

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350649

研究課題名(和文) 最適電気刺激条件による褥瘡の加速的治療に関する研究

研究課題名(英文) The promotional effect of electrotherapy by optimum microcurrent on pressure ulcer healing

研究代表者

杉元 雅晴 (Sugimoto, Masaharu)

神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：20379457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：(1)電気刺激療法により線維芽細胞を電気走性させた時には、放電操作(シャント操作)が必要な操作であることが確認された。(2)線維芽細胞の増殖実験では、最適電流強度200 $\mu$ Aで周波数が少ない(1 Hz群、2 Hz群、4 Hz群)ほうが細胞分裂を促進することが確認された。(3)線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進する周波数に関する研究結果は確認できなかった。(4)病院での臨床試験や症例研究は少数症例にとどまったが、全ての症例で創の縮小効果が認められ、副作用は認められなかった。今後の実践を考えて、電気刺激装置の使用方法の映像マニュアルを製作した。

研究成果の概要(英文)：(1)Discharging of reverse current is necessary for electrical stimulation to promote galvanotaxis of fibroblasts.(2)We observed that low-frequency (1, 2, or 4 Hz) electrical stimulation (intensity; 200  $\mu$ A) promoted proliferation of fibroblasts.(3)We are currently investigating the frequency to induce fibroblasts differentiation into myofibroblasts.(4)There were several clinical studies that investigated the effects of electrotherapy for pressure ulcers healing, and the wound contraction was observed without side effects in all of the cases. We made the instruction manual of electrical stimulation device for future clinical trials.

研究分野：理学療法

キーワード：直流微弱電気刺激 パルス電流 周波数 褥瘡 線維芽細胞 筋線維芽細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ベッドでは高機能のマットレス、車椅子ではクッションを使用して、褥瘡を予防しているが、褥瘡が発症すると治癒に長期間を要し、医療コストは膨大である。褥瘡発症の予防と相まって、要介護の高齢者を在宅で療養していくには褥瘡治癒促進療法の開発が重要かつ緊急な課題である。

日本褥瘡学会ガイドラインでは電気刺激療法が創の縮小を促進する局所治療(推奨度B)として報告されている。自然治癒において、創は好中球やマクロファージにより壊死組織が除去され清浄化する。その時の創部への遊走(電気走性; galvanotaxis)を促進させる電流刺激強度は、陽極に直流 60  $\mu$ A であることが確認されている。肉芽増殖期や創の縮小期には創部に陰極を置き、陽極を創の周辺部に設置して線維芽細胞の遊走を促進させる。挑戦的萌芽研究で得られた培養細胞実験結果では、ヒト線維芽細胞の電気走性を促進させる最適刺激条件(極性; 陰極・周波数; 0.3Hz・刺激電流強度; 100 ~ 200  $\mu$ A)が確認された。今までの基盤研究(C)では、褥瘡治癒に最適刺激条件の小型専用直流電流刺激装置(67×43×21 mm, 約 50g)を製作し、臨床試験委員会(IRB)の指導の下で安全性と実用性の確認を始めた。今後、電気走性に加えて、線維芽細胞の増殖や創を収縮させる筋線維芽細胞への分化を促進する最適電気刺激条件を確認し、小型専用直流電流刺激装置に機能を追加し、医療機器申請をする。その後、褥瘡に物理療法を実施しようと考えている全国の主要施設に、ヒトの創部

(translational research: 基礎研究の結果をヒトに適用)での電気刺激療法の成果を検討する。

### 2. 研究の目的

(1) ヒト皮膚線維芽細胞の電気走性における放電操作(シャント操作)の有効性を確認する。

(2) ヒト皮膚線維芽細胞の増殖をさせる電気刺激条件(周波数)を確認する。

(3) ヒト皮膚線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進する電気刺激条件(周波数)を確認する。

(4) 確認された電気刺激療法の最適条件が臨床での有効性を確認する。

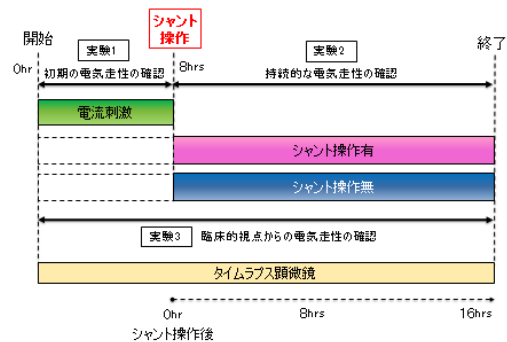
### 3. 研究の方法

#### (1) 放電操作の有効性実験

方法: 実験には、ヒト皮膚由来線維芽細胞の6-8継代を用い、直流パルス微弱電流刺激装置で電流を通電した。電流強度は、0  $\mu$ A (コントロール)群、200  $\mu$ A 群、400  $\mu$ A 群、600  $\mu$ A 群(周波数; 2 Hz、パルス幅; 250 ms、刺激時間; 8時間)の4条件で実施した。その後、通電した3群を無作為に、通電終了直後に1分間のシャント操作をした群(シャント有群)としなかった群(シ

ャント無群)に分けた(計7群)。通電終了後のシャント操作の効果を見るため、通電終了直後に計測を開始し、8時間後、16時間後にタイムラプス顕微鏡下で撮影を行った。線維芽細胞の遊走距離から遊走比率を算出した。

#### 実験手順



(2) 線維芽細胞の増殖をさせる最適条件  
方法: 実験にはヒト皮膚線維芽細胞の7-8継代を用いて、直流パルス微弱電流刺激を周波数の違う7条件とコントロール(通電なし)群の8条件で実験を行った。直流パルス微弱電流刺激は強度を 200  $\mu$ A とし、周波数を 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz, 8 Hz, 16 Hz, 32 Hz, 64 Hz に変更した。パルス幅については Duty factor を 50 % に設定しているため、周波数に依存するパルス幅をとった。培養時間は 96 時間とし、1 時間毎にタイムラプス顕微鏡で撮影した。直流パルス微弱電流刺激は播種後 24 時間、48 時間、72 時間の時点で 1 時間通電した。細胞数は 96 時間後にトリパンプルー法にて細胞数と生存率を求めた。また、電気刺激の影響を多く受ける dish 中央部分の 1 mm<sup>2</sup> あたりの細胞数を算出した。

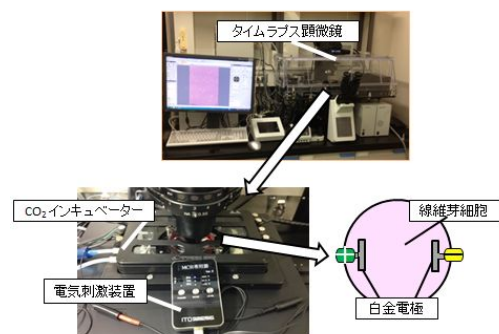


図2. タイムラプス顕微鏡(電気刺激下での細胞培養)

#### (3) 筋線維芽細胞への分化実験

方法: 実験には、ヒト皮膚由来線維芽細胞(CC-2511; Clonetics, San Diego, CA)の8継代を用い、直流パルス微弱電流刺激装置で電流を通電した。電流刺激条件は、対照(コントロール)群と電流強度 200  $\mu$ A で、周波数; 2 Hz、10Hz で、パルス幅; Duty factor

を 50% に設定して通電した。電気刺激には白金電極を使用し、6-well plate 内に挿入し、37 の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間実施した。

mRNA 発現解析；刺激終了後、TRIzol Reagents (Thermo Fisher scientific, Bremen, Germany) にて mRNA を分離し、クロロホルム、イソプロパノール、75%エタノール、RNase-free 水を使用して mRNA を抽出した。抽出された mRNA を逆転写し、得られた cDNA にて real-time PCR (applied biosystems StepOne™; life technologies) を解析行った。プライマーは GAPDH, TGF 1、-SMA (TaqMan® Gene Expression Assay) を用いた。PCR 反応には、iCycler IQ を使用し、95 30 秒、62.5 30 秒、72 30 秒の 3 ステップ反応を 40 cycle 行った。PCR 反応後の融解曲線解析にて、ターゲット遺伝子の特異性を確認し、GAPDH を reference 遺伝子とした t 法にて相対発現量を算出した。

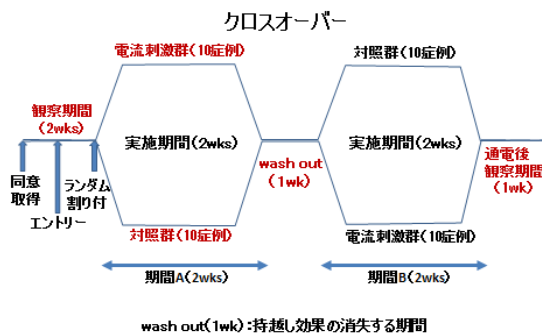
(4) 臨床試験；平成 25 年、26 年で確認した結果を最適条件として組み込んだ小型専用直流電流刺激装置を製作し、臨床試験委員会 (IRB) の承認のうえで、安全性と有効性の検証をする。

褥瘡の病態評価 NPUAP の stage 分類で (表皮から真皮までの欠損) または (皮下脂肪組織までの損傷) を有する患者に同意を得て臨床試験を行う。

無作為に割り付けし、両群の褥瘡部に電流刺激 (対照群：0 μA、直流微弱電流刺激群：100 ~ 200 μA、最適周波数、最適パルス幅) を開始する。電流刺激は 1 日 1 回、60 分間で、2 週間継続する。その後、1 週間の wash out 期間をおき、電気刺激条件を交代 (クロスオーバー) し行う。褥瘡の治癒過程は日本褥瘡学会の開発した評価尺度 DESIGN-R® と創面積を経時的 (1 回/週) に測定する。

尚、大学病院が早期退院を推進するようになり、協力病院へも上記の臨床研究を依頼する。医療機器として販売されている電気刺激治療器を使用し、治療として同様の刺激条件で実施し、症例報告としてまとめた。生命倫理・安全に関する留意して実施した。

臨床試験の概略図

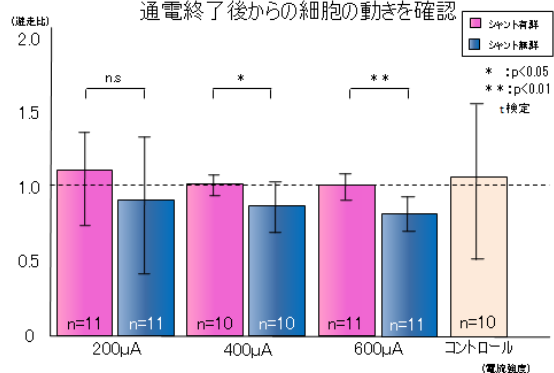


#### 4. 研究成果

(1) 線維芽細胞の電気走性における放電操作の有効性；この操作は、今後の実験を継続していく上で、証明しておく必要のある実験である。

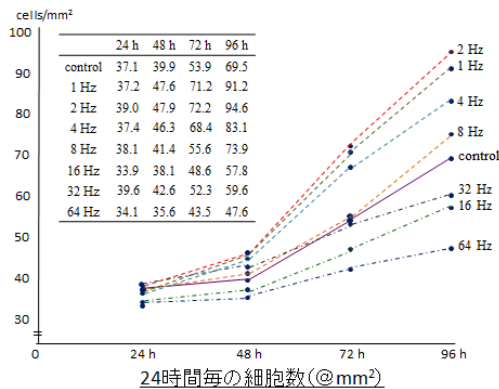
結果：線維芽細胞の直流微弱電流刺激後の電気走性における放電操作 (シャント操作) の有効性を検討した。シャント操作は、直流電流刺激後に発生する放電電流を除去する操作である。通電中の遊走比率では 200 μA 群は他群より有意に陰極方向へ遊走していた。通電終了後には、シャント操作の有無により 400 μA 群間、600 μA 群間で有意差があり、シャント操作により陰極方向への遊走が維持されていた。通電開始から通電終了 16 時間後では、シャント有群の 200 μA 群と 600 μA 群間に有意差があり、200 μA 群で陰極方向へ遊走していた。また 600 μA 群においては、シャント無群で陽極方向へ遊走していた。通電終了直後と通電終了 16 時間後のシャント有群においては、全ての群に有意差はなく、通電終了後も通電中の遊走比率を維持していた。シャント無群での遊走比率は、600 μA 群において有意差があり、陽極方向へ遊走していた。以上より、シャント操作は線維芽細胞の遊走に必要な操作であることが確認された。

実験2；シャント操作の効果を確認するため  
通電終了後からの細胞の動きを確認



#### (2) 線維芽細胞の増殖実験

結果：細胞数はコントロール群に比較して、周波数 1 Hz 群、2 Hz 群、4 Hz 群、8 Hz 群で有意に多かった。また、周波数 64 Hz 群はコントロール群に比べ有意に細胞数が少なかった。細胞生存率は 8 群すべてにおいて変化はみられなかった。1 mm<sup>2</sup> あたりの細胞数の検討では、コントロール群に比べ 1 Hz 群、2 Hz 群、4 Hz 群が有意に多く、16 Hz 群、32 Hz 群、64 Hz 群が有意に少なかった。最適電流強度 200 μA では、周波数が少ないほうが細胞分裂を促進することが確認された。



(3) 線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進する電気刺激条件を確認する。

対照群と比較して、周波数 2 Hz で刺激した線維芽細胞群の  $\alpha$ -SMA mRNA 発現が高くなり、周波数 10Hz では対照(コントロール)群と同値を示していた。また、TGF  $\beta$ 1 mRNA 発現は、周波数 2 Hz では上がり、周波数 10Hz 群では軽度上昇していた。これらの結果から、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化が周波数 2Hz 群に認められたことになり、先行研究や仮説と矛盾する結果となった。今後、機器のメンテナンス及び手技の検討を継続する必要があることが確認できた。(1) n=3 のテクニカルレプリケートのばらつきが大きい、(2) 検量線サンプルの設定が適切でない、(3) 蛍光強度のプラトーが全てのアッセイで低い、に関する問題箇所の検討に入っている。

#### (4) 臨床試験

結果：大学病院で最後まで追跡可能な症例は 2 例であり、短期入院の推奨による影響がでた。それを解消するため、2 病院の協力を得ることができ、最適条件下での研究が遂行できるよう指導をしてきた。今後の実践を考えて、電気刺激装置の使用法の映像マニュアルを製作した。

全ての症例で、創の縮小効果が認められ、副作用は認められなかった。

今回の研究を通して得られた最適刺激条件を「手続き補正書」にて優先権主張をした。

電気刺激装置(小型、電流強度 170  $\mu$ A、周波数 2~4Hz、通電終了後に自動放電機構)として医療機器申請の手続きに入った。

#### 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 9 件)

Mikiko Uemura, Noriaki Maeshige, Yuka Koga, Michiko Ishikawa-Aoyama, Makoto Miyoshi, Masaharu Sugimoto, Hiroto Terashi, and Makoto Usami: Monophasic Pulsed 200-  $\mu$ A Current Promotes Galvanotaxis With Polarization of

Actin Filament and Integrin 2 1 in Human Dermal Fibroblasts.

Eplasty: 16, e6, 2016.

工藤和善, 水木猛夫, 南本俊之, 杉元雅晴: 褥瘡に対して直流微弱電流刺激で得られた結果の検証. 物理療法科学 23: (掲載確定)

出口太紀, 岩川展春, 杉元雅晴他: 褥瘡に対する電気刺激療法の治癒促進効果に関する検証. 物理療法科学 22: 44-47, 2015.

杉元雅晴, 前重伯壮: 麻痺, 拘縮のある患者の褥瘡ケア. WOC Nursing 2(4): 24-31, 2014.

杉元雅晴, 前重伯壮他: 褥瘡対策チームで発揮できる理学療法技術. 理学療法学 41(8): 690-698, 2014.

杉元雅晴: 褥瘡治癒を促進する専用電気刺激治療器の開発 臨床治験による安全性と効果の確認. 理学療法学 40(8): 732-738, 2013.

吉野 修, 杉元雅晴: 臨床に生かす, 新しい物理療法 創傷・骨折治癒. J. Clinical Rehabilitation 22(8): 101-107, 2013.

杉元雅晴, 前重伯壮, 吉川義之: 慢性創傷に対する理学療法. 理学療法 30(4): 402-410, 2013.

杉元雅晴: 褥瘡治癒を促進する専用電気刺激治療器の開発 臨床治験による安全性と効果の確認. 理学療法学 40(8): 732-738, 2013.

[学会発表](計 8 件)

工藤和善, 水木猛夫, 南本俊之, 杉元雅晴: 褥瘡に対して直流微弱電流刺激で得られた結果の検証. 第 23 回日本物理療法学会学術大会(2015 年 10 月 25 日; 神戸学院大学)

杉元雅晴: 「物理療法の進歩 トランスレーショナル リサーチ」第 23 回日本物理療法学会 学会長講演(2015 年 10 月 24 日; 神戸学院大学)

植村弥希子, 前重伯壮, 古賀由華, 吉川義之, 藤島里英子, 杉元雅晴, 他 4 名: 線維芽細胞の電気走性における直流微弱電流刺激強度と integrin 2 1 の発現の関連性. 第 17 回日本褥瘡学会学術集会(2015 年 8 月 28 日; 仙台国際会議場)

杉元雅晴: 「創傷治癒におけるメカニカルストレスの応用 - 直流微弱電流刺激療法 -」第 42 回日本生体電気・物理刺激研究会 シンポジウム講演(2015 年 3 月 14 日; 東京慈恵医科大学)

出口太紀, 岩川展春, 杉元雅晴, 原田孝: 褥瘡に対する電気刺激療法の治癒効果に関する検証. 第 22 回日本物理療法学会学術集会(2014 年 10 月 26 日; 信州大学付属病院講堂)

吉川義之, 杉元雅晴, 前重伯壮, 他 4 名:

ヒト皮膚線維芽細胞増殖における電気刺激周波数の関連性.第16回日本褥瘡学会学術集会(2014年8月29日;名古屋国際会議場)

杉元雅晴:「褥瘡対策チームで発揮できる理学療法技術」(基礎研究から臨床応用へ治療(down stream)には予防(up stream)を考えて)第49回日本理学療法学術大会 シンポジウム講演(2014年5月31日;パシフィコ横浜)

杉元雅晴:「褥瘡治療を促進する専用電気刺激治療器の開発 臨床治験による安全性と効果の確認」第48回日本理学療法学術大会(2013年5月25日;名古屋国際会議場)

〔図書〕(計 3件)

杉元雅晴(編集)吉川義之,前重伯壮:褥瘡.理学療法を活かす 褥瘡ケア 評価・治療・予防,200(総頁),文光堂,東京,2016.(発刊予定;6/20)

杉元雅晴:褥瘡.慢性創傷.今日の理学療法指針,内山靖(総編集),499-503,506-510,医学書院,東京,2015.

杉元雅晴,吉川義之,前重伯壮:褥瘡.理学療法から診る廃用症候群 基礎・予防・介入,(編集)奈良勲,神戸晃男,山崎俊明,木林勉,73-85,文光堂,東京,2014.

杉元雅晴:物理療法におけるリスク管理・疾患別理学療法プログラムの実際.標準理学療法学 物理療法学第4版(編集)網本和,菅原憲一,243-256,285-287,医学書院,東京,2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称:電気刺激治療器  
発明者:杉元雅晴  
権利者:学校法人 神戸学院  
種類:特許  
番号:特願 2014-185752  
出願年月日:2014年9月11日

種類:手続き補正書  
番号:特願 2015-177106  
出願年月日:2016年3月9日  
国内外の別:国内

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  
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉元雅晴(SUGIMOTO Masaharu)  
神戸学院大学・理学療法学科・教授  
研究者番号:20379457

(2)研究分担者

寺師浩人(TERASHI Hiroto)  
神戸大学医学部附属病院・形成外科・教授  
研究者番号:80217421

前重伯壮(MAESHIGE Noriaki)

神戸大学保健学研究科・理学療法学科・助教  
研究者番号:80217421

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者