

令和元年9月25日現在

機関番号：34447

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01441

研究課題名(和文) 糖尿病性微小血管障害に対する電気刺激・低酸素刺激の併用療法の開発

研究課題名(英文) Development of electric stimulation and hypoxic stimulation for diabetic microangiopathy

研究代表者

森藤 武 (Morifuji, Takeshi)

大阪河崎リハビリテーション大学・リハビリテーション学部・准教授

研究者番号：30708764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病に伴う骨格筋内微小血管障害に対する電気刺激と血流制限による低酸素刺激の併用療法の効果を検証した。8週間、電気刺激と低酸素刺激の併用療法を糖尿病ラットの骨格筋に実施したところ、骨格筋内毛細血管容積や直径の減少、及び筋萎縮を予防した。また、電気刺激と低酸素刺激の併用療法は、糖尿病に伴う血管新生因子VEGFの減少を予防した。これらの結果より、電気刺激・低酸素刺激の併用療法は、糖尿病により惹起される毛細血管ネットワークの退行予防に効果的であり、その機序には、VEGFが関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病では、血糖の上昇予防に加え、血管障害を予防する必要がある。しかし、運動耐容能が低く、効率的な運動を実施できない患者も少なくない。そのため、我々は、運動耐容能が低い糖尿病患者でも実施できる方法として、電気刺激と低酸素刺激の併用療法を提案した。その結果、電気刺激と低酸素刺激の併用療法は、糖尿病に惹起される骨格筋毛細血管の三次元構造や容積を温存し、微小血管障害を予防できることが示唆された。運動耐容能が低い糖尿病患者においても、血管障害予防のために実施できる手段を示すことができたことは、リハビリテーション分野において意義があることと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to verify the effect of combination therapy of electrical stimulation and hypoxic stimulation in diabetic microangiopathy. A combination therapy of electric and hypoxic stimulation of skeletal muscle in diabetic rats for 8 weeks was seen to prevent decrease in skeletal muscle capillary volume and diameter as well as muscle atrophy. In addition, this therapy prevented reduction in angiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF), which is associated with diabetes. These results suggest that combination therapy of electric and hypoxic stimulation is effective in preventing regression of capillary network caused by diabetes; furthermore, VEGF is seen to be involved in the mechanism.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：電気刺激 低酸素刺激 血流制限 骨格筋 毛細血管 VEGF

### 1. 研究開始当初の背景

近年、食生活や運動習慣などライフスタイルの変化により、2 型糖尿病は世界中で急激に増加している。糖尿病では微小血管および大血管障害により惹起される重篤な合併症が問題となるため、血糖の上昇予防に加え、血管障害を予防する必要がある。糖尿病の骨格筋では微小血管障害が出現し (Sexton WL, Am J Physiol, 1994) 下肢の血管障害は重篤になると下肢切断に繋がる。さらに、インスリン感受性は骨格筋における毛細血管密度と強く相関すると報告されており (Lillioja S, J Clin Invest, 1987) 糖尿病では骨格筋の微小血管障害を予防することが求められている。そのため、糖尿病に伴う骨格筋の微小血管障害を予防するための効果的な方法を開発することは重要である。

継続的な持久運動は毛細血管数や直径の減少を予防し (森藤, 日本基礎理学療法学雑誌, 2012) さらに、毛細血管ネットワークの予防には、ミトコンドリア代謝能 (Morifuji T, ScientificWorldJournal, 2012) や血管新生因子の増加や血管抑制因子の減少 (Kondo H, Muscle Nerve, 2014) が関与している。しかし、高齢や心疾患、骨関節疾患を有するなどの理由で、効率的な運動を実施できない糖尿病患者も少なくない。そのため、運動耐容能が低い糖尿病患者の微小血管障害を予防・改善する治療を開発することが求められる。

### 2. 研究の目的

現在、リハビリテーション分野において栄養や運動以外に糖尿病に伴う微小血管障害を予防する有効な手段は見当たらない。

長時間 (700 分/日) の低強度電気刺激は、虚血下の骨格筋内毛細血管を増加することが報告されている (Kelal CJ, 2004)。また、下肢への血流制限下でのトレーニングにより血管新生因子である VEGF が上昇することが報告されている (Takano, 2005)。そのため、我々は、電気刺激と血流制限による低酸素刺激を併用することが、糖尿病性微小血管障害に効果的ではないかと考えた。

そこで、本研究の目的は、電気刺激と低酸素刺激の併用療法が糖尿病に伴う微小血管障害に対する予防効果を検証することとした。

### 3. 研究の方法と結果

全ての実験は、イソフルラン吸入麻酔器を使用して深麻酔科にて実施した。

#### 1) 実験 1 : 低酸素刺激の至適条件の検討

11 週齢の雄性 Wistar ラット (n=3) を使用し、ラットに対する最適な低酸素刺激を検討した。

ラット大腿部に、幅 16mm、長さ 90mm のカフを装着後、圧を加えた。血流制限は、80mmHg、100mmHg、120mmHg、150mmHg の 4 条件とし、圧迫下の 5 分間と除圧後 5 分間、足底の血流量をレーザー血

計にて測定した (図 1)。

本実験は、糖尿病等にて障害されている血管に対する治療であるため、マイルドな刺激が最適である必要があると考えた。4 条件の中で、最も低い 80mmHg の圧迫であっても、足底の血流が 50% 程度に制限されているため、本実験で使用する血流制限圧は、80mmHg とした。

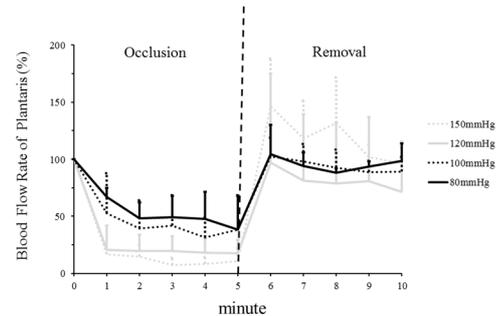


図1. ラット大腿部の血流制限下における足底の血流量

#### 2) 実験 2 : 正常モデルにおける電気刺激と低酸素刺激の併用療法の効果検証

##### 実験プロトコル

11 週齢の雄性 Wistar ラットを対照群 (CON 群、n=5) 下腿部に電気刺激を実施する電気刺激群 (ES 群、n=5) 大腿部に血流制限を実施する血流制限群 (BFR 群、n=5)、下腿部への電気刺激と大腿部への血流制限を併用して実施する電気刺激 + 血流制限群 (ES+BFR 群、n=5) の 4 群を設けた。電気刺激は、変調波 100Hz の中周波電気刺激を用い、刺激サイクルを 1 秒 on、2 秒 off に、刺激強度を最大筋張力の 30% に設定した。血流制限は、大腿にカフを用い 80mmHg の圧を加えた。全ての介入は 5 分間を 4 セット (セット間の休息は 5 分間) 行い、週に 3 回の頻度で 8 週間実施した。

##### 足関節底屈筋力の測定

実験終了後の 19 週齢で、電気刺激の超最大刺激により誘発された最大等尺性収縮をフォーストランスデューサーにて測定し、その値を体重で除し、足関節底屈筋力の指標とした。

##### 毛細血管ネットワークの測定

最後の介入より 12 時間後以降に、左ヒラメ筋を摘出し筋湿重量を測定後、急速凍結し、薄い横断切片を作成した。切片は骨格筋内の毛細血管数の指標である毛細血管/筋線維比 (capillary-to-fiber ratio; CF 比) を測定するため、アルカリフォスファターゼ染色を施した後、光学顕微鏡に接続した CCD カメラで撮影し、画像解析ソフトにて解析した。

一方、毛細血管の三次元構造を観察するため、腹部大動脈よりカテーテルを挿入して、蛍光剤を右下肢に灌流した後、右ヒラメ筋を摘出し急速凍結した。凍結した右ヒラメ筋よ

り薄い縦断切片を作成した後、共焦点レーザー顕微鏡を使用して、毛細血管の三次元構造を解析した。

### 3) 実験3: 糖尿病モデルにおける電気刺激と低酸素刺激の併用療法の効果検証

#### 実験プロトコル

11週齢の雄性 Wistar ラットを対照群 (CON 群、n=6) とし、同一週齢の糖尿病モデル GK ラットを、介入を実施しない糖尿病群 (GK 群、n=6) 下腿部に電気刺激を実施する電気刺激群 (GK+ES 群、n=5) 大腿部に血流制限を実施する血流制限群 (GK+BFR 群、n=5)、下腿部への電気刺激と大腿部への血流制限を併用して実施する電気刺激 + 血流制限群 (GK+ES+BFR 群、n=5) の4群に区分した。実験2と同様のプロトコルを実施した。

#### 足関節底屈筋力の測定

実験2同様の方法で測定した。

#### 血糖値の測定

介入終了後、尾静脈より採血をおこない、血糖値測定器を用いて、全血より空腹時血糖値を測定した。

#### 毛細血管ネットワークの測定

実験2と同様の方法にて、ヒラメ筋のCF比、毛細血管の三次元解析を実施した。

#### コハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase; SDH) 活性の測定

凍結された左ヒラメ筋より切片を作成後、SDH染色を施し、ミトコンドリアにおける酸化リン酸化反応の指標であるSDH活性値の測定を実施した。

#### VEGFとTSP-1の発現量の測定

ヒラメ筋における血管新生因子であるVEGFと血管抑制因子であるTSP-1のタンパク発現量をウェスタンブロッティング法によって測定した。

## 4. 研究成果

### 1) 実験2の成果

電気刺激と低酸素刺激の併用療法が筋力に与える効果

足関節底屈筋力は、ES+RBF群は、他の3群と比較して有意に高値を示した。また、RBF群は、Cnt群、ES群と比較して有意に高値を示した。以上の結果より、電気刺激と低酸素刺激の併用は、筋力増強に効果的であることが示唆された。

電気刺激と低酸素刺激の併用療法が骨格筋の毛細血管ネットワークに与える効果 (図2、3)

ヒラメ筋CF比では、ES+BFR群はCnt群と比較して有意に高値を示した。

ヒラメ筋の毛細血管容積では、ES+BFR群はCnt群と比較して有意に高値を示した。また、ヒラメ筋の毛細血管径では、ES+BFR群はCnt群、ES群と比較して有意に高値を示した。以上の結果より、電気刺激と低酸素刺激の併用は、骨格筋の毛細血管ネットワークの構築に効果的に働くことが示唆された。

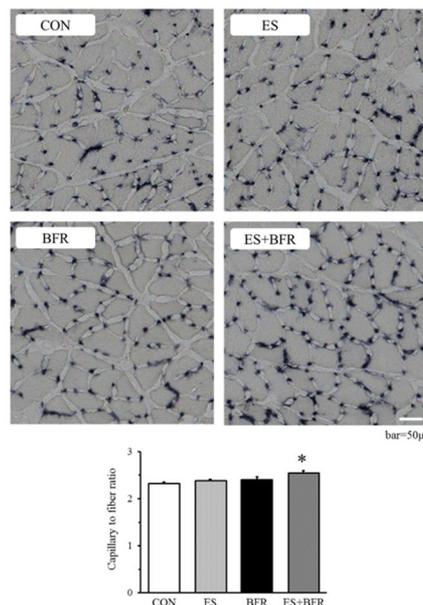


図2. ヒラメ筋の毛細血管/筋線維比  
上図はヒラメ筋のアルカリフォスファターゼ染色画像  
CON: コントロール, ES: 電気刺激, BFR: 血流制限, ES+BFR: 電気刺激+血流制限  
mean ± SE. \*: CON との有意差 ( $P < 0.05$ )

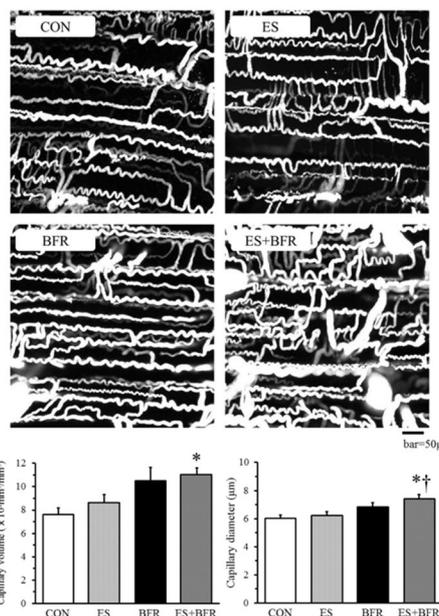


図3. ヒラメ筋毛細血管の3次元解析  
上図はヒラメ筋毛細血管の3次元可視化画像  
CON: コントロール, ES: 電気刺激, BFR: 血流制限, ES+BFR: 電気刺激+血流制限  
mean ± SE. \*: CON, †: ES との有意差 ( $P < 0.05$ )

### 3) 実験3の成果

電気刺激と低酸素刺激の併用療法が糖尿病モデルの筋力に与える効果

足関節底屈筋力では、GK+ES+BFR 群は、他の 4 群と比較して有意に高値を示した。そのため、電気刺激と血流制限の併用は、糖尿病の骨格筋においても筋力増強の効果があることが示唆された。

### 電気刺激と低酸素刺激の併用療法が糖尿病モデルの血糖値に及ぼす影響

空腹時血糖値において、糖尿病モデルである GK 群、GK+ES 群、GK+BFR 群、GK+ES+BFR 群は、Cnt 群と比較して有意に高値を示した。しかし、糖尿病モデルの 4 群では有意差は認められなかった。以上の結果より、電気刺激と低酸素刺激の併用療法は、糖尿病の血糖値改善に影響を与えないと考えられる。

電気刺激と低酸素刺激の併用療法が糖尿病モデルにおける骨格筋の微小血管障害に与える効果 (図 4、5)

ヒラメ筋 CF 比において、全ての群間において有意差を認めなかった。しかし、毛細血管容積において、GK 群は、CON 群と比較して有意に低値を示した。一方、GK+ES+BFR 群は GK 群と比較して有意に高値を示した。毛細血管径のヒストグラムを図 5 に示す。GK 群では、CON 群と比較して細い血管の比率が多いが、GK+ES+BFR 群では、GK 群と比較して太い細い血管の比率が多いことが分かる。これらの結果より、電気刺激と低酸素刺激の併用療法は、糖尿病に伴う微小循環障害の改善に効果的であることが示唆された。

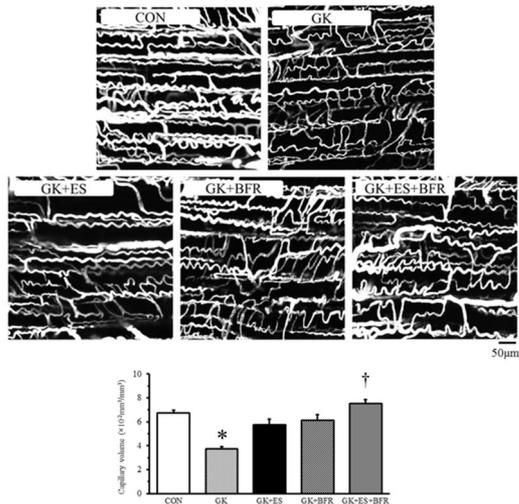


図4. ヒラメ筋毛細血管の3次元解析  
上図はヒラメ筋毛細血管の3次元可視化像  
CON: コントロール, GK: 糖尿病, GK+ES: 糖尿病+電気刺激,  
GK+BFR: 糖尿病+血流制限, GK+ES+BFR: 糖尿病+電気刺激+血流制限. mean ± SE. \*: CON, †: GKとの有意差 ( $P < 0.05$ ).

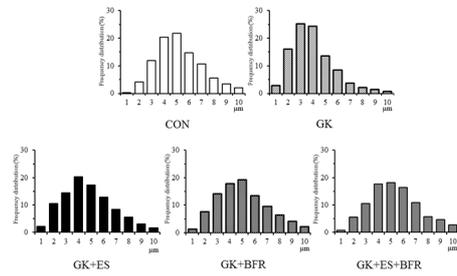


図5. ヒラメ筋毛細血管のヒストグラム  
CON: コントロール, GK: 糖尿病, GK+ES: 糖尿病+電気刺激, GK+BFR: 糖尿病+血流制限, GK+ES+BFR: 糖尿病+電気刺激+血流制限

電気刺激と低酸素刺激の併用療法が糖尿病モデルの血管新生因子、血管抑制因子に及ぼす影響 (図 6)

血管新生因子である VEGF において、GK 群と GK+ES 群では、CON 群と比較して有意に低値を示した。一方、GK+ES+BFR 群では、GK 群、GK+ES 群と比較して有意に高値を示した。血管抑制因子である TSP-1 においては、5 群間に有意差を認めなかった。これらの結果より、電気刺激と低酸素刺激の併用療法が糖尿病に伴う微小循環障害を改善する機序には血管新生因子 VEGF の関与が示唆された。

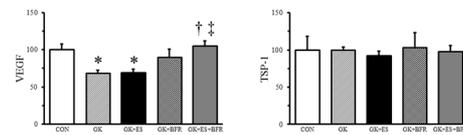


図6. VEGF と TSP-1  
Cnt: コントロール, GK: 糖尿病, GK+ES: 糖尿病+電気刺激, GK+BFR: 糖尿病+血流制限, GK+ES+BFR: 糖尿病+電気刺激+血流制限.  
mean ± SE. \*: CON, †: GK, ‡: GK+ESとの有意差 ( $P < 0.05$ ).

電気刺激と低酸素刺激の併用療法が糖尿病モデルにおける骨格筋のミトコンドリア機能障害に与える影響 (図 7)

SDH 活性において、GK 群では、CON 群と比較して有意に低値を示した。しかし、GK 群、GK+ES 群、GK+BFR 群、GK+ES+BFR 群の間には有意差を認めなかった。以上の結果より、電気刺激と血流制限の併用が糖尿病に伴うミトコンドリア機能障害の改善に効果が限定的であることが示唆された。

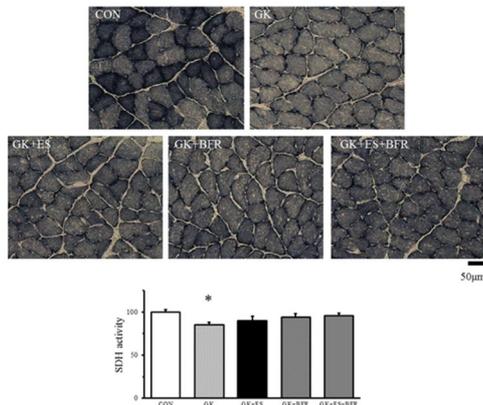


図7. コハク酸脱水酵素活性  
上図はヒラメ筋毛細血管の3次元可視化像  
CON: コントロール, GK: 糖尿病, GK+ES: 糖尿病+電気刺激,  
GK+BFR: 糖尿病+血流制限, GK+ES+BFR: 糖尿病+電気刺激+血流制限. mean ± SE. \*: CON との有意差 ( $P < 0.05$ ).

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Tanaka M, Morifuji T, Yoshikawa M, Nakanishi R, Fujino H. Effects of combined treatment with blood flow restriction and low-intensity electrical stimulation on diabetes mellitus-associated muscle atrophy in rats. J Diabetes, 査読有, 11(4), 2019, pp326-334

[学会発表](計4件)

森藤武, 吉川まどか, 田中稔, 平山佑介, 藤野英己. 血流制限と電気刺激の併用療法が骨格筋の毛細血管網に及ぼす効果. 第71回日本体力医学会大会. 2016年9月

吉川まどか, 森藤武, 田中稔, 前重伯壮, 藤野英己. 大腿圧迫による下腿後面への電気刺激がヒラメ筋・足底筋に及ぼす肥大効果. 第24回日本物理療法学会学術大会. 2016年11月

吉川まどか, 森藤武, 田中稔, 前重伯壮, 藤野英己. 大腿部の血流制限を伴う下腿三頭筋への電気刺激が骨格筋に与える肥大効果. 日本理学療法学術大会. 2017年5月

田中稔, 森藤武, 吉川まどか, 藤野英己. 糖尿病性筋萎縮に対する血流制限下の電気刺激の予防効果. 第72回日本体力医学会大会. 2017年9月

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

森藤 武 (MORIFUJI, Takeshi)

城西国際大学・福祉総合学部理学療法学科・准教授

研究者番号: 30708764

(2)研究分担者

藤野 英己 (FUJINO, Hidemi)

神戸大学大学院・保健学研究科・教授

研究者番号: 20278998

田中 稔 (TANAKA, Minoru)

大阪保健医療大学・保健医療学部・准教授

研究者番号: 00735508

田坂 厚志 (TASAKA, Atsushi)

大阪保健医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号: 90710260