

論文内容の要旨

専攻 医療リハビリテーション学専攻

専攻領域 リハビリテーション科学領域

専攻分野 生体機能・病態解析学

学籍番号 9713103

氏 名 吉川義之

論文題目

Monophasic Pulsed Microcurrent of 1-8 Hz Increases the Number of Human Dermal Fibroblasts

(1-8Hz の直流パルス微弱電流刺激はヒト皮膚線維芽細胞の生細胞数を増加させる)

指導教員 春藤 久人 教授

要旨

【はじめに】

褥瘡の中でも皮下組織を超える褥瘡は深い褥瘡と定義され、治癒までに相当な期間を有する。この皮下組織を超える褥瘡が治癒するには、組織の修復が必要であり、肉芽形成が必須の条件となる。肉芽形成には、肉芽の基盤となる皮膚線維芽細胞を創部に集積させ、増殖・分化することが必要である。それゆえに、線維芽細胞の遊走・増殖・分化を促進させることで治療期間が短縮できる。褥瘡に関する国際的なガイドラインにおいて、褥瘡に対する電気刺激療法は創閉鎖を促進すると推奨されている。また、多くの臨床研究により、電気刺激療法で創の縮小が認められ創治癒率が高かったと報告している。さらに、創の縮小に対する電気刺激療法はシステマティックレビューでも示され、有効な治療手段の一つである。このように臨床研究での成果は多く報告され、ガイドラインでも推奨されているが、電気刺激による治療メカニズムや最適刺激条件は解明されておらず、臨床研究での刺激条件は多岐にわたる。

電流強度については、我々の行った培養線維芽細胞を用いた遊走実験において、陰極方向へ 100-200 μA が最適であることが確認されている。周波数を変更した研究では、10 Hz においてコントロール群および 100 Hz よりも線維芽細胞が有意に増加したとの報告がある。しかし、臨床研究では周波数 2 Hz で創の治癒が促進しているため、10 Hz 以下の周波数を検討する必要がある。そこで、本実験では、直流パルス微弱電流刺激 (Monophasic pulsed micro-current stimulation; MPMS) の周波数がヒト皮膚線維芽細胞の細胞増殖に与える効果について検討した。

【方法】

実験にはヒト皮膚由来線維芽細胞 (CC-2511; Clonetics, San Diego, CA) の 7-8 継代を使用した。培養は 10% ウシ胎仔血清 (ニチレイ) 含有の D-MEM (Dulbecco modified Eagle medium; 大日本住友製薬) にて 100 mm ディッシュ (イワキ) で培養した。培養環境はインキュベーター内 (5% CO_2 , 湿度 100%, 37°C) で培養し、3 日毎に培地交換を行った。線維芽細胞がサブコンフルントになったらトリプシンにて線維芽細胞を剥離し、60 mm ディッシュに 10×10^4 cells/ml の細胞濃度で播種した。その後、インキュベーター内で培養し、24 時間後に線維芽細胞の接着を確認し、培地交換を行った。MPMS に使用する電極は、細胞毒性を防ぐため、イオン化傾向の低い白金電極を使用した。白金電極は 70% アルコールで 10 分間滅菌し、PBS 洗浄を行った後に 60mm ディッシュ内に挿入した。MPMS は 37°C の CO_2 インキュベーター内 (東海ヒット) で実施した。

MPMS は強度を 200 μA とし、周波数を 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz, 8 Hz, 16 Hz, 32 Hz, 64 Hz の 7 条件とコントロール群 (刺激なし) の 8 条件で実験を行った。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。MPMS は播種後 24 時間, 48 時間, 72 時間の時点で 1 時間実施した。

生細胞数および細胞生存率の検討はトリパンブルー染色を使用した。播種か

ら 96 時間培養した 60 mm ディッシュを CO₂ インキュベーターから取り出し、トリパンブルー染色にて生細胞数および死細胞数を光学顕微鏡下（OLYMPUS®）で血球計数器を用いてカウントした。細胞生存率は“生存率（%）＝（計測した全体の細胞数－染色された細胞数）／計測した全体の細胞数 ×100”で算出した。また、上記の方法により得られた結果から、生細胞数の増加および抑制が最も確認された群とコントロール群に関しては、24 時間毎に生細胞数と生存率を上記の方法で計測した。それぞれの測定値は平均値±標準偏差で表し、コントロール群との群間比較は t 検定を用いて検討した。なお、有意水準は 5%とした。

【結果】

播種 96 時間後の生細胞数は、コントロール群が $(20.2 \pm 1.0) \times 10^4$ cells/ml, 1 Hz 群が $(24.9 \pm 1.8) \times 10^4$ cells/ml, 2 Hz 群が $(25.2 \pm 2.5) \times 10^4$ cells/ml, 4 Hz 群が $(24.6 \pm 1.4) \times 10^4$ cells/ml, 8 Hz 群が $(22.8 \pm 1.6) \times 10^4$ cells/ml, 16 Hz 群が $(19.9 \pm 1.4) \times 10^4$ cells/ml, 32 Hz 群が $(20.2 \pm 2.0) \times 10^4$ cells/ml, 64 Hz 群が $(18.4 \pm 1.3) \times 10^4$ cells/ml であった。生細胞数はコントロール群に比べ、1 Hz 群, 2 Hz 群, 4 Hz 群, 8 Hz 群が有意に多かった ($p < 0.01$)。また、64 Hz 群はコントロール群に比べ有意に少なかった ($p < 0.05$)。細胞生存率は、コントロール群が $89.4 \pm 1.9\%$, 1 Hz 群が $88.9 \pm 1.2\%$, 2 Hz 群が $90.6 \pm 1.3\%$, 4 Hz 群が $91.8 \pm 1.0\%$, 8 Hz 群が $90.5 \pm 0.9\%$, 16 Hz 群が $88.7 \pm 1.6\%$, 32 Hz 群が $90.6 \pm 1.5\%$, 64 Hz 群が $87.1 \pm 1.9\%$ といずれも高値で、有意な差は認めなかった。生細胞数の増加が最も多かった群は 2 Hz 群、抑制された群は 64 Hz 群であった。そのため、2 Hz 群, 64 Hz 群およびコントロール群に関しては 24 時間毎に生細胞数と生存率を追視した。その結果、播種後 24 時間の時点では 3 群において生細胞数に変化はみられず、生存率も高い値であった。播種後 48 時間では 2 Hz 群のみ生細胞数の増加が確認され、その時の生存率には差はみられなかった。播種後 72 時間の時点では 2 Hz 群の生細胞数の増加はさらに確認され、64 Hz 群の生細胞数はコントロール群に比べ減少傾向にあった。この時点でも細胞生存率には 3 群ともに 90%以上の高い値であった。播種後 96 時間では 2 Hz 群の生細胞数はさらに増加し、コントロール群に比べ約 5×10^4 cells/ml 多い状態であった。64 Hz 群の細胞数は 72 時間と比べ増加傾向にあるが、コントロール群より低値であった。この時点での細胞生存率も 3 群において差はみられなかった ($90.4\% \text{ vs } 90.5\% \text{ vs } 89.7\%$)。

【考察】

本研究により、1-8 Hz の低い周波数の MPMS が線維芽細胞の生細胞数の増加に適していることが示唆された。特に 1-4 Hz 群で生細胞数の増加が確認された。これは 24 時間毎の MPMS が生細胞数の増加に影響を与えたと考えられる。細胞増殖および分化に関する研究では、神経前駆細胞に対して周波数を変更した実験がある。その研究では 5 Hz, 10 Hz, 50 Hz の 3 条件でそれぞれに細胞増殖の差はみられなかったが、5 Hz 群および 10 Hz 群に比べ 50 Hz 群では分化を抑制

したとの報告がある。また、マウスの線維芽細胞を用いた増殖実験においては、細胞増殖は強度と周波数により変化が観察されたが、強度や周波数が高すぎる場合には増殖が抑制されたと報告している。さらに、線維芽細胞に対する電気刺激の周波数を 10 Hz, 100 Hz に変更した先行研究では、コントロール群と 100 Hz 群において細胞数に変化はみられないが、10 Hz 群において増殖が確認されている。そのため、10 Hz 以下の周波数では細胞数を増加させるが、64 Hz 以上では抑制作用が生じる可能性が示唆された。その他、50-100 mV/mm の電界刺激で線維芽細胞の細胞増殖と線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor; FGF-1, 2) が増加したと報告されている。本実験では細胞サイクルや FGF-1, 2 の解析を行っていないが、MPMS が FGF-1, 2 分泌を促進させた可能性がある。そのため、今後これらの解析を行っていく必要がある。

一方、我々は臨床研究において、MPMS 周波数 2 Hz (褥瘡部陰極, 強度 80 μ A, パルス幅 250msec) で行い、褥瘡治癒が促進したことを報告している。この臨床研究の結果は過去に行われている臨床研究よりも週治癒率が高い結果となっている。この論文では褥瘡治癒は細胞遊走による効果が高かったと考察しているが、本実験の結果を考慮すると、周波数 2 Hz で実施しているため、細胞遊走に加え細胞増殖による効果も加味されたのではないかと考えられる。また、褥瘡モデルを用いた研究においても創の治癒は細胞増殖によるものが大きいと考察されている。従って、創の縮小には線維芽細胞の遊走に加え増殖することが重要であるといえる。それゆえに、本実験と先行研究の結果から周波数 1-8 Hz, 強度 200 μ A で電気刺激を行うことで創傷治癒を促進させる一助となることが示唆される。