

氏名	友利 幸之介
学位の種類	博士（体育学）
学位記番号	第8号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成22年12月2日
学位論文題目	Low-intensity electrical stimulation ameliorates disruption of transverse tubules and neuromuscular junctional architecture in denervated rat skeletal muscle fibers
論文審査委員	主査 教授 竹倉 宏明 副査 教授 齋藤 和人 副査 准教授 田巻 弘之

#### 論文概要

We determine the effects of direct electrical stimulation (ES) on the histological profiles in atrophied skeletal muscle fibers after denervation caused by nerve freezing. Direct ES was performed on the tibialis anterior (TA) muscle after denervation in 7-week-old rats divided into groups as follows: control (CON), denervation (DN), or denervation with direct ES (subdivided into a 4mA (ES4), an 8mA (ES8), or a 16mA stimulus (ES16)). The stimulation frequency was set at 10 Hz, and the voltage was set at 40V (30 min/day, 6 days/week, for 3 weeks). Ultrastructural profiles of the membrane systems involved in excitation-contraction coupling, and four kinds of mRNA expression profiles were evaluated. Morphological disruptions occurred in transverse (t)-tubule networks following denervation: an apparent disruption of the transverse networks, and an increase in the longitudinal t-tubules spanning the gap between the two transverse networks, with the appearance of pentads and heptads. These membrane disruptions seemed to be ameliorated by relatively low intensity ES (4mA and 8mA), and the area of longitudinally oriented t-tubules

and the number of pentads and heptads decreased significantly ( $P < 0.01$ ) in ES4 and ES8 compared to the DN. The highest intensity (16mA) did not improve the disruption of membrane systems. There were no significant differences in the  $\alpha_{1s}$ DHPR and RyR1 mRNA expression among CON, DN, and all ES groups. After 3 weeks of denervation all nerve terminals had disappeared from the neuromuscular junctions (NMJs) in the CON and ES16 groups. However, in the ES4 and ES8 groups, modified nerve terminals were seen in the NMJs. The relatively low-intensity ES ameliorates disruption of membrane system architecture in denervated skeletal muscle fibers, but that it is necessary to select the optimal stimulus intensities to preserve the structural integrity of denervated muscle fibers.

## 論文概要 (和訳)

### 【目的】

末梢神経が損傷を受けると、その神経に支配されていた骨格筋では、筋萎縮、筋張力や収縮速度の低下、神経筋接合部の変性など、様々な退行性変性が急速に発現する。そのため、リハビリテーションにおいては、これら除神経筋の退行性変性を出来る限り予防するために電気刺激療法が用いられている。電気刺激療法に関する基礎研究や臨床応用研究の結果、電気刺激は筋萎縮や筋収縮速度、神経再生に対して効果があると報告されている。しかし、除神経筋に対する電気刺激療法は効果が認められないとの臨床研究も散見され、特に実験動物を対象とした研究では、電気刺激は末梢神経終末の再生を阻害するとされ、その効果に関しては否定的な報告も少なくない。これらの先行研究を概観すると、電気刺激療法の効果に関する結果の不一致は、刺激強度と退行性変性の種類によって異なる傾向にあると推察される。本研究では、除神経処置を施したラットの前脛骨筋に対して異なる3種類の強度を用いた経皮的直接電気刺激を実施し、筋萎縮、筋細胞内膜系及び神経筋接合部の超微細構造変化を検討した。

### 【方法】

実験動物には生後7週齢のWistar系雌性ラット39匹を用い、無作為に対照群 ( $n = 8$ )、除神経処置を行った群 (DN群、 $n = 8$ )、除神経後に電気刺激を実施した群 (E

S群、n=23)に分類した。ES群については、4mA (ES4、n=8)、8mA (ES8、n=8)、16 mA (ES16、n=7)の3種類の刺激強度を設定した。除神経処置は神経凍結法により行った。電気刺激は、リハビリテーションの臨床現場で用いられる表面電極による神経筋電気刺激法により行った。麻酔下のラット右下腿部を剃毛し、銀皿電極を塗布した後、刺激電流を3種類の強度により電気刺激を行った。刺激強度以外の設定は同一(電圧40V、頻度10Hz、パルス巾250 $\mu$ sec)とし、1日1回30分間、週6日の頻度で、合計3週間実施した。電気刺激終了後に前脛骨筋を摘出し、重量を計測した後、mRNAを抽出し、real-timePCR法にてInsulin-like growth factor (IGF)-1及び2、骨格筋型 dihydropyridine receptor ( $\alpha_{1s}$ DHPR)、骨格筋型 ryanodine receptor-1 (RyR1)のmRNAの発現量を測定した。また、神経筋接合部(NMJ)及び横行小管(T管)の形態を電子顕微鏡により観察した。

#### 【結果と考察】

相対的筋重量は、ES8、ES16群がDN群に比較して有意に( $P<0.05$ )増加した。また筋肥大に関与するIGF-1mRNAも刺激強度に依存して増加する傾向にあり、ES16群では有意に( $P<0.05$ )増加したことから、除神経筋に対する電気刺激は、刺激強度依存的に筋萎縮を抑制することが示唆された。除神経処置を施したDN群及びES群では、対照群ではほとんど観察されない縦断方向に走行するT管や、pentads及びheptadsが観察されたが、DN群、ES16群に比較して、ES4、ES8群では、これらの内膜系の発現量は有意に( $p<0.01$ )減少した。従って、低強度の電気刺激は、除神経筋における筋内膜系の再生に効果がある可能性が示唆された。 $\alpha_{1s}$ DHPR、RyR1のmRNA発現量は、各群間に差は認められなかった。NMJの微細構造は、軸索終末がES4mA群で50%、ES-8mA群で30%程度観察されたのに対して、DN群、ES16群では全てのNMJにおいて軸索終末が観察されなかった。IGF-2 mRNA発現量は、各群間に差は認められなかった。低強度、中強度の電気刺激は軸索終末の形態を維持あるいは再生を促進するように働くものの、刺激強度がある閾値を超えると、軸索終末の維持や再生が抑制される可能性が示唆された。

#### 【結論】

除神経筋に対する電気刺激は、刺激強度や退行性変性の種類によって、その改善効果が異なる可能性が示唆された。低強度、中強度の電気刺激はT管の再生や、NMJの維持(あるいは再生)に対して効果的であり、中強度、高強度の電気刺激は筋萎縮の抑制に効果があることが示唆された。一方で、刺激強度がある閾値を超え

ると、T管の再構築や軸索終末の再生を抑制する可能性も示唆された。従って、機能回復を目的として除神経筋に対して電気刺激を行う際には、様々な退行性変化の中で、どの退行性変化を改善するかを明確にした上で、刺激強度を選択する必要があると考えられる。

### 論文審査の要旨

学位論文は、除神経を行ったラット下肢骨格筋に対して、異なる周波数による電気刺激を行って骨格筋を強制的に収縮させた際の筋細胞内膜系、神経筋接合部の微細構造、各種 mRNA の発現状態を検討し、病態骨格筋の機能回復プログラム作成のための基礎的試料を得ることを目的とした。除神経筋に対する電気刺激は、刺激強度や退行性変性の種類によって、その改善効果が異なる可能性が示唆された。低強度、中強度の電気刺激は、T管の再生やNMJの維持（あるいは再生）に対して効果的であり、中強度、高強度の電気刺激は筋萎縮の抑制に効果があることが示唆された。従って、除神経筋に対して電気刺激を行う際には、様々な退行性変化の中で、どの退行性変化を改善するかを明確にした上で、刺激強度を選択する必要があると考えられる。審査会においては、研究内容及び関連する研究を総括した発表が行われ、続いて発表に対する質疑応答が行われた。