

低頻度電気刺激誘発性筋収縮は不動初期の筋毛細血管数の減少を防止する

新潟医療福祉大学運動機能医科学研究所

中川弘毅, 田巻弘之, 大西秀明

新潟医療福祉大学理学療法学科 早尾啓志

鹿屋体育大学スポーツ生命科学系 與谷謙吾, 荻田太

新潟リハビリテーション病院 山本智章

【背景・目的】除神経による不動で、骨格筋萎縮、筋毛細血管数の減少ならびに血管内腔の構造的変化が引き起こされると報告されている(Holloszy, 1984, Borisov, 2000)。一方、骨格筋の収縮、特に持続的な筋収縮により筋毛細血管の数と密度は増加する(Honig, 1980)。筋収縮は随意的に行うだけでなく、電気刺激でも誘発することが可能であり、持続的電気刺激により血管内皮増殖因子 VEGF の発現が促進される報告も見られる(長坂, 2002)。随意的に筋収縮を行うことが困難なケースにおいては、筋電気刺激処方ではそれを惹起する有効な手段であるが、効果を得るためには比較的高強度の刺激で実施されるケースが散見され、これが処方時の疼痛や不快感を招く可能性がある。低頻度電気刺激（低収縮張力発揮）ではこれらは軽減できるが、筋毛細血管の形態に及ぼす影響については明らかにされておらず、不動による萎縮筋への低頻度電気刺激の効果についてはさらに不明点が多い。そこで本研究では、不動初期の下肢骨格筋に対して低頻度電気刺激による筋収縮を誘発し、筋毛細血管の形態に及ぼす影響を検討した。

【方法】7週齢 Fischer344 系雄性ラット 13 匹を対象に、左坐骨神経の凍結損傷による除神経のみを行った群(NF 群, n=4, 140±3g)、除神経後に電気刺激処置を行った群(NF-ES 群, n=4, 137±9g)及び age-matched control 群(Cont 群, n=5, 138±10g)を設けた。NF-ES 群はイソフルラン麻酔下で、処置側の下腿前面への経皮的電気刺激(10Hz, 16mA, 30分/日, 6日/週)を1週間実施した。NF 群はES 群と同じ時間及び期間イソフルラン麻酔のみを行った。ES 処方終了後、前脛骨筋を採取してグルタールアルデヒドとパラホルムアルデヒドの混合固定液で固定後パラフィン包埋ブロックを作成した。滑走マイクロームで5µmの薄切切片を作成し、脱パラフィン後にH-E及びトルイジンブルー染色、免疫組織化学を施した。

免疫組織化学は脱パラフィン後、0.1Mリン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、抗原賦活剤(UNI-TRIEVE, Wako)でインキュベートした。PBSで洗浄後、1%Triton X-100及び5%正常血清、0.1M PBSの混合液を用いて室温で1時間ブロッキングした。一次抗体として、毛細血管を識別するためにマウス抗CD31抗体(BD Pharmingen, 1:100)を、2.5%正常血清、0.1%Triton X-100を含むPBSで希釈し、4℃にて16-20時間インキュベートした。PBSで洗浄後、二次抗体としてAlexa Fluor 488標識抗マウスIgG抗体(1:500)を、2.5%正常血清、1%Triton X-100を含むPBSで希釈し、室温で遮光して1時間インキュベート

を行った。PBSで洗浄後、6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を含むマウント剤で封入した。各種染色を行った切片は、光学及び蛍光顕微鏡(BX-60, Olympus)にて観察し、CCDカメラ(DP72, Olympus)及び画像撮影解析ソフト(Image-Pro Premier, Media Cybernetics)にて撮影し、前脛骨筋の筋線維直径(Fiber diameter)と面積(Fiber area)、筋線維間に存在する筋毛細血管直径(Capillary diameter)とその面積(Capillary area)を計測した。得られた毛細血管の数から、筋線維1本あたりに対する毛細血管の割合(Capillary to fiber ratio; C/F ratio)を求めた。

本研究は、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議, 2006)を遵守して、新潟医療福祉大学動物実験委員会、鹿屋体育大学動物実験委員会の倫理審査の承認を得て実施した。

【結果】Fiber areaはCont群と比較してNF群及びNF-ES群では有意に低値を示した。Capillary diameterはCont群及びNF-ES群と比較してNF群では有意に低値を示した。C/F ratioはCont群、NF-ES群でNF群よりも有意に高値を示した。

	Cont群	NF群	NF-ES群
Fiber area(µm ²)	492.52±141.33††	289.89±53.24*	339.03±98.45*
Capillary diameter(µm)	3.44±0.75††	2.54±0.13**	3.21±0.29††
C/F ratio	0.87±0.40†	0.64±0.25*	1.19±0.38††

表1 各群における筋線維横断面積、筋毛細血管直径、C/F ratioの値。*P<0.05 vs Cont, **P<0.01 vs Cont, †P<0.05 vs NF, ††P<0.01 vs NF。

【考察】経皮的電気刺激により、不動による筋線維の萎縮ならびに筋毛細血管の狭小化、数の減少を緩和させることができると示唆された。前脛骨筋の筋毛細血管の狭小化及び数の減少が生じた場合、下腿部の血行動態は受傷以前と比べ低下しやすいと考えられた。そのため、低強度刺激で毛細血管の構造的維持が可能であった本研究の結果は、筋萎縮が完全に防止できない場合であっても、筋血流がある程度維持される可能性または筋代謝が維持改善される可能性が推察された。今後、下肢筋に廃用を呈した患者に対し、対象組織の血流を維持する目的で経皮的電気刺激を用いることの有効性並びに危険性を共に検証し、よりよい実用化に向けてのエビデンス構築がなされていくことが必要と考えられた。

【結論】不動初期において、筋線維横断面積、毛細血管径、C/F比が低下するが、低頻度電気刺激誘発性筋収縮によりこれらの低下を防止することが示唆された。

【謝辞】本研究の一部は、科学研究費(基盤研究(B), (C))及び新潟医療福祉大学研究奨励金により実施された。記して謝意を表します。