

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011年度～2012年度
 課題番号：23700600
 研究課題名（和文） 心不全に伴う骨格筋萎縮に対するインプラント型治療的電気刺激の予防効果
 研究課題名（英文） Effect of implanted electrical stimulation on skeletal muscle atrophy in heart failure
 研究代表者
 藤田 直人（FUJITA NAOTO）
 神戸大学・大学院保健学研究科・助教
 研究者番号：90584178

研究成果の概要（和文）：骨格筋の萎縮予防に対する治療的電気刺激の効果と、その作用機序を検証した。モノクロタリン誘導性右心不全モデル動物、及び不活動モデル動物の後肢には、顕著な筋萎縮が確認された。一方、治療的電気刺激による介入群では、タンパク質のユビキチン化が抑制され、後肢骨格筋における筋線維横断面積の減少は軽減された。また、変調波による治療的電気刺激は、低周波では萎縮の予防が困難であった深層筋にも有効であった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the present studies were to investigate the effects of electrical stimulation and the mechanisms on skeletal muscle atrophy in heart failure. Skeletal muscle atrophy was induced by right heart failure and inactivity. Electrical stimulation inhibited overexpression of ubiquitinated proteins by inactivity and attenuated loss of muscle mass. Although electrical stimulation with low-frequency current failed in the prevention of muscle atrophy in deep layer, electrical stimulation with premodulated interferential current could prevent it.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：筋萎縮、電気刺激、心不全

1. 研究開始当初の背景

心不全患者は、心拍出量の低下による骨格筋への血流量減少により、運動耐容能が著しく低下している。また、心不全によって誘発される神経性及び内分泌性異常によって骨格筋は萎縮し、この骨格筋萎縮による身体活動量の減少は更なる骨格筋の廃用性萎縮を引き起こし、運動耐容能の低下を助長するという悪循環を生じる。

骨格筋の萎縮を予防する手段として、ランニングやスクワットの様な全身性の運動は有効であるが、心不全患者は運動耐容能が低下しているため、積極的な運動療法を実施す

ることが困難である。よって、治療的電気刺激などの局所的かつ他動的に骨格筋をトレーニングできる介入方法は、心不全患者の低下した運動耐容能を考慮した場合、有用であると思われる。

しかし、現在のリハビリテーションにて広く普及している経皮的な表面電極型電気刺激を用いた場合、皮膚直下の浅層に位置する骨格筋を刺激することは可能であるが、深層の骨格筋を刺激することは困難である。運動耐容能を決定する因子の1つに骨格筋の筋線維タイプがあり、持久的な運動には主として遅筋タイプの線維が関与する。この遅筋線

維は深層部に多く存在しているため、心不全患者の運動耐容能低下を治療対象とする場合には、より深層まで刺激可能な治療電極が必要になる。

2. 研究の目的

本研究では、深層の骨格筋に留置可能なインプラント型電極の開発、及び心不全における骨格筋萎縮に対する治療的電気刺激の効果検証と作用機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

研究は以下のように細分化して実施した。

(1) 心不全モデル動物の作製

4週齢のWistar系雄性ラット（平均体重93g）を用いて、モノクロタリンの腹腔内投与（30mg/Kg）にて肺高血圧症、及び右心不全を惹起した。

(2) インプラント型電気刺激装置の作製

電子回路基板、ボタン型電池、電線、抵抗、コンデンサ、インバータICチップ、RF送信モジュール・RF受信ICチップ、任意波形発生器を用いて電気刺激装置を作製した。電気刺激装置にて骨格筋を十分に収縮させるには、パルス幅100~1000msの矩形波を用いて、50~100Hzの刺激周波数、4mA以上の刺激出力が必要であった。これらの刺激条件が可能であり、生体内に2週間以上留置してもバッテリー交換の必要が無い電気刺激装置は、最小3×4cmサイズのものになった。しかし、このサイズの電気刺激装置は、心不全モデル動物の生体内に留置するには実用性に欠けるため、骨格筋萎縮に対する治療的電気刺激の効果検証には、経皮電極を用いた。

(3) 骨格筋萎縮に対する治療的電気刺激

動物に対して安定した治療的電気刺激を実施するには、動物が動いて電極が外れないように、動物の身体を十分に固定する必要がある。よって、治療的電気刺激は、ペントバルビタール（40mg/kg）を用いた浅麻酔下で実施した。

予備実験において、骨格筋の萎縮を効果的に予防するには、ターゲットとする骨格筋に対して1日200回以上の刺激が必要であった。この電気刺激の治療時間を確保するには、動物に対して麻酔を毎日実施する必要がある。しかし、心不全モデル動物に対する麻酔処置の繰り返しは、長期間の飼育を困難にした。よって、骨格筋萎縮に対する治療的電気刺激の効果検証には、不活動による廃用性筋萎縮モデル動物を用いた。

4. 研究成果

(1) 心不全モデル動物における骨格筋の萎縮とアポトーシス

モノクロタリンを腹腔内に投与されたラットは、概ね3週間後に肺動脈壁の肥厚を生じ、肺高血圧症を発症した。さらにその約1週間後、モノクロタリンを投与されたラットの右心室には肥大した心筋線維を認めるようになり、右心室肥大を生じた（図1）。モノクロタリンを投与されたラットは概ね4週間後に急激な体重減少を生じ、体重減少が2日続いた時点で、後肢の主要な骨格筋を摘出した。

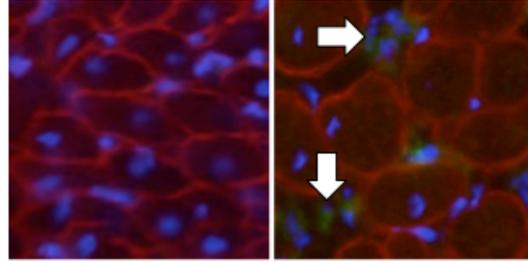


図1 心筋線維の横断切片

左:対照群;右:モノクロタリン投与群

モノクロタリン投与群では心筋線維の肥大や炎症細胞の浸潤(矢印)が確認できる。

摘出した後肢の骨格筋試料を用いて凍結切片を作製し、HE染色およびATPase染色像より筋線維横断面積を計測したところ、全ての後肢筋において筋萎縮が生じ、特に腓腹筋と長指屈筋において顕著であった。また、TUNEL染色像にて筋核アポトーシスを確認したところ、全ての後肢筋において、心不全モデル動物の陽性筋線維数は対照群に比べて有意に高値を示した（図2）。

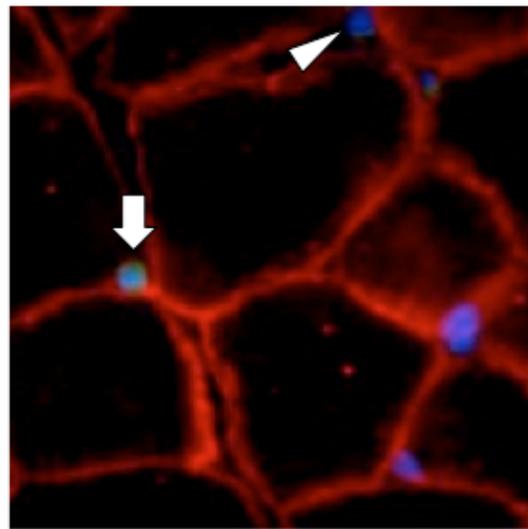


図2 骨格筋線維のアポトーシス

矢頭:通常の核;矢印:アポトーシスした核

(2) 骨格筋萎縮に対する治療的電気刺激の効果検証

① 不活動による廃用性筋萎縮モデル動物に対する治療的電気刺激の効果

2週間の不活動によって生じた前脛骨筋の

萎縮に対して、経皮電極にて、1日240回の治療的電気刺激を実施したところ、不活動に伴う筋線維横断面積の減少は軽減された。この治療的電気刺激による筋萎縮予防効果には、タンパク質合成系の促進よりも、分解系の軽減が関与していた。具体的には、治療的電気刺激を行うことで、ユビキチン化タンパク質の過剰発現（図3）や、Atrogin-1及びMuRF-1 mRNAの発現が軽減された（図4）。これらのタンパク質分解経路に対する抑制効果は、骨格筋の収縮様式が等張性の場合よりも、等尺性収縮の場合において顕著であった。これらの研究成果は国内と国外の関連学会、及び国内誌と国際誌にて報告した。

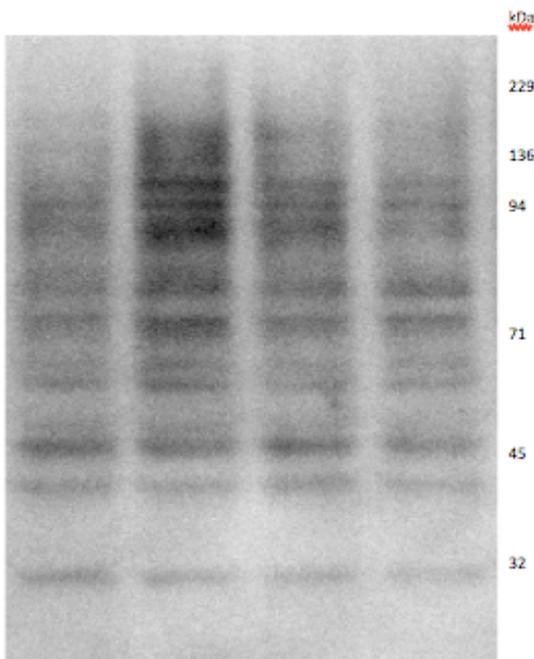


図3 治療的電気刺激によるユビキチン化タンパク質の軽減
ユビキチン化タンパク質の発現は、対照群(左)に比べて不活動(左から2番目)で増加したが、治療的電気刺激(右と右から2番目)によって有意に軽減された。

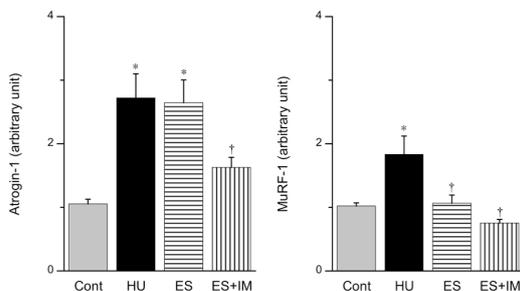


図4 治療的電気刺激によるAtrogin-1(左)及びMuRF-1(右) mRNAの軽減
Atrogin-1とMuRF-1の発現量は、対照群(Cont)に比べて不活動(HU)で増加したが、治療的電気刺激(ESとES+IM)によって有意に軽減された。

②変調波を用いた治療的電気刺激の効果

経皮電極を用いて治療的電気刺激を実施した場合、低周波では深層筋を刺激することが困難である。よって、変調波による治療的電気刺激にて、深層筋の萎縮予防効果を検証した。その結果、低周波では予防困難な深層筋（ヒラメ筋）の廃用性筋萎縮は、変調波では予防することが可能であった。これらの研究成果は国内と国外の関連学会、および国内誌と国際誌にて報告した。

③今後の展望

今回の研究にて、治療的電気刺激はユビキチン・プロテアソーム経路の抑制によるタンパク質分解系の軽減により、骨格筋萎縮の予防に有効であることが確認された。また、たとえ経皮電極を用いた方法であっても、変調波を用いれば、深層筋にも有効であることが確認された。今回の研究では、麻酔処置の問題により、心不全モデル動物に対する治療的電気刺激の効果を確認できなかった。よって、今後は、心不全モデルにおける有効性や安全性を検証し、効果的なプロトコルを開発する必要がある。

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4件)

(1) Tanaka M, Hirayama Y, Fujita N, Fujino H. Comparison of premodulated interferential and pulsed current electrical stimulation in prevention of deep muscle atrophy in rats. *J Mol Histol* 44. 203-11. 2013. 査読有
DOI: 10.1007/s10735-012-9473-4

(2) 藤田直人, 村上慎一郎, 藤野英己. 廃用性筋萎縮の予防に対する治療的電気刺激を用いた等尺性収縮の効果. *日本物理療法学会誌* 15. 53-8. 2012. 査読有
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=cq2phsio/2012/001900/011&name=0053-0058j&UserID=133.41.94.90>

(3) Fujita N, Murakami S, Fujino H. The combined effect of electrical stimulation and high-load isometric contraction on protein degradation pathways in muscle atrophy induced by hindlimb unloading. *J Biomed Biotechnol* 2011. 401493. 2011. 査読有
DOI: 10.1155/2011/401493

(4) Fujita N, Murakami S, Arakawa T, Miki A, Fujino H. The combined effect of electrical stimulation and resistance isometric contraction on muscle atrophy in rat tibialis anterior muscle. *Bosn J Basic Med Sci* 11, 74-9. 2011. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21619551>

〔学会発表〕(計24件)

(1) 平山佑介, 田中稔, 藤田直人, 村上慎一郎, 近藤浩代, 永友文子, 石原昭彦, 藤野英己. 中周波および低周波電気刺激が後肢非荷重ラットの深層骨格筋における毛細血管退行に及ぼす影響. 第20回日本運動生理学会大会. 2012年07月28日~29日(筑波)

(2) 田中稔, 平山佑介, 藤田直人, 藤野英己. 萎縮ヒラメ筋に対する中周波電気刺激のユビキチン化タンパク質発現の減衰効果. 第2回日本基礎理学療法学会学術集会. 2012年05月24日~27日(神戸)

(3) 田中雅侑, 福留千弥, 藤田直人, 藤野英己. 肺高血圧症による筋萎縮に対する運動が与える影響. 第47回日本理学療法学会学術大会. 2012年05月24日~27日(神戸)

(4) Tanaka M, Fujita N, Fujino H. Preventive effects of premodulated interferential and pulsed currents on muscle atrophy in deep layer of rat hindlimb muscle. *Experimental Biology* 2012. 2012.4.22-24. San Diego, USA

(5) 松本愛香, 藤田直人, 荒川高光, 三木明德. ラット前脛骨筋における除神経性筋萎縮と廃用性筋萎縮に対する電気刺激の影響の比較. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2011年11月5~6日(青森)

(6) 藤田直人, 村上慎一郎, 藤野英己. 廃用性筋萎縮の予防に対する等尺性収縮を用いた治療的電気刺激の効果. 第19回日本物理療法学会学術大会. 2011年10月15日~16日(徳島)

(7) 藤田直人, 村上慎一郎, 藤野英己. 電気刺激による等尺性収縮の廃用性筋萎縮に対する予防効果. 第66回日本体力医学会大会. 2011年9月16日~18日(下関)

(8) Fujita N, Fujino H. PROTECTIVE EFFECTS OF ISOMETRIC CONTRACTION USING ELECTRICAL STIMULATION ON MUSCLE ATROPHY. 16th World Confederation for Physical Therapy. 2011.6.19-25. Amsterdam, Netherland

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fhs-fujino/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 直人 (FUJITA NAOTO)

研究者番号 : 90584178