

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700444
 研究課題名（和文） 除神経筋への電気刺激が筋萎縮と神経再生に及ぼす影響 - 異なる刺激強度による検討 -
 研究課題名（英文） Effect of neuromuscular electrical stimulation on denervated muscle in the rat using various stimulation intensities
 研究代表者
 友利幸之介 (TOMORI KOUNOSUKE)
 神奈川県立保健福祉大学・リハビリテーション学科・作業療法学専攻・講師
 研究者番号：90381681

研究成果の概要：

本研究では、神経損傷後の骨格筋に対する電気刺激が筋萎縮と神経再生に及ぼす影響について、刺激強度によって異なるか否か検討した。強度の電気刺激では、筋萎縮の進行は抑制されるものの、骨格筋の超微細構造は破壊され、また神経終末の再生も抑制される所見が得られた。軽度～中程度の電気刺激では、筋萎縮はわずかに抑制され、超微細構造および神経終末の再生が促進される所見が得られた。神経損傷後の骨格筋に対する電気刺激は、目的とする機能改善によって刺激強度を選択的に設定する必要があると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 2,400,000 | 0 | 2,400,000 |
| 2008 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 総計 | 3,200,000 | 240,000 | 3,440,000 |

研究分野：リハビリテーション

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション・福祉用具

キーワード：リハビリテーション，末梢神経損傷，電気刺激，筋萎縮，神経再生，

1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷後のリハビリテーションにおいて特に問題になるのが骨格筋の萎縮である。筋萎縮は神経が再接続するまで進行し続けるため、一般的には除神経筋への電気刺激が用いられている。しかしながら、除神経筋に対する電気刺激は神経再生を阻害するとの報告もあり、電気刺激の効果については、筋萎縮のみならず神経再生も同時に検討する必要がある。

除神経筋への電気刺激が筋萎縮に及ぼす影響について、一般的には筋萎縮の進行を抑制するとの見解が得られている。また、研究代表者の先行研究においても、除神経筋に対

する電気刺激は除神経期から再支配期初期における筋萎縮の進行を抑制した。しかしながら、電気刺激を受けた除神経筋の細胞・分子生物学的な変化については未だ不明な点が多い。通常、筋線維肥大が生じる場合は内分泌系のホルモン分泌が深く関与されると言われてきたが、近年では、ホルモンは骨格筋の肥大に必須ではなく、筋線維自体の機械的刺激（筋活動や伸張刺激など）によってタンパク質合成や分解が調節されていると報告されている。そして、その細胞内伝達シグナルとして、骨格筋細胞由来成長因子である **Insulin-like growth factor(IGF)-1** が重要な役割を果たしている。ただ、除神経筋への電気刺激を行った場合でも、IGF-1 の動態が変

化するかは未だ明らかではない。

また、筋萎縮と共に重要なのが筋収縮特性である。神経損傷後は筋張力や筋収縮速度が低下するが、電気刺激を行うとその低下を抑制するとの報告がある。筋の収縮特性に主要な役割を担っているのが興奮収縮連関である。近年、運動や不活動などの刺激によって、筋細胞内膜系の形態的特徴が可逆的に変化すると報告されており、電気刺激にて除神経筋の収縮特性が維持されるなら、興奮収縮連関に関連する形態的特徴も何らかの変化が生じている可能性が考えられる。しかし、その関連性については現在のところ明らかではない。

一方、除神経筋に対する電気刺激が神経再生に及ぼす影響として、先行研究によれば、除神経筋に対する電気刺激は筋膜上のアセチルコリン感受性を抑え、神経末端からの発芽 (terminal sprouting) を抑制するとの報告が多くなされた。しかしながら、これらの報告で用いられた電気刺激は、刺激強度 20~30mA、周波数 100~150Hz と、高強度、高頻度の設定である。これに対し、刺激強度 4mA、周波数 10Hz の低強度、低頻度の刺激条件では terminal sprouting には影響を及ぼさなかったことから、強度の電気刺激は神経再生を阻害している可能性が考えられるが、現在のところ、その点について検討された報告は見当たらない。また、IGF-2 は除神経筋内で発現し、神経再生を促進すると報告されているが、電気刺激によってその動態が変化するかどうか不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、除神経筋に対する電気刺激が筋萎縮および神経再生に及ぼす影響が、刺激強度によって異なるかどうか検討することである。その目的を達成するために、異なる3段階 (低・中・高) の刺激強度を用いて、神経凍結損傷後のラット前脛骨筋に対して電気刺激を行い、以下3つの指標に及ぼす影響について検討した。

(1) 筋萎縮に関して

筋重量および IGF-1 mRNA の発現

(2) 興奮収縮連関に関して

筋細胞内膜系の超微細構造の観察および Dihydropyridine receptor α 1s (DHPR)、Ryanodine receptor-1 (RYR1) mRNA 発現

(3) 神経再生に関して

神経筋接合部の超微細構造および IGF-2 mRNA の発現

3. 研究の方法

(1) 実験動物

7週齢の Wistar 系雄性ラット 12匹 (体重: 195~215g) を無作為に対照群 (CON; n=8)、

電気刺激を行う群 (ES; n=23)、電気刺激を行わない群 (DN; n=8) に振り分けた。各群のラットは飼育ケージに3匹ずつ飼育し、食餌および飲水は自由に行えるようにした。なお、本実験は神奈川県立保健福祉大学動物実験専門部会の承認を得て、神奈川県立保健福祉大学施設内で行った。

(2) 電気刺激

ES群のラットには、麻酔下で神経凍結損傷を加えた。その翌日から、刺激群のラットの下腿前面を剃毛し、直径3mmの銀皿電極を貼り付け、4mA (ES-4; n=8)、8mA (ES-8; n=8)、16mA (ES-16; n=7)の刺激強度で電気刺激を加えた。刺激条件は周波数10Hz、パルス幅250 μ secとし、これを1日30分、週6日、延べ3週間実施した。

(3) 試料採取

1週間の実験終了後は、上記した方法でラットに麻酔を行い、右側の前脛骨筋を採取した。前脛骨筋は筋湿重量を測定し、表層部を切り出して以下に示す実験方法に供した。

(4) 細胞生物学的検索

前脛骨筋を3.5%のグルタルアルデヒド (75mM CaCl₂, 100mM カコジル酸緩衝液 pH 7.25) で約1時間固定した後、およそ1mm角の小片に細断し、さらに同様の溶液にて2時間の固定した。筋細胞内膜系用の試料は、緩衝液にて十分に洗浄し、2%オスミウム酸 - 0.8%フェリシアン化カリウム (100mM カコジル酸緩衝液)にて約2時間の後固定を行った。蒸留水にて洗浄後、飽和酢酸ウラニル水溶液に1時間浸漬し、エタノールにより脱水、アセトン置換の後、エポン樹脂に包埋した。そして40、60度にてそれぞれ1昼夜ずつ乾燥させ、マイクロトームにて厚さ約0.3~0.5 μ mの切片を作製し、無染色のまま写真撮影を行った。神経筋接合部用の試料は、コリンエステラーゼ染色溶液を含むトリス塩酸緩衝液に約10分浸漬した後、染色された部位をトリミングし、100mM カコジル酸緩衝液にて洗浄。そして2%オスミウム酸にて後固定を行い、上記の方法でエポンに包埋し、ウラニル染色を施した後、写真撮影を行った。

(5) 分子生物学的検索

採取した前脛骨筋は、それぞれ液体窒素で急速凍結した。凍結保存しておいた前脛骨筋からtotal mRNAを抽出した。抽出したmRNA (1 μ g) からcDNAを合成し、IGF-1、IGF-2、DHPR、RYR1 mRNAの発現量を real-time polymerase chain reaction法 (PCR) で測定した。測定機器には、Light-Cycler instrument system (Roche)を

用い、定量解析には相対定量である $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を適用した。ハウスキーピング遺伝子には glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

(6) 統計処理

統計処理には、SPSS 15.0J for Windows を用いた。相対筋重量および mRNA の発現量については、一元配置分散分析を適用し、CON 群、ES-4、8、16 群、DN 群間で比較し、有意差を認めた場合は多重比較検定に Tukey の方法を適用し、2 群間の比較を行った。なお、全ての統計手法とも有意水準は 5% 未満とした。

4. 研究成果

相対筋重量および IGF-1 mRNA の発現量は刺激強度に依存して増加したことから、除神経筋に対する電気刺激は刺激強度に依存して筋萎縮を抑制することが示唆された (Fig1)。除神経によって横行小管の構造様式は著しく乱れることが知られているが、DN 群、ES-16 群に比較して、ES-4、ES-8 群では乱れた横行小管の回復が促進される傾向が認められた (Fig2)。除神経に対する低～中強度の電気刺激は、興奮収縮連関の機能回復を促進する可能性が示唆された。DHPR、RYR1 mRNA 発現量は、各群間に有意差は認められなかった (Fig3)。神経筋接合部の微細構造では、軸索終末が ES-4 群で 50%、ES-8 群で 30% 程度観察されたのに対して、DN 群、ES-16mA 群では全ての神経筋接合部において軸索終末が観察されなかった (Fig4)。低～中強度の電気刺激は軸索終末の形態を維持するように働くものの、刺激強度がある閾値を超えると、逆に軸索終末の再生を抑制する可能性が示唆された。IGF-2 mRNA 発現は各群で有意差が認められなかった (Fig5)。これらのことから、末梢神経損傷に伴う除神経筋に対する経皮的電気刺激は、高強度 (16mA) では筋萎縮の改善に対して、低～中強度 (4mA、8mA) では神経筋接合部や横行小管の再構築に対して効果的であることが示唆された。従って、除神経筋に対する電気刺激は、目的とする機能改善によって刺激強度を選択的に設定する必要があると考えられる。これらの知見は、国内外でもなされておらず、国外の雑誌に投稿予定である。

Fig 1

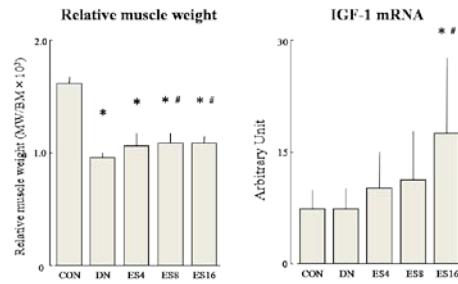


Fig. 1. Relative muscle weight and expression of IGF-1 mRNA in rat tibialis anterior muscle. CON, control muscle; DN, 3 weeks after denervated muscle; ES4, ES8, ES16, 3 weeks denervated and direct stimulated muscle at 4mA, 8mA, 16mA respectively. Data are shown with means \pm SD. * $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.05$ vs. denervation.

Fig 2

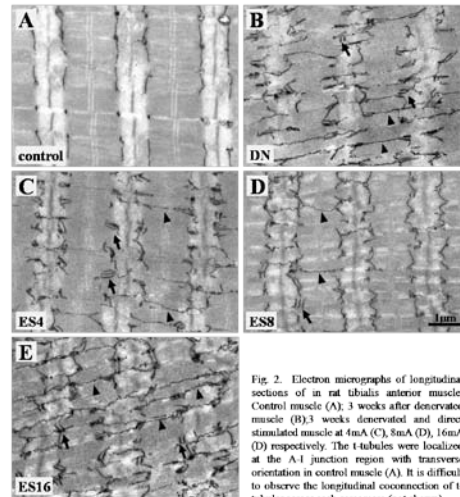


Fig. 2. Electron micrographs of longitudinal sections of in rat tibialis anterior muscle. Control muscle (A), 3 weeks after denervated muscle (B), 3 weeks denervated and direct stimulated muscle at 4mA (C), 8mA (D), 16mA (E) respectively. The t-tubules were localized at the A-I junction region with transverse orientation in control muscle (A). It is difficult to observe the longitudinal coconnection of t-tubules across each sarcomere (not show).

The number of longitudinally oriented t-tubules was increased following denervation (arrow heads in B, C, D, and E). The pentads (i.e., a close approximation of two t-tubular elements with three elements of terminal cisternae) and heptads (i.e., a close approximation of three t-tubular elements with four elements of terminal cisternae) structures appeared and increased after denervation (arrows in B, C, D, and E). Scale bar = 1 μ m.

Fig 3

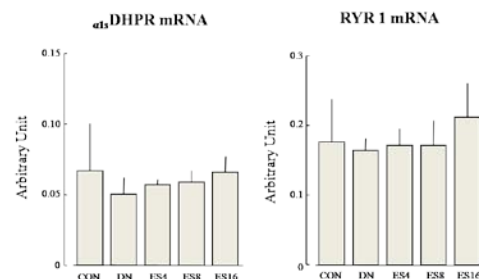


Fig. 3. Expression of α_1 DHPR and RYR1 mRNA in rat tibialis anterior muscle. CON, control muscle; DN, 3 weeks after denervated muscle; ES4, ES8, ES16, 3 weeks denervated and direct stimulated muscle at 4mA, 8mA, 16mA respectively. Data are shown with means \pm SD.

Fig 4

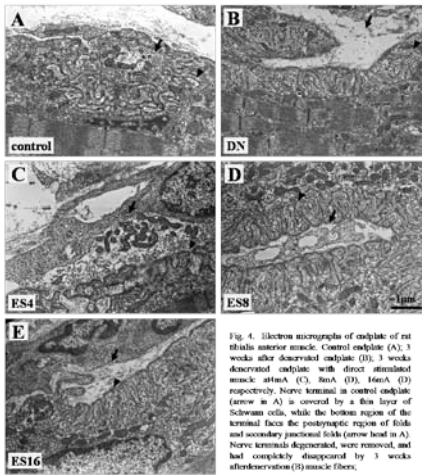


Fig. 4. Electron micrographs of endplate of rat tibialis anterior muscle. Control endplate (A); 3 weeks after denervated endplate (B); 3 weeks denervated endplate with direct stimulated muscle at 4mA (C); 8mA (D); 16mA (E) respectively. Nerve terminal in control endplate (arrow in A) is covered by a thin layer of Schwann cells, while the bottom region of the terminal faces the postsynaptic region of folds and secondary junctional folds (arrow head in A). Nerve terminals degenerated, were removed, and had completely disappeared by 3 weeks after denervation (B) muscle fibers.

however, the original sites of synapses could be identified by the strata of basal lamina that had once lined secondary junctional folds (arrow head in B). The nerve terminal has regenerated in direct electrical stimulation for 3 weeks in 4mA (C) and 8mA (D), and contains abundant small synaptic vesicles with clear contents, fewer giant synaptic vesicles with clear contents, and mitochondria in stimulation at 4mA (C). The nerve terminal had completely disappeared in the stimulation at 16mA (E). Scale bar = 1 μ m.

Fig 5

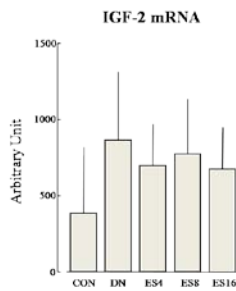


Fig. 5. Expression of IGF-2 mRNA in rat tibialis anterior muscle. CON, control muscle; DN, 3 weeks after denervated muscle; ES4, ES8, ES16, 3 weeks denervated and direct stimulated muscle at 4mA, 8mA, 16mA respectively. Data are shown with means \pm SD.

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 2 件)

- ① Tomori K. et al. Effect of neuromuscular electrical stimulation of denervated muscle on the mRNA expression of IGFs in rat skeletal muscle and sciatic nerve. *J.Phys.Ther.Sci*, 21; 3, 2009 (in press).
- ② 友利幸之介, 他, 末梢神経損傷による麻痺筋の萎縮予防と筋力増強. *理学療法ジャーナル*, 43, 2009 (in press)
- ③ 友利幸之介, 他, 不動がラットヒラメ筋におけるタイプ I・III コラーゲン mRNA の発現量におよぼす影響. *日本作業療法研究学会雑誌*, 12; 1, 11-15, 2009.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 友利幸之介, 異なる強度の電気刺激が除神経筋における興奮収縮連関の機能回復に及ぼす影響, 日本作業療法学会, 2007. 6, 鹿児島市.
- ② 友利幸之介, 末梢神経損傷後の経皮的電気刺激が IGF-1 の発現と神経筋接合部の微細構造変化に及ぼす影響, 日本体力医学会, 2007. 9, 秋田市.
- ③ 友利幸之介, 除神経筋における Ca²⁺チャンネル mRNA 発現量の経時的変化, 日本体力医学会, 2008. 9, 別府市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友利 幸之介 (TOMORI KOUNOSUKE)

神奈川県立保健福祉大学・リハビリテーション学科・作業療法学専攻・講師

研究者番号 : 90381681