により、それまで約10年で総数69例であったが、改正後の約2年間でほぼ同数の移植がなされている（図1）。また、2009年には、心肺同時移植に大阪大学チームが成功している⁸⁾。心臓移植数は2012年9月1日現在138例である。その成績も国際的な比較で良好な結果が示されている^{6,9)}。一方でVADによる移植までの繋ぎ療法（Bridge to Transplantation, BTT）が進み、以下の様にVADなしでは移植にたどり着かない状況である。

2012年5月までの集計（表2）では、心臓移植総数は120例であり、全てが医学的緊急度というStatus-1（カテコールアミン依存、VAD装着など集中治療が必要な状態）であった。特徴は、VADからのBTTが89%とほとんどを占め、待機期間も最長2,772日、平均で2年以上と大変過酷な状況である。そういう中で、以下に述べる良好な成績が得られたのは、実施施設（最初は3施設、現在9施設）が互いに連携し、心臓移植を定着させようとする努力の賜物である。

遠隔成績では、10年生存率では96%と良好である。なお10年を超えた時期での遠隔死が2例発生し、その原因は悪性腫瘍、腎不全であった⁹⁾。なお、慢性拒絶での死亡や再移植は現在のところ生じていない。また、社会復帰という面では、海外での分析（国際心肺移植学会）では50%近い患者が、パートないしフルタイムで仕事に復帰している³⁾。本邦ではまだ詳細な分析が出ていないが、厚生労働省の検証会議の報告によると、2011年末の時点で心臓移植を受けた80人のうち



図1. 我が国における脳死から臓器提供数と心臓移植の推移

ここでは心停止後の提供は含めていない。Organ Donor：提供数、HeartTx：心臓移植、H/L：心肺同時移植。法律改正は成立時点（実施は2010年8月）。（データは日本臓器移植ネットワークから）

表2. 我が国の心臓移植：まとめ（1999-2-2011-12）

| | |
|------------|-------------------------|
| 総数 | 120人 |
| 待機状態 | 全員 status-1 |
| 年齢 | 8-62 (37.5) 歳 |
| 補助心臓 VAD | |
| VAD + | 106 |
| VAD - | 14 |
| 待機期間(登録期間) | 29-2772 日 (960) |
| Status-1: | 29-1549 日 (851) |
| VAD: | 29-1703 日 (882) |
| 結果: | |
| 早期死亡 | 1 |
| 病因死亡 | 1 |
| 遠隔期死亡 | 3 [4 yr, 10yr and 11yr] |

()は平均値

76人(95%)が生存し、32人(50%弱)が何らかの仕事についているという結果である。一方、布田らの海外での移植例を含めた自験例の分析では、運動耐容量という点では健康成人に比べて低下しており、必ずしも経年的に回復するというわけではないことも示されている¹⁰⁾。今後、我が国でも心臓移植のナショナルデータベースを構築し、科学的な分析が待たれるところである。

5. 心臓移植の課題

心臓移植の課題はドナー不足に尽きる。法律が改正され、本人の意思が不明の時は家族が代行できるようになって提供数は年間10例前後から50例程度まで増加している。しかし、これらは殆んど意思表示カードなしのケースであり、本来のカード所持者からの提供はあまり変わっていないという見方もある。また、15歳未満の方からの提供はまだまだ少なく、6歳未満の提供も実現したが、小さな子供さんへの道は依然として厳しく、海外に依存しているという状況である。意思表示が健康保険証、運転免許証でも可能となったが、まだまだ国民の関心は低く、今後さらなる社会的啓発が必要である。

適応年齢が現在は60歳未満が望ましいとなっているが、比較的高齢の慢性心不全患者が増加していることや、60歳以上でも社会的に活動度も高いことから、年齢の上限の見直しが進んでいる。近々、海外並みの65歳まで引き上げられるであろうが、臓器配分の面からは60歳未満が優先される仕組みが検討されている。この年齢上限の改定は、VADの適応にも大きく影響することが予想されるが、現状ではBTTと後述のDestination Therapy (DT)とは明確に分けて考える必要がある¹¹⁾。

6. 補助人工心臓の役割

先に述べたように、我が国の心臓移植もやっと100例を超えたが、そのほぼ9割がVADからのブリッジであり、かつその待機期間は平均2年を超えている。さらに使われた機種を見ると、対外式のものが全体で61%を占めている¹²⁾。ここ5年ほどで植込み型VADが普及しつつあるが、法改正後の51例についても植込み型は37%であり、依然として体外式が主体である。体外式では退院も出来ず長期の制限された入院を余儀なくされる。植込み型では在宅管理が出来る大きなメリットがあり、今後期待される¹³⁾。

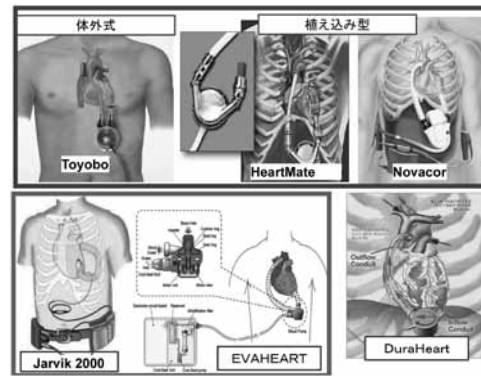


図2. 補助人工心臓の進歩

拍動型の時代から現在は無拍動(連続流)で植込み型VADが主体となった。現在我が国で保険償還されているものは、EVAHEART(サンメディカル社製)とDuraHeart(テルモ社製)である。

BTT用の植込み型としては、1990年代からまずNovacor、TCI-HeartMateVEなどの拍動型で始まったが、この10年ほどは無拍動である連続流型VAD時代へと移ってきた。因みに、本邦での心臓移植再開第一例はNovacorからのBTTであった⁵⁾。海外に比べこの分野ではデバイスラグが深刻であったが、関係学会の働きかけで連続流型のEVAHEART[®]やDuraHeart[®]の臨床治験が迅速に行われた。2011年4月にはこの2機種がBTTとして保険償還され¹³⁾、以降は植込み型の装着が急速に増えていて、移植へ到達する症例も見られるようになった。今後はさらに、Jarvik2000[®]、HeartMateII[®]が認可される予定であり、在宅管理で移植を待つ症例も増えていくものと予想される(図2)。

7. 植込み型補助人工心臓の永久使用について

VADの適応は欧米ではBTTからDTへの動きも活発であり、我が国でもその気運があるものの、BTTでの実績がまず求められている。DTに関しては2001年のREMATCH Trailの成績発表が嚆矢となっている¹⁴⁾。これは移植適応から外れた末期的心不全患者に、内科治療かVAD治療(HeartMate VE拍動型)を無作為に適用したものである。その結果、2年弱のフォローではあるがVADの生存率が有意差をもって良い結果であった。この研究は、米国のFDAとNIHが共同で企画したもので、この結果からHeartMateVEのDTへの保険償還がFDAから認められた。DTとは心臓移植をゴールとしない、VADが最終であるという意味である。米国では連続流型VADではHeartMateII(図3)のみがDTの認可を得ている。

我が国では、DTに準じた適応について研究がされているが、医療費の問題や適応年齢などで循環器内科医や行政のコンセンサスはまだ得られていない。今後検討を要する課題である¹⁵⁾。

8. 重症心不全と理学療法

最近、我が国でも慢性心不全への疫学的な研究も見られるようになり、高齢者での対応が求められている。眞芽、筒井らは2,000例以上の慢性心不全患者のレジストリーを行い¹⁶⁾、その分析が出てきている。それによると、高齢者で慢性心不全が多くなり、再入院率も高く、腎障害や低体重で死亡のリスクが高い結果であった。今後この分野でも心臓リハビリテーションの役割が期待される所である。

心不全の管理においてはその重症度の把握も重要である。従来のNYHA分類ではなく最近では米国のACC/AHAが出しているStage分類（AからD）が使われるようになった。また、VADの領域では米国ではFDA主導で市販後登録制度を立ち上げている（Intermacs: Interagency Registry for Mechanical Assisted Circulatory Support）。そこから出されているVAD適応患者の術前状態の分類がIntermacs Profileである¹⁷⁾。NYHAでいうと、進行した3度と従来の4度を対象としている。Profile-1は臓器不全が進行し、緊急的な植込みであり良好な予後が期待されず、当初は多く該当していたが現在は植込み型の適合外になりつつある^{17,18)}。また、血中BNP測定も待機患者やVAD装着患者の管理に使われるようになり、さらに心臓リハの面からも運動耐容能検査での $p\text{-}\dot{V}O_2$ の役割も重要となってきている。

心臓リハビリ分野では、心不全患者への積極的な介



図3. HeartMatell (Thoratec社製)

軸流ポンプで、世界での植え込み数は7,000例を超えている。我が国では治験は終了し認可待ちである。

入が試みられ、心臓リハビリテーションの役割が注目されている¹⁹⁾。心不全への理学療法の応用を考えるうえで心不全患者の病態の把握も重要で、骨格筋に着目し心不全患者では骨格筋量と $p\text{-}\dot{V}O_2$ は相関するというデータもあり（図4）、理学療法の役割が科学的に支持されてきている²⁰⁾。また、心不全患者へのリハビリテーションにおいて、レジスタンストレーニングの有用性も示されつつある²¹⁾。

心臓移植を受けた患者のQOLや予後については近年向上して来ているが、遠隔期の血管病変の進行や冠動脈硬化（慢性拒絶反応）はいまだに問題である。また、心臓移植後患者は運動耐容能の回復が乏しく、心臓リハの介入が待たれる。海外から高レベルの運動療法の心臓移植患者への効果について報告があり²²⁾、かかる運動療法は、最高血圧の低下、 $p\text{-}\dot{V}O_2$ の改善、血管内皮反応を向上させたことを示している。また、同じグループは、心臓移植後患者で精神面（不安、うつ）に効果あることも報告している。

一方、VAD患者は感染症や心血管合併症のリスクが高く、QOLの低下もあり、装着患者に対しても一般の心不全患者と同様にリハビリテーションの関与が求められる。最近、海外ではVAD装着患者への運動療法の応用とその意義が多く報告されているが^{23,24)}、我が国ではその緒についた所であり、今後の心臓リハにおける理学療法士の方々の参加と活躍が期待される²⁵⁾。

9. まとめ

末期的心不全の最終的な治療である心臓移植はわが国ではその導入が遅れていたが、臓器移植法律制定によって1999年に法律下での第一例が行われた。2010年の法改正によって年間移植数も増加し、2012年8月

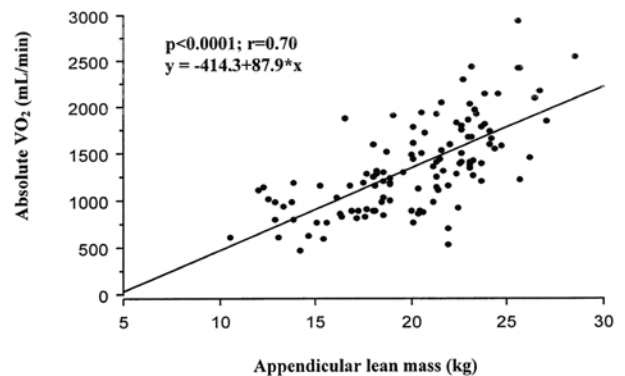


図4. 心不全患者における骨格筋量と運動耐容能の関係（文献20参照）

現在で150例になった。しかし、ドナー不足は依然として厳しい状況で、待機患者の多くはVADの装着を余儀なくされている。このように、末期的心不全治療体系での心臓移植はドナー不足や適応年齢の制限もあり、ごく一部の患者にしかその道は開かれていないといえる。

一方では、心臓移植適応患者が待機中に心不全の増悪でVADの装着を必要とする機会も増えている。さらに、小型連続流植込み型VADの登場で長期の在宅管理も可能となってきた。海外ではDTという応用も進んできている。我が国でも心臓移植が定着しつつあり、また最新の連続流VADの登場で重症心不全治療の考え方においても新しい時代が来ている。このようななかで、心不全治療における理学療法の役割も変わりつつあり、科学的な根拠でもってその意義を明らかにしていく気運が高まってきている。この分野の更なる発展を期待して、稿を閉じる。

最後に、第2回基礎理学療法学会で講演の機会を作って頂いた玉木彰会長に感謝します。

なお、本論文の要旨は、兵庫医療大学紀要第1巻第1号に掲載しています。

【文 献】

- 1) 松田暉：心不全の外科治療. 日本臨床 65：211-216, 2007
- 2) 後藤葉一：管治療としての心臓リハビリテーション, 過去・現在・未来. 心臓リハビリテーション 17：8-16, 2012
- 3) Josef Stehlik, et al: The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Heart Transplant Report-2011. J Heart Lung Transplant 30: 1078-1094, 2011
- 4) 松田暉, 他：臓器移植法制定後初めて行われた脳死からの臓器移植. 日本医事新報 3926：20-23, 1999
- 5) Matsuda H, et al: First brain dead donor heart transplantation under new legislation in Japan. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg. 47: 499-505, 1999
- 6) 福嶋教偉：臓器移植改正法施行後の心臓移植. Annual Review 循環器281-286, 2012
- 7) 心臓移植および心肺同時移植適応検討に関する申請の現状. 日本循環器学会ホームページ (心臓移植委員会報告) <http://plaza.umin.ac.jp/~hearttp/>
- 8) 松宮護郎：心肺同時移植手術 本邦1例目の報告. 移植 44:533-538, 2009.
- 9) 福嶋教偉：心臓移植後の遠隔治療成績. 移植 44：513-522, 2009
- 10) 布田伸一：心臓移植後のQOL. 心臓移植. 東京, Springer Japan, pp377-381, 2011
- 11) 松田暉：日本における補助人工心臓 - Destination Therapyへの展望. 呼吸と循環 55：19-21, 2007
- 12) 小野稔：心臓移植待機患者の課題, 補助人工心臓装着患者について. 移植 46：256-262, 2011
- 13) 戸田宏一：小型植込み型補助人工心臓保険適用. 人工臓器 40：154-157, 2011
- 14) Rose EA, et al: Randomized Evaluation of Mechanical Assistance for the Treatment of Congestive Heart Failure (REMATCH) Study Group. Long-term mechanical left ventricular assistance for end-stage heart failure. N Engl J Med 345: 1435-1443, 2001
- 15) 松田暉：慢性心不全と機械的補助循環：Destination Therapy への展開. 心臓移植. 東京, Springer Japan, pp.357-359, 2011
- 16) 眞芽みゆき, 他：日本における心不全の疫学. 日医雑誌140：719-728, 2011
- 17) Stevenson LW et al: INTERMACS Profiles of Advanced Heart Failure: The Current Picture. J Heart Lung Transplant 28: 535-541, 2009
- 18) 絹川浩一郎：重症心不全の新展開；植え込み型補助人工心臓の時代を迎えて. 医学のあゆみ 239：205-208, 2011
- 19) 高橋哲也, 他：兵庫県下における心臓リハビリテーションの現状と今後の課題. 心臓リハビリテーション228-232, 2012
- 20) Cicoira M, et al: Skeletal muscle mass independently predicts peak oxygen consumption and ventilatory response during exercise in noncachectic patients with chronic heart failure. J Am Coll Cardiol 37: 2080-2085, 2001
- 21) 高橋哲也：心不全に対する心臓リハビリテーションの実際；心不全に対するレジスタンストレーニング. 循環器内科69：252-258, 2011
- 22) Hermann TS, et al: Effect of high intensity exercise on peak oxygen uptake and endothelial function in long-term heart transplant recipients. Am J Transplant 11: 536-541, 2011
- 23) Carvalho VO, et al: Aerobic exercise prescription

in adult heart transplant recipients: a review.
Cardiovasc Ther 29: 322–326, 2011

- 24) Laoutaris ID, et al: Effects of exercise training on exercise capacity and quality of life in patients with a left ventricular assist device: a preliminary randomized controlled trial. J Heart Lung Transplant 31: 729–734, 2012
- 25) 牧田茂：LVAD患者の社会復帰を目指したリハビリテーション 現状と今後の課題. 呼吸と循環59：19–21, 2011

総 説

「移植・再生医療と理学療法」

細胞移植による損傷骨格筋再生と運動機能の回復

蜷川 (竹中) 菜々¹⁾ 磯部 恵里²⁾ 平山 由梨²⁾ 小林 麻美¹⁾ 川端 佑果²⁾ 鳥橋 茂子^{1,2)}

キーワード：ES細胞，間葉系幹細胞，細胞移植，損傷骨格筋再生，運動機能回復

1. はじめに

人体は約60兆個，約200種類の細胞から構成されており，それらは全てたった一種類の細胞，受精卵由来している。受精卵は細胞分裂を繰り返して細胞増殖すると共に，それぞれの細胞種へと性質と形態を変化させながら所定の位置へと移動し，最終的に，体が出来上がる。受精卵は，初期の段階では体を構成する全ての細胞種へなりうる「全能性」を持っている。それが，様々な刺激を介して特定の役割を持つ細胞に完全に分化してしまうと，もう他の細胞になることはほとんどできない¹⁾。

このように，細胞のたどる運命は，一方通行であると考えられてきた。ところが，ES (Embryonic stem cell：胚性幹細胞) 細胞やiPS (induced pluripotent stem cell：人工多能性幹) 細胞といった幹細胞の登場により，その常識は覆され，in vitroで時間をまきもどして発生の過程を再現することが可能となった。その技術は現在では，発生研究の分野に限らず，再生医療・創薬開発等，様々な分野で応用されている。

2. 幹細胞による再生医療研究

2-1 幹細胞とは

幹細胞とは，「自己複製能力と，特定の役割を持ったある系列の細胞種へと変化する能力 (分化能) を併せ持つ特殊な細胞種」を指して言う。中でもES細胞には，体のあらゆる組織に分化する能力があり，なお

かつ，「生体外で未分化のままほぼ無限に増やすことができる」という特性がある。ES細胞は受精後5～6日後の受精卵 (胚：Embryo) に由来する。そのことから，胚性幹細胞，Embryonic stem cell，略してES細胞と呼ばれている。5～6日目の受精卵は，内部細胞塊と呼ばれるヒトでは100個程度の細胞の塊と，それを包む栄養膜に分かれ，栄養膜は後に母体の子宮内で胎児を支持する組織となり，内部細胞塊は胎児の体そのものを形成する。そのため，内部細胞塊の細胞を取り出し，特定の培養条件で培養すると，それらは胎児の体を構成する全ての組織に分化することが可能である¹⁾ (図1)。

1981年にはマウスES細胞が，1998年にはヒトのES細胞が樹立されてからは，ES細胞から様々な細胞を大量に作り出し，脊髄損傷やパーキンソン病，心臓病，糖尿病，骨粗鬆症，筋ジストロフィー症…等といった患者への移植治療に有効ではないかと期待された。しかし，ES細胞は受精卵由来する細胞であるため，自分自身と同じ遺伝情報を持ったES細胞の作製は不可能である。従って他人の細胞を移植することによる拒絶反応が避けられない。また，移植先で，制限なく増殖し続け，腫瘍化する可能性が高いことも指摘されている。さらに，本来廃棄される予定のものを使用しているとはいえ，受精卵を破壊して細胞を作製することに対する倫理的問題は大きく，ES細胞は発生や再生過程の研究材料としては優れているが，移植用の細胞源としては実用的ではないと考えられている。

一方で，受精卵や胎児だけでなく，成体の様々な組織中にも，幹細胞が存在していることが分かっている。それらはまとめて組織幹細胞とよばれている。ES細胞と比較して分化能力は低いが，自己組織からの採取が可能であり，これらの自己組織に由来する幹細胞を

1) 名古屋大学大学院医学系研究科リハビリテーション療法学専攻

(〒461-8673 名古屋市東区大幸南1-1-20)

2) 名古屋大学医学部保健学科理学療法学専攻

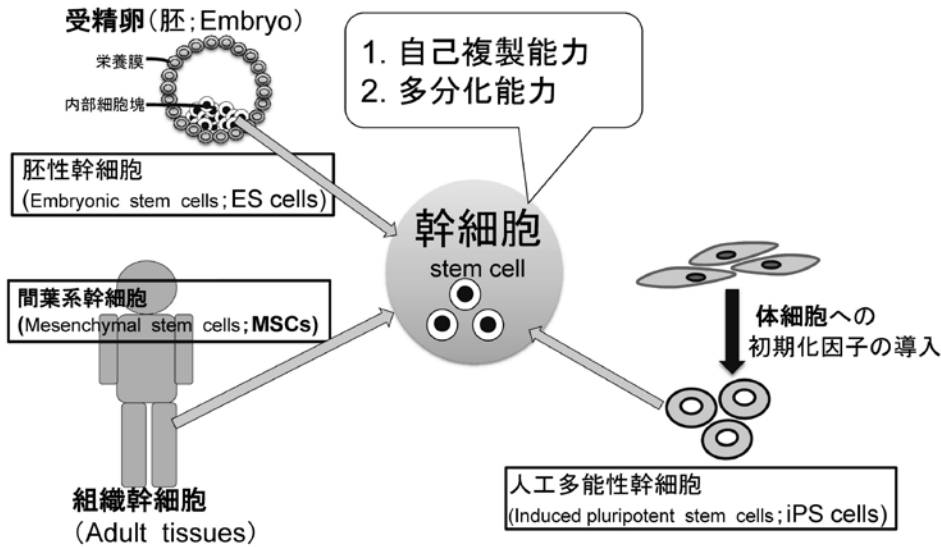


図1. 幹細胞とは

幹細胞とは、「1. 自己複製能力」と「2. 多分化能力」の二つを併せ持つ細胞の総称である。幹細胞の中には、受精卵の内部細胞塊に由来するES細胞と、生体組織中に存在する組織幹細胞が含まれる。組織幹細胞の一種として、骨髄や脂肪組織中に存在する間葉系幹細胞がある。これら間葉系幹細胞もES細胞と同様に自己複製能と多分化能力を持つことで知られているが、その能力はES細胞と比較して低い。

さらに、体細胞にいくつかの初期化遺伝子を導入することで、強制的に分化段階を初期化する技術が発明された。この細胞はiPS細胞と呼ばれ、成体の体細胞に由来する、ES細胞と同等の自己複製能力と多分化能力を併せ持った細胞である。

移植治療に用いれば、移植治療に伴う免疫拒絶や倫理的な問題が解消される。そのため、これらの組織幹細胞はすでにヒトを対象とした移植治療に多く用いられている。

中でも、骨髄や脂肪組織などの成体組織中に存在する幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSCs: 間葉系幹細胞) は、様々な組織へ分化することが知られている²⁻⁶⁾。MSCsは自家移植が可能であるということに加えて、移植片拒絶や奇形腫形成の危険性がない。さらに、MSCsが分泌する様々なサイトカインや成長因子は損傷治療促進効果を持つことも報告されており、再生医療の分野では非常に有益な細胞として注目されている⁷⁻⁹⁾。しかし、組織中にそれらの細胞はごくわずかしか存在していないため、骨髄や脂肪組織からMSCsを高純度で分離することは困難が伴い、細胞採取時のドナーに対する侵襲性やドナーの個体差によって生じる細胞の性質の違い等、問題点も多く挙げられている。さらには、MSCsを骨格筋へ分化誘導するのは一般的に難しいと言われており、高効率でMSCsを骨格筋細胞へ分化誘導したという報告はこれまでほとんどない^{10,11)}。

2-2 幹細胞による再生医療の現状

現在、様々な組織損傷や臓器障害、疾患を対象にした細胞移植治療法が開発されており、実際に患者を対象として研究されているものもいくつかみられる。

その対象となる組織は、中枢神経、末梢神経、心筋、膵臓、網膜、角膜、骨、軟骨…と多岐にわたり、その対象組織に応じて、移植に用いる細胞源や移植方法は、様々である。また、移植細胞の分化誘導方法や移植方法、もしくは移植に用いる足場素材等の改良が進み、細胞移植研究は臨床応用実現に向けて近年目まじしく進んでいる。

これまでの再生医療は細胞移植治療が主体であり、発生過程に細胞間相互作用を必要とする複雑な臓器の構造を、in vitroで完全に再現し形成することは不可能と考えられてきた。しかし、2010年、Blastocyst Complementation (胚盤胞補完) 法と幹細胞の技術を組み合わせることで、別の種の動物の体内で、幹細胞に完全に由来する臓器を作ることに成功している。しかも、そのキメラ動物 (異種動物の臓器を自己の体内で形成した動物) は免疫拒絶を受けることもなく生存可能であり、臓器は異種動物の体内でも正常に機能するだけでなく、その後移植された同種動物の体内でも正常に機能していた¹²⁾。倫理的な問題や未知の

感染症等, 解決すべき問題はあつたものの, ドナー不足が続くヒトの移植用臓器を別の動物の体内で育て, その臓器を移植手術に使うことも, 将来的には可能となるかもしれない。

本稿では, これまでに行われてきた様々な再生研究のうち, 理学療法学分野にも関係の深い, 骨格筋再生研究の現状を報告し, 続いて, 理学療法学分野が今後どのように再生医療分野に関わっていくべきであるかについて考察する。

2-3 骨格筋再生研究

骨格筋は非常に再生能力の高い組織の一つである。機械的破壊・毒素注射等により, 骨格筋に傷害を加えると, 骨格筋組織中に存在する幹細胞であるサテライト細胞が中心的役割を果たして骨格筋の再生が起こる。単核の細胞であるサテライト細胞は, 多核の筋線維の基底膜の内側でしかも筋細胞膜の外側に存在している。この細胞は胚発生の後期に出現し, 成体骨格筋組織では通常, 細胞分裂休止の状態にあるが, 運動・外傷などの刺激により分泌される様々な物質の働きにより, 細胞分裂を開始し, 筋芽細胞に分化する。やがて筋芽細胞は分裂を停止し, 互いに融合することにより多核の筋管細胞へ分化し, やがて成熟した筋線維へと変化する¹³⁾。

ところが, デュシェンヌ型筋ジストロフィー症等の骨格筋疾患では, 骨格筋壊死と骨格筋再生のバランスが崩れ, サテライト細胞が枯渇する。これにより骨格筋機能が顕著に低下し, その結果生命維持が困難となる不治の病である。そこで, それらの筋疾患の進行を阻止し, さらに根絶させる治療法の一つとして幹細胞やサテライト細胞を含む骨格筋前駆細胞による移植治療が期待されている。これまでの細胞移植研究では, サテライト細胞を採取し, *in vitro*で培養し増殖させた後, 移植を行い, 損傷骨格筋の再生効果を検証したものが多くあつたが, サテライト細胞の*in vitro*での増殖能力は低く, 移植治療への応用に十分な量まで増やすことは困難であつた¹⁴⁾。それに代わる細胞源として, 高い自己複製能力と分化能力を併せ持つES細胞やiPS細胞, MSCsといった幹細胞が注目されており, いくつかの研究グループが幹細胞由来骨格筋前駆細胞移植による骨格筋疾患治療効果を報告している^{11, 15-18)}。しかし, それらの幹細胞を高効率で安定して骨格筋へ誘導することは難しく, 安定した誘導方法が未だ確立されていないため, 損傷骨格筋の再生を目的とした幹細胞移植研究は, 他の組織と比較して非常に少ない。

我々は, ES細胞から骨格筋への高い分化能力を持つ間葉系幹細胞に類する細胞を誘導することに成功した。そして, それらの細胞を損傷骨格筋へ移植することで, 損傷組織の再生が促進されることと, さらに移植動物の運動機能が改善されることを初めて詳細に解析し明らかにした¹⁹⁾。

3. ES細胞由来の間葉系幹細胞を利用した骨格筋再生研究

3-1 ES細胞由来の間葉系幹細胞は骨格筋への高い分化能力を示す

間葉系幹細胞 (MSCs) は, ES細胞とは異なり, 奇形腫形成のリスクが低いこと, 様々な成長因子やサイトカインを分泌することで損傷組織の回復促進効果や抗炎症作用を発揮すること, さらに免疫寛容性を持ち, 同種異系への移植が可能であるといった利点がある²⁰⁻²²⁾。しかし, 一方で, *in vitro*での増殖に限界があるという点や, ドナー側の個体差により細胞の性質にばらつきが生じるといった問題点も挙げられている²⁾。そこで, 多分化能を持ち, 高い自己複製能力を持つES細胞からMSCsを作製することで, 高い分化能力を持つが, その一方で, 腫瘍を形成する危険性は低く抑えられた, 性質の均一な細胞集団を安定して多量に獲得できるのではないかと考えた。我々は, これを実際に試してみたところES細胞の脂肪分化誘導過程にMSCsと同様の性質を持つ細胞が出現することを発見した。そこでMSCsのマーカーであるCD105を指標としてそれらの細胞を収集することで, ES細胞由

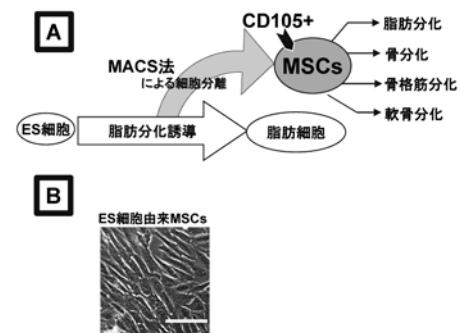


図2. ES細胞からMSCsを作製する方法

A: ES細胞の脂肪分化誘導過程に, 間葉系幹細胞の特異的なマーカーである細胞表面抗原CD105を発現している細胞を収集した。収集された細胞は, 組織由来のMSCsと同様に, 脂肪・骨・軟骨への高い分化能力を示した。さらに, それらに加えて骨格筋への非常に高い分化能力も示した。

B: 間葉系幹細胞の特異マーカーであるCD105を指標として収集されたES細胞由来MSCsは, 紡錘形をした非常に均一な細胞集団であり, それらの形態は組織由来MSCsと類似していた。(Bar = 50 μ m)

来MSCsを獲得する方法を新たに確立した。さらにこれらの細胞が様々な間葉系細胞へ分化可能であることを確認した(図2)。中でも特筆すべきは、これまで一般的に用いられてきた組織由来MSCsでは低いとされてきた骨格筋への高い分化能力を示したことである¹⁹⁾。その一方で、ES細胞由来MSCsは、本来ES細胞が持っている多分化能力に関連した遺伝子の発現レベルは抑えられており、生体内移植実験でも奇形腫の形成は見られず、移植の安全性も確かめられた。

そこで、ES細胞由来MSCsをマウスの損傷骨格筋への移植実験を行い、in vivoでの骨格筋分化能力と、さらには、移植による損傷骨格筋の再生促進効果を検証した。具体的には、マウスの前脛骨筋に挫滅損傷を加えた骨格筋損傷モデルマウスの損傷部位へES細胞由来MSCsを直接局所注射により移植した。損傷部位へ移植する細胞は、EGFPでラベルされた(緑色蛍光物質を発現するように遺伝子操作された)マウスES細胞(G42: 理研 丹羽博士より分与)から作製したため、移植後もその動向が追跡可能である。移植の1・2・3週間後凍結切片を作成し、EGFP, MHC, M-cadherinなどの免疫蛍光染色とHE染色により、移植細胞の骨格筋分化と損傷骨格筋の再生過程を観察した(図3)。

その結果、先行研究と同様に奇形腫の形成は移植の6ヶ月後でも観察されず、移植後1・2・3週間と経過を追うことで移植細胞が体内で骨格筋細胞へ分化することが確認できた。従って、ES細胞を一旦MSCsの状態まで分化させた後に移植することで、骨格筋への高い分化能は維持したまま、ES細胞が持つ奇形腫

形成のリスクを抑制できたと考える。

さらに、MSCsの移植を行った1週間後から中心核を有する再生骨格筋が出現し始め、移植2週間後には損傷骨格筋の横断面積が、移植を行っていないものと比較して有意に拡大し、細胞移植3週間後には、損傷を起こしていない正常骨格筋と同等のレベルまで回復していた。この組織学的結果を、MSCs移植を行わない損傷骨格筋の自然治癒過程の組織変化と比較すると、移植により骨格筋の再生が約1週間短縮されたことが分かり、細胞移植による修復の促進が組織学的に確認できた。

3-2 ES細胞由来の間葉系幹細胞移植による損傷骨格筋組織再生

近年、組織由来MSCsからの神経系や脈管系への分化や、成長因子の分泌による神経再生、血管新生促進効果も相次いで報告されている。MSCsの分泌するGDNFやNGF等の因子が末梢神経系の再生を促すことや、それらと同様にMSCsから分泌されるVEGFも、血管新生促進効果や骨格筋組織再生の促進効果を持つことも報告されている^{8, 9, 23, 24)}。そこで、我々が作製したES細胞に由来するMSCsも組織由来MSCsと同様に、移植先の骨格筋損傷領域で骨格筋以外の組織である末梢神経や脈管の再生過程にも関与するか否かについて検討した。

SMI31, α -Bungarotoxin, flk-1免疫蛍光染色による観察の結果、骨格筋の損傷領域に伸長する末梢神経線維数と再生された神経筋接合部の数が、MSCsの移

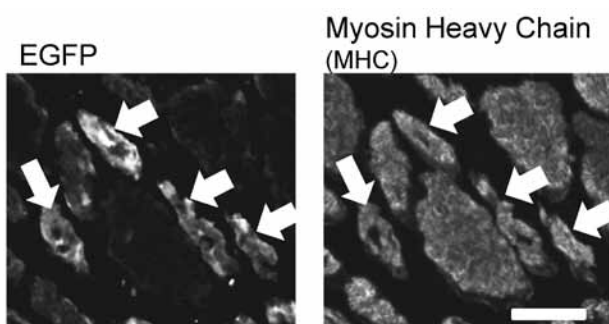


図3. ES細胞由来MSCsのin vivoでの骨格筋分化

MSCs移植1週間後の骨格筋損傷領域の横断切片 免疫蛍光染色像

移植細胞をEGFP(左)で、また再生骨格筋をMHC(右)で二重染色した同一領域を示す。

矢印は移植したES細胞由来MSCsがEGFPとMHCの両方を発現していることから骨格筋へ分化したことを示している。

損傷領域の再生骨格筋は、その8割が移植細胞に由来していた。(Bar = 50 μ m)

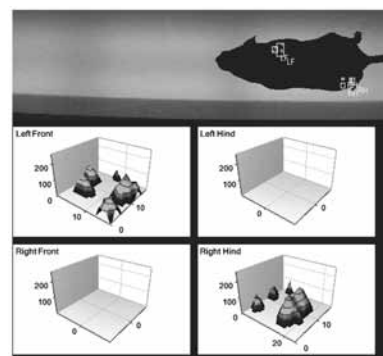


図4. マウスの自然歩行解析法

マウスの運動能力解析にはCat Walk (Noldus社)を用いた。この機器のガラス板上でマウスに自然歩行させ、その様子を下からビデオカメラで撮影する(上)。

その際、マウスの足底接地面積、接地圧力の分布、歩行速度、各歩行周期の時間配分等、細かくデータを採取する(下)。この機器を用い、ある筋に損傷を加えた際の生じる歩行障害に関するパラメーターを解析することで、損傷骨格筋の運動機能回復をマウスの個体レベルで評価することができる。

植で増加していた。さらに移植したMSCsから形成された新生血管も観察され、脈管系の再生も末梢神経同様にES細胞由来MSCsの移植で促進されることが確認できた。これまで多数報告されてきたMSCsによる組織全体にわたる再生効果が本実験でも認められた。

3-3 損傷骨格筋の運動機能回復促進

これまで、細胞移植治療の効果判定には組織学的な評価が用いられてきた。すなわち移植細胞の生体内での分化能力か、もしくは組織損傷の修復が解析されることがほとんどで、細胞移植による障害組織の修復によって生じる運動機能回復まで評価しているものはほとんどなかった。さまざまな細胞資源を移植する目的は組織の再生に裏付けられた損傷部位の機能回復である。従ってこの機能の評価は移植の目的が達成されたかどうかの判定には欠かせない。近年、細胞の分化誘導法や移植方法が改良され、移植細胞の生着率等が改善されてきた結果、運動機能の改善に着目することが今後ますます重要になり、それと共に新たな評価法も必要になるであろう^{15, 25)}。

本移植実験は、ES細胞由来MSCsの移植が、組織学的な損傷骨格筋回復だけでなく、マウスの個体レベルでの運動能力改善に効果を持つことを明らかにした。片方の前脛骨筋に控滅損傷を起こしたモデルマウスを、細胞移植した群と細胞移植しない群に分け、それぞれについてCatWalk (Noldus社)を用いて、フットプリントとゲイトによる歩行分析を行い、損傷筋の機能回復を個体レベルで比較した(図4)。その結果、移植を行わない群に比べて、移植を行った群で運動機能の回復が有意に促進されることが明らかとなった。その背景にES細胞から作製したMSCsを損傷骨格筋に移植すると、生体内で移植細胞が直接骨格筋細胞へ分化して筋再生に関与するとともに、損傷骨格筋組織内の末梢神経や脈管の再生も促進することがある。これらの総合作用によりMSCsの移植が、損傷骨格筋の運動機能回復を早めることが示唆された。我々が作製したES細胞に由来するMSCsも組織由来MSCsと同様に、移植部位での様々な成長因子やサイトカインを分泌が強く示唆された。MSCsから放出された因子が、骨格筋組織を含む損傷領域の組織再生を促進し、結果として運動機能回復が促進されたものと考えられる。

4. 幹細胞研究と理学療法との関わり

2006年にマウスのiPS細胞(induced pluripotent stem cell)が樹立され、2007年にはヒトのiPS細胞の

樹立が報告された^{26, 27)}。iPS細胞は、ヒトの体細胞へいくつかの特定の遺伝子を導入し、分化の段階を強制的に初期状態にリセットすることで作成する。この細胞はES細胞と同等の幅広い分化能力や高い増殖能力を持つ一方で、受精卵を破壊する必要がなく、自身の細胞を利用できるため、移植拒絶の問題も倫理的な問題も一気に解決される。患者自身の体細胞からES細胞と同等の分化能力を持った細胞を獲得できるようになったことから、再生医療研究は臨床応用に向けてより着実に進んでいくだろう。

今後、細胞移植等の再生医療がより一般的なものとなった時、理学療法士も再生医療へ関与していく可能性は非常に高い。そのため、移植を行った組織に対して、理学療法的アプローチを導入し、それによる治療効果の向上を示していくことで、将来的に再生医療分野における理学療法学的果たす役割は大きくなる。

実際に、最近、細胞移植後の運動介入が細胞の生着率や移植後の機能改善に寄与するという報告がなされた。中枢神経系の障害や、骨格筋疾患に対する細胞移植治療に理学療法学的介入を加えることの有効性が徐々に明らかにされつつある²⁸⁻³⁰⁾。

5. おわりに

iPS細胞はほとんどES細胞と同等の性質を持っているため、ES細胞で確立した細胞作製方法をほぼそのまま応用することができる。この先、これまでにES細胞で達成されてきた多くの研究がiPS細胞で再現され、ヒトへの臨床応用へ確実に繋がっていくであろう。

実際に、我々も本稿で述べたES細胞由来MSCsと同様の方法を用い、iPS細胞からも骨格筋への高い分化能力を持つMSCsを作製することに成功している。今後は、骨格筋損傷モデル以外にも、より臨床的意義の高い、デュシェンヌ型筋ジストロフィー症モデル動物等を用い、この細胞による疾患治療効果を示していく必要がある。その際に、組織学的評価のみでなく運動機能の改善も移植効果を示す指標とすることはもちろん、運動介入による効果、さらには運動介入の時期や負荷量等を具体的に検討し示すことで、細胞移植治療における理学療法学分野の果たせる役割をより明確にできると考えている。

iPS細胞の発明により、細胞移植治療は、急速に臨床応用実現に向けて研究が加速している。

現在では、あまり一般的であるとはいえない幹細胞移植治療も、近い将来、一般的な治療手段になること

は否定できない。その際、理学療法士がどのように関わっていただけるのか、今から積極的に考え提示していく必要がある。

【文 献】

- 1) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of THE CELL*. 5th ed. USA: Garland Science; 2010.
- 2) Locke M, Feisst V, Dunbar PR. Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. *Stem Cells* 29: 404 – 411, 2011
- 3) Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4: 267 – 274, 1976
- 4) Schäffler A, Büchler C: Concise review: adipose tissue-derived stromal cells–basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 25: 818 – 827, 2007
- 5) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143 – 147, 1999
- 6) Barry FP, Murphy JM.: Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 568 – 584, 2004
- 7) Oliveira JT, Almeida FM, Biancalana A, et al: Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit enhance median-nerve regeneration, prevent decrease of creatine phosphokinase levels in muscle, and improve functional recovery in mice. *Neuroscience* 170: 1295 – 1303, 2010
- 8) Shibata T, Naruse K, Kamiya H, et al: Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. *Diabetes* 57: 3099 – 3107, 2008
- 9) Pan HC, Cheng FC, Chen CJ, et al: Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J Clin Neurosci* 14: 1089 – 1098, 2007
- 10) de la Garza-Rodea AS, van der Velde-van Dijke I, Boersma H, et al: Myogenic properties of human mesenchymal stem cells derived from three different sources. *Cell Transplant* 21: 153 – 173, 2012
- 11) Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, et al: Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 309: 314 – 317, 2005
- 12) Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, et al: Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 142: 787 – 799, 2010
- 13) Wagers AJ, Conboy IM: Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell* 122: 659 – 667, 2005
- 14) I Cossu G, Mavilio F: Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? *J Clin Invest* 105: 1669 – 1674, 2000
- 15) Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, et al: Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* 14: 134 – 143, 2008
- 16) Darabi R, Santos FN, Filareto A, et al: Assessment of the myogenic stem cell compartment following transplantation of Pax3/Pax7-induced embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells* 29: 777 – 790, 2011
- 17) Darabi R, Arpke RW, Irion S, et al: Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 10: 610 – 619, 2012
- 18) Sakurai H, Okawa Y, Inami Y, Nishio N, Isobe K: Paraxial mesodermal progenitors derived from mouse embryonic stem cells contribute to muscle regeneration via differentiation into muscle satellite cells. *Stem Cells* 26: 1865 – 1873, 2008
- 19) Ninagawa N, Murakami R, Isobe E, Tanaka Y, Nakagawa H, Torihashi S: Mesenchymal stem cells originating from ES cells show high telomerase activity and therapeutic benefits. *Differentiation* 82: 153 – 164, 2011

- 20) Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O: HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 31: 890–896, 2003
- 21) Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al: Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363: 1439–1441, 2004
- 22) Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP: Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)* 2:8, 2005
- 23) Sassoli C, Pini A, Chellini F, et al: Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Stimulate Skeletal Myoblast Proliferation through the Paracrine Release of VEGF. *PLoS One* 7: e37512, 2012
- 24) Gu Y, Wang J, Ding F, Hu N, Wang Y, Gu X: Neurotrophic actions of bone marrow stromal cells on primary culture of dorsal root ganglion tissues and neurons. *J Mol Neurosci* 40: 332–341, 2010
- 25) Niapour A, Karamali F, Nemati S, et al: Cotransplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors and schwann cells in a rat spinal cord contusion injury model elicits a distinct neurogenesis and functional recovery. *Cell Transplant* 21: 827–843, 2012
- 26) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 63–76, 2006
- 27) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861–872, 2007
- 28) Bouchentouf M, Benabdallah BF, Mills P, Tremblay JP: Exercise improves the success of myoblast transplantation in mdx mice. *Neuromuscul Disord* 16: 18–29, 2006
- 29) Radley-Crabb H, Terrill J, Shavlakadze T, Tonkin J, Arthur P, Grounds M: A single 30 min treadmill exercise session is suitable for 'proof-of concept studies' in adult mdx mice: a comparison of the early consequences of two different treadmill protocols. *Neuromuscul Disord* 22: 170–182, 2012
- 30) Kubasak MD, Jindrich DL, Zhong H, et al: OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. *Brain* 131: 264–276, 2008

総 説

「移植・再生医療と理学療法」

デュシェンヌ型筋ジストロフィー症への治療戦略

櫻井 英俊¹⁾

はじめに

デュシェンヌ型筋ジストロフィー症 (DMD) は、X染色体劣性遺伝の致死的な筋萎縮性疾患である (図1)。DMDは出生男児約3,500人に一人と比較的高い割合で起こり、先天性筋疾患の中では最も重篤で比較的患者数の多い疾患として知られている。原因遺伝子ジストロフィン¹⁾は79個のエクソンからなる巨大な遺伝子で、DMDではゲノムの欠失・重複によりフレームシフト変異を生じ、その下流でナンセンス変異を来すために蛋白全長が合成されず発症する¹⁾。原因の6割がゲノムの欠失、2割が転座・重複、2割が点変異と言われている。臨床経過としては3歳頃より筋力が低下し、10歳代で車イス、20歳代で人工呼吸器管理が必要となることが多く、30歳代で心不全や呼吸器感染症によって死に至る。今のところ根本的治療法のない難病で、現在はステロイド投与などの対症療法によって歩行期間が2年程度延長するほか、関節拘縮予防の理学療法程度しか治療法がない。この難病を治療するために、様々な研究がなされてきた。その内容は1. 薬剤の開発、2. 遺伝子治療、3. 細胞移植治療の三種に大別される。はじめにそれら三種の治療研究の経過と最新の研究動向について述べる。

1. 薬剤の開発

薬剤の開発については、唯一有効性が証明されているステロイド剤を中心に、抗炎症剤、免疫抑制剤が候補として研究されている。しかし、ステロイドについても歩行期間が2年延長する程度の効果であり、確かに進行は緩徐になるのであるが、継続して使用しなければならぬため、その間に副作用を発現することが

問題となっている。したがってその病態に適した薬剤の開発が研究されている。

DMDの病態としては、以前はジストロフィンが欠損することで筋細胞膜が脆弱となり、運動によって細胞膜が損傷するため慢性炎症が起こり、全身的な筋萎縮へと進展すると考えられていた。しかしながら多くの動物実験によりその考え方は否定されつつあり、現在では筋細胞内のCa²⁺濃度が異常に上昇し続けることが、病態の根幹であると考えられている (図2)。詳述すると、ジストロフィンの欠損により、Stretch Activated Channel (SAC) の筋細胞膜上での発現が亢進し、筋細胞内Ca²⁺濃度が上昇する。そのためミトコンドリア内のCa²⁺濃度が上昇し、ミトコンドリアが機能不全に陥るため活性酸素種 (ROS) が上昇する。それらが協調的に働いてNF-kBの活性が亢進し慢性炎症へと至るといふ仮説である²⁾。SACの一つであるTRPV2を阻害するドミナントネガティブフォームの強制発現により、DMDモデルマウスの症状が軽減したこと³⁾、あるいは正常なマウスにSACを強制発現すると、DMD様の組織変化が起こったこと⁴⁾により、この仮説は有力なものとなっている。現在は骨格

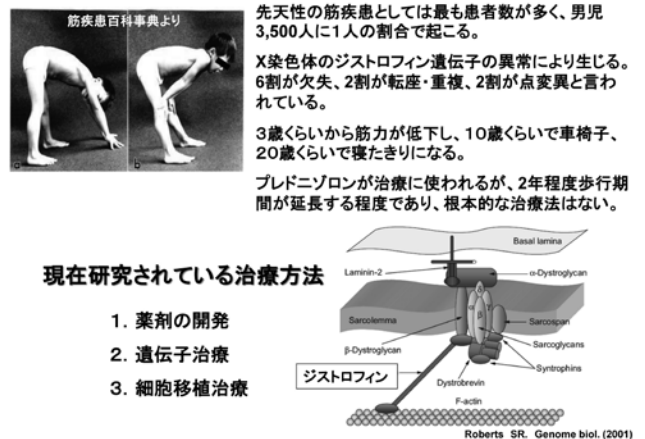


図1. デュシェンヌ型筋ジストロフィー

1) 京都大学iPS細胞研究所 臨床応用研究部門
(〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53)

病態仮説: 以前は筋膜の脆弱性と言われていましたが...

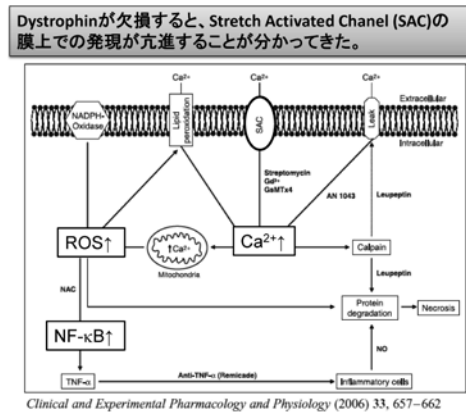


図2. 病態仮説と創薬ターゲット

筋特異的なSACの阻害剤や、フリーラジカルスカベンジャーなどが動物モデルで有効性が証明されており、患者への応用にも期待が高まっている。

2. 遺伝子治療

遺伝子治療については、ウイルスベクターを用いて、単純に骨格筋にジストロフィンを発現させる研究が古くから進められている。現在のところ効果は限定的であり、全身的に効率よく遺伝子を発現させられるベクターシステムが模索されている。またジストロフィン遺伝子cDNAが約13kbpと巨大であるため、これを搭載させるベクターについても開発が進んでいる。

一方、新しい遺伝子治療としてエクソン・スキッピングという方法が検証されている⁵⁾。これは、人工的にエクソンをスキップさせ、フレームシフト変異をインフレーム変異に変えることで不全型ながらも蛋白を合成させDMDを軽症化させるという治療法である(図3)。筋ジストロフィーモデル犬へのアンチセンスオリゴ投与によるエクソン・スキッピングにより、DMD症状の改善や炎症の抑制、予後の改善が認められたという報告⁶⁾を皮切りに、ヒトへの応用研究

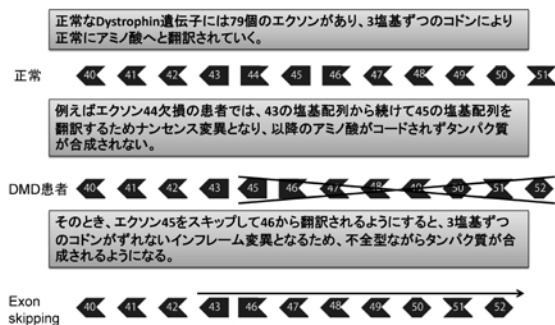


図3. エクソン・スキッピング

が進んでいる。DMDにおけるジストロフィン遺伝子変異の位置はさまざまであるが、エクソン50変異患者を対象としたスキッピング療法でジストロフィンの発現回復や、リンパ球浸潤の減少など一定の成果を挙げたのをうけて⁷⁾、ついに2011年国際共同治験(Phase III)が開始された。

3. 細胞移植治療

細胞移植治療については、もともと骨格筋には筋芽細胞が融合して再生するという性質が備わっているため、生体内に存在する筋芽細胞移植が最初に検討された。しかしながら父親からの筋芽細胞を患児に移植した研究では、ドナー由来の筋芽細胞は移植部位に限定した筋再生しか起こさないため、全身的な改善は見込めないという結論に至っている⁸⁾。そこで、筋芽細胞より上位の幹細胞であるサテライト細胞を増殖させる方法が世界中で検討されている。今のところサテライト細胞は、試験管で培養すると全て筋芽細胞に分化してしまうため、サテライト細胞の状態のまま、移植に必要な細胞数を集めることができていない。サテライト細胞を、幹細胞の性質を保ったまま増殖させるため、培養条件の改善や、遺伝子導入など様々な方法が検討されている。それ以外にも、細胞移植に適した前駆細胞が報告されている。2003年、マウス胎児の大動脈周囲に存在するMesoangioblastは、筋ジストロフィーモデルマウスへの移植によりホストの骨格筋と融合し、組織学的な改善のみならず、運動機能の改善まで認めたという報告がなされた⁹⁾。続いてイヌのモデルでもその有用性が報告されており¹⁰⁾、現在はヒト細胞において、このMesoangioblastと同等の能力を持つ細胞を分離する試みが研究されている。

またES細胞やiPS細胞からサテライト細胞になる前駆細胞を誘導する方法も検討されている。マウスES細胞においては、誘導した骨格筋前駆細胞のDMD

筋ジストロフィー症に対する細胞移植治療のイメージ

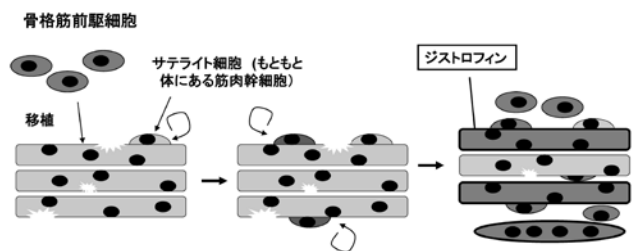


図4. 細胞移植治療: 根治療法としての期待

モデルマウスへの移植により、ジストロフィンの発現を回復させ治療に成功している¹¹⁾。またヒトES、iPS細胞においても2012年5月、モデルマウスへの移植による治療実験に成功したと報告された¹²⁾。これら多能性幹細胞はほぼ無限の増殖力を持っており、一度に多くの骨格筋前駆細胞を得ることが可能となるため、治療に適した細胞ソースとなると期待されているが、移植後の腫瘍化の問題など課題も存在する。

4. iPS細胞を用いた研究開発

次に、我々の研究テーマであるiPS細胞の利点・問題点ならびにDMD治療への応用研究について述べる。iPS細胞は、体細胞に山中4因子と呼ばれる転写因子、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycを導入することにより得られる多能性幹細胞であり、2006年マウスで¹³⁾、2007年にはヒトで作成に成功したと報告された¹⁴⁾。多能性幹細胞にはES細胞があるが、これは受精卵から採取・樹立されるものである。ヒトES細胞においては生命の萌芽である受精卵を破壊することへの倫理的問題が大きく、また移植治療細胞のソースとして考えた時に、基本的に他家移植となり拒絶反応も問題となるため、多くの国で臨床応用は困難と考えられていた。iPS細胞は、この倫理的問題と拒絶反応という二つのハードルを乗り越える画期的な発見であり、一躍再生医療の移植細胞のソースとして注目を浴びている。

当初考えられていたその利点に加えて、誰からでもiPS細胞を樹立できる点が、新たな価値を生み出している。すなわち、個性の分かっている個人から樹立可能であることから、遺伝性疾患患者由来のiPS細胞を用いた病態研究や創薬への応用、HLAタイプを揃えた移植用iPS細胞バンクの設立による他家移植治療への応用など、ES細胞では実現できなかったであろう

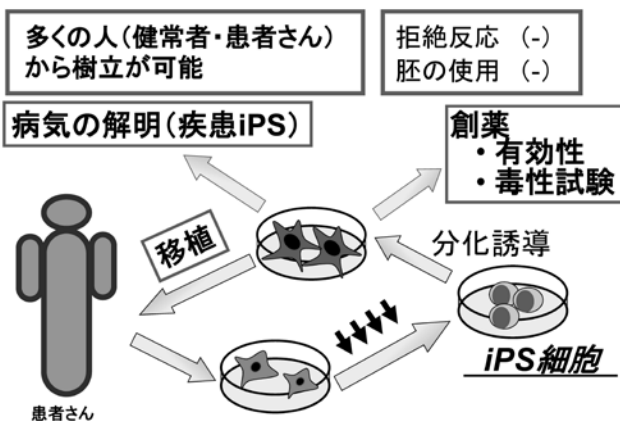


図5. iPS細胞に何ができるのか？

治療研究が始まっている(図5)。しかしながらiPS細胞に全く問題が無いわけではない。ES細胞と同じく、未分化細胞の混入による移植後の奇形腫発生危険性や、正常な組織になった後の癌化の危険性が懸念されている。現在、安全なiPS細胞とは何かを定義づけるため、様々な遺伝子、樹立法、分離法などが研究されており、動物実験での安全性確認が続けられている。

iPS細胞を用いたDMDの治療研究については、先述した利点を考え、我々は大きく二つの戦略を描いている(図6)。iPS細胞から成熟した骨格筋細胞を分化誘導する過程で、おそらく骨格筋系譜へと運命決定された骨格筋前駆細胞が存在すると考えられる。この骨格筋前駆細胞をDMDへの細胞移植治療に用いる研究が一つ目の戦略である。またDMD患者からiPS細胞を樹立し、成熟骨格筋細胞へと分化誘導させ、健常者由来の骨格筋細胞と比較することで病態再現系を確立し、創薬研究のツールとして用いる研究が二つ目の戦略である。これらの研究を実現化するにあたり、最も重要になるのは骨格筋細胞への分化誘導法である。これまでのヒトES・iPS細胞からの骨格筋分化誘導法は、誘導効率が低いものや、誘導効率が良いと報告されているものでは再現性に乏しい方法がほとんどであった。これらの問題点を克服するため、我々は骨格筋分化のマスター遺伝子であるMyoDをテトラサイクリン応答性に発現調節することで、高効率かつ再現性の高い分化誘導法の確立を目指した(図7A)。

様々な培養条件、テトラサイクリン添加条件を検討し、誘導初期には高いKSR濃度、誘導中期から後期には低いKSR濃度が適しており、テトラサイクリンは誘導1日目から5日以上添加することが必要であることが明らかとなった。以上のような知見から図7Bに示すプロトコルを確立した。このプロトコルによる分化誘導では、テトラサイクリン添加24時間後には極めて高い外因性MyoDの発現を認め、引き続いて内因性MyoDおよび分化骨格筋マーカーであるMyogeninの発現が上昇した。成熟骨格筋マーカー

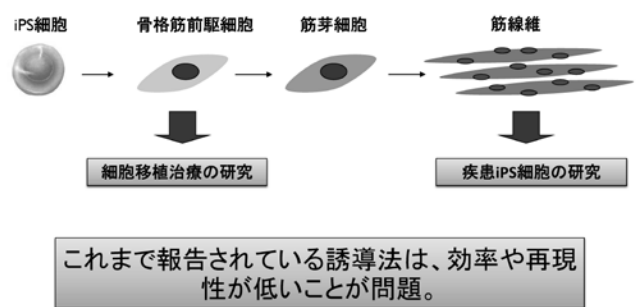


図6. iPS細胞を用いた筋疾患への治療研究

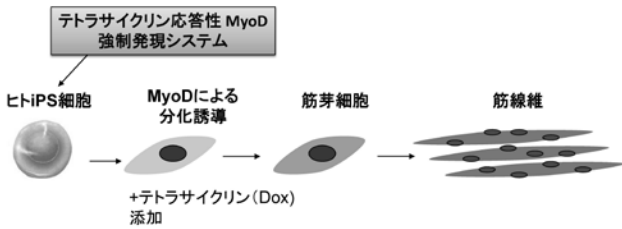


図7 A. ヒトiPS細胞からの骨格筋分化の戦略

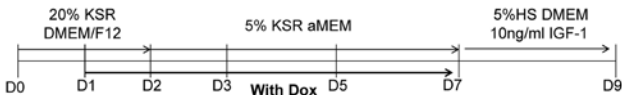


図7 B. 実際の分化誘導プロトコール

であるCK-MやDystrophinなども外因性MyoDの発現の後に上昇を認め、MyoDの強制発現により転写レベルでの下流因子の発現制御が起こっていることが明らかとなった。次にタンパクレベルでの骨格筋細胞の定性的評価を行った。誘導された骨格筋細胞は、その特異的マーカーであるSkeletal muscle actinを始め、Myosin heavy chain(MHC), CK-M, Myogeninといった筋分化マーカーを発現しており、ミトコンドリアも豊富に含んでいることが分かり、定性的には成熟骨格筋の性質を有していると考えられた。タイムラプス撮影により、未分化iPS細胞からの骨格筋分化の様子を観察すると、極めて均一に骨格筋細胞へと分化していることが分かった。MHC陽性細胞の割合により、分化効率を算出すると、6クローン間で70~90%もの高い効率で骨格筋に分化していることが分かった。これらは異なる3種のヒトiPS細胞株から2クローンずつ樹立されたものであり、患者由来iPS細胞からも同様に分化誘導できることから、極めて再現性の高い方法であると言える。

最後に、このiPS細胞からの骨格筋細胞の機能的な解析を行った。培養成熟筋細胞を電気刺激により収縮させる技術を、首都大学東京の藤井先生との共同研究により導入し、分化14日目の誘導骨格筋細胞の電気刺激を行った。100Vまで電圧を上げると、誘導骨格筋細胞が収縮する様子が観察された。やや非対称的に収縮する様は、まさに骨格筋細胞の特徴を示しており、誘導骨格筋細胞は収縮という機能も有していることが明らかとなった。

以上のように、in vitroでの解析には十分耐えられる効率、再現性で、機能まで持っている骨格筋細胞をヒトiPS細胞から分化誘導することに成功した。この分化誘導系を用いて、患者由来iPS細胞と健常iPS細胞を同時に分化させ、例えば昨年報告されたエクソン・

- ・エクソンスキッピングによる遺伝子治療はすでに治験まで進んでおり、今後臨床の現場で筋力が回復するDMD患者が現れる。
- ・現在のDMDに対する理学療法は、関節の拘縮予防や呼吸訓練が中心であるが、今後は筋細胞の壊死を誘発しない程度の運動強度で、筋力の維持や回復を目指すという方向にシフトするかもしれない。
- ・動物モデルを用いて、エクソンスキッピング後の理学療法が与える影響を解析するなど、基礎分野において進めるべき課題も多く存在する。
- ・根治療法としての細胞移植治療も動物実験レベルでは効果が認められており、今後治験へと進んでいくものもあると考えられる。
- ・細胞移植後の理学療法が、移植細胞の生着や増殖に寄与するのか？など、これも基礎分野での研究が必要である。

図8. まとめ

スキッピングを起こす化合物¹⁵⁾をスクリーニングするような、創薬への応用研究が可能になる。

図8に掲げるように理学療法の分野における提言としては、エクソン・スキッピングによる遺伝子治療はすでに治験が開始されており、近い将来エクソン・スキッピングで筋力の回復が見られる患者が臨床の現場でも現れると考えられる。現在、DMDに対する理学療法は拘縮予防や呼吸訓練が中心であるが、今後は筋細胞の壊死を誘発しない程度の運動強度で、筋力の維持・回復を目指すといった方向にシフトする可能性があることを十分に考慮しておく必要がある。動物モデルを用いてエクソン・スキッピング後の理学療法が与える影響を解析するなど、基礎分野において進めておくべき課題も多く存在する。また根治療法としての細胞移植治療も動物実験レベルでは効果が認められており、今後治験へと進んでいくものもあると考えられる。細胞移植後の理学療法が、移植細胞の生着や増殖に寄与するのかどうか？など、これも基礎分野での研究が必要な課題である。

【文 献】

- 1) R. G. Roberts, *Genome Biol* 2, REVIEWS3006 (2001).
- 2) N. P. Whitehead, E. W. Yeung, D. G. Allen, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33, 657 (Jul, 2006).
- 3) Y. Iwata, Y. Katanosaka, Y. Arai, M. Shigekawa, S. Wakabayashi, *Human molecular genetics* 18, 824 (Mar 1, 2009).
- 4) D. P. Millay et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19023 (Nov 10, 2009).
- 5) A. Goyenvalle, J. T. Seto, K. E. Davies, J. Chamberlain, *Human molecular genetics* 20, R69 (Apr 15, 2011).
- 6) T. Yokota et al., *Ann Neurol* 65, 667 (Jun, 2009).
- 7) S. Cirak et al., *Lancet* 378, 595 (Aug 13, 2011).
- 8) D. Skuk et al., *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65, 371 (Apr, 2006).
- 9) M. Sampaolesi et al., *Science (New York, N.Y)* 301, 487 (Jul 25, 2003).
- 10) M. Sampaolesi et al., *Nature* 444, 574 (Nov 30, 2006).
- 11) R. Darabi et al., *Nature medicine* 14, 134 (Feb, 2008).
- 12) R. Darabi et al., *Cell Stem Cell* 10, 610 (May 4, 2012).
- 13) K. Takahashi, S. Yamanaka, *Cell* 126, 663 (Aug 25, 2006).
- 14) K. Takahashi et al., *Cell* 131, 861 (Nov 30, 2007).
- 15) A. Nishida et al., *Nat Commun* 2, 308 (2011).

総 説

「移植・再生医療と理学療法」

肺移植の現状と理学療法の役割

玉木 彰¹⁾

はじめに

臓器移植とは、心臓や肝臓、肺、腎臓など、生命を維持するために重要な役割を果たしている臓器が、ほぼ（あるいは全く）機能しなくなり、臓器を代替する以外に治療法がない場合に行われる医療である。1983年にトロント大学のCooperら¹⁾によって世界最初の成功例となる肺移植手術が施行されて以来、欧米先進国を中心に急速に普及し、今日では終末期肺疾患に対する有効な治療法として世界中で実施されている。そして現在までに全世界において30,000例以上の肺移植が行われ、近年では片肺および両肺移植を合わせると年間に3,000例近く実施されている²⁾。

本邦では1997年に臓器移植法が制定されたことで、脳死ドナーからの臓器提供が可能となり、多くの重症心不全、肝不全、呼吸不全、腎不全などの患者に臓器を移植し、生命予後が改善している。しかしながら、臓器移植には術前・術後と通して多くの問題点が存在していることも事実である。

そこで本稿では、本邦における肺移植の現状を供覧するとともに、肺移植前後の理学療法の役割について、欧米の報告や我々の経験を基に紹介する。

本邦における肺移植の現状

本邦では、1997年10月に「臓器移植に関する法律（臓器移植法）」が施行され、脳死ドナーからの肺移植が実施可能となった。そして1998年10月に岡山大学で本

邦初の生体肺移植が実施され³⁾、その後2000年3月には初めての脳死肺移植が大阪大学と東北大学でそれぞれ行われた。しかし、その後は脳死ドナーの不足から、脳死肺移植の実施件数はあまり増加せず、生体肺移植が多く実施されてきた。

臓器移植法制定から13年近く経過した2010年7月に改正臓器移植法が施行されたことで、それまでは本人の意思確認が必須であった臓器提供が、家族承諾でも可能となり、脳死ドナー数が急激に増加していった。その結果、2011年には1年間に実施された肺移植51例のうち、脳死ドナーからの移植が37例と、脳死肺移植が全体の7割以上を占めるようになった。そして2012年10月現在、脳死ドナーからの肺移植は150例となり、生体肺移植を合わせると250例以上の肺移植が実施されている。このように改正臓器移植法施行後は脳死ドナーが大幅に増加したが、現時点でも180名以上の肺移植待機患者がいるのが現状である。また欧米では生体肺移植は極わずかし実施されておらず、この点も本邦の現状とやや異なっている。

肺移植の適応

（疾患およびレシピエント適応基準）

肺移植の適応疾患としては表1の通り17の疾患が挙げられている⁴⁾。本邦でこれまでに実施されてきた脳死および生体肺移植患者の基礎疾患をみると、原発性肺高血圧症、肺リンパ脈管筋腫症、特発性肺線維症、閉塞性細気管支炎などが多いが、これに対し欧米では肺気腫や嚢胞性肺線維症などが多い。

肺移植を受けるレシピエントには、肺・心肺移植関連学会協議会による『肺・心肺移植レシピエント適応基準』⁴⁾が定められており、移植を受ける場合にはこの基準を満たすことが必要である。この基準は一般的適応指針として、“年齢は原則として、両肺移植の場

1) 兵庫医療大学大学院医療科学研究科
リハビリテーション科学領域
Graduate School of Health Science, Hyogo University
of Health Sciences.
(〒650-8530 兵庫県神戸市中央区港島1丁目3番6)

表1. 肺移植の適応基準

・両肺全体に広がる病気で、進行性かつ有効な治療のない病気が対象となる。具体的には肺・心肺移植関連学会協議会の定められた以下の17の疾患が対象とされている。

- | | |
|----------------|-------------------------------|
| ①原発性肺高血圧症 | ⑨好酸球性肉芽腫 |
| ②特発性肺線維症 | ⑩びまん性汎細気管支炎 (DPB) |
| ③肺気腫 | ⑪アイゼンメンジャー症候群 |
| ④気管支拡張症 | ⑫慢性血栓性肺高血圧 |
| ⑤肺サルコイドーシス | ⑬多発性肺動脈瘤 |
| ⑥肺リンパ管筋腫症 | ⑭ α -1アンチトリプシン欠損型肺気腫 |
| ⑦その他の間質性肺炎 | ⑮嚢胞性線維症 (cystic fibrosis) |
| ⑧閉塞性細気管支炎 (BO) | ⑯塵肺 |
| | ⑰その他、肺・心肺移植関連学会協議会で承認する進行性肺疾患 |

文献4)より引用

合は55歳未満、片肺移植の場合は60歳未満であること”などの他に、“本人が精神的に安定しており、家族および患者を取り巻く環境に十分な協力体制が期待できること”などが明記されている。また除外条件の一つには“リハビリテーションが行えない、またはその能力が期待できない症例”という項目があり、肺移植後にはリハビリテーションを行うことが絶対条件であることが示されている。

肺移植後に発生する問題点

肺移植後には様々な問題が発生するが、まずは急性期における肺合併症が挙げられる。肺は外気と交通している唯一の臓器であり、移植後も気道を通じて外気と直接交通する。また移植後には自己免疫が移植した臓器を攻撃することを抑えるため、免疫抑制剤を使用しており、易感染性の状態である。そして移植肺は虚血再灌流障害のために肺水腫を生じやすく、特に生体肺移植の場合は移植肺が小さいため、肺水腫に陥りやすい。さらに移植肺は迷走神経が切断されているため咳嗽反射が低下・消失し、喀痰排泄能が低下している。

次に、術後における最大の問題点は拒絶反応である。拒絶反応には急性と慢性があるが、移植後2ヶ月以内において、主に血管系（肺動脈）がターゲットとなり急性拒絶が起こりやすい。多くの場合ステロイドパルスに反応し死亡することは比較的少ない⁵⁾。一方、慢性拒絶は主に細気管支がターゲットとなり、移植後6ヶ月以降に起こりやすいが、慢性拒絶に対しては効果的な治療がなく、慢性期の死亡原因の大半を占めている⁵⁾。このように他人の臓器を移植することによって起こる拒絶反応を如何に抑えるかが、肺移植後には最も大きな課題となる。

肺移植前後における理学療法の役割

1) 肺移植前の理学療法の重要性と問題点

肺移植待機患者に対する理学療法は非常に重要であり、実際に肺移植が実施されるまで継続して行うことが理想である。その理由として、一般に肺移植待機中の患者は重度の呼吸機能障害のため、日常生活における活動性は低く、そのため移植までの待機期間が長くなるにしたがい、ディコンディショニング（脱調節）が徐々に進行していく。我々の経験では、肺移植後の運動機能の回復には肺を移植することによる呼吸機能の回復だけでなく、下肢筋力や全身持久力が大きく影響し、術前の運動機能が高いほど、術後の回復が早い傾向にある。したがって、移植待機中から可能な限り理学療法を実施し、ディコンディショニングの進行を予防しながら移植に備えることが大切である。

しかし、本邦では肺移植待機患者が理学療法を受ける機会が少ないという問題が認められる。我々は、肺移植適応判定のために入院した重症呼吸不全患者20名に対し、呼吸理学療法を受けた経験の有無を調査した結果、理学療法を実施できない医学的理由が認められないにも関わらず、実際に経験していた患者はわずか6名であった⁶⁾。さらにこれらの患者の運動機能（6分間歩行距離、下肢筋力など）および健康関連QOLを評価したところ、理学療法を経験していない患者は経験している患者に比べ、有意に運動機能や健康関連QOLが低いことが明らかとなった⁶⁾。これらの結果は、肺移植待機患者に対する理学療法の重要性を示唆しているものであるが、本邦では未だに理学療法を経験していない患者が多いため、その重要性が広く認識されることが今後の課題と言える。

2) 肺移植前の呼吸理学療法の実際

肺移植待機中に行う呼吸理学療法プログラムは、特別なものではない。先にも述べたように肺移植待機患者は、重度の呼吸不全のため活動性が低く、そのため、運動機能やADL能力が低下している。したがって、待機中には運動耐容能の低下、上肢・下肢の筋力低下、胸郭可動性の低下、姿勢の変化に対する予防的プログラムが必要である⁷⁾。具体的には、患者の基礎疾患、重症度、全身状態などによって異なるが、①リラクゼーション、②呼吸練習、③気道クリアランス、④胸郭および四肢の関節可動域練習、⑤上・下肢筋力トレーニング、⑥酸素吸入下での運動療法などを必要に応じて実施する。ただしすべての移植待機患者に対して、呼吸理学療法が積極的に実施できるわけではな

く、基礎疾患や重症度によって様々な注意点がある。

例えば本邦における肺移植患者として比較的多い、肺リンパ脈管筋腫症 (Lymphangioleiomyomatosis: LAM) では、気胸を繰り返すことが多いため、気道や胸腔に対し強い陽圧が加わるような呼吸練習や手技には注意し、下肢を中心とした筋力トレーニングや持久力トレーニングを実施するようにする。また、リスクが高いことから積極的な介入が困難と考えられていた肺高血圧症患者に対する介入については、近年、その効果や安全性についていくつかの報告がなされている。Merelesら⁸⁾は、薬物治療により安定している肺動脈圧が平均50 mmHgの肺高血圧症患者に対し、自転車エルゴメーターによる運動トレーニング (心拍数120拍以下、動脈血酸素飽和度85%以上を基準)、60分間の歩行練習、ダンベルによる筋力トレーニングや呼吸練習などを実施したところ、6分間歩行距離、最高酸素摂取量、健康関連QOLなどが有意に改善したことを明らかにしている。またGrünigら⁹⁾も同様に、重度の肺高血圧症患者に対する運動療法によって、6分間歩行距離などの運動能力の改善や安静時心拍数の低下とともに、1年後、2年後における生存率がそれぞれ100%、95%であったと、その安全性を示している。このように、病態の安定した肺高血圧症患者に対しては薬物療法に加える形での運動療法の併用は安全に実施可能であり、その効果が期待できるものと考えられる。

ただし、呼吸困難や動作時の低酸素血症が著明であり、積極的なリハビリテーションが困難な症例に対しては、過負荷による病態の悪化に注意を払いながら、ベッド上や身の周りの基本的なADLトレーニングなど継続していくようにする。

肺移植後の呼吸理学療法の実際

肺移植によって、著しく障害されていた肺機能は劇的に改善していくが、肺の機能を活かすための身体機能 (胸郭運動性や筋骨格筋機能) は移植前の状態のままであり、何も変化しない。したがって肺移植後の呼吸理学療法では、移植前の低肺機能の影響により低下した身体機能 (骨格筋機能) の向上を図り、ADL能力を高め、社会復帰を目指すことが目標となる。肺移植直後からの段階的な目標としては、①術後肺合併症の予防・改善、②呼吸法の再教育、③胸郭運動性の改善、④四肢筋力トレーニング、⑤運動耐容能の向上、⑥ADL能力の向上・自立、⑦QOLの向上、⑧社会復帰などである。

1) ICUにおける呼吸理学療法 (術後～1週間程度)

肺移植後の急性期に発生する呼吸器系の問題として、①ガス交換障害、②肺内シャント、③線毛運動低下による気道清浄化の障害、④肺内水分バランスの崩れ¹⁰⁾などがあり、これらに加え、①挿管や人工呼吸器の使用、②手術中の長時間同肢位、③免疫抑制剤の使用、④創部痛、⑤術後一定期間の臥床、⑥体位制限などによって、更に状態を悪化させることがある^{11,12)}。したがって、肺移植後の呼吸理学療法は、これらのことを十分理解した上で、実施すべきである。

呼吸理学療法を開始する時期は、基本的に心肺機能や血行動態が安定していることが前提条件であるが、術後1日目から開始されることが多い。ただし開始の時期は患者の術後の状態によって異なるため、主治医の判断によって決まる。

この時期における呼吸理学療法では、①気道クリアランス (排痰)、②ventilatorからのweaningの補助、③肺拡張性、胸郭運動性の改善、④呼吸法の再教育、⑤離床に向けた練習、などを実施する。気道のクリアランスは、術後感染症や無気肺などの予防および早期抜管のためには最も重要である。しかし移植後の患者では、除神経や線毛運動による気道内クリアランス能力の低下、咳嗽反射の消失などが生じる^{13,14)}。これは移植肺ではドナーから肺を摘出する際に迷走神経が完全に遮断されることで咳嗽反射は消失するためであり、そのため術後早期の気道クリアランスや体位変換などが重要となる。

患者の覚醒状態が高まり、徐々に自発的な呼吸が可能となってきたら、抜管前後を問わず肺の拡張性を促すと共に胸郭の運動性を高める目的で深呼吸の練習を行う。移植患者は術前の重度な呼吸障害のため胸郭可動性は低下しており、また過剰な努力を伴った呼吸パターンが術後も継続している場合が多い。したがって術後は移植肺の拡張を促すだけでなく、胸郭の運動性・拡張性を高めるように呼吸介助手技を用いて深呼吸の練習を行う。また抜管前後を問わず、離床に向けた臥位での下肢筋力トレーニングも積極的に実施し、全身状態が許す限り可及的早期より、座位や立位などを行い、離床を進めていく。ICUでの滞在期間が長いほど大腿四頭筋力が低下することが明らかとなっており¹⁵⁾、可能な限り早期にICUを退出できるよう援助すべきである。

2) ICU退出後の呼吸理学療法 (術後1週～3週程度)

ICUを退室し、病棟回復室または個室にて管理され

るようになるこの時期は、リハビリテーション室での本格的な運動療法を進めていく前段階となる。この時期における理学療法の方針は、①積極的に離床を進める、②日中は可能な限り座位やヘッドアップ位で過ごすようにする、③身の回りADLの自立を目指した動作指導やベッドからの立ち座り、立位での足踏み、スクワット、ポータブルトイレへの移乗、ベッド周りでの歩行練習などを行う、④下肢筋力トレーニングを行う、⑤病棟内歩行（連続200～300 m）へと進める、などである。ただしこれらの練習時には動脈血酸素飽和度（SpO₂）や心拍数（HR）をモニターし、患者の自覚症状（呼吸困難、疲労感）などに注意しながら実施する。

3) 退院に向けた呼吸理学療法（術後3週～2ヶ月程度）

リハビリテーション室への入室が可能となったら、運動療法を中心としたプログラムにより身体機能の向上を図り、社会復帰に向け日常生活における応用動作や運動耐容能の向上を目指していく。この時期の目標は①四肢筋力・呼吸筋力の強化、②胸郭可動性の改善、③運動耐容能の向上、④ADLの自立、⑤退院に向けた生活指導である。

この時期になると肺移植患者は、酸素吸入なしでも動作時における酸素飽和度の低下は殆どなくなるが、呼吸困難や疲労感を訴えることがある。これは移植待機中のデイコンディショニングによって、骨格筋における筋組織中の酵素の減少¹⁶⁾や筋線維の萎縮、さらには毛細血管の減少¹⁷⁾などが起こっているためである。そのため肺移植患者の最大運動能力は、正常値の約50%程度であるとの報告もされており¹⁸⁻²⁰⁾、これは呼吸機能の問題ではなく、四肢筋力および筋持久力の低下によるものであると考えられる。したがって、下肢を中心とした四肢筋力の強化や運動耐容能の向上を目的とした自転車エルゴメーター駆動、さらに連続歩行練習などを積極的に行い、身体機能の向上を図ることが大切である。またレジスタンストレーニングは筋力を向上させるだけでなく、長期間ステロイドを服用している肺移植患者の骨粗鬆症予防のためにも有用である²¹⁾。さらに退院後を想定し、床からの立ち上がり、階段昇降、坂道の上り下り、長時間歩行など、社会復帰に向けたプログラムを進めていく。そしてすべてのADL動作を自立させた上で退院となり、その後は外来にて定期的な身体機能の評価や運動指導を行っていく。

退院後の呼吸理学療法

肺移植前後における呼吸理学療法の重要性は明らかであるが、退院後も理学療法を継続する必要があるのかについても検討する必要がある。これについてLangeraら²²⁾は、肺移植後患者に対し、退院直後から3ヶ月間の集中的な理学療法を受けた群と受けなかった群において、移植後1年における身体機能に与える影響について検討した結果、1日の歩行時間、大腿四頭筋力、6分間歩行距離は、集中的な理学療法を受けた群で有意に良好であり、退院後における呼吸理学療法の継続を強く推奨している。また肺移植患者に対し、12週間、週3回の在宅でのトレーニング（自転車エルゴメーター駆動中心）が運動耐容能、筋機能、QOLに与える効果について検討した研究²³⁾では、在宅でのトレーニングにより運動耐容能、筋機能、QOLの全てにおいて改善が認められ、より改善が認められたのは、著明な筋機能障害を有する患者より、中等度の筋機能障害を認めた移植後1年以内の患者であった報告としている。これらのことから、入院中に獲得した身体機能を維持するためには、退院後の継続的な呼吸理学療法が必要であると考えられる。

おわりに

本邦における肺移植の現状と肺移植前後における呼吸理学療法の内容について紹介した。本邦の肺移植患者の生存率は欧米に比べ高いことが示されているが、移植数が増加したのは近年になってからであるため、移植患者の長期的な身体機能やQOLのデータはまだ十分ではない。したがって、今後も継続的にデータを蓄積することで肺移植患者の長期的予後を明確にし、身体機能を維持するために必要な呼吸理学療法プログラムの確立と継続的に支援していくためのシステムづくりが望まれる。

【文 献】

- 1) Toronto Lung Transplant Group: Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1986; 314: 1140.
- 2) Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY et al: The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report--2011. *J Heart Lung Transplant*. 2011; 30 :1104.
- 3) Date H, Yamashita M, Nagahiro I et al: Living-donor lobar lung transplantation for primary ciliary dyskinesia. *Ann Thorac Surg* 2001; 71:2008.
- 4) 肺・心臓移植関連学会協議会 <http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/surg/shinpai/pg164.html>
- 5) 伊達洋至：各臓器移植についての拒絶反応の解説・移植の新しい治療法の紹介 肺移植の免疫 MHC 15巻3号2008:69-77.
- 6) 玉木 彰, 大島洋平, 長谷川聡他：呼吸リハビリテーションの経験の有無は肺移植待機患者の身体機能および健康関連QOLに影響する 第20回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会 2010
- 7) Connors G, Hilling L, eds. AACVPR Guidelines for pulmonary Rehabilitation programs. Champaign, III: Human Kinetics Inc: 1993: -10.
- 8) Mereles D, Ehlken N, Kreuzer S et al: Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation* 2006, 114:1482.
- 9) Grünig E, Ehlken N, Ghofrani A, et al: Effect of exercise and respiratory training on clinical progression and survival in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Respiration* 2011, 81:394.
- 10) Egan TM, Cooper JD: The lung following transplantation. In: Crystal RG et al, eds. *The Lung: Scientific Foundations*. New York, NK: Raven Press, 1991, p2205.
- 11) Butler BB: Physical Therapy in heart and lung transplantation. In: Hillegas E at al eds. *Cardiopulmonary Physical Therapy*. 3rd ed. St Louis, Mosby-Year Book Inc, 1995, p404
- 12) Biggar DG, Malen JF, Trulock EP, et al: Pulmonary rehabilitation before and after lung transplantation. In Kasaburi R at al, eds. *Principles and Practice of Pulmonary rehabilitation*. Philadelphia, Pa :WB Saunders Co, 1993, p459.
- 13) Dolovich M, Rossman C, Chambers C et al: Mucociliary function in patients following single lung or lung/ heart transplantation. *Am Rev Respir Dis*. 1987;135:363.
- 14) Jakobsson P, Jorfeldt L, Henriksson J: Metabolic enzyme activity in the quadriceps femoris muscle in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151: 374.
- 15) Maury G, Langer D, Veeleden G: Skeletal muscle force and functional exercise tolerance before and after lung transplantation: A cohort study. *Am J Transplant*. 2008;8:1275-81.
- 16) Jobin J , Maltais F, Doyon JF et al: Chronic obstructive pulmonary disease: capillarity and fiber-type characteristics of skeletal muscle. *J Cardiopulm Rehabil*. 1998;18:432-437.
- 17) Murciano D, Ferretti A, Boczkowski J et al: Flow limitation and dynamic hyperinflation during exercise in COPD patients after single lung transplantation. *Chest*. 2000;118:1248.
- 18) Pantoja JG, Andrade FH, Stoki DS et al: Respiratory and limb muscle function in lung allograft recipients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160: 1205.
- 19) Wang XN, Williams TJ, McKenna MJ et al: Skeletal muscle oxidative capacity, fiber type, and metabolites after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:57.
- 20) Mathur S, Reid WD, Levy RD : Exercise limitation in recipients of lung transplants. *Phys Ther*. 2004;84:1178.
- 21) Mitchell MJ, Baz MA, Fulton MN et al: Resistance training prevents vertebral osteoporosis in lung transplant recipients. *Transplantation* 2003;76: 557-562.
- 22) Langer D, Burtina C, Schepers L et al: Exercise training after lung transplantation improves participation in daily activity: A randomized controlled trial. *Am J Transplant* 2012; 12: 1584.

- 23) VivodtzevahI, Pison C, Guerrero K et al: Benefits of home-based endurance training in lung transplant recipients *Respiratory Physiology & Neurobiology* 177 :2011; 189.

原 著

足関節背屈制限と歩行速度の変化が
歩行時の下肢関節角度と筋活動に与える影響北谷亮輔¹⁾, 大畑光司¹⁾, 澁田紗央理²⁾

キーワード：足関節背屈制限, 歩行速度, 反張膝歩行, 筋電図

緒 言

脳卒中後片麻痺者の特徴的な歩行パターンとして知られている歩容に反張膝歩行がある¹⁻³⁾。この反張膝歩行の原因について、Bleyenheuftら⁴⁾は足関節底屈筋の痙性などによる足関節背屈制限, 膝関節伸展筋群の筋力低下や痙性, 殿筋群・膝関節屈曲筋群の筋力低下などを挙げている。また, Mulroyら²⁾は急性期に反張膝歩行が見られた片麻痺者では, 足関節背屈制限, 足関節底屈および背屈筋力の低下, 膝関節伸展筋および股関節伸展筋の筋力低下が見られたとしている。さらに, Kerriganら⁵⁾は反張膝歩行の主要な原因は, 足関節底屈筋の痙性やアキレス腱の拘縮による足関節背屈制限, 大腿四頭筋の痙性や足関節底屈筋の筋力低下としている。

一方で反張膝歩行では立脚期に床反力ベクトルが膝関節の前方を通るため, 受動的な膝関節伸展モーメントにより, 歩行時の膝折れを防止できるという利点もある⁴⁾。そのため, 長下肢装具を要するような重症片麻痺者では反張膝歩行は有利な歩行パターンであることが示唆される。しかし, 反張膝歩行は膝関節に負荷を与えてしまい, 膝関節の疼痛を引き起こすとされている⁴⁾。また, 反張膝歩行を呈する片麻痺者は歩行速度が低下している¹⁻³⁾ことから, 反張膝歩行を呈する軽症片麻痺者において, 更なる歩行機能の改善を目指すには, 反張膝歩行に対する理学療法アプローチが重要となると考えられる。

先行研究では異なった関節の筋力低下を反張膝歩行の原因として挙げていることが多いが^{2,4,5)}, 足関節背屈制限は反張膝歩行の主要な原因として多くの先行研究で一致している^{2,5)}。この足関節背屈制限は反張膝だけでなく, 股関節屈曲や体幹前傾などのアライメントにも影響を及ぼすとされ⁶⁾, 股関節や膝関節などにも大きな影響を与えていることが予想される。

Perryら⁶⁾は, 足関節背屈制限を可動性のある-15度の背屈制限, 可動性のない-15度の背屈制限, -30度の背屈制限の3つに分類し, 背屈制限角度が増加することで歩行周期中に異常歩行が観察される相が多くなるとしている。しかし, 足関節背屈制限が増加することにより, 具体的に歩行時の下肢関節角度や筋活動などにどのような変化が生じるのか詳細に検討されていない。また, 反張膝歩行の特徴として低速度歩行が挙げられていることから¹⁾, 歩行速度の影響が予想されるが, 詳細に検討された報告はない。さらに反張膝歩行に大きく影響を与えることが予想される足関節背屈制限と歩行速度が歩行時にどのような相互作用を与えるか明らかになっていない。

しかし, 実際の片麻痺者に様々な条件変化を与えることは困難であり, 他の要因に関係なく足関節背屈制限と歩行速度のみの要因に伴う変化が歩行時に与える影響を検討することは不可能である。そこで, 本研究の目的は, 健常者において, 装具により足関節の背屈運動を制限し, 足関節背屈制限角度と歩行速度の変化が下肢関節角度および下肢筋活動に与える影響を明らかにすることとした。

1) 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻
(Department of Physical Therapy, Human Health Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University)

2) 京都大学医学部附属病院

対象および方法

1. 対象

対象は下肢に整形疾患の既往のない健常者11名(男

性7名, 女性4名, 平均年齢 21.5 ± 0.8 歳, 平均身長 166.0 ± 7.7 cm, 平均体重 57.5 ± 7.3 kg)とした。

各対象者に測定方法および本研究の目的を説明した後, 同意を得て行われた。

2. 測定方法

金属支柱付短下肢装具 (Double Klenzack 足継ぎ手) を右下肢に装着させ, 足関節角度条件と歩行速度条件を変化させた時の下肢の関節角度変化および下肢筋の筋活動を測定した。足関節角度条件は装具を装着した状態での制限なし条件と, 正常歩行における足関節最大背屈角度は10度程度とされている⁹⁾ことを参考にし, 装具における足関節背屈制限を背屈0度, -10度, -20度制限の4条件とし, 左下肢には歩行に影響を及ぼしにくい履き慣れた運動靴にて歩行を行わせた。また, 装具の構造上の制限のため, 足関節底屈方向への可動域は20度までとした。健常成人における快適歩行速度は約4.8km/hとされている⁹⁾が, 片麻痺者における反張膝歩行は低速度歩行にて生じる¹⁻³⁾とされていることから, 歩行速度条件は2 km/h, 3 km/h, 4 km/h, 5 km/hの4つの歩行速度を酒井医療株式会社製 Treadmill 上にて設定した。被験者には Treadmill 上で各試行条件での歩行に慣れるために歩行練習を行った後, 歩行を行わせた (図1)。被験者には快適に歩行するように指示し, 歩容に関する指示は与えずに歩行を行わせた。試行順序は, 足関節角度の設定および同一足関節角度内での歩行速度の順序を無作為とした。

3. 歩行動作解析

動作解析用のマーカーを右側の第5中足骨頭, 踵骨, 外果, 膝関節外側裂隙, 大転子, 上後腸骨棘, 上前腸

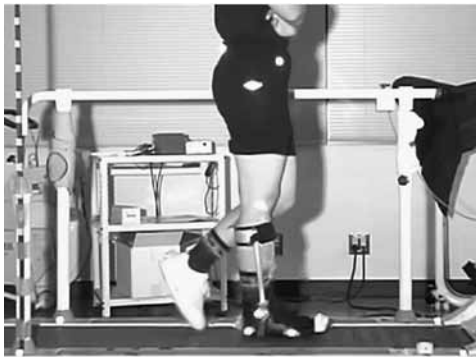


図1. 測定環境

骨動作をビデオカメラにて Treadmill の側面に対して垂直に撮影した。金属支柱付短下肢装具にて足関節背屈運動を制限し, Treadmill 上にて歩行速度を変化させた。

骨棘に添付した。デイケイエイチ社製高速1394カメラを用いて, 歩行動作を Treadmill の側面に対して垂直に撮影し, デイケイエイチ社製 Bcam を用いてサンプリング周波数30 Hzにて画像を録画した。その後, デイケイエイチ社製 Frame-Dias-IV を用いて, 2次元4点実長換算法による2次元動作解析により, 下肢関節角度を算出した。足関節角度を膝関節と外果を結ぶ線と踵骨と第5中足骨頭を結ぶ線のなす角, 膝関節角度

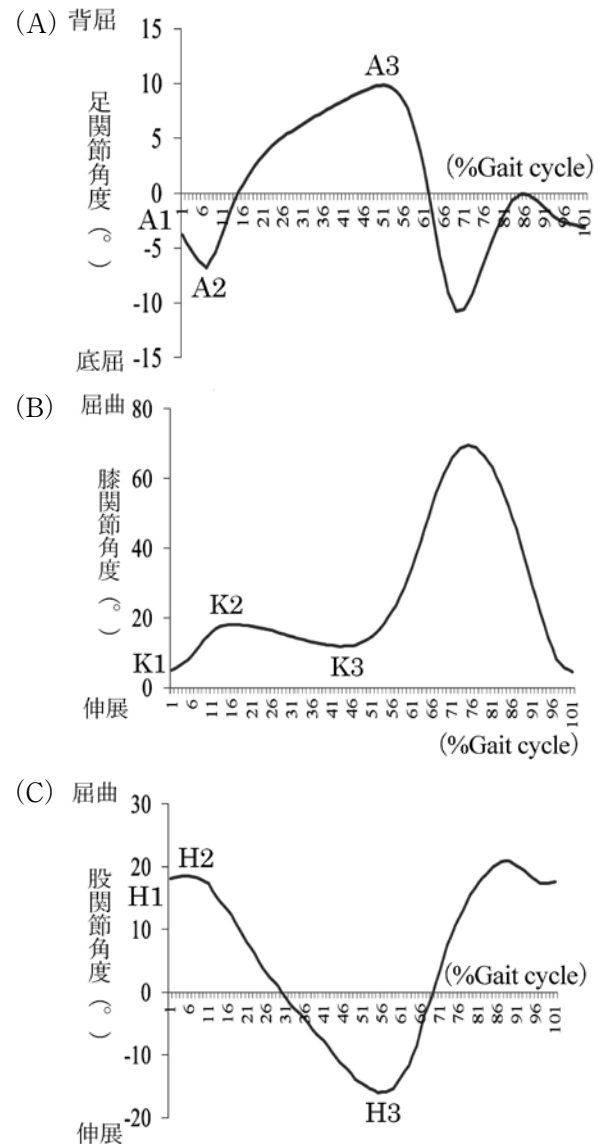


図2. 各関節角度における算出項目

(A) 足関節角度算出項目。A1: 初期接地 (Initial Contact : 以下IC) 時の足関節角度, A2: 荷重応答期 (Loading Response : 以下LR) の足関節最大底屈角度, A3: 単脚立脚期 (Single stance Phase : 以下SSt) の足関節最大背屈角度。
 (B) 膝関節角度算出項目。K1: IC時の膝関節角度, K2: LRの膝関節最大屈曲角度, K3: SStの膝関節最大伸展角度。
 (C) 股関節角度算出項目。H1: IC時の股関節角度, H2: LRの股関節最大屈曲角度, H3: SStの股関節最大伸展角度。

表 1. 測定筋と筋電図貼付部位

| 測定筋 | 筋電図貼付部位 |
|---------|--------------------------------------|
| 前脛骨筋 | 脛骨の前外側で、膝蓋骨下縁と足関節部前面を結ぶ直線の近位 1/4~1/3 |
| 腓腹筋内側頭 | 膝関節裂隙から遠位約 10cm で、下腿中心線から約 2cm 内側 |
| 内側広筋 | 膝蓋骨上縁から内側へ約 2cm で、内側広筋の遠位 1/3 |
| 大腿直筋 | 上前腸骨棘と膝蓋骨上縁を結ぶ直線の midpoint |
| 半腱様筋 | 坐骨結節と脛骨内側顆を結ぶ直線の midpoint |
| 縫工筋 | 上前腸骨棘から遠位内側方向に約 4cm |
| 中殿筋後部線維 | 腸骨稜と大転子を結ぶ直線の近位 1/3 |
| 大殿筋上部線維 | 上後腸骨棘と大転子を結ぶ直線の midpoint |

を大転子と膝関節、外果の3点より算出し、股関節角度を上前腸骨棘と上後腸骨棘を結ぶ線と大転子と膝関節を結ぶ線のなす角より算出した。

各試行における各関節角度をそれぞれ5歩行周期取り出し、1歩行周期を100% Gait Cycle (以下% GC) として時間の正規化を行った。

初期接地 (Initial Contact : 以下IC) 時の足関節角度をA1, 1歩行周期の0~10% GCである荷重応答期 (Loading Response : 以下LR) の足関節最大底屈角度をA2, 10~50% GCである単脚立脚期 (Single Stance Phase : 以下SSt) の足関節最大背屈角度をA3として算出した (図2-A)。IC時の膝関節角度をK1, LRの膝関節最大屈曲角度をK2, SStの膝関節最大伸展角度をK3として算出した (図2-B)。IC時の股関節角度をH1, LRの股関節最大屈曲角度をH2, SStの股関節最大伸展角度をH3として算出した (図2-C)。

また、足関節背屈制限の増加により、立脚期において踵を早期に挙上させる代償運動が生じることが考えられる⁶⁾。この踵挙上による代償の大きさを判断する

ため、静止立位時の踵骨部を基準として、立脚期全体 (0~50% GC) の踵骨の挙上量を算出した。そして、立脚期の時間に対するarea under the curve (以下AUC), つまり踵骨挙上量の曲線の下部の面積を算出し (図3)⁷⁾、解析対象としてLR時をAUC1, SSt時をAUC2とした。

4. 筋電図測定

筋電図および加速度計はDelSys社製3軸加速度筋電計Trigno Wireless systemを用いた。周波数帯域は20~450 Hz, サンプリング周波数は筋電図が4000 Hz, 加速度計が296 Hzであった。測定筋は右側の前脛骨筋, 腓腹筋内側頭, 内側広筋, 大腿直筋, 半腱様筋, 縫工筋, 中殿筋後部線維, 大殿筋上部線維の8筋とした。電極の貼付位置はCramら⁸⁾の報告を参考に筋を触診し、筋線維の走行に沿って貼付した (表1)。ICを判断するため、右側の踵部に加速度計を設定した。

得られた筋電図は全て10 msecの二乗平均平方根 (Root Mean Square) 波形で平滑化した。各試行における筋電図波形をそれぞれ5歩行周期取り出し、1歩行周期を100% GCとして時間の正規化を行った。筋電図の振幅は、最大等尺性収縮を100% Maximum Voluntary Contraction (以下% MVC) として正規化した。歩行周期の0~10% GCをLR, 10~50% GCをSStとし、各相での筋活動の平均値を求めた。

5. 統計方法

統計処理は、各関節角度、各AUC、各相での各筋活動の算出項目において、足関節背屈制限角度と歩行速度の2つの条件における反復測定二元配置分散分析を行った。また、本研究では足関節背屈制限角度と歩行速度の増加による全体的な変化について焦点を当てて検討するため、分散分析後の多重比較は行わなかった。本研究の有意水準は5%未満とした。

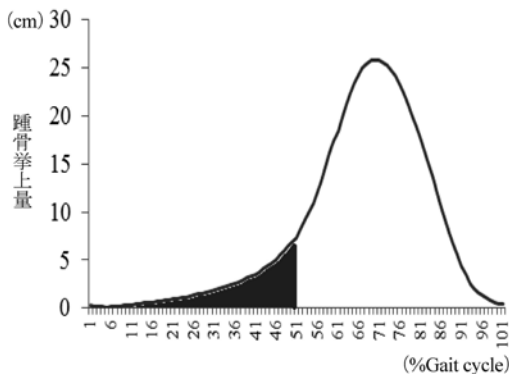


図 3. 踵骨挙上量曲線と The area under the curve (AUC)

静止立位時の踵骨部を基準の位置として算出した歩行周期中の踵骨挙上量の曲線。

立脚期 (0~50% GC) の時間に対する踵骨挙上量曲線の下部の面積をAUCとして算出し、LR中をAUC1, SSt中をAUC2とした。

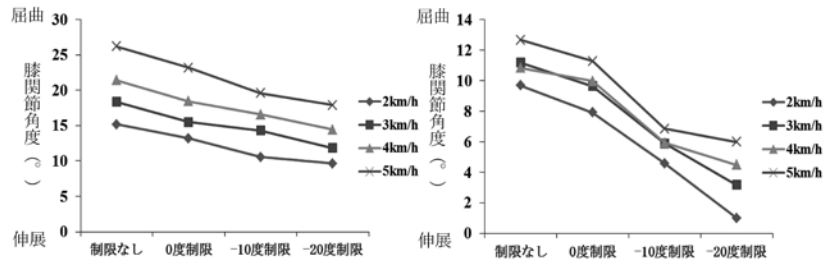


図4 足関節背屈制限と歩行速度による膝関節の角度変化 (K2, K3)

* : 足関節背屈制限要因 $p < 0.05$, # : 歩行速度要因 $p < 0.05$

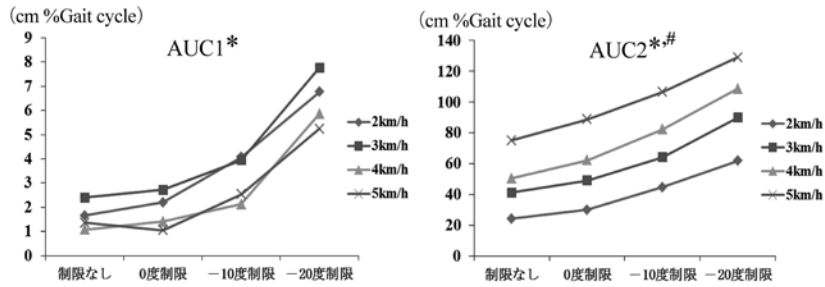


図5 踵骨挙上量であるThe area under the curve (AUC) の変化

* : 足関節背屈制限要因 $p < 0.05$, # : 歩行速度要因 $p < 0.05$

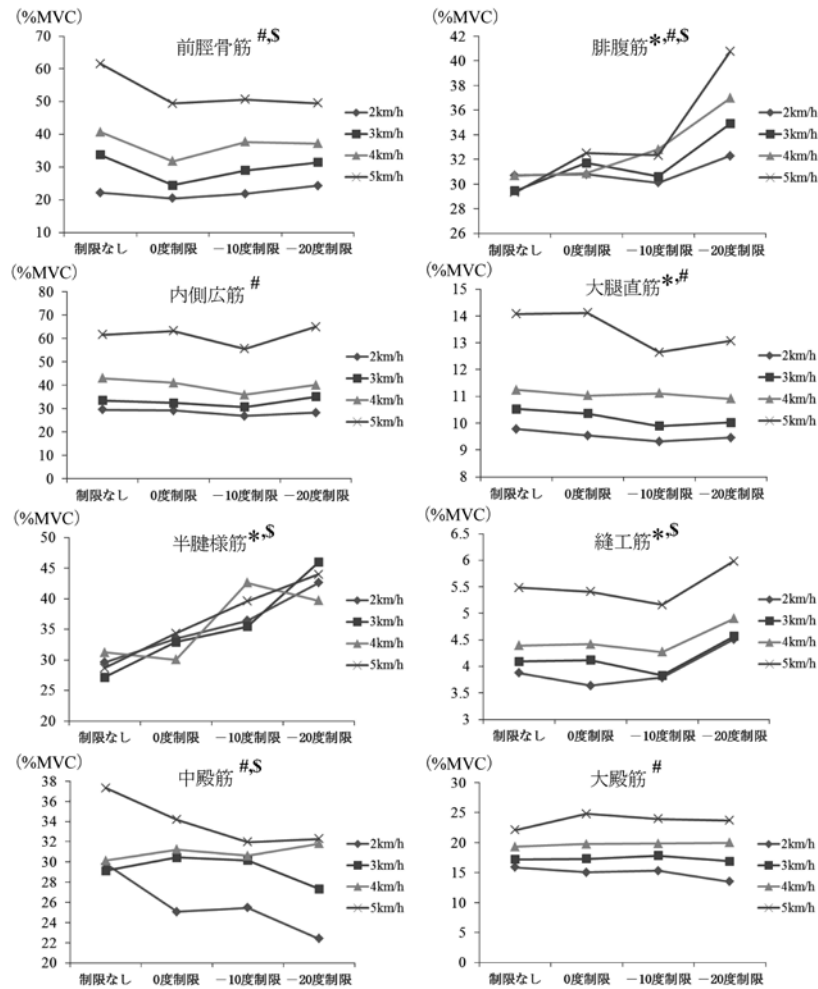


図6. 荷重応答期 (Loading Response) における筋活動変化

* : 足関節背屈制限要因 $p < 0.05$, # : 歩行速度要因 $p < 0.05$, \$: 交互作用 $p < 0.05$

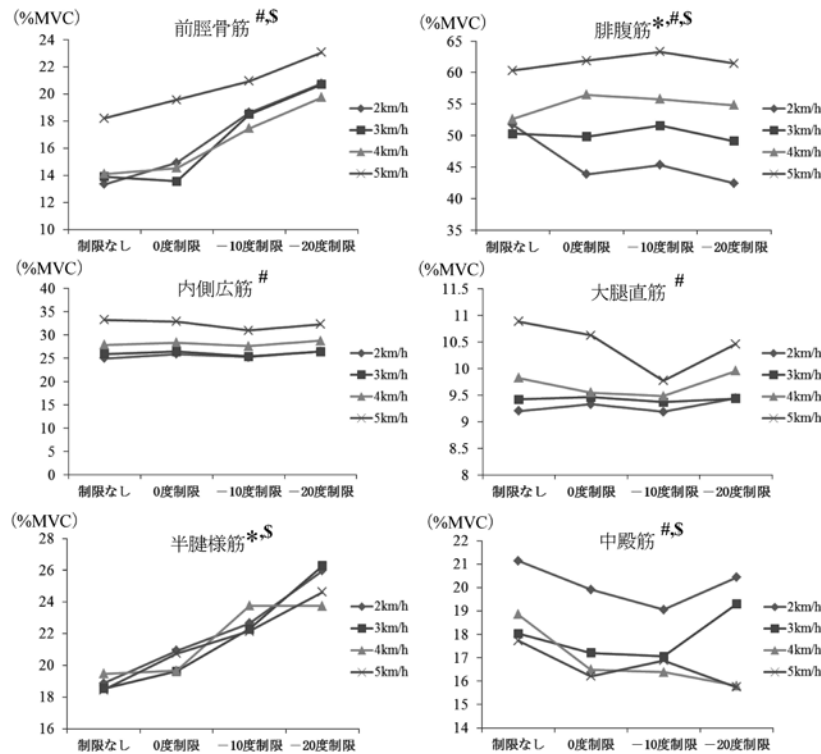


図7. 単脚立脚期 (Single Stance Phase) における筋活動変化

*: 足関節背屈制限要因 $p < 0.05$, #: 歩行速度要因 $p < 0.05$, \$: 交互作用 $p < 0.05$

結果

1. 各関節角度と各AUCへの足関節背屈制限角度と歩行速度の影響

各関節角度と踵挙上量である各AUCにおいて、足関節背屈制限角度と歩行速度の間に有意な交互作用は認めなかった。

足関節背屈制限角度の増加により、足関節ではA1とA3において足関節底屈角度が有意に増加し ($p < 0.05$)、A2の角度が有意に増加した ($p < 0.05$)。膝関節ではK2において膝関節伸展角度が有意に増加し ($p < 0.05$)、K3の角度が有意に増加した ($p < 0.05$) (図4)。股関節では有意な変化は得られなかった。

歩行速度の増加により、足関節ではA1とA2で足関節背屈角度が有意に増加し ($p < 0.05$)、A3で足関節底屈角度が有意に増加した ($p < 0.05$)。膝関節ではK2の角度が有意に増加し ($p < 0.05$)、K3では膝関節屈曲角度が有意に増加した ($p < 0.05$) (図4)。股関節ではH1では股関節屈曲角度が有意に増加し ($p < 0.05$)、H2とH3の角度が有意に増加した ($p < 0.05$)。

また、AUC1は足関節背屈制限の増加により有意に増加し ($p < 0.05$)、AUC2は足関節背屈制限および歩

行速度の増加により有意な増加を示した ($p < 0.05$) (図5)。

2. LRにおける筋活動への足関節背屈制限角度と歩行速度の影響 (図6)

足関節背屈制限角度の増加により、LRで筋活動が有意に増加した筋は縫工筋であり ($p < 0.05$)、大腿直筋では有意に筋活動が減少した ($p < 0.05$)。

歩行速度の増加により、LRで筋活動が有意に増加した筋は内側広筋、大殿筋 ($p < 0.001$)、大腿直筋、縫工筋 ($p < 0.05$) であった。

LRで足関節背屈制限角度と歩行速度の交互作用の得られた筋は、前脛骨筋、腓腹筋、半腱様筋、中殿筋であった ($p < 0.05$)。

単純主効果の検定により、足関節背屈制限が増加すると、前脛骨筋では、歩行速度が3 km/hの場合のみ有意に筋活動が増加し ($p < 0.05$)、腓腹筋では、歩行速度が3 km/hと5 km/hの場合に筋活動が増加 ($p < 0.05$)、半腱様筋では、歩行速度が2 km/h、3 km/h、5 km/hの場合で有意に筋活動が増加していた ($p < 0.05$)。また、歩行速度が増加すると、前脛骨筋では、全ての足関節角度条件にて筋活動が増加し ($p <$

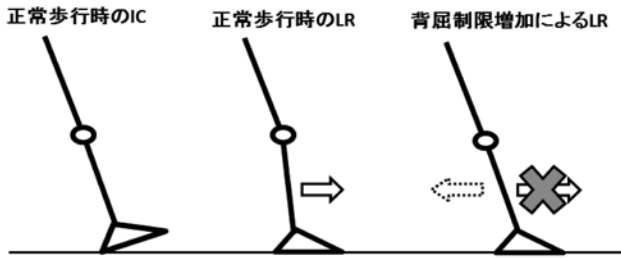


図8. IC～LR時の膝関節角度変化の様子

正常歩行では下腿が垂直位に近づき、膝関節が軽度屈曲する。しかし、足関節背屈制限の増加により、下腿が垂直位に近づかないため、LR時の膝関節が伸展しやすくなる。このため、遠心性収縮が生じない大腿直筋では筋活動が減少した。

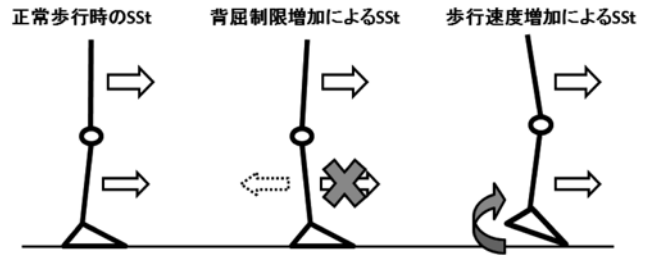


図9. SSt時の膝関節角度変化の様子

正常歩行ではSSt時に下腿が前傾する。足関節背屈制限の増加により、下腿の前傾が阻害されるが、大腿部は前方へ推進するため、SSt時の膝関節が伸展しやすくなる。

歩行速度が増加すると、踵の挙上量が増加し、下腿を前傾させるため、膝関節が屈曲しやすくなる。このため、内側広筋・大腿直筋で筋活動が増加する。

0.05), 腓腹筋では、足関節背屈制限が -10 度の場合のみ歩行速度の増加により筋活動が増加 ($p < 0.05$), 中殿筋では、足関節背屈制限がない場合のみ歩行速度の増加により有意に筋活動が減少していた ($p < 0.05$).

3. SStにおける筋活動への足関節背屈制限角度と歩行速度の影響 (図7)

足関節背屈制限角度の増加により、前脛骨筋と半腱様筋の筋活動が、SStにおいて有意に増加した ($p < 0.05$).

歩行速度の増加により、SStでは前脛骨筋、内側広筋 ($p < 0.001$), 大腿直筋 ($p < 0.05$) の筋活動が有意に増加した。

SStでは、足関節背屈制限角度と歩行速度の交互作用は、腓腹筋と中殿筋で得られた ($p < 0.05$).

単純主効果の検定により、足関節背屈制限が増加すると、腓腹筋では、歩行速度が 2km/h の場合のみ有意に筋活動が減少した ($p < 0.05$). また、歩行速度が増加すると、腓腹筋では、全ての足関節角度条件にて有意に筋活動が増加し ($p < 0.05$), 中殿筋では、足関節背屈制限角度が制限なし、 0 度、 -20 度制限の場合で有意に筋活動が減少していた ($p < 0.05$).

考 察

1. 足関節背屈制限角度と歩行速度の変化が歩行時に与える影響

足関節背屈制限の増加により、IC時 (A1) とLR時 (A2) の足関節底屈角度が増加し、LR時の膝関節 (K2) が伸展する結果が得られた。正常歩行において、LR時では前脛骨筋の遠心性収縮とHeel Rocker機能

によって、膝関節はIC時の伸展位から、LR時に大腿四頭筋の遠心性収縮を伴って軽度屈曲位となる⁶⁾。しかし、足関節背屈制限により足関節が背屈方向に運動出来ないため、正常歩行よりLR時に下腿が垂直位に近づかず、IC時から膝関節が伸展したままになることが考えられる (図8)。また、このために、大腿四頭筋の遠心性収縮が生じず、LR時に大腿直筋の筋活動が減少したと考えられる。

これとは反対に、歩行速度の増加により、LR時の膝関節 (K2) が屈曲する結果が得られた。歩行速度の増加に伴い、IC時に立脚側への荷重移動が急速になり、床面との衝突と荷重により生じる立脚側下肢への衝撃が増加していることが推察される。この接地時の衝撃の増加に対して、IC～LR時の衝撃吸収に作用する大腿四頭筋の遠心性収縮を伴った膝関節屈曲の必要性が増加することが考えられる。このために、歩行速度の増加により、LR時 (K2) の膝関節が屈曲しやすくなり、膝関節屈曲を制動するために遠心性収縮する内側広筋および大腿直筋の筋活動が増加したと考えられる。

また、SSt時では足関節背屈制限の増加により、足関節底屈角度 (A3) が増加し、膝関節 (K3) は伸展する結果が得られた。正常歩行ではSSt時に足関節は 10 度程度まで背屈し⁶⁾、下腿が前傾するとされているが、足関節背屈制限によって下腿部が前進しにくい状態となることが推察される。しかし、体幹の前方への慣性力によって大腿部は前進を続けるため⁶⁾ (図9)、SSt時の膝関節伸展が生じやすくなり、反張膝傾向が生じたと考えられる。このような足関節背屈制限によって立脚期の膝関節伸展が生じる現象は、健常者から得られたシミュレーション研究においても報告されている⁹⁾。また、片麻痺者においては、LR～SSt時に

下腿三頭筋の筋活動が高いことによって下腿の前傾が少なくなった場合、反張膝歩行が生じやすいとされている¹⁰⁾が、今回の結果のように、腓腹筋の筋活動に変化がなくても、足関節背屈角度の制限があることで反張膝傾向が生じることが推察された。しかし、一方で足関節背屈制限の増加によって、LR時とSSt時に踵骨部の挙上量 (AUC1およびAUC2) が増加しており、足関節背屈制限は反張膝傾向を生じさせるのみでなく、立脚期に踵を挙上させる代償運動も生じさせていることが考えられる。先行研究では、健常者において、テーピングにより足関節を約24度の底屈位で固定した場合、踵を挙上させる代償運動がIC時から生じやすくなると報告されている¹¹⁾。

歩行速度の増加により、IC～LR時と同様に、SSt時に膝関節 (K3) では屈曲角度が増加していた。また、歩行速度の増加により、踵骨部の挙上量と腓腹筋の筋活動が増加しており、下腿を前傾させるために踵を挙上させていることが推察される (図9)。立脚期では尖足位などの踵の挙上に応じて膝関節が屈曲することから、歩行速度の増加により、SSt時に膝関節が屈曲しやすくなり、この膝関節屈曲を制動するために、内側広筋および大腿直筋で筋活動が増加したと考えられる。

立脚期全体を通して、足関節背屈制限が増加すると膝関節が伸展し、歩行速度を増加させると膝関節が屈曲するような膝関節角度変化の特徴に交互作用が得られなかったことから、足関節背屈制限の程度に関わらず、足関節背屈可動域制限による反張膝傾向は、特に低速度歩行でより生じやすくなることが示唆された。片麻痺者においても反張膝歩行は通常歩行速度の20%未満などの低速度歩行で見られるとされており¹⁻³⁾、足関節背屈制限などの原因のみでなく、片麻痺者では通常歩行速度で歩行するために必要な運動機能が低いために、低速度歩行になってしまうことが、さらに反張膝歩行を引き起こしていることが推察された。また、足関節背屈制限の増加は、反張膝傾向を生じさせているのみでなく、足部では踵を挙上させる代償運動も生じやすくさせており、この踵を挙上させる代償運動は、歩行速度の増加によっても生じやすくなることが示唆された。

本研究の制限

本研究の制限として、足関節を装具で制限しているにも関わらず、歩行速度の増加により足関節角度 (A1, A2, A3) において有意な変化が得られたことは、装

具の金属支柱のしなりやたわみなどの影響が考えられ、これらの影響を考慮して今回得られた結果を解釈する必要がある。また、動作解析を2次元動作解析に行っているために、歩行時の下肢の回旋運動などの影響を除外できておらず、実際の歩行時の関節角度と算出した関節角度に誤差が生じてしまっている可能性がある。さらに、今回の対象は筋力低下のない健常者であり、筋力低下などの足関節背屈制限以外の要因も関連している片麻痺者においては、今回の結果における歩行速度の変化によって生じた膝関節角度変化や大腿四頭筋の筋活動変化などの影響を一概に解釈することは出来ず、今後詳細な検討および考察が必要となる。

まとめ

本研究では、足関節背屈制限が原因として生じる反張膝歩行を模擬的に形成するため、健常者を対象に、足関節背屈制限と歩行速度の程度を変化させ、歩行時の下肢関節角度と下肢筋の筋活動の変化の特徴を検討した。

足関節背屈制限の増加は膝関節を伸展させる方向に働くが、歩行速度の増加により膝関節は屈曲しやすくなる影響を受けるために、足関節背屈制限のみでは一概に反張膝傾向が生じるわけではなく、低速度歩行などの歩行速度の要因を考慮に入れる必要があることが示唆された。

また、足関節背屈制限と歩行速度の増加による膝関節の屈曲・伸展角度変化に対応するように、主に大腿四頭筋にて筋活動が増減する反応が得られた。

今後、今回の足関節背屈制限と歩行速度の要因のみによる歩行時の下肢関節角度変化および下肢筋の筋活動変化の結果を基に、足関節背屈制限以外の要素も関連している片麻痺者における歩行の特徴を詳細に検討していく必要がある。

【文 献】

- 1) De Quervain IA, Simon SR, Leurgans S, Pease WS, McAllister D: Gait pattern in the early recovery period after stroke. *J Bone Joint Surg Am* 78: 1506-1514, 1996
- 2) Mulroy S, Gronley J, Weiss W, Newsam C, Perry J: Use of cluster analysis for gait pattern classification of patients in the early and late recovery phases following stroke. *Gait Posture* 18: 114-125, 2003

- 3) Kinsella S, Moran K: Gait pattern categorization of stroke participants with equinus deformity of the foot. *Gait Posture* 27: 144 – 151, 2008
- 4) Bleyenheuft C, Bleyenheuft Y, Hanson P, Deltombe T: Treatment of genu recurvatum in hemiparetic adult patients: a systematic literature review. *Ann Phys Rehabil Med* 53: 189 – 199, 2010
- 5) Kerrigan DC, Deming LC, Holden MK: Knee recurvatum in gait: a study of associated knee biomechanics. *Arch Phys Med Rehabil* 77: 645 – 650, 1996
- 6) Perry J: *Gait Analysis -Normal and Pathological Function*. Thorofare, SLACK, 1992
- 7) Matthews JN, Altman DG, Campbell MJ, Royston P: Analysis of serial measurements in medical research. *British Medical Journal* 300: 230 – 235, 1990
- 8) Cram JR, Kasman GS, Holtz J: *Introduction to Surface Electromyography*. USA, AN ASPEN PUBLICATION, pp 349 – 377, 1998
- 9) Higginson JS, Zajac FE, Neptune RR, Kautz SA, Burgar CG, Delp SL: Effect of equinus foot placement and intrinsic muscle response on knee extension during stance. *Gait Posture* 23: 32 – 36, 2006
- 10) Knutsson E, Richards C: Different types of disturbed motor control in gait of hemiparetic patients. *Brain* 102: 405 – 430, 1979
- 11) Goodman MJ, Menown JL, West JM Jr, Barr KM, Vander Linden DW, McMulkin ML: Secondary gait compensations in individuals without neuromuscular involvement following a unilateral imposed equinus constraint. *Gait Posture* 20: 238-244, 2004

The influences of limitation of the ankle dorsiflexion and gait speed to lower limb joint angles and muscle activities during gait

Abstract

Limited range of motion at the ankle joint is one of the main causes of genu recurvatum. The purpose of this study was to clarify the kinematic and electromyographic changes induced by limited ankle joint motion during gait.

Eleven healthy subjects (21.5 ± 0.8 years old) participated in this study. An ankle-foot orthosis was used to limit the ankle dorsiflexion (DF) motion from 0 to 20 degree. The gait analysis was performed at 2, 3, 4, and 5 km/h on a treadmill. The joint angles and electromyographic signals on the right side of the lower limb were measured during gait. In addition, the degree of heel elevation during the stance phase, which is a kinematic change caused by limited DF motion, was measured.

The knee angle extended significantly as DF motion was limited, whereas it flexed significantly as gait speed increased during loading response and single-limb stance phase. Rectus femoris and vastus medialis muscle activities increased significantly with increased gait speed during the same phases. Heel elevation significantly increased with limited ankle motion and increased gait speed during the stance phase.

These results suggest that genu recurvatum is influenced by gait speed. With changes in knee angle, quadriceps muscles become more activated to support the weight in the flexed knee position.

Key words: limitation of the ankle dorsiflexion, Gait speed, Genu recurvatum, Electromyography

原 著

廃用性筋萎縮による骨格筋毛細血管退行に対する アスタキサンチンの予防効果

金指 美帆¹⁾, 藤田 直人¹⁾, 村上 慎一郎^{1,2)}, 藤野 英己¹⁾

キーワード：アスタキサンチン, 毛細血管, 筋萎縮

緒 言

ギプス固定や長期臥床などの安静で生じる廃用性筋萎縮筋では、活性酸素種の発生による酸化ストレスの増加¹⁾で血管内皮細胞が傷害され、骨格筋毛細血管の退行性変化が生じる²⁾。酸化ストレスは活性酸素種が抗酸化物質に比べて著しく増加し、生体の酸化と抗酸化のバランスが崩れた状態³⁾と定義され、血管内皮細胞障害発生メカニズムに関して、酸化ストレス増加との関連が示唆されている⁴⁾。骨格筋毛細血管の増減は、筋活動量に依存し⁵⁾、不活動により筋活動量が減少すると骨格筋毛細血管の退行性変化が生じると報告されている²⁾。また、血管新生および脈管形成には、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) が関与し⁶⁻⁷⁾、廃用性筋萎縮に伴い、VEGFの発現量が減少する⁸⁾。骨格筋における毛細血管の役割は骨格筋線維への酸素供給や糖・代謝産物の輸送であり、骨格筋線維でのエネルギー代謝に密接に関係している。一方、毛細血管の退行は、骨格筋線維のエネルギー代謝を制限し、筋活動を抑制することから、廃用性筋萎縮筋において毛細血管の退行性変化を予防することは、正常な筋活動を営むために重要であると考えられる。

非荷重で生じる骨格筋の不活動による酸化ストレス

の増加に対し、ビタミンE⁹⁻¹¹⁾やエストロジェン¹²⁾などの抗酸化物質を投与することで、酸化ストレスの増加を軽減し、スーパーオキシドディスムターゼ (Cu/Zn-Superoxide dismutase; SOD-1) の増加を抑制したとの報告があり、酸化ストレスに対して抗酸化物質を用いた研究が数多く行われている。酸化ストレスの増加に伴い抗酸化酵素であるSOD-1産生も増加することから、SOD-1は酸化ストレスマーカーとして多くの研究で用いられている¹³⁾。また、抗酸化物質の中でもカルテノイド色素の一種であるアスタキサンチンは、強力な抗酸化作用があり¹⁴⁾、ビタミンEの1000倍、β-カロテンの40倍の抗酸化力がある¹⁵⁾。アスタキサンチンは甲殻類、藻類などに多く含まれ、活性酸素種の一つである一重項酸素や過酸化脂質を抑制し¹⁶⁻¹⁷⁾、酸化ストレス基となるラジカルを効率よく捕捉できる分子構造を有することで強力な抗酸化力を生じるとされている¹⁸⁾。臨床において廃用性筋萎縮の予防および回復に運動療法がよく用いられているが、不活動期間中や萎縮筋に対する運動では酸化ストレスが増加すると言われている¹⁹⁻²⁰⁾。そこで、予防や回復を目的に行われる運動により生じる酸化ストレスをアスタキサンチンにて減少することができれば、より効果的に骨格筋毛細血管退行を予防することができ、さらには筋萎縮の予防につながるのではないかと考えた。そこで、本研究では、まず第1段階として、不活動時にアスタキサンチンを投与することで酸化ストレスの増加を軽減すれば、骨格筋毛細血管の退行性変化を予防できるという仮説を立て、検証した。

対象と方法

1. 実験動物

Wistar系雄性ラット24匹 (12週齢, 体重240-287 g)

1) 神戸大学大学院保健学研究科

(Department of Rehabilitation Science, Kobe University Graduate School of Health Sciences)

(〒654-0142 神戸市須磨区友が丘7-10-2)

2) 姫路獨協大学医療保健学部理学療法学科

(Department of Physical Therapy, Himeji Dokkyo University)

を用い、これらのラットを無作為に次の4群に区分した。1) 対照群 (CON群), 2) アスタキサンチンを投与した群 (ASX群), 3) 後肢非荷重群 (HU群), 4) 後肢非荷重期間中にアスタキサンチンを投与した群 (HU+ASX群) とした。ラットは室温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 12時間の明暗周期の環境下にて実験期間中を通じて個別ケージに飼育され、食餌および飲水は自由とした。本研究は、日本生理学会の「生理学領域における動物実験に関する基本指針」および神戸大学における動物実験に関する承認を得て、指針に従って実施した。

2. アスタキサンチン投与

ASX群とHU+ASX群には50 mg/kgのアスタキサンチン (富士化学工業) を1日2回、ゾンデを用いて経口投与した。また1回目の投与と2回目の投与間隔を6時間とし、7日間投与した。投与量については先行研究^{9,21)}を参考にして決定した。

3. 骨格筋萎縮モデルの作製

HU群とHU+ASX群はMorey法²²⁾を用い、7日間後肢非荷重状態とし、廃用性筋萎縮を惹起させた。また、前肢によりケージ内を自由に移動できる高さで固定した。

4. ヒラメ筋標本の作製、組織染色、毛細血管径測定

CON群とASX群は7日間の自由飼育後、HU群とHU+ASX群は7日間の後肢非荷重期間終了後に、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) で麻酔し、ヘパリン (1000 U/kg) を投与した。下大静脈から採血し血清を採取した後、左ヒラメ筋を摘出し、筋湿重量を測定した。次に、腹大動脈にカニューレを挿入して、生理食塩溶液で骨格筋毛細血管内を灌流し、脱血した。骨格筋毛細血管の三次元構造を観察するために、 42°C で液状にした8%ゼラチン溶液 (Sigma-Aldrich) に1%蛍光物質 (蛍光マーカー補充インク, Tombow) を加えた蛍光造影剤を灌流した後、15分間水冷し、右ヒラメ筋を摘出した。摘出した両ヒラメ筋は、ドライアイスで冷却したアセトン中で急速凍結した。左ヒラメ筋は組織化学染色、およびタンパク質解析に用いるまで、右ヒラメ筋は共焦点レーザー顕微鏡による骨格筋毛細血管の観察まで、 -80°C のディープフリーザで保存した。凍結保存した左ヒラメ筋試料からクリオスタット (CM3050S, Leica Microsystems) を使用して、厚さ $12 \mu\text{m}$ の横断切片を作製した。切片は骨格筋毛細血管を観察するためにアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase ;

AP) 染色を施した。AP染色は、Hansen Smithらの方法²³⁾を用い、切片を4% paraformaldehydeで前固定した後、0.02% 5bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate toluidine saltと0.1% nitroblue tetrazoliumを加えた0.2 M borate bufferにて60分間室温で反応させた。その後、4% paraformaldehydeで後固定した後、アルコールとキシレンにて脱水および透徹を行い、封入剤 (Mount quick, Daido Sangyo) で封入した。

凍結保存した右ヒラメ筋試料を、クリオスタットで厚さ $100 \mu\text{m}$ の縦断切片を作製した後、4% paraformaldehydeにて固定した。骨格筋毛細血管の三次元構造を観察するために、切片はアルゴンレーザー (488 nm) を用いた共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP, Leica Microsystems), および蛍光イメージングソフトウェア (LAS-AF, Leica Microsystems) で、筋切片 $1 \mu\text{m}$ 毎に存在する毛細血管をスキヤニングし、骨格筋毛細血管径を測定した。

5. 解析方法

AP染色を施した標本は、1標本あたり4箇所 of 顕微鏡視野を任意に選択し、光学顕微鏡 (BX-51, Olympus) で観察した。撮影条件を統一した後、光学顕微鏡に接続したCCDカメラ (VB-7000, Keyence) を用いて撮影し、撮影した組織像をパーソナルコンピュータに取り込んだ。画像解析ソフト (Image J, NIH) を用いて、筋線維横断切片における筋線維1本の筋線維膜に接する毛細血管数 (capillary number/fiber ; CAF) を算出した。さらに、取り込んだ画像内における全ての筋線維数と毛細血管数を数え、筋線維あたりの毛細血管比率 (capillary-to-fiber ratio ; C/F ratio) を算出した。

毛細血管直径は、共焦点レーザー顕微鏡により得られた三次元画像から画像解析ソフト (Image J, NIH) を用いて算出した。

6. SOD-1およびVEGF発現量の測定と解析

凍結保存した左ヒラメ筋標本の筋腹中央部約20 mgを切り出し、proteinase inhibitor (1 : 200, P8340, Sigma Chemical) を含む10倍量の抽出溶液 (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4) を加えて、超音波ホモジナイザー (UR-20P, Tomy Seiko) で均質化した。均質化したサンプルは 4°C で遠心分離 (8000 g) し、上清液を回収した。Bradford法により総タンパク質量を測定し、SDSサンプルバッファー溶液 (Tris-HCl 62.5 mM, 2% SDS, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol, 0.02% bromphenol blue) でヒラメ

表1. 体重とヒラメ筋の筋湿重量

| | 体重 (g) | 筋湿重量 (mg) | 相対重量比 |
|--------|----------|-----------|--------------|
| CON | 279 ± 7 | 111 ± 7 | 0.40 ± 0.02 |
| ASX | 271 ± 2 | 116 ± 7 | 0.43 ± 0.02 |
| HU | 235 ± 4* | 80 ± 7* | 0.34 ± 0.02* |
| HU+ASX | 234 ± 7* | 76 ± 5* | 0.32 ± 0.01* |

CON群: 対照群, ASX群: アスタキサンチンを投与した群, HU群: 後肢非荷重群, HU+ASX群: 後肢非荷重期間中にアスタキサンチンを投与した群
mean ± SD, * 対照群との有意差 (p < 0.05)

筋総タンパク量を1.0 mg/ml に調整した. その後, 80 °Cで15分間の熱処理を行った.

Laemmli 法²⁴⁾により, 12.5%のポリアクリルアミドゲルを用いて, 各ウェルへ20 µgのタンパク質を注入し, 電気泳動 (40 mA, 90 分間) にて筋タンパク質の分離を行った. 電気泳動終了後, セミドライ法によりタンパク質をPVDF膜に転写 (150 mA, 90分間) し, PVDF膜の過剰反応基をブロックするために, 5%ブロッキング溶液 (Blocking Agent, Amersham Biosciences) に3時間振盪させた. 次にSOD-1 モノクローナル抗体 (1:200, sc-8637, Santa Cruz Biotechnology) およびVEGFモノクローナル抗体 (1:200, sc-7269, Santa Cruz Biotechnology) とそれぞれ4 °Cにてover nightでインキュベートさせ, 洗浄後にHRP標識二次抗体 (1:1000) と1時間反応させた. SOD-1およびVEGF発現量は, 化学発光法 (ECL Plus, Amersham Life Science) でシグナルを検出し, 光化学発光装置 (LAS-1000, Fujifilm) で検出を行った. 検出したSOD-1およびVEGFの各バンドは, 画像解析ソフト (Science Lab, Fujifilm) でデンストメトリーを測定した. また, 内在性コントロールとしてβ-actinを使用し, CON群を100とした時の割合を算出した.

7. 統計処理

得られた測定値は平均値 ± 標準偏差で表示した. 各群間の比較には一元配置分散分析とTurkey-Kramerの多重比較検定を行い, 有意水準は5%未満とした.

結果

1. 体重およびヒラメ筋相対筋湿重量比

体重はCON群が279 ± 7g, ASX群が271 ± 2g, HU群が235 ± 4g, HU+ASX群が234 ± 7gとなり, 7日間の後肢非荷重としたHU群およびHU+ASX群が, CON群と比較して有意に低値を示した (表

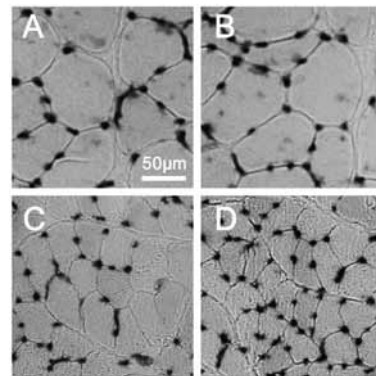


図1. アルカリフォスファターゼ染色画像

A: 対照群, B: アスタキサンチンを投与した群, C: 後肢非荷重群, D: 後肢非荷重期間中にアスタキサンチンを投与した群
Bar = 50 µm.

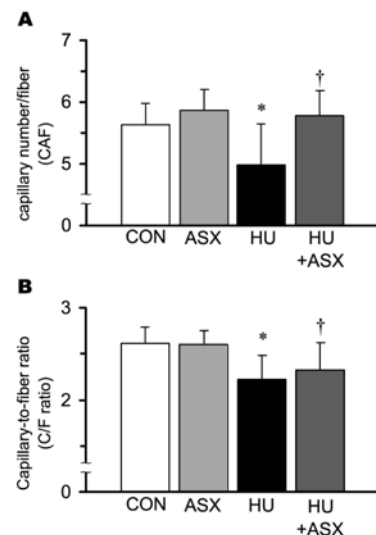


図2. 筋線維周囲の毛細血管数 (A) と筋線維あたりの毛細血管比率 (B)

CON群: 対照群, ASX群: アスタキサンチンを投与した群, HU群: 後肢非荷重群, HU+ASX群: 後肢非荷重期間中にアスタキサンチンを投与した群
mean ± SD, *と†はそれぞれCON群, HU群との有意差 (p < 0.05)

1). ヒラメ筋相対筋湿重量比は、CON群が 0.40 ± 0.02 , ASX群が 0.43 ± 0.02 , HU群が 0.34 ± 0.02 , HU+ASX群が 0.32 ± 0.01 となり、CON群に比較して、HU群, HU+ASX群ともに有意に低値を示した。

2. 1本の筋線維膜に接する毛細血管数 (CAF) および筋線維あたりの毛細血管比率 (C/F ratio)

AP染色像 (図1) から、HU群 (図1C) とHU+ASX群 (図1D) が、CON群 (図1A) とASX群 (図1B) に比較して骨格筋毛細血管密度が高いことが観察された。CAF (図2A) は、CON群が 5.65 ± 0.29 本, ASX群が 5.85 ± 0.39 本, HU群が 4.88 ± 0.77 本, HU+ASX群が 5.80 ± 0.45 本となった。C/F ratio (図2B) は、CON群が 2.36 ± 0.20 , ASX群が 2.49 ± 0.19 , HU群が 2.07 ± 0.24 , HU+ASX群が 2.31 ± 0.22 となった。CAFおよびC/F ratioは、HU群において、CON群と比較して有意に低値を示した。一方、HU+ASX群に

おいて、HU群に比較して有意に高値を示し、CON群との間に有意差を認めなかった。

3. 骨格筋毛細血管直径

共焦点レーザー顕微鏡像 (図3) から骨格筋毛細血管直径を算出した結果、CON群が $5.84 \pm 1.60 \mu\text{m}$, ASX群が $5.30 \pm 1.53 \mu\text{m}$, HU群が $3.92 \pm 1.07 \mu\text{m}$, HU+ASX群が $4.52 \pm 1.38 \mu\text{m}$ となった。HU群において、CON群と比較して有意に低値を示した。一方、HU+ASX群では、HU群に比較して有意に高値を示した。

骨格筋毛細血管直径の解析結果を元に、毛細血管径割合 (図4) をヒストグラムに示し、赤血球の通過不可能である $2.5 \mu\text{m}$ 以下²⁵⁾の毛細血管比率を算出した。その結果、CON群0.5%, ASX群1.7%に対して、HU群では6.8%と増加を示したが、HU+ASX群では3.0%となり、毛細血管径が維持された。

4. SOD-1発現量

SOD-1発現量 (図5) はCON群を 100.0 ± 24.5 とした場合、ASX群が 69.6 ± 21.7 , HU群が 132.3 ± 29.3 , HU+ASX群が 94.4 ± 28.5 となった。CON群に比較してASX群が有意に低値を示し、HU群は有意に増加した。一方、HU+ASX群では、HU群に比較して有意に低値を示し、CON群との間に有意差を認めなかった。

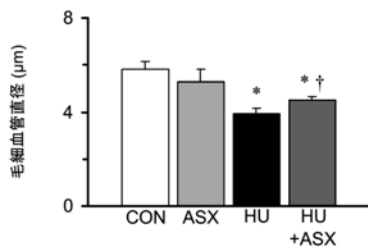


図3. 毛細血管直径

CON群: 対照群, ASX群: アスタキサンチンを投与した群, HU群: 後肢非荷重群, HU+ASX群: 後肢非荷重期間中にアスタキサンチンを投与した群

mean ± SD, *と†はそれぞれCON群, HU群との有意差 (p < 0.05)

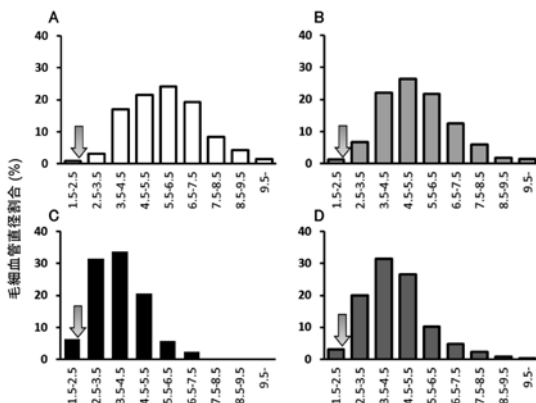


図4. 毛細血管径割合

A: 対照群, B: アスタキサンチンを投与した群, C: 後肢非荷重群, D: 後肢非荷重期間中にアスタキサンチンを投与した群

矢印は $2.5 \mu\text{m}$ の毛細血管直径の位置

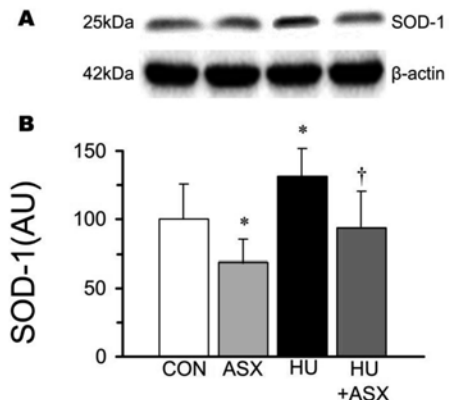


図5. SOD-1発現量

ウエスタンブロッティング法により検出したSOD-1 (25 kDa) のバンドおよびβ-actin (42 kDa) のバンド (A)

CON群: 対照群, ASX群: アスタキサンチンを投与した群, HU群: 後肢非荷重群, HU+ASX群: 後肢非荷重期間中にアスタキサンチンを投与した群 (B)

mean ± SD, *と†はそれぞれCON群, HU群との有意差 (p < 0.05)

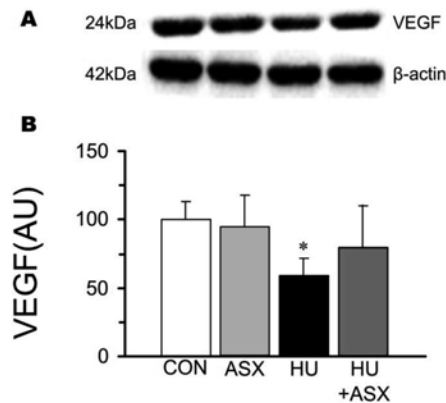


図6. VEGF発現量

ウエスタンブロッティング法により検出したVEGF (24 kDa) のバンドおよび β -actin (42 kDa) のバンド (A)

CON群: 対照群, ASX群: アスタキサンチンを投与した群, HU群: 後肢非荷重群, HU+ASX群: 後肢非荷重期間中にアスタキサンチンを投与した群 (B)

mean \pm SD, *と \dagger はそれぞれCON群, HU群との有意差 ($p < 0.05$)

5. VEGF発現量

VEGF発現量 (図6) は, CON群を 100.0 ± 14.4 とした場合, ASX群が 92.2 ± 28.4 , HU群が 58.4 ± 13.9 , HU+ASX群が 79.3 ± 31.9 となった. CON群と比較して, HU群は有意に減少した. 一方, HU+ASX群では, HU群と比較して高値を示し, CON群との間に有意差を認めなかった.

考 察

本研究では, アスタキサンチンを投与することによって, 廃用性筋萎縮に伴う骨格筋毛細血管退行性変化を抑制することを明らかにした. Musacchiaら²⁶⁾は, 7日間の後肢非荷重により, 骨格筋毛細血管数が減少すると報告している. 本研究においても7日間の後肢非荷重により, 骨格筋毛細血管数や毛細血管直径の減少が生じることを確認した. 廃用に伴う不活動は骨格筋線維の代謝活性を低下させると共に, 酸化的酵素活性の減少により生じる骨格筋毛細血管の退行的なりモデリングを発生させる²⁷⁾. また, 後肢非荷重による不活動が骨格筋内の酸化ストレスを上昇させる²⁸⁾と言われており, 酸化ストレスの増加によりVEGFの発現が抑制され, 血管形成を減少したとの報告もある²⁹⁾. さらに, 骨格筋毛細血管のリモデリングの制御には, 血管内皮細胞に特異的に作用するVEGFが関与している⁸⁾と言われており, 本研究では, 後肢非荷重によりSOD-1の有意な増加が生じ, さらにVEGFの発現量の減少が確認できた. 酸化ストレスマーカーである

SOD-1の増加から, 後肢非荷重において酸化ストレスの増加が生じたと考えられ, 酸化ストレスの増加によりVEGFの発現が抑制されたと考えられる. また, Murakamiら³⁰⁾は, VEGFが発現することで骨格筋における毛細血管ネットワークが維持されている可能性があるとして述べている. これらのことから, HU群では, 廃用による不活動が酸化ストレスを上昇させ, その結果, VEGFの発現が抑制されることで骨格筋毛細血管の退行性変化が生じたと考えられる.

一方, 後肢非荷重期間中にアスタキサンチンを投与したHU+ASX群では, 骨格筋毛細血管数や毛細血管直径が維持されていた. HU+ASX群ではHU群と比較してSOD-1の増加, つまり酸化ストレスの増加が抑制され, VEGF発現の減少を抑制したことが確認できた. また, ASX群ではCON群と比較してSOD-1が減少しており, アスタキサンチンの抗酸化作用が確認された. このことから, 強力な抗酸化力のあるアスタキサンチンが廃用による酸化ストレスの上昇を抑制したことで, VEGFの発現が維持され, 骨格筋毛細血管の退行性変化を抑制したものと考えられる. また, 赤血球の通過可能な毛細血管は $2.5 \mu\text{m}$ 以上と報告されている²⁵⁾. 毛細血管直径割合の結果からも, HU+ASX群ではHU群と比較して機能的な骨格筋毛細血管を維持できたことが示唆された. さらに赤血球には酸素や栄養素を運搬する働きがあり, 毛細血管を介して細胞に酸素や栄養素の供給を行っていることから, 廃用性萎縮筋において, 毛細血管構造を維持することは骨格筋活動再開時に, 酸素や栄養素の供給を維持し, より効果的な回復の可能性が示唆された.

これらの結果から, アスタキサンチンは不活動による酸化ストレスの増加を抑制し, 骨格筋毛細血管の退行性変化を予防することが明らかとなり, 安静による骨格筋機能の変化に対する予防を促進できるものと考えられる. 今後は, 運動にアスタキサンチン投与を併用し, より効果的な廃用性筋萎縮の予防, 回復の効果を検証していこうと考える.

【文 献】

- 1) Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC: Mechanisms of disuse muscle atrophy; role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: 337-344, 2005
- 2) Fujino H, Kohzaki H, Takeda I, Kiyooka T, Miyasaka T, Mohri S, Shimizu J, Kajiya F: Regression of capillary network in atrophied

- soleus muscle induced by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* 98: 1407-1413, 2005
- 3) Halliwell B: Antioxidant characterization; Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 49: 1341-1348, 1995
 - 4) Kim HW, Lin A, Guldborg RE, Ushio-Fukai M, Fukai T: Essential role of extracellular SOD in reparative neovascularization induced by hindlimb ischemia. *Circ Res* 101: 409-419, 2007
 - 5) Hong CR, Odoroff CL, Frierson JL: Capillary recruitment in exercise rate, extent, uniformity, and relation to blood flow. *Am J Physiol* 238: 31-42, 1980
 - 6) Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D, Witzenbichler B, Kearney M, Couffinhal T, Isner JM: Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med* 3: 879-886, 1997
 - 7) Clauss M, Schaper W: Vascular endothelial growth factor: A Jack-of-all-trades or a nonspecific stress gene? *Circ Res* 86: 251-252, 2000
 - 8) 藤野英己, 上月久治, 武田功, 笹井宣昌, 村上慎一郎, 村田伸, 石井禎基, 松永秀俊, 石原昭彦, 梶谷文彦: 廃用性萎縮筋における毛細血管リモデリングと血管増殖因子の抑制. *理学療法科学* 23 (2) : 203-208, 2008
 - 9) Servais S, Letexier D, Favier R, Duchamp C, Desplanches D: Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation; links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free Radic Biol Med* 42: 627-635, 2007
 - 10) Kondo H, Kodama J, Kishibe T, Itokawa Y: Oxidative stress during recovery from muscle atrophy. *FEBS Lett* 326: 189-191, 1993
 - 11) Urso ML, Clarkson PM: Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189: 41-54, 2003
 - 12) Sugiura T, Ito N, Goto K, Naito H, Yoshioka T, Powers SK: Estrogen administration attenuates immobilization-induced skeletal muscle atrophy in male rat. *J Physiol Sci* 56: 466, 2006
 - 13) Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J: Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17: 235-248, 1994
 - 14) Pashkow FJ, Watumull DG, Campbell CL: Astaxanthin; a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 101: 58-68, 2008
 - 15) Guerin M, Huntley ME, Olaizola M: Hematococcus astaxanthin; applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* 21: 210-216, 2003
 - 16) Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, Utsumi K: Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol Chem Phys Med NMR* 22: 27-38, 1990
 - 17) Spiller GA, Dewell A: Safety of an astaxanthin-rich Haematococcus pluvialis algal extract: a randomized clinical trial. *J Med Food* 6: 51-56, 2003
 - 18) Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitahama K, Yamashita E, Terada H: Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipids membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Bochim Biophys Acta* 1512: 251-258, 2001
 - 19) Aoi W, Naito Y, Yoshikawa T: Exercise and functional foods. *Nurt J* 5: 15, 2006
 - 20) Kato Y, Miyake Y, Kato Y, Miyake Y, Yamamoto K, Shimomura Y, Ochi H, Mori Y, Osawa T: Preparation of a monoclonal antibody to N(epsilon) - (Hexanonyl)lysine application to the evaluation of protective effects of flavonoid supplementation against exercise-induced oxidative stress in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 389-393, 2000
 - 21) Wang X, Willen R, Wadstrom T: Astaxanthin-rich algal meal and vitamin C inhibit helicobacter pylori infection in BALB/cA mice. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2452-2457, 2000
 - 22) Morey ER, Sabelman EE, Turner RT, Baylink DJ: A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist* 22: 23-24, 1979
 - 23) Hansen-Smith FM, Blackwell LH, Joswiak GR: Expression of muscle capillary alkaline phosphatase is affected by hypoxia. *J Appl Physiol* 73: 776-780, 1992

- 24) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227: 680-685, 1970
- 25) Henquell L, LaCelle PL, Honig CR: Capillary diameter in rat heart in situ; relation to erythrocyte deformability, O₂ transport, and transmural O₂ gradients. *Microvasc Res* 12: 259-274, 1976
- 26) Musacchia XJ, Steffen JM, Fell RD, Dombrowski MJ: Skeletal muscle response to spaceflight, whole body suspension, and recovery in rats. *J Appl Physiol* 69: 2248-2253, 1990
- 27) Poole DC, Mathieu CO, West JB: Capillary tortuosity in rat soleus muscle is not affected by endurance training. *Am J Physiol* 256: 1110-1116, 1989
- 28) Kondo H, Nakagaki I, Sasaki S, Hori S, Itokawa Y: Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol* 265: 839-844, 1993
- 29) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al.: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985, 1983
- 30) Murakami S, Fujino H, Takeda I, Momota R, Kumagishi K, Ohtsuka A: Comparison of capillary architecture between slow and fast muscles in rats using a confocal laser scanning microscope. *Acta Med Okayama* 64: 11-18, 2010

Protective effects of astaxanthin supplementation on capillary regression of disuse atrophied muscle.

Abstract

Disuse-induced capillary regression in skeletal muscle is related to overexpression of oxidative stress and/or disorder of endocapillary cell following generation of oxidative stress. We hypothesized that astaxanthin, as an antioxidant supplement, is able to attenuate oxidative stress induced by disuse, and the attenuation consequently lead to inhibit capillary regression in atrophied skeletal muscle. The purpose of the present study was to identify antioxidant effect of astaxanthin, and then to investigate preventive effects of astaxanthin on capillary regression of soleus muscle during hindlimb unloading. Twenty-four male Wistar rats were used in the present study. Rats were divided into control, control plus astaxanthin treatment, hindlimb unloaded, or hindlimb unloaded plus astaxanthin treatment group for seven days. Hindlimb unloading without astaxanthin resulted in a loss of muscle weight and a decrease of the number of capillaries. Additionally, hindlimb unloading without astaxanthin caused an overexpression of superoxide dismutase (SOD-1), and a decreased expression level of vascular endothelial growth factor (VEGF), whereas hindlimb unloading with astaxanthin maintained the expressions of SOD-1 and VEGF at the control level, prevented disuse-induced capillary regression. These results suggest that astaxanthin is effective to attenuate oxidative stress and capillary regression in disuse muscle atrophy.

Key words: astaxanthin, capillary, muscle atrophy

原 著

デトレニング期間中のメンタルプラクティスが 未経験運動の短期的練習効果の維持に及ぼす影響

岡和田愛実¹⁾, 金子 文成²⁾, 柴田恵理子¹⁾, 青木 信裕²⁾

キーワード：メンタルプラクティス, 運動学習, 剣道

緒 言

スポーツ選手やリハビリテーションを受けている患者は外傷や発熱などにより、ある一定期間、トレーニングを休止しなければならない状況が発生することがある。このようにトレーニングを一時的に休止、あるいは中止することをデトレニングという¹⁾。トレーニングによって変化した筋出力や運動耐容能などは、デトレニングを行うことで、トレーニング前の状態に戻ると報告されている^{1,2)}。さらに、これらの身体機能の低下に伴い、パフォーマンスも低下すると考える。

一方、身体運動を伴わずに身体機能やパフォーマンスを向上する方法として、メンタルプラクティスがある。メンタルプラクティスとは、技能習得を目的として、運動イメージを繰り返し実施することである³⁾。また運動イメージとは、実際の運動は伴わずにその運動をイメージすることで、内的に運動を再現する能動的な過程⁴⁾と定義されている。身体機能やパフォーマンスに対するメンタルプラクティスの効果に関して、Yueら⁵⁾は小指外転運動のメンタルプラクティスによって、筋肥大を伴わずに、小指外転筋の筋出力が向上したと報告した。さらに、Pascual-Leoneら⁶⁾はピアノ練習のメンタルプラクティスにより、ピアノのパ

フォーマンスが向上したと報告した。これらの報告から、メンタルプラクティスは繰り返し運動を内的に再現することによって、パフォーマンスの向上に寄与するということが示唆される。

このメンタルプラクティスをデトレニング期間に行うことにより、習熟したパフォーマンスが維持されることが近年報告されている⁷⁾。大場⁷⁾は、デトレニング期間に行ったメンタルプラクティスがデトレニング後のパフォーマンスに及ぼす影響を報告した。まず、被験者はダーツ投げを4週間練習した。その後、3週間のデトレニング期間を設けた。その結果、デトレニング期間にメンタルプラクティスを行った群では習熟したダーツ投げのパフォーマンスを維持することができたが、メンタルプラクティスを行わなかった群ではパフォーマンスが低下した。つまり、デトレニング期間にメンタルプラクティスを行うことにより、長期間の練習によって向上したパフォーマンスが維持される可能性が示唆される。

一方、運動の鍛錬者と非鍛錬者ではメンタルプラクティスの効果が異なるということも報告されている^{8,9)}。Clark⁸⁾はバスケットボールのフリースローにおいて、鍛錬者では実際に練習した群とメンタルプラクティスを行った群で同じ程度パフォーマンスが向上したと報告した。一方、非鍛錬者ではメンタルプラクティスを行った群よりも実際の練習を行った群のほうがパフォーマンスは向上した。そのため、非鍛錬者はメンタルプラクティスによる効果が得られない可能性があると報告した。また林ら⁹⁾は、剣道の鍛錬者と非鍛錬者を対象として、イメージする運動の習熟度が運動イメージの効果に及ぼす影響を検討した。その結果、剣道の面打ちの運動イメージ中に測定した運動誘発電位の振幅は、安静時と比較して鍛錬者では増大したが、非鍛錬者では変化がなかった。デトレニング期間中

1) 札幌医科大学大学院 保健医療学研究科
(Graduate School of Health Sciences, Sapporo Medical University)
2) 札幌医科大学 保健医療学部 理学療法第二講座
(Second Division of Physical Therapy, Sapporo Medical University)
(〒060-8556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目)



図1. 実験手順

突き打ちの測定は、前ステージと後ステージに行った。前ステージでは、最初に検者が被験者に竹刀を持たせながら突き打ちの教示を行った。次に、椅子に座り、5分間安静にするよう指示した。その後、突き打ち動作を10回行った。これを1セットとして、合計5セット繰り返した。後ステージでは教示は行わず、その他は前ステージと同様の手順で行った。各ステージの1セット目と5セット目を解析対象とした。

表1. 教示

| |
|---|
| 構え |
| <p>【手の握り】</p> <ul style="list-style-type: none"> • 右手が上、左手が下。 • 左手は、手のひらの全部に柄が納まるようにし、小指から順番に握るようにする。小指と薬指をしっかり締め、親指と人差し指を軽くそえるようにして握る。 • 左手の中に円錐のものがすっぽり納まるような形をつくって竹刀を持つ。 • 右手の左手同様、上から軽く握り、指の強さも左手と同じようにする。 <p>【竹刀の位置】</p> <ul style="list-style-type: none"> • 左手の位置は自分の身体よりおよそ拳一つ分離れたところ、そして自分のへそよりわずかに下に置く。 • 剣先は喉の高さ。 <p>【足の位置】</p> <ul style="list-style-type: none"> • 左右のかかとを前後にずらす。足は一足長分前後しているのが理想。 • 左のかかとは少し浮かせる。 |
| 突き打ち |
| <ol style="list-style-type: none"> ① 構えの姿勢から、左足に重心を移しつつ右足を踏み出し始める。 ② 右足を踏み出すのと同時に、左右の手を内側に絞りながら押し出す。 ③ 右足が接地するのと同時に、剣先で咽頭部を突く。 ④ すぐに左足をひきつけ、体制を整えて中段の構えに戻る。 |

前ステージで行った突き打ちの教示内容を示す。

のメンタルプラクティスによりパフォーマンスが維持されると報告した大場⁷⁾の研究においては、4週間の練習で鍛錬者と同様にメンタルプラクティスの効果を得ている。

しかし林ら⁹⁾は、先の実験で、非鍛錬者においても鍛錬者の動画を見ながら運動イメージを行うことによって、運動誘発電位の振幅が増大したことを示した。つまり、非鍛錬者においても動画を用いることによって、運動イメージの効果が得られることが示唆される。以上より、熟練していない未経験の運動課題では、運動イメージの効果が得られにくいことが示唆される。このことから、未経験の運動課題であっても、デトレーニング期間に動画を用いた運動イメージによるメンタルプラクティスを行うことによって、メンタルプラクティスの効果が得られる可能性がある。

そこで我々は、過去にメンタルプラクティスの効果がないとされてきた非鍛錬者をモデルとし、1日の練習で向上した運動に対する動画を用いたメンタルプラクティスの効果に着目した。そして、動画を用いたメンタルプラクティスが短期的な練習によって向上したパフォーマンスの維持に及ぼす影響を検証することを目的とした。また、被験者が行ったことのない動作であり、日常的に行わない動作として、剣道の突き打ちを実験課題として採用した。

対象と方法

1. 研究対象

対象は、健康な成人22名（平均身長165.5±7.2 cm、平均体重64.0±10.7 kg、平均年齢22.8±2.5歳）とした。被験者は、2週間のデトレーニング期間に動画を用い

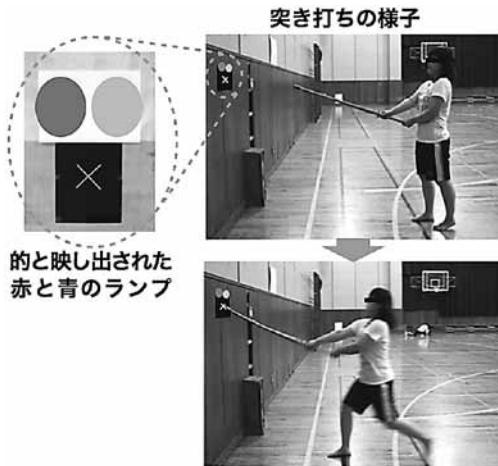


図2. 突き打ち動作

的と後方からプロジェクターにより映し出された赤と青のランプを示す(左). 突き打ち動作の様子を示す(右). 青の光が点灯した時 (Goの合図) では突き打ちを行い, 赤の光が点灯した時 (No goの合図) では突き打ちは行わなかった。

たメンタルプラクティスを行う群 (以下, 介入群: 平均身長164.4±6.0 cm, 平均体重58.4±11.0 kg, 平均年齢22.9±0.6歳, 男子6名, 女子5名) と, 介入を行わない群 (以下, 対象群: 平均身長164.6±7.4 cm, 平均体重59.6±10.3 kg, 平均年齢23.3±3.27歳, 男子6名, 女子5名) の2群に割付けた。除外基準は, 剣道経験者, 整形外科的疾患がある者, 介入期間中に日常的に行っていない激しい運動を行う予定がある者とした。

2. 方法

2-1. 実験手順

実験手順を図1に示した。本研究において, 突き打ちの測定はGo/No go課題を用いて行った。Go/No go課題による突き打ちの測定は, 介入前 (以下, 前ステージ) と2週間のデトレニング後 (以下, 後ステージ) に実施した。測定は以下の手順で行った。前ステージでは, 最初に教示を行った。教示は, 被験者に突き打ちの動画を一度見せ, その後, 竹刀を持たせた状態で突き打ちの教示を明記した文章 (表1) を音読させた。次に, 椅子に座って, 5分間安静にするよう指示した。その後, Go/No go課題による突き打ちをGoの試技が10回となるまで行わせた。突き打ち10回を1セットとして, 合計5セット繰り返した。後ステージでは教示は行わず, その他の手順は前ステージと同様に行った。

2-2. 実験課題

実験課題は剣道の突き打ちとした。突き打ちは相手の喉を突く動作であり, 実際には相手の喉を保護して

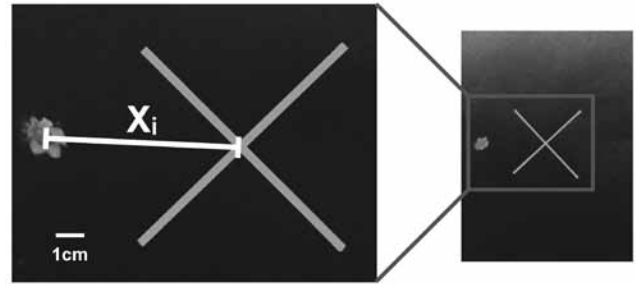


図3. 的の中心と打点間距離

白で書かれたばつ印の中心が的の中心, 赤の点が打点を示す。的の中心と打点間の距離を X_i とした。

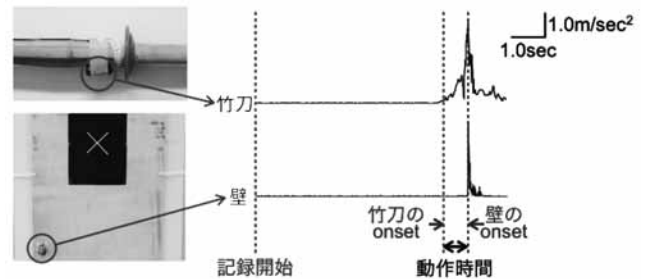


図4. 動作時間

竹刀の鏢元に加速時計が設置されている様子を示す (左上). 壁に加速時計が設置されている様子を示す (左下). それぞれの加速時計から得られた波形を示す (右). 竹刀の加速度のonsetから壁の加速度のonsetの間を動作時間と定義した。

いる突き垂を突く。本研究において, 突き打ちには1.15 mの竹刀を用いた。開始地点からの的までの距離は1.9 mとした。突き打ちを行う的は, 黒い紙の中心に白いばつ印をつけ, その交点を的の中心とした (図2)。竹刀の先に赤いチョークを塗り付け, 的に打点が示されるようにした。被験者には的の中心を狙って突き打ちを行うよう指示した。また, 動き始めてから竹刀が的にあたるまでの突き打ちの動作時間は1秒とし, 動作時間を一定にするために1 Hzのメトロノームに合わせて突き打ちを行うよう指示した。

また, 突き打ち動作前の準備状況を統制するため, 光刺激を用いたGo/No go課題を用いた。的の上スクリーンを設置し, 被験者の後方に設置したプロジェクターから赤と青の光を映し出した (図2) 青の光が点灯した時 (Goの合図) には突き打ちを行い, 赤の光が点灯した時 (No goの合図) には突き打ちを行わないように指示した。また, この赤と青の光はランダムに点灯するよう設定した。

2-3. 介入方法

前ステージと後ステージ間の2週間を介入期間とし, 介入群では毎日動画を用いたメンタルプラクティ

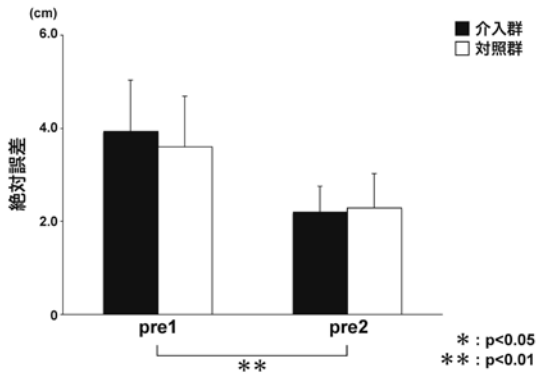


図5. 絶対誤差のグラフ

pre1とpre2における前ステージの絶対誤差を示す。両群で測定時期に主効果があり ($F = 34.970, p < 0.0005$), pre1に対してpre2が減少した。また、群と測定時期の要因に交互作用はなかった ($F = 0.685, p = 0.418$)。

スを行うよう指示した。メンタルプラクティスは、ポータブルマルチメディアプレーヤー (iPod touch, Apple社製) で突き打ちの動画を見せながら、一人称的イメージを行わせた。突き打ちの動画は、剣道経験者が突き打ちを行っている姿を左斜め後方から撮影したものを使用した。このメンタルプラクティスを10回1セットとして、セット間に数分間の安静を挟み、2セット行わせた。メンタルプラクティスを行う場所は、1人になれる静かな部屋とし、姿勢は座位とした。また、メンタルプラクティスを行う時間帯は日中とした。被験者には介入実施後に、介入を行ったことを検者に報告するよう指示した。これに対して、対照群には2週間のデトレーニング期間中、剣道または突き打ちのことを考えずに過ごすよう指示した。

2-4. データ収集

本研究においては、的から打点までの距離が短いほど、突き打ちの正確性が高いことを示す。そのため、的中心から打点までの距離を測定した (図3)。また、突き打ちの速度は難易度に影響するため、本研究では1 Hzのメトロノームに合わせて突き打ちを行わせることにより動作時間を統制した。さらに、著しく他の試技と動作時間が逸脱している試技を除外するために、突き打ちの動作時間を測定した。動作時間の測定には加速度を使用した。加速度計 (TRIGNO WIRELESS, DELSYS社製) は、図4のように竹刀の鏑元と、的が貼付されている壁に設置した。そして、竹刀の加速度から突き打ちの開始時間、壁の加速度か

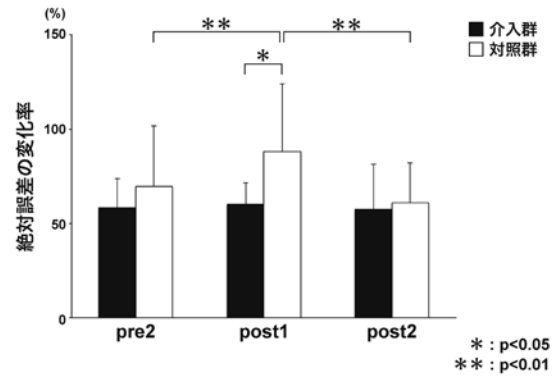


図6. 絶対誤差のpre1に対する変化率のグラフ

pre1に対する絶対誤差の変化率を示す。群と測定時期の要因に交互作用があった ($F = 3.942, p = 0.036$)。介入群では、各測定時期において有意差がなかったのに対し、対照群ではpre2と比較してpost1で有意に増大し、post1と比較してpost2で有意に減少した (pre2 vs. post1: $p = 0.003$, post1 vs. post2: $p = 0.004$)。また、post1において、介入群と比較して対照群で絶対誤差の変化率が有意に増大した (介入群 vs. 対照群: $p = 0.03$)。

ら突き打ちの終了時間を計算し、その差を動作時間として算出した。

2-5. データ解析

解析対象は、前ステージの1セット目と5セット目 (以下、pre1, pre2), 後ステージの1セット目と5セット目 (以下、post1, post2) とし、Goの試技のみ採用した。

変数として、的中心と打点間距離の平均 (絶対誤差) を算出した。またpre1に対する各測定時期 (pre2, post1, post2) の絶対誤差の変化率を算出した。絶対誤差は以下の計算式から算出した。なお、的中心と打点間の距離を X_i とした (図3)。

$$\text{絶対誤差} \quad X_a = \left(\frac{1}{n}\right) \sum_{i=1}^n X_i$$

データの除外基準は、以下の手順で動作時間から規定した。まず、竹刀と壁に取り付けた加速度計から得られたX軸・Y軸・Z軸の加速度を合成した。合成加速度を平滑化するために、10 Hzのローパスフィルタ処理を行った。次に記録開始1秒後から3秒間の静止時における加速度の標準偏差 (SD) を算出した。記録開始後の加速度が、静止時の加速度 + 5 SDを上回る地点を加速度の発見地点 (以下、onset) とし、壁と竹刀に取り付けた加速度計からonsetを算出した。そして、壁のonsetと竹刀のonsetの差から動作時間を算出した (壁のonset - 竹刀のonset = 動作時間)。この動作時間が、全被験者のpre1・2とpost1・2の動

作時間の平均よりも3 SD以上外れている試技を除外した。

2-6. 統計学的解析

絶対誤差、またそれぞれの変化率について、群（介入群・対照群）と測定時期を要因とした二元配置分散分析を行った。ただし、絶対誤差については測定時期要因の水準をpre1, pre2とし、変化率についてはpre1を除くpre2, post1, post2とした。いずれも交互作用があった場合、単純主効果の検定（Bonferroni法）を行った。有意水準は5%とした。

結果

動作時間の平均は 0.897 ± 0.288 秒であり、除外した試技は全被験者で34試技あった。

前ステージにおける絶対誤差の結果を図5に示す。絶対誤差は測定時期に有意な主効果があり、pre1に対してpre2が減少した（ $F = 34.970$, $p < 0.0005$ ）。しかし、群と測定時期の要因に交互作用はなかった（ $F = 0.685$, $p = 0.418$ ）。

絶対誤差の変化率での結果を図6に示す。介入群における絶対誤差の変化率は、pre2が $58.3 \pm 15.6\%$ 、post1が $60.0 \pm 11.5\%$ 、post2が $63.9 \pm 24.0\%$ であった。これに対し、対照群では、pre2が $69.8 \pm 31.8\%$ 、post1が $88.0 \pm 36.0\%$ 、post2が $60.8 \pm 21.2\%$ であり、群と測定時期の要因に交互作用があった（ $F = 3.942$, $p = 0.036$ ）。さらに、介入群では各測定時期において絶対誤差の変化率に有意差はなかった。これに対し、対照群ではpre2と比較してpost1で有意に増大し、post1と比較してpost2で有意に減少した（pre2 vs. post1: $p = 0.003$, post1 vs. post2: $p = 0.004$ ）。またpost1において、介入群と比較して対照群で絶対誤差の変化率が有意に増大した（介入群 vs. 対照群: $p = 0.03$ ）。

考察

本研究では、パフォーマンスの指標として絶対誤差を用いた。絶対誤差の減少は、的から打点までの距離が短いということであり、突き打ちの正確性が増したことを示す。

前ステージにおける絶対誤差の結果から、両群において突き打ちの正確性におけるパフォーマンスが、短期的な練習で向上したことが示された。このことから、前ステージでは突き打ちの運動学習が行われたと考える。

また、絶対誤差の変化率の結果から、対照群ではデ

トレーニング後に突き打ちの正確性が低下したことが示された。それに対して、介入群ではpre2で向上した突き打ちの正確性がデトレーニング後も維持された。つまり、前ステージにおいて行われた運動学習が、介入群では維持され、対照群では維持されなかったことが示唆される。

学習は経験によって変化していく能力であり、記憶はこの変化を長時間にわたり維持する能力であると定義されている¹²⁾。記憶には短期記憶と長期記憶があり、短期記憶の効果は数分から数時間、長期記憶の効果は特別な記憶の強化過程によって、数年あるいは一生持続するとされている¹³⁾。本研究では、前ステージでの短期的な練習による運動学習効果は両群とも短期記憶に置換されたと考える。しかし、短期記憶の効果は数分から数時間であるため、短期記憶は放置されると忘却してしまう¹²⁾。忘却を防ぐためには「リハーサル」が必要である¹³⁾。リハーサルとは、繰り返し思い起こす活動のことであり、2つのタイプが存在する¹⁴⁾。一つは同じ内容を単純に反復し、短期記憶に情報を保持するためだけに使用される維持リハーサルである。もう一つは短期記憶に情報を保持するだけでなく、他の知識と結びつけたりしながら反復し、長期記憶へ情報を移行させ保持させる精緻化リハーサルである¹⁴⁾。本研究では、メンタルプラクティスにより突き打ちを反復しているため、メンタルプラクティスが維持リハーサルに当たると考える。先行研究によると、運動イメージを行うとイメージした運動の出力に関わる脳部位が賦活されると報告されている³⁾。このことから、本研究においても、介入群ではデトレーニング期間にメンタルプラクティスを行ったことで、突き打ちの運動出力にかかわる脳部位が賦活され、これを繰り返すことによって短期記憶が維持されたと考える。しかし、対照群ではデトレーニング期間中に何も行わなかったことにより、前ステージでの短期記憶が忘却されたと考える。

また運動の鍛練者において、メンタルプラクティスはパフォーマンスを向上させる効果があるが、非鍛練者では効果がないと報告されている⁸⁾。デトレーニング期間に行ったメンタルプラクティス影響を調べた大場⁷⁾の研究では、デトレーニング前の練習期間を4週間としている。それに対して本研究では、練習期間を1日としており、練習期間に違いがある。すなわち本研究は、過去にメンタルプラクティスの効果がないとされてきた非鍛練者をモデルとしたものである。また本研究では、練習期間が短いことから、メンタルプラクティスを行わせる際に動画を見せた。大場⁷⁾の研究

においては、4週間の練習で向上したパフォーマンスが3週間のデトレーニング期間にメンタルプラクティスを行うことによって、維持された。そのため鍛練者と同様に、メンタルプラクティスの効果が得られたと考える。しかし、本研究の練習期間は1日であり、本研究の練習による運動学習段階は初期の段階であるということ、また、対象を剣道の未経験者としたことから、非鍛練者と類似した状況である。そのため、非鍛練者と同様に、メンタルプラクティスの効果は得られにくいと考えた。一方、運動の非鍛練者は、運動イメージ想起を行っても鍛練者のように皮質脊髄路の興奮性は増大しないが、運動イメージ想起と同時に動画を見せたところ、鍛練者と同様に皮質脊髄路の興奮性が増大したと報告されている⁹⁾。そこで、動画を用いることで非鍛練者であっても鍛練者と同様にメンタルプラクティスの効果を得られると考え、本研究ではデトレーニング期間中に動画を用いたメンタルプラクティスを実施した。その結果、デトレーニング期間後もパフォーマンスが維持された。

以上のことから、デトレーニング期間にメンタルプラクティスを行うことにより、全く未経験の運動課題であっても、短期的な練習効果が維持される可能性が示唆された。

理学療法では、起立や歩行など既に長期記憶されている動作を再学習させる場合がある。しかし、その場合の患者の身体状況は以前と異なっていることが多いため、長期記憶されている動作を再学習させるモデルがあてはまるかどうかは不明である。そのため本研究では、対象を未経験者とした。一方、臨床現場では訓練中の患者が体調不良などで運動療法が行うことができない状況がある。しかし、本研究により動画を用いたメンタルプラクティスが短期記憶の維持に貢献する可能性が示唆された。このことから、訓練により学習したパフォーマンスは、運動療法を行うことができない期間にメンタルプラクティスを実施することで、維持できる可能性があると考えられる。本研究は、メンタルプラクティスに臨床的有用性があることを示しているという点で、理学療法研究として意義深いといえる。

【文献】

- 1) Mujika I, Padilla S: Detraining: Loss of Training-Induced Physiological and Performance Adaptations. Part I: Short Term Insufficient Training Stimulus. *Sports Medicine* 30: 79-87, 2000
- 2) Mujika I, Padilla S: Detraining: Loss of Training-Induced Physiological and Performance Adaptations. Part II: Long term insufficient training stimulus. *Sports Medicine* 30: 145-154, 2000
- 3) Jackson PL, Lafleur MF, Malouin F, Richards C, Doyon J: Potential role of mental practice using motor imagery in neurologic rehabilitation. *Arch Phys Med Rehabil* 82: 1133-1141, 2001
- 4) Decety J, Grezes J: Neural mechanisms subserving the perception of human actions. *Trends Cogn Sci* 3: 172-178, 1999
- 5) Yue G, Cole KJ: Strength increases from the motor program: Comparison of training with maximal voluntary and imagined muscle contractions. *J Neurophysiol* 67: 1114-1123, 1992
- 6) 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* 74: 1037-1045, 1995
- 7) 大場 渉: メンタルプラクティスが習熟後のパフォーマンスに与える影響. *体育学研究* 54: 437-448, 2009
- 8) Clark LV: Effect of mental practice on the development of a certain motor skill. *Res Quart* 31: 560-569, 1960
- 9) 林司佳子, 長谷川善輝, 矢作晋, 笠井達也: 運動イメージによる運動誘発電位の出現動態. 剣道の鍛練者と非鍛練者の運動誘発電位 (MEP) による検討. *体育学研究* 46: 47-59, 2001
- 10) 大辞林 第3版. 東京, 三省堂, 2010
- 11) 中村隆一: 基礎運動学 第5版. 東京, 医歯薬出版, 2000
- 12) Mark L: 運動神経生理学講義. 東京, 荘光舎, pp171, 2002
- 13) 大橋ゆかり: セラピストのための運動学習ABC. 東京, 文光堂, pp55-65, 2004
- 14) 麓信義: 運動行動の学習と制御. 東京, 杏林書院, pp87-95, 2006

Effect of mental practice during detraining after short-term training on tsuki performance

Abstract

The purpose of this study was to clarify the effect of the mental practice on a completely inexperienced performance that improved after short-term practice. In this study, 22 healthy subjects were randomly assigned to 2 groups: the mental practice group and the control group. The mental practice group performed mental practice during detraining, and the control group performed normal daily activities. The new movement task was “tsuki” of kendo. The distance between the center of the target and the hit point of the shinai was measured before (pre-stage) and after (post-stage) detraining for 2 weeks. The absolute error value was calculated using the distance measured at the 1st set and the 5th set of each stage (pre1, pre2, post1, and post2). Relative changes to the results in the pre1 were calculated using each parameter measured in the pre2, post1, and post2.

The results obtained in this study, showed that relative differences in the absolute error value did not significantly change between each stage in the mental practice group. However, in the control group, relative difference increased to a greater extent in post – 1 than in pre2, and relative difference decreased more significantly in post2 than in pre2.

These results suggested that the effect of short-term practice was maintained by mental practice during detraining, even if the mentally practiced movement was new for the subjects.

Key words: mental practice, motor learning, kendo

日本基礎理学療法学会雑誌 投稿規定

1. 目的

日本基礎理学療法学会の会誌として、理学療法に関する学術的情報公開の場を提供し、理学療法の基礎研究を通して理学療法学の発展に貢献することを目的とする。

2. 投稿記事の種類

原著、症例報告、短報、総説、その他編集委員会で掲載を承認されたものとする。投稿原稿は他紙に掲載予定がなく未発表の邦文とし、他紙への同時投稿は認めない。

また、総説は編集委員会からの依頼原稿を原則とする。

3. 原稿枚数

[原著、症例報告]

原則として400字詰原稿用紙40枚(本文、文献、図表説明)以内とし、そのうち、図表は10枚以内とする。

[短報]

400字詰め原稿用紙15枚以内

[総説]

依頼時に規定する。

4. 執筆要項

- 1) 原稿はWindows版のMicrosoft word, またはテキストファイルを用いてA4判の用紙に横書きで作成する(1ページ当たりの字数は400字)。常用漢字、ひらがな、現代かなづかいを用い、文献、人名、薬品名、生物学名などは原語を用いる。
- 2) 英数文字や記号は半角とし、原則として特殊文字は使用しない。ただし、特殊文字で表記せざるをえないものについては、表記文字とその表記場所を記載したリスト(1部)を添付し、提出する原稿にもその表記場所を赤字でマークする。
- 3) 数字は算用数字を用い、度量衡単位は国際単位系(SI単位)を用いる(長さ:m, 質量:kg, 時間:s, 温度:℃, 周波数:Hz等)。
- 4) 原著、症例報告、短報については原則として緒言(はじめに)、対象と方法(症例報告)、結果(経過)、考察、文献等の小見出しをつけ、これらの順に構成・記載する。
- 5) 表紙には論文タイトル、著者氏名(著者の資格を示すもの、例えばPhD, PTなど)、所属および投稿責任者(correspondence author)の連絡先(住所、電話番号、FAX番号、E-mail address)、原稿の枚数、図表の枚数、5つ以内のキーワードを記入する。
- 6) 英文で表題、著者名、所属、要旨(200語前後)と5つ以内のキーワードをつける。
- 7) 図表説明は文献の後に記載し、番号、タイトルおよび簡潔な説明を加える。
- 8) 図、表は原稿用紙1枚として換算する。特に、写真に関しては縮小・拡大しても印刷に耐える程度の解像度を有すること。
- 9) 引用文献は必要最小限にとどめ、引用順に通し番号をつけ、本文の最後に「文献」として引用順に列挙する。番号は本文中の引用箇所の右肩

上に右片カッコにしてつける(すべて半角文字を用いる)。

10) 著者は全て連記する。

11) 記載方法は以下の例に従う。

(雑誌の場合)

- 1) Yoshimura A, Fujitsuka C, Kawakami K, Ozawa N, Ojala H, Fujitsuka N: Novel myosin isoform in nuclear chain fibers of rat muscle spindles produced in response to endurance swimming. J Appl Psychol 73:1925-1931, 1992
- 2) 曾我部正博, 成瀬恵治, 曾我浩之: 膜伸展によって活性化されるイオンチャンネル. 心臓 24: 333-343, 1992

(本の章、節、項が参考の場合)

- 3) King A, Cavanaugh JM: Neurophysiologic basis of low back pain. In The Lumbar Spine. Wiesel SW, Weinstein JN, Herkowitz H(Ed.), Philadelphia, WB Saunders, pp 74-80, 1996
- 4) 熊沢孝朗: 痛みのメカニズム. 新医科学大系7. 星猛(編). 東京, 中山書店, pp 153-167, 1995
- 5) 伊藤文雄: 筋感覚. 名古屋, 名古屋大学出版会, 1994

5. 投稿手続

投稿原稿(原稿ならびに図表)は原稿データを保存したCDを提出し、氏名、所属を抜いた原稿データも用意する。提出先は学術誌局とする。なお、原稿受付年月日は原稿が学術誌編集委員会に到着した日とし、受理年月日は原稿の審査が終了し、掲載可能となった日とする。

6. 引用・転載の許諾について

他著作物からの図表の引用・転載については、著作権保護のため原出版社および原著者の許諾が必要である。引用・転載を行う場合は投稿者があらかじめ許諾を得て、その旨を図表説明に明記すること。

7. その他

- ・掲載された論文等の著作権は日本基礎理学療法学会に属する。
- ・採用された原稿の印刷構成は投稿者の責任において初稿のみとする。
- ・掲載料はカラーページ(実費負担)を除き、すべて本学会の負担とする。
- ・別刷りは30部まで無料とし、それ以上は実費とする。
※不明な点は学会誌局までお問い合わせください。

日本基礎理学療法学会 学術誌局

〒852-8501

長崎市坂本1-7-1

長崎大学病院リハビリテーション部内

坂本淳哉

TEL / FAX : 095-819-7258

E-mail : jun-saka@nagasaki-u.ac.jp

編集後記

本誌では第2回学術集会において特別講演をいただいた兵庫医療大学学長の松田 暉先生ならびにパネリストとしてご発表頂いた蜷川先生、櫻井先生、玉木先生に総説論文をご執筆頂きました。非常に興味深い内容となっておりますので、学術集会に参加できなかった会員の皆様に熟読して頂けたらと思います。

そして、今回は3編の原著論文を掲載することができました。今後、本誌が国際的な学術誌となり理学療法学の発展に寄与できるよう鋭意努力していきますので、今後も引き続きご協力いただきますようお願いいたします。

(文責 坂本)

編集委員

学術誌局長

| | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| 坂本 淳哉 | 中野 治郎 | 金子 文成 | 大西 英明 | 片岡 英樹 |
| 近藤 康隆 | 関野 有紀 | 本田祐一郎 | 森本 陽介 | 濱上 陽平 |
| 佐々部 陵 | 中願寺風香 | | | |

編集同人

| | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| 松原 貴子 | 城 由起子 | 下 和弘 | 乾 公美 | 河上 敬介 |
| 菊池 真 | 沖田 実 | 肥田 朋子 | 森岡 周 | 小塚 直樹 |
| 清水 英樹 | 高柳 清美 | 玉木 彰 | 中 徹 | 東 登志夫 |
| 藤野 英己 | 前島 洋 | 村上 太郎 | 吉田 正樹 | 今北 英高 |
| 大畑 光司 | 島田 裕之 | 菅原 健一 | 谷口 圭吾 | 西上 智彦 |

日本基礎理学療法学会雑誌

第16巻第2号

2013年3月27日 発行

編集
発行

日本基礎理学療法学会 学術誌局

〒852-8501
長崎市坂本1-7-1
長崎大学病院リハビリテーション部内
TEL / FAX : 095-819-7258

印刷
製本

社会福祉法人 北海道リハビリ

〒061-1195
北海道北広島市西の里507番地1
TEL : 011-375-2116 FAX : 011-375-2115

