

# 鍼通電刺激がラット下腿筋群の筋血流量に及ぼす影響 —低頻度および高頻度鍼通電刺激の相違と ATP および ADP の関与—

長岡 里美<sup>\*1)</sup>, 新原 寿志<sup>2)</sup>, 木村 啓作<sup>3)</sup>,  
河北 剛<sup>1)</sup>, 日野 ころろ<sup>2)</sup>, 角谷 英治<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 明治国際医療大学大学院鍼灸学研究科, <sup>2)</sup> 明治国際医療大学鍼灸学部基礎鍼灸学講座,

<sup>3)</sup> 明治国際医療大学鍼灸学部保健・老年鍼灸学講座

**要 旨** 【目的】本研究は, 低頻度と高頻度の鍼通電刺激 (以下, 低頻度刺激, 高頻度刺激と称す) がラット下腿筋群の筋血流量に及ぼす影響と, これらの作用機序における ATP と ADP の関与について検討した。

【方法】実験動物には Sprague-Dawley 系ラット (雄, N=133) を用いた。低頻度刺激 (2Hz) または高頻度刺激 (100Hz) を右前脛骨筋に 5 分間与えた。下腿筋群の筋血流量測定には蛍光マイクロスフェアを, 前脛骨筋の透析液の回収にはマイクロダイアリシス法を, 透析液中の ATP, ADP, AMP, アデノシンの解析には高速液体クロマトグラフィーを用いた。P<sub>2</sub> 受容体拮抗薬としてスラミン (100mg/kg) を用いた。

【結果】低頻度及び高頻度刺激は刺激中の筋血流量を有意に増加させたが, 両刺激の間に有意差は認められなかった。刺激後 30 分において, 低頻度刺激は ATP と ADP の合計濃度を, 高頻度刺激はアデノシンを有意に増加した。P<sub>2</sub> 受容体拮抗薬は刺激後 30 分における低頻度刺激による筋血流量を有意に抑制したが, 高頻度刺激では認められなかった。

【考察および結語】低頻度と高頻度刺激による筋血流量増加の作用機序は異なること, また, 低頻度刺激による刺激後の筋血流量の増加に ATP と ADP が限定的に関与することが示唆された。

**Key words** 高頻度鍼通電刺激 high EA, 低頻度鍼通電刺激 low EA, 骨格筋血流 skeletal muscle blood flow, ATP, ADP

Received September 6, 2016; Accepted January 5, 2017

## 1. はじめに

現在, 鍼療法は統合医療の有力な治療法の一つとして世界中で利用されている。鍼療法は, 刺入を目的とした毫鍼, 接触や擦過刺激を目的とする皮膚鍼 (小児鍼, 梅花鍼など), 押圧刺激を目的とする鍣鍼, 圓鍼, 瀉血 (日本では禁止) を目的とする三稜鍼, 長時間の刺激が可能な皮下鍼 (皮内鍼, 円皮鍼) などを用いて刺激を与え, 生体に好ましい反応を惹起させ疾病からの回復を図る治療法である<sup>1)</sup>。

古来より鍼療法は各種鍼を用いて徒手的に刺激

(マニュアル鍼) を行ってきたが, 1970 年以降の鍼麻酔ブームにおいて, 長時間に渡るマニュアル鍼刺激の代替として毫鍼に電気を流すいわゆる鍼通電法 (以下, 鍼通電と称す) が考案された<sup>2)</sup>。鍼通電は, 刺激強度, 頻度 (周波数), 時間あるいはパルスの形状を変化させることにより, 定量的にさまざまな体性刺激を与えることができる。また, 特定の組織をターゲットにした鍼通電は, 筋パルス, 神経パルス, 皮膚パルスなどと呼ばれることもあり, 現在では, 単なる刺激法としてではなく一つの治療法として確立されている<sup>3)</sup>。

臨床においては低周波帯域の刺激頻度を用いることから, 低周波鍼通電療法 (electroacupuncture: EA) と呼ばれている。また, 筋の単収縮が起こる刺激頻度

\* 連絡先: 〒 629-0392 京都府南丹市日吉町保野田ヒノ谷 6-1  
明治国際医療大学大学院  
E-mail: s\_nagaoka@meiji-u.ac.jp

(1~10Hz)を低頻度低周波鍼通電(以下,低頻度刺激と称す),完全強縮の起こる刺激頻度(100Hz前後)を高頻度低周波鍼通電(以下,高頻度刺激と称す)と呼び,この中間の刺激頻度を中頻度低周波鍼通電と慣例的に呼んでいる<sup>4)</sup>.

鍼麻酔のブームに先立ち,ゲートコントロール説<sup>5)</sup>の発表,局所脳刺激による鎮痛効果とオピエート受容体および内因性オピオイドペプチドの発見,さらには,下行性疼痛抑制系<sup>6)</sup>の証明および広汎性抑制調節(diffused noxious inhibitory controls: DNIC)<sup>7)</sup>の発表など,内因性痛覚抑制系の機序が次々と明らかにされるに至り,鍼による鎮痛効果はこれらの内因性痛覚抑制系によるものとして,1970年代から1980年代にかけてこれを証明するための研究が数多くなされた<sup>2)</sup>.なお,鍼麻酔は,臨床において多くの場合,麻酔の代替とならなかったことから,後に鍼鎮痛と呼ばれるようになった<sup>4)</sup>.鍼鎮痛の基礎研究および臨床研究の多くは,前述の経緯と理由から鍼通電を採用した.また,近年,動物を用いた鍼鎮痛以外の基礎研究においても鍼通電が多く採用されている<sup>8)</sup>.

鍼鎮痛の動物実験においては,刺激頻度により中枢神経系内に放出されるオピオイドペプチドが異なるとの報告<sup>9)</sup>や,電気神経刺激による動物実験においても刺激頻度により筋のエネルギー代謝の動態<sup>10)</sup>が異なるとの報告があり大変興味深い.鍼通電が生体へ及ぼす影響と共に刺激頻度による相違を明らかにすることは,臨床における鍼通電およびその刺激頻度の選択に大きな示唆を与えるものと考えられる.例えば,より局所血流量を増加させるためにはどのような周波数を使用するのか有効であるか,という選択の指標となりうる.

これまで我々は,鍼鎮痛や筋機能(筋張力)の回復に寄与すると考えられている筋循環に対する鍼の効果を検討してきた.特に,マニュアル鍼による筋血流量増加の機序について,生理学的,生化学的,薬理学的手法を用いて検討し,これを明らかにしてきた<sup>11,12)</sup>.一方,鍼通電が筋循環に及ぼす影響については,ヒトや動物を対象とした研究があるが,その機序について検討したものはほとんどなく,特に刺激頻度の相違について検討したものもわずかである<sup>8,13)</sup>.

最近我々は,マニュアル鍼刺激によって刺激局所の細胞外ATP及びその代謝物質の濃度,及び局所骨格筋血流量が増加すること,この増加にP<sub>2</sub>受容体を介してATP及びADPが関与することを明らかにした<sup>11)</sup>.

そこで今回我々は,低頻度刺激と高頻度刺激が

ラットの下腿筋群の筋循環に及ぼす影響を明らかにすると共に,その機序について生化学的・薬理的に検討を行った.そして,本実験の結果と,これまで我々が行ってきたマニュアル鍼による実験結果とを踏まえてその作用機序について考察を行った.

## II. 方法

### 1. 実験動物

実験には,Sprague-Dawley系ラット(雄,N=133,300-370g,日本クレア,東京)を用いた.実験は全てイソフルラン(1.5~2.0%,3L/min)による吸入麻酔下で行われた.実験動物は,一定の室温(25±1°C),12時間の明暗サイクル(lights on at 7:00 and off at 19:00)にて飼育し,飲水と摂食は自由に行われた.なお,本研究は明治国際医療大学動物実験委員会の承認・審査を受け(承認番号27-1,27-9,28-1),委員会の規定に従った.

### 2. 鍼通電刺激

鍼通電刺激は,右前脛骨筋へステンレス製の単回使用毫鍼(20号鍼,40mm,セイリン,静岡)を斜刺にて15mm刺入し(陰極),右足底部へ自作の皮膚電極(脳波測定用皿電極,日本光電,東京)を貼付することで行った(陽極).通電には,電気刺激装置(SEN-3401,日本光電,東京)とアイソレータ(SS-104J,日本光電,東京)を用いた.持続時間は0.1msec,刺激頻度は,低頻度刺激は2Hz,高頻度は100Hzとし,刺激強度は4mA,刺激時間は5分間とした<sup>8)</sup>.

### 3. 薬品

蛍光マイクロスフェアの回収には,水酸化カリウム(85%,2M,ナカライテスク,京都),エタノール(99%,甘槽化学産業,東京),ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(0.5%,ナカライテスク,京都,以下Tween 80と称す),リン酸緩衝液(100mM,pH7.00,ナカライテスク,京都),ジエチレングリコールモノエチルエーテルアセテート(98%,ナカライテスク,京都,以下ジエチルエーテルアセテートと称す)を用いた.

マイクロダアリスでは,灌流液としてリンゲル液(フソー,扶桑薬品工業,大阪)を,アデノシン再取り込み阻害剤としてS-(4-ニトロベンジル)-6-チオイノシン(ワコーケミカル,宮崎)を用いた.

高速液体クロマトグラフィの移動相には,リン酸二水素カリウム(98%,ナカライテスク,京都),硫化水素テトラブチルアンモニウム(98%,シグマ

アルドリッチ, ドイツ), 水酸化カリウム (85%, ナカライテスク, 京都), アセトニトリル (99%, ナカライテスク, 京都) を, 標準物質には ATP (アデノシン -5'-三リン酸 2 ナトリウム, ナカライテスク, 京都), ADP (アデノシン -5'-二リン酸 ナトリウム, ナカライテスク, 京都), アデノシン一リン酸 (adenosine diphosphate: AMP (アデノシン -5'-一リン酸 ナトリウム, ナカライテスク, 京都), アデノシン (ナカライテスク, 京都), 過塩素酸 (60%, 0.4M, ナカライテスク, 京都) を用いた。

#### 4. 筋血流量測定

筋血流量測定には蛍光マイクロスフェア (FluoSpheres® Polystyrene Microspheres, 15µm, Yellow-Green Fluorescent, Invitrogen™, Life Technologies Japan Ltd.) を用いた<sup>11)</sup>。

マイクロスフェアの注入は以下の手順で行った。(1) プルポンプを用いてラットの左大腿動脈に挿入したカテーテルから採血 (以下, 回収した血液を対照血液と称す) を開始した (流速 0.6ml/分, 60 秒間)。(2) 採血開始後 5 秒で, プッシュポンプを用いて右総頸動脈に挿入したカテーテルからマイクロスフェアを大動脈弓へ注入すると共に, 採血終了まで, カテーテル内に残存するマイクロスフェアを生理食塩水 (以下, 生食と称す) でフラッシュした (流速 0.6ml/分)。(3) 麻酔薬の過剰吸入 (イソフルラン) により屠殺後, 右前脛骨筋, 右足底筋, 右腓腹筋を摘出し, それぞれ重量を測定した (図 1)。

対照血液と摘出した筋内のマイクロスフェアの回収は, Deveci らの報告に準じ, 以下の手順で行った<sup>14)</sup>。(1) 対照血液及び摘出した筋は, 水酸化カリウム (0.56g), エタノール (5ml), Tween80 (0.025ml) の入った遠沈管内で溶解した (60°C, 2~4 時間)。途中 30 分毎にボルテックスした。(2) 遠心分離 (3,000 r.p.m, 1,500g, 15 分間) 後, 上澄みを取り除き蒸留水 (1ml) を加えた。(3) エタノール (99v/v%) に Tween80 (0.5v/v%) を加えた溶液 (9ml) を加えた後, 遠心分離 (3,000r.p.m, 1,500g, 15 分間) により完全に沈殿させた。(4) 上澄みを取り除き, リン酸緩衝液 (5ml) を加え, 沈殿物を中和させた。(5) エタノール (4ml) を加え, ボルテックス後, 遠心分離 (3,000r.p.m, 1,500g, 20 分間) した。(6) 上澄みを取り除き 200µl 未満とした。(7) 全体が 3ml になるまでジエチルエーテルアセテートを加え, マイクロスフェアを 30 分かけて溶解し蛍光物質を溶出した。途中 3~5 分間毎にボルテックスした。(8) 超音波処理 (5 分間) でマイクロスフェアを完全に溶解し, 再度, 遠心分離 (3,000r.p.m, 1,500g, 5

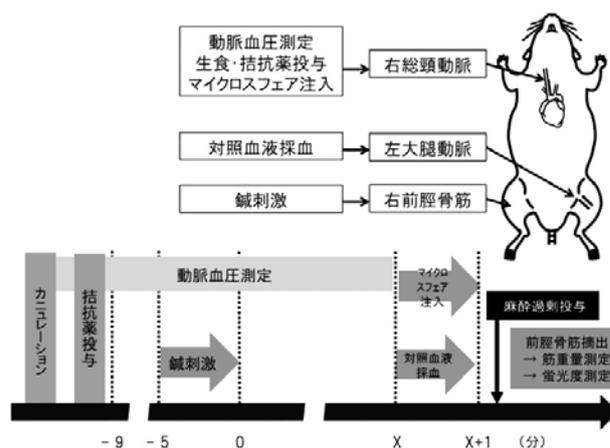


図 1 筋血流量測定のプロトコル

マイクロスフェアの注入は以下の手順で行った。(1) プルポンプを用いてラットの左大腿動脈に挿入したカテーテルから採血を開始した (流速 0.6ml/分, 60 秒間)。(2) 採血開始後 5 秒で, プッシュポンプを用いて右総頸動脈に挿入したカテーテルからマイクロスフェアを大動脈弓へ注入すると共に, 採血終了まで, カテーテル内に残存するマイクロスフェアを生食でフラッシュした (流速 0.6ml/分)。(3) 麻酔薬の過剰吸入により屠殺後, 右前脛骨筋, 右足底筋, 右腓腹筋を摘出し, それぞれ重量を測定した。

(9) 回収された蛍光物質の蛍光度は, マルチプレートリーダー (SpectraMax M2e, モレキュラーデバイスジャパン, 東京) を用いて測定した (Excitation/Emission=492/535nm)。

MBF の算出には以下の式を用いた。

$$MBF \text{ (ml/min/100g)} = 100 \times (At/Ab) \times (S/W)$$

なお, At は筋の蛍光度, Ab は対照血液の蛍光度, S は対照血液の回収速度 (0.6ml/min), W は筋重量 (g) とした。マイクロスフェアの投与は, 刺激前, 刺激中, 刺激後 30 分, 60 分, 90 分の時点でそれぞれ行った。ただし, マイクロスフェアによる筋血流量測定は, 連続して経時的測定できないことから各時点において実験群 (後述) を設けた。

また, これらの実験群は, 拮抗薬投与実験の対照群とすることを念頭に拮抗薬と同様に (後述) 生食を投与した。

#### 5. 動脈血圧測定

実験動物の状態および血圧が筋循環へ及ぼす影響を確認するために動脈血圧測定を行った。動脈血圧測定は, 右総頸動脈に挿入したカテーテル, 及び血圧モニタリング用ディスプレイ用血圧トランスデューサーキット (DX-100, 日本光電, 東京) を介し, マイクロスフェア投与直前まで経時的に行った。

## 6. ATP, ADP, AMP, アデノシンの細胞外濃度測定

### 1) マイクロダイアリシス

対象は右前脛骨筋とし、マイクロダイアリシスによる透析液の回収は以下の手順で行った。(1) 右後肢の皮膚を切開し、前脛骨筋を露出させ、(2) マイクロダイアリシス用プローブ(臓器透析用プローブ O-P-100-10型, エイコム, 京都)をその透析膜が前脛骨筋中央に位置するように留置した。(3) プローブに S-(4-ニトロベンジル)-6-チオイノシン (50 $\mu$ M)<sup>15)</sup>を加えた灌流液をシリンジポンプ(Model ESP-64インフュージョンポンプ, エイコム, 京都)を用いて流した。(4) プローブ挿入90分後、透析液の回収を開始した。透析液の回収は、鉞通電刺激開始前49分から19分まで(以下、鉞刺激前と称す)、刺激前19分から刺激終了後まで(以下、鉞刺激中と称す)、鉞刺激終了後から30分後まで(以下、鉞刺激後30分と称す)、鉞刺激30分後から60分後まで(以下、鉞刺激後60分と称す)、刺激後60分後から90分後まで(以下、鉞刺激後90分と称す)の合計4回、各30分間行った。(5) 回収した透析液は直ちに、以下の高速液体クロマトグラフィ装置で分析を行った。

### 2) 高速液体クロマトグラフィ

高速液体クロマトグラフィには、ポンプ(Binary HPLC Pump, Waters, 米国)、脱気装置(In-Line Degasser AF, Waters, 米国)、紫外光検出器(Photodiode Array Detector, Waters, 米国)、カラム(5C18-MS-II, 4.6mm $\times$ 250mm, Waters, 米国)からなる装置を用いた。移動相は、リン酸二水素カリウム(58.52g)、硫化水素テトラブチルアンモニウム(1.56g)、水酸化カリウム(0.53g)、アセトニトリル(80ml)としpH4.81に調整した。ポンプの流速は1ml/分とし、1回の測定に30分間を要した。標準物質のATP, ADP, AMP, アデノシンは過塩素酸にて濃度を調整した。分析は、波長258nmで得られたクロマトグラフを付属の専用ソフト(Empower 2, Waters, 米国)を用いて行った。ATP, ADP, AMP, アデノシンの細胞外濃度は、各標準物質(20 $\mu$ M)との面積比から算出した。なお、波形が基線と区別をつけることのできない場合、濃度は0 $\mu$ Mとした。

## 7. P<sub>2</sub> 受容体拮抗薬

P<sub>2</sub>受容体の非選択的拮抗薬としてスラミン(suramin sodium, 和光純薬, 100mg/kg, 京都)を用いた<sup>16)</sup>。スラミン投与は、鉞通電刺激前5分の時点とし、右総頸動脈に挿入したカテーテルを介して行った。なお、スラミンは臨床においては抗生物質として用いられているが<sup>17)</sup>、循環系に対しては血管抵抗の増加

(血管収縮)を誘発する<sup>18)</sup>。

## 8. 実験群

筋血流量測定では、実験動物を低頻度群(N=40)、高頻度群(N=40)に大別し、さらにそれぞれを刺激前群、刺激中群、刺激後30分群、60分群、90分群の5群に分けた(各N=8)。

ATP等の細胞外濃度測定では、無刺激群(N=7)、低頻度群(N=7)、高頻度群(N=7)の3群を設けた。

拮抗薬投与実験では、上述の筋血流量測定における低頻度群の刺激後30分群、高頻度群の刺激後30分群を、それぞれ低頻度群、高頻度群とした。そして、これらの条件下において拮抗薬を投与した無刺激-拮抗薬群(N=8)、低頻度-拮抗薬群(N=8)、高頻度-拮抗薬群(N=8)の3群を新たに設けた。

## 9. 統計解析

統計解析には統計解析ソフト(Prism 5 for Windows 日本語版 Version 5.01, MDF)を使用した。

筋血流量測定及び拮抗薬投与実験において、低頻度群あるいは高頻度群の各時点の比較には一元配置分散分析法を用いた。低頻度群及び高頻度群の経時的パターンの比較には、二元配置分散分析法を用いた。

平均動脈血圧の比較では、1分間毎の平均値(平均動脈血圧)を算出し、これを繰り返しのある一元配置分散分析法を用いて解析した。

ATP等の細胞外濃度測定における各群の比較には、繰り返しのある二元配置分散分析法を用いた。

一元配置分散分析および二元配置分散分析において有意差が認められた場合には、多重比較として、筋血流量及び血圧のデータにはDunnnett検定、拮抗薬実験の筋血流量のデータにはTukey検定、二元配置分散分析にはBonferroni検定をそれぞれ行った。

有意水準(P)は5%とし、データは全て平均 $\pm$ 標準誤差で表し、高速液体クロマトグラフィ法における標準物質の保持時間の結果についてのみ平均 $\pm$ 標準偏差で表した。

## III. 結果

### 1. 鉞通電刺激による筋血流量の経時変化

鉞通電刺激による筋血流量の変化について、低頻度群及び高頻度群ともに前脛骨筋において有意な増加が観察された(各々 $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ : 一元配置分散分析, 図2-A)。この増加は、低頻度群においては刺激中群、高頻度群においては刺激中群及び刺

激後 60 分群の各時点で認められた (各々  $P < 0.05$  : Dunnett 検定, 対 刺激前, 図 2-A). 一方で, 足底筋及び腓腹筋については, 低頻度群及び高頻度群共に有意な変化が観察されなかった (各々  $P > 0.05$  : 一元配置分散分析, 図 2-B, 2-C).

低頻度群と高頻度群の二元配置分散分析による比較では, 前脛骨筋, 足底筋及び腓腹筋の全てにおいて, 筋血流量及びその経時的パターンに有意差は認められなかった (各々  $P > 0.05$ ).

2. 鍼通電刺激による平均動脈血圧の経時的変化

全群において刺激前後における平均動脈血圧の有意な変化は認められなかった (各々  $P > 0.05$  : 繰り返しのある一元配置分散分析, 対 刺激前, 表 1).

3. 鍼通電刺激による ATP, ADP, AMP, アデノシンの細胞外濃度の経時変化

図 3 は代表的なクロマトグラフ (高頻度群のうち刺激中群) を示す. クロマトグラフにおいて, 各物質のピークは AMP, アデノシン, ADP, ATP の順に観察され, 各々の標準物質の保持時間は,  $463 \pm 19$  秒,  $573 \pm 34$  秒,  $663 \pm 27$  秒,  $1151 \pm 48$  秒であった (平均値  $\pm$  標準偏差).

ATP では, 高頻度群の刺激中に有意な細胞外濃度の増加が認められた ( $P < 0.01$  : Bonferroni 検定, 対 無刺激群, 図 4-A). ADP では, 低頻度群の刺激後 30 分に有意な増加が認められた ( $P < 0.001$  : Bonferroni 検定, 対 無刺激群, 図 4-B). AMP では, いずれの群においても有意な変化は認められなかった (図 4-C). アデノシンでは, 高頻度群の刺激後 30 分において有意な増加が観察された ( $P < 0.001$  :

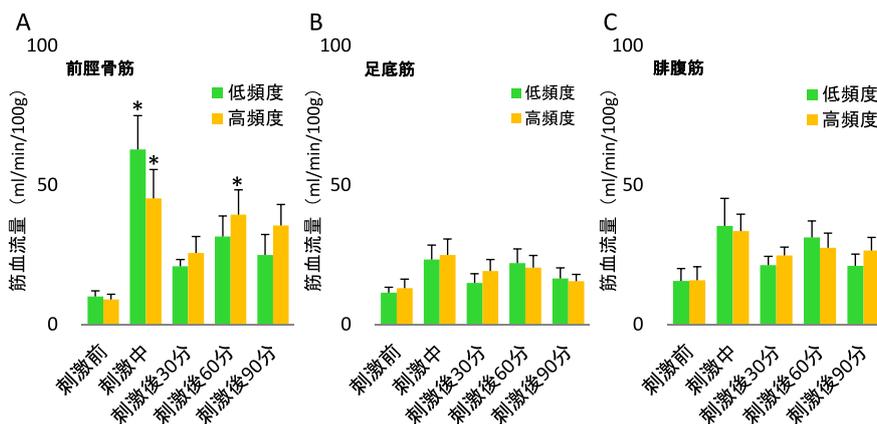


図 2 低頻度または高頻度刺激がラット下腿筋群の筋血流量に及ぼす影響

低頻度 (2Hz) または高頻度 (100Hz) 刺激は, 刺激前群を除く各群の右前脛骨筋に与えられた (各  $N = 8$ ). 低頻度群及び高頻度群共に前脛骨筋においてのみ有意な筋血流量の増加が観察された (A). また, この増加は低頻度群においては刺激中群, 高頻度群においては刺激中群及び刺激後 60 分群の各時点で認められた (A). 低頻度群と高頻度群の二元配置分散分析による比較では, 前脛骨筋, 足底筋及び腓腹筋の全てにおいて, 筋血流量及びその経時的パターンに有意差は認められなかった. 有意水準は 5%, データは全て平均値  $\pm$  標準誤差で表した.  $*P < 0.05$  対 刺激前, Dunnett 検定.

表 1 低頻度または高頻度刺激がラットの平均動脈血圧に及ぼす影響

実験群	N	平均動脈血圧 mmHg					統計解析	
		刺激前 -1~0分	刺激中 4~5分	刺激後 29~30分	刺激後 59~60分	刺激後 89~90分		
低頻度群	刺激前群	8	96 $\pm$ 4	100 $\pm$ 4	—	—	—	$P = 0.32$
	刺激中群	8	94 $\pm$ 5	93 $\pm$ 5	—	—	—	$P = 0.82$
	刺激後 30 分群	8	79 $\pm$ 4	79 $\pm$ 4	78 $\pm$ 4	—	—	$P = 0.86$
	刺激後 60 分群	8	95 $\pm$ 6	92 $\pm$ 6	88 $\pm$ 5	89 $\pm$ 3	—	$P = 0.29$
	刺激後 90 分群	8	84 $\pm$ 8	81 $\pm$ 8	81 $\pm$ 6	73 $\pm$ 6	73 $\pm$ 7	$P = 0.10$
高頻度群	刺激前群	8	86 $\pm$ 8	86 $\pm$ 7	—	—	—	$P = 0.94$
	刺激中群	8	89 $\pm$ 5	86 $\pm$ 5	—	—	—	$P = 0.10$
	刺激後 30 分群	8	86 $\pm$ 4	87 $\pm$ 4	81 $\pm$ 2	—	—	$P = 0.22$
	刺激後 60 分群	8	79 $\pm$ 5	79 $\pm$ 4	81 $\pm$ 4	82 $\pm$ 4	—	$P = 0.62$
	刺激後 90 分群	8	74 $\pm$ 7	77 $\pm$ 7	69 $\pm$ 6	74 $\pm$ 7	67 $\pm$ 6	$P = 0.45$

Bonferroni 検定, 対 無刺激群, 図 4-D).

図 4-E は P<sub>2</sub> 受容体のリガンドである ATP と ADP の細胞外濃度の合計の経時的变化を示す. 低頻度群の刺激後 30 分時点において ATP と ADP の合計濃度の有意な増加が認められた (P<0.001: Bonferroni 検定, 対 無刺激群).

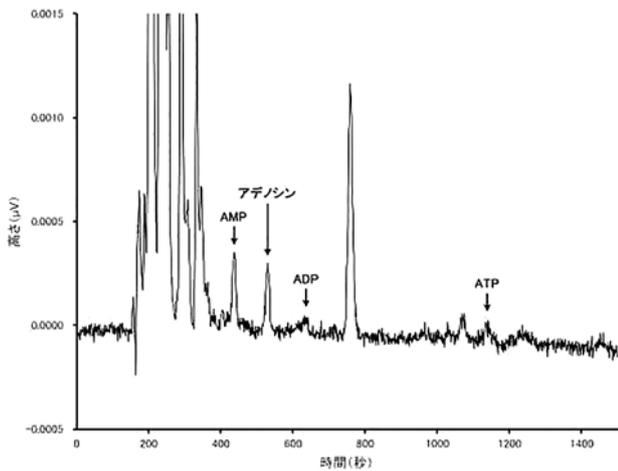


図 3 マイクロダイアリスプローブを介して回収された透析液のクロマトグラフ  
代表的なクロマトグラフ (高頻度群のうち刺激中群) を示す. 透析液は, ラット右前脛骨筋へ刺入したマイクロダイアリスプローブを介して回収され高速液体クロマトグラフィにて解析された. クロマトグラフにおいて, 各物質のピークは AMP, アデノシン, ADP, ATP の順に観察され, 各々の標準物質の保持時間は, 463±19 秒, 573±34 秒, 663±27 秒, 1151±48 秒であった (平均値±標準偏差).

#### 4. 鍼通電刺激による筋血流量増加作用に対する P<sub>2</sub> 受容体拮抗薬前投与の影響

低頻度刺激によって筋血流量の有意な増加が認められた (P<0.001: 一元配置分散, P<0.05: Tukey 検定, 無刺激群 対 低頻度群, 無刺激-拮抗薬群 対 低頻度群, 図 5-A). この増加は, P<sub>2</sub> 受容体拮抗薬によって有意に抑制された (P<0.05: Tukey 検定, 低頻度群 対 低頻度-拮抗薬群, P>0.05: Tukey 検定,

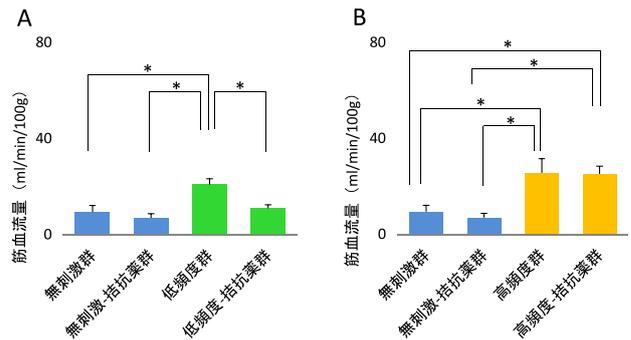


図 5 低頻度または高頻度刺激による筋血流量の増加に対する P<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の影響  
グラフは刺激後 30 分時点の筋血流量を示す. 低頻度 (2Hz) または高頻度 (100Hz) 刺激は, ラットの右前脛骨筋に与えられた (各 N=8). 低頻度刺激による右前脛骨筋の筋血流量の有意な増加は, P<sub>2</sub> 受容体の非選択的拮抗薬であるスラミンの前投与により有意に抑制された (A). 一方, 高頻度刺激による筋血流量の有意な増加は全く影響を受けなかった (B). 同様に無刺激群においても有意な変化は認められなかった (A, B). 有意水準は 5% とし, データは全て平均値±標準誤差で表した. \*P<0.05, Tukey 検定.

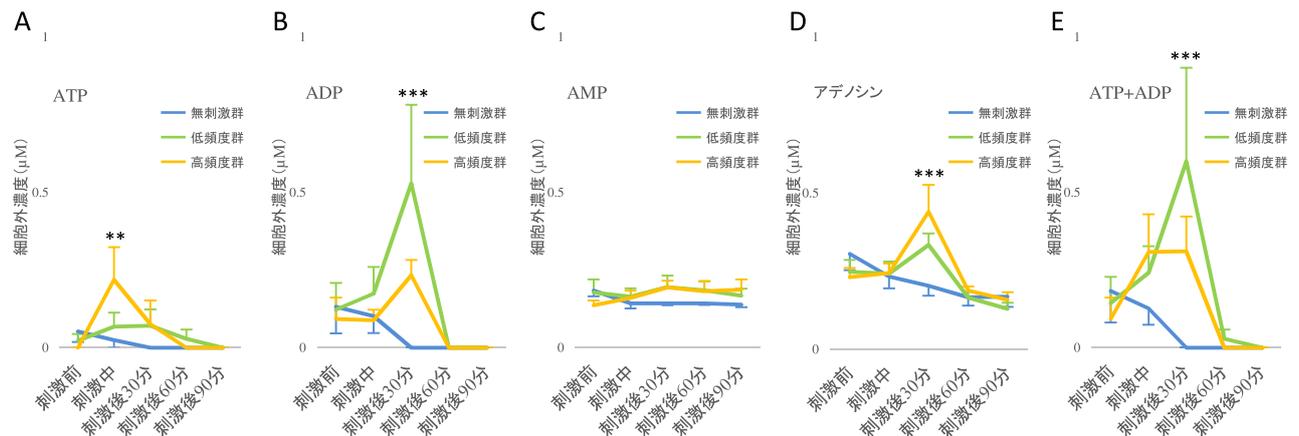


図 4 低頻度または高頻度刺激によるラット前脛骨筋の ATP, ADP, AMP, アデノシンの細胞外濃度の経時的变化  
低頻度 (2Hz) または高頻度刺激 (100Hz) は, 無刺激群を除く各群の右前脛骨筋に与えた (各 N=7). 低頻度刺激は刺激後 30 分の時点における ADP (B) の細胞外濃度を, 高頻度刺激は刺激中の ATP (A) と刺激後 30 分の時点におけるアデノシン (D) の細胞外濃度を有意に増加させた. 一方, AMP の細胞外濃度は, いずれの刺激にも影響を受けなかった.  
E は, P<sub>2</sub> 受容体のリガンドである ATP (A) と ADP (B) の細胞外濃度を合計したものである. 低頻度刺激は, 刺激後 30 分の時点における P<sub>2</sub> 受容体リガンド (ATP+ADP) の細胞外濃度を有意に増加させた.  
有意水準は 5% とし, データは全て平均値±標準誤差で表した. \*\*\*P<0.001 対 無刺激群, \*\*P<0.01 対 無刺激群, Bonferroni 検定.

無刺激群 対 低頻度-拮抗薬群, 無刺激-拮抗薬群 対 低頻度-拮抗薬群, 図 5-A).

高頻度刺激も同様に, 筋血流量の有意な増加が認められた ( $P < 0.01$ : 一元配置分散分析,  $P < 0.05$ : Tukey 検定, 無刺激群 対 高頻度群, 無刺激-拮抗薬群 対 高頻度群, 図 5-B). しかしながら, この増加は  $P_2$  受容体拮抗薬によって抑制されなかった ( $P > 0.05$ : Tukey 検定, 高頻度群 対 高頻度-拮抗薬群, 図 5-B).

なお,  $P_2$  受容体拮抗薬投与による筋血流量の変化は認められなかった ( $P > 0.05$ : Tukey 検定, 無刺激群 対 無刺激-拮抗薬群, 図 5-A, 5-B).

### 5. $P_2$ 受容体拮抗薬投与ラットにおける鍼通電刺激による平均動脈血圧の経時的変化

$P_2$  受容体拮抗薬を前投与したラットでは, 鍼通電刺激に関わらず平均動脈血圧の有意な低下が認められた (各々  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ : 一元配置分散分析,  $P < 0.05$ : Dunnett 検定, 刺激前 対 刺激中・刺激後, 表 2).

## IV. 考察

これまで我々は, 放射性および蛍光マイクロスフェアを用いて, マニュアル鍼刺激による筋血流量の増加作用機序について検討してきた<sup>11,12)</sup>.

動物を対象とした筋血流量測定法には, 本実験で使用した蛍光マイクロスフェア法<sup>14)</sup>に加え, レーザードップラー血流計<sup>8,19)</sup>, 吸入式および電解式水素クリアランス法<sup>20,21)</sup>などがある. 接触型レーザードップラー血流計による筋血流量測定では, 経時測定が可能であるが, プローブを測定対象の筋に直接接触させなければならず皮膚切開が必要となる. また, 測定領域はプローブ先端の  $1\text{mm}^3$  の半円球状に留まり, 筋全体の血流量を測定することはできない<sup>19)</sup>. また, 振動に弱いため刺鍼中の手技や鍼通電は不可能である. 非接触型も皮膚切開が必要であり, また,

測定領域が不明瞭といった問題がある. 吸入式および電解式水素クリアランス法は, 数分間隔で経時的にデータが測定できるものの, プローブを測定対象筋に刺入しなければならない<sup>9,10)</sup>. 接触型レーザードップラー血流計と同様に, プローブ先端の血流量のみしか測定することはできず, また, 振動に弱いという欠点がある.

本実験で用いた蛍光マイクロスフェアは, 組織処理に時間と手間がかかること, 経時測定ができないなどの欠点があるが, 対象のみならず複数の筋血流量を同時に測定可能であること, また, プローブの接触や挿入が不要であり振動にも影響を受けないなどの利点がある. このような理由から, 本実験では蛍光マイクロスフェアを用いた. なお, 放射性マイクロスフェアは, 被爆等の問題から 2010 年頃に販売中止となった.

マニュアル鍼刺激 (雀啄術) では少なくとも刺激後 5 分から刺激後 60 分まで有意な筋血流量増加が認められた<sup>12)</sup>. 一方, 低頻度刺激は刺激中, 高頻度刺激は刺激中及び刺激後 60 分時点においてのみ有意な筋血流量増加が認められた. また, マニュアル鍼刺激による筋血流量増加は低頻度および高頻度刺激のそれよりも高かったことから<sup>12)</sup>, 筋血流量を増加させることを目的とする場合は, マニュアル鍼刺激のほうが有効であると考えられた.

鍼通電刺激による筋血流量の有意な増加は, マニュアル鍼刺激と同様に, 鍼を刺入した前脛骨筋でのみ認められ, 鍼を刺入していない足底筋や腓腹筋では観察されなかった. 野口らは, ラットの足蹠に鍼通電刺激を行い大腿二頭筋の筋血流量の有意な増加を報告している<sup>8)</sup>. 彼らは, 神経切断および薬理学的検討から, この遠隔部鍼通電刺激による筋血流量の増加を内臓血圧の上昇に伴う受動的な血管拡張であると結論づけている. 一方, 本研究においては, 平均動脈血圧の有意な変化は観察されなかった. 以上の結果から, 鍼通電刺激による筋血流量の増加は血圧などの全身性の反応ではないことが示唆された<sup>12)</sup>.

表 2 低頻度または高頻度刺激が  $P_2$  受容体拮抗薬投与ラットの平均動脈血圧に及ぼす影響

実験群	N	平均動脈血圧 mmHg			統計解析	
		刺激前 -1~0 分	刺激中 4~5 分	刺激後 29~30 分		
無刺激群	無刺激群	8	95±5	95±4	90±4	$P=0.28$
	無刺激-拮抗薬群	8	106±6	90±4*	90±4*	$P<0.01$
低頻度群	刺激後 30 分群	8	79±4	79±4	78±4	$P=0.86$
	刺激後 30 分群-拮抗薬群	8	111±3	100±4*	93±4*	$P<0.001$
高頻度群	刺激後 30 分群	8	86±4	87±4	81±2	$P=0.22$
	刺激後 30 分群-拮抗薬群	8	102±2	93±3*	90±2*	$P<0.01$

低頻度および高頻度ともに刺激後、筋血流量は急速に低下した。この低下は、刺激中の筋ポンプ作用の関与を示唆する。刺激中の筋血流量の増加や刺激後の低下の程度は、両群間で有意差は認められないものの、低頻度刺激の方が高頻度刺激よりも大きいように見える。単収縮を繰り返す低頻度刺激では、強縮を起こす高頻度刺激よりも、効率的に筋のポンプ作用が働いた可能性がある。また、本研究では刺激中における筋血流量増加の機序について検討していないため、その詳細は不明である。

ATP, ADP, AMP アデノシンの細胞外濃度測定において、低頻度刺激では、刺激後30分時点においてADPの有意な増加が認められた。一方、高頻度刺激では、刺激中のATPと刺激後30分時点のアデノシンの有意な増加が認められるなど、両群間で異なる経時的变化を示した。

安静時の骨格筋においてATPおよびADPの細胞外濃度は非常に低いことが知られている。本測定においても同様の結果を得ている。一般に細胞外ATPの供給源としては、血管内皮細胞、赤血球、骨格筋細胞、交感神経、感覚神経などが挙げられる<sup>22-24)</sup> (図6)。

本研究におけるATP等の細胞外濃度の動態は、マニュアル鍼刺激を用いた我々の先行研究と類似した変化を示し、いずれも刺激後60分には刺激前値に戻った<sup>11)</sup>。しかしながら、これらの細胞外濃度の増加は、マニュアル鍼刺激によるそれよりも低い値であった<sup>11,15)</sup>。

マニュアル鍼刺激によるATP等の有意な増加は、雀啄術、すなわち鍼の繰り返しによる上下運動により破壊された骨格筋細胞から漏出したATPに由来すると我々は考えている。

事実、刺鍼中の手技を比較した以前の我々の報告では、単刺術すなわち鍼を一回のみの刺抜の場合、ほんの僅かに筋血流量を増加させるのみであった(有意差なし)。一方、雀啄術(30回/分×1分間)では筋血流量の有意な増加が観察された<sup>25)</sup>。本研究では、前脛骨筋に鍼を刺入後、いわゆる雀啄術などの刺鍼中の手技は行わずそのまま鍼通電を行った。そのため組織損傷は少なく、骨格筋細胞からのATPの漏出は、刺激中から刺激後にわたり僅かであったと考えている。

組織の酸素分圧が低下した場合、血管内皮細胞や赤血球からATPが放出されることが知られている。強縮は単収縮よりも酸素分圧を低下させることから<sup>26)</sup>、高頻度刺激は低頻度刺激よりも、血管内皮細胞<sup>24,27)</sup>や赤血球<sup>22)</sup>から多くのATPを血中に放出させたと考えられる(図6)。放出されたATPの一

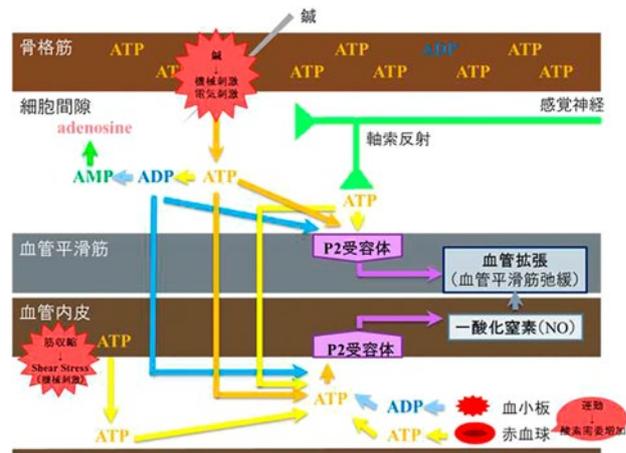


図6 鍼通電刺激による筋血流量増加反応の作用機序仮説  
細胞外ATPの供給源としては、血管内皮細胞、赤血球、骨格筋細胞、交感神経、感覚神経などが挙げられる。血管内皮細胞及び赤血球からのATP放出は筋収縮による組織の酸素分圧によって、骨格筋細胞からのATP放出は鍼刺激に伴う組織損傷によって、感覚神経からのATP放出は軸索反射によって生じる。これらのATP、またはATPの分解によって生じたADPは、血管内皮細胞上にあるP<sub>2Y</sub>受容体に結合して細胞内の一酸化窒素の合成を促進する。この合成された一酸化窒素は拡散して隣接する血管平滑筋に作用し、これを拡張させることにより局所筋血流量を増加させると考えられている。一方、この経路とは別にATPとADPが血管平滑筋上のP<sub>2Y</sub>受容体に結合し、直接これを弛緩させる経路も存在すると考えられている。

部は、血管の細胞間隙を通過して細胞外に漏出し、その結果、刺激中、ATPの細胞外濃度が有意に上昇したと考えられた。

今回用いた鍼通電刺激は、刺激量が4mAであったことから、いずれも侵害性の電気刺激に区別される<sup>8)</sup>。侵害刺激により誘発された軸索反射は、感覚神経の終末よりCGRPやATPおよびサブスタンスP等を放出する<sup>24)</sup>。CGRPやATPは血管拡張に作用する。一方でサブスタンスPは血管拡張には作用しないが、血管透過性を亢進させ、前述の赤血球や血管内皮細胞由来のATPの血管外漏出を促進させた可能性がある。

刺激後30分の時点で、低頻度刺激ではADPの有意な増加が認められた。また、高頻度刺激でも有意差はないものの増加する傾向が認められた。安静時、骨格筋細胞内のADPは非常に低い濃度で維持されている<sup>28)</sup>。また、細胞外に放出されたATPはATPase(ATPをADPと無機リン酸に分解する酵素の総称)をはじめとする酵素群によって素早くATP→ADP→AMP→アデノシンへと分解されることから、本研究で観察されたADPは、主として前述の血管内皮細胞あるいは赤血球から放出されたATP

が ATPase によって分解されたものと考えている<sup>29)</sup>。

一方、高頻度刺激においては、刺激後 30 分の時点でアデノシンの有意な増加が観察された。ATPase は 100Hz 前後の電気刺激で活性が高くなることが知られている<sup>30)</sup>。高頻度の電気刺激により ATPase 以外の酵素の活性が高くなるか否かは不明であるが、高頻度刺激では低頻度刺激に比べて、より速やかに ATP がアデノシンへと分解されたと考えられた。

以上のことから、低頻度と高頻度刺激における ATP 等の濃度差および経時的变化の違いに影響を与えた因子として、酸素分圧及び ATPase 等の酵素活性が考えられた。

P 受容体は、P<sub>1</sub> 受容体（アデノシン受容体）と P<sub>2</sub> 受容体（ATP および ADP 受容体）に大別される。P<sub>1</sub> 受容体には、A<sub>1</sub> 受容体、A<sub>2</sub> 受容体、A<sub>3</sub> 受容体のサブタイプがある。P<sub>2</sub> 受容体には、P<sub>2X</sub> 受容体と P<sub>2Y</sub> 受容体のサブタイプがある。これらのうち A<sub>1</sub> 受容体、A<sub>2</sub> 受容体、P<sub>2Y</sub> 受容体は、血管拡張を有する。これらの受容体は血管内皮細胞あるいは血管平滑筋上に存在するとされる<sup>22,31)</sup>。

ATP と ADP は、血管内皮細胞上にある P<sub>2Y</sub> 受容体に結合して細胞内の一酸化窒素（nitric oxide: NO）の合成を促進する。この合成された NO は拡散して隣接する血管平滑筋に作用し、これを弛緩させることにより局所血流量を増加させると考えられている（NO 系）<sup>22)</sup>。一方、この経路とは別に、ATP と ADP が血管平滑筋上の P<sub>2Y</sub> 受容体に結合し、直接これを弛緩させる経路も存在すると考えられている（非 NO 系）<sup>22)</sup> (図 6)。

交感神経は血管平滑筋を直接支配し血圧を調節している。交感神経の終末から放出される ATP は、血管平滑筋上の P<sub>2Y</sub> 受容体に結合し、その細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度を増加させることによって血管収縮を引き起こす<sup>24,31,32)</sup>。交感神経由来の ATP が本実験にどのような影響を与えたかは不明であるが、平均動脈血圧の有意な変化は観察されなかったことから、その関与は低かったと考えている。

我々は先行研究において、マニュアル鍼刺激の筋血流量増加作用に P<sub>2</sub> 受容体すなわち ATP と ADP が部分的に関与することを明らかにした<sup>11)</sup>。

本研究において、低頻度および高頻度刺激の筋血流量増加作用における P<sub>2</sub> 受容体の関与を検討するにあたり、ATP と ADP の細胞外濃度を合計しその動態を確認した。その結果、刺激後 30 分の時点において、低頻度刺激では有意な増加が認められ、また、高頻度刺激では有意差はないものの高い値を示した。これらの増加は、刺激後 60 分の時点で消失した。そのため刺激後 30 分の時点で拮抗薬を投与し

P<sub>2</sub> 受容体の関与を検討した。

その結果、P<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の前投与は、低頻度刺激の刺激後 30 分時点における筋血流量増加を有意に低下させ、低頻度-拮抗薬群の筋血流量は無刺激群のそれと同等であったことから、刺激後 30 分の時点における低頻度刺激による筋血流量の増加は、P<sub>2</sub> 受容体を介して ATP および ADP が関与することが示唆された。一方、高頻度刺激では、拮抗薬による有意な抑制は観察されなかったことから、筋血流量の増加に P<sub>2</sub> 受容体は関与しないことが示された。

低頻度刺激による筋血流量の有意な増加は刺激中、高頻度刺激においては刺激中及び刺激後 60 分時点において観察された。しかしながら、拮抗薬実験（刺激後 30 分時点）においては、低頻度群及び高頻度群は共に無刺激群と比較して筋血流量を有意に増加させた。

筋血流測定の際の経時的データの一元配置分散分析において、刺激後 30 分時点の低頻度および高頻度刺激が筋血流量の有意な増加を示さなかった理由として、我々は両群ともに刺激中の筋血流量増加が著しく高く、統計学的に刺激後の各時点の増加が低く見積もられ、また、経時データの統計解析では時点を増やせば有意差は厳しく見積もられることから、上記のような統計学的な相違が生じたと考えられた<sup>33)</sup>。

どのくらいの筋血流量の増加が、生理学的に意義があるのかという問題は統計解析では明らかにできない。この問題を解決するには別途実験を行う必要があると我々は考えている。

なお、低頻度および高頻度刺激後 30 分時点の筋血流量は、マニュアル鍼刺激によるものと比べると低い<sup>12)</sup>。その為、低頻度刺激による筋血流量増加における ATP 及び ADP の関与は限定的であると考えられた。

拮抗薬投与による平均動脈血圧の有意な低下が観察された。この反応は無刺激群においても観察されたが、無刺激群における筋血流量の有意な変化は観察されなかった。その為、この血圧の低下による筋血流量への影響はないと考えられた。

高頻度群では、刺激後 30 分の時点においてアデノシンの有意な増加が観察された。アデノシンは、ATP や ADP と同様に血管拡張作用を有し、血管内皮細胞あるいは血管平滑筋上の A 受容体に結合して血管を弛緩させ血流量を増加させる。高頻度刺激による刺激後 30 分における筋血流量の増加にはアデノシンが関与した可能性がある。

低頻度および高頻度刺激において、血管拡張作用を有する ATP, ADP, アデノシンはいずれも刺激後

60分で無刺激群と同等の値までに低下した。また、両群ともに筋血流量はATP等の有意な変化の観察されなかった刺激後30分から60分にかけても、やや増加するように見える。これらの結果は、ATPやADPあるいはアデノシン以外の血管拡張因子として、CGRP、プロスタグランジン、ブラジキニンなどが関与している可能性を示唆する。

## V. 結語

低頻度と高頻度の鍼通電刺激がラット下腿筋群の筋血流量とATP、ADP、AMPおよびアデノシンの細胞外濃度に及ぼす影響、さらには、これらの鍼通電刺激による筋血流量増加作用におけるP<sub>2</sub>受容体の関与について検討し、以下の結果を得た。

- ・低頻度刺激及び高頻度刺激による筋血流量の増加は、刺激局所である前脛骨筋においてのみ観察された。
- ・低頻度刺激及び高頻度刺激による筋血流量への影響に有意な差は認められなかった。
- ・刺激後30分において、低頻度刺激は細胞外ATPとADPの合計濃度を、高頻度刺激はアデノシンを有意に増加した。
- ・P<sub>2</sub>受容体拮抗薬は、刺激後30分における低頻度刺激による筋血流量の増加を有意に低下させた。一方、高頻度刺激による筋血流量の増加は全く影響を受けなかった。

以上の結果から、低頻度と高頻度刺激が局所筋血流量へ及ぼす影響の差は認められなかった。しかしながら、P<sub>2</sub>受容体が低頻度刺激による筋血流量の増加にのみ関与するなど、低頻度と高頻度刺激では作用機序が異なることが示唆された。

謝辞：筋血流量測定（蛍光測定）を行うにあたり、多大なるご協力を賜りました京都府立医科大学大学院 医学研究科 免疫学教室 教授の松田修先生と同教室准教授の岸田綱郎先生に深謝致します。また、高速液体クロマトグラフィ測定において、ご指導を賜りました明治国際医療大学 保健医療学部 柔道整復学科 スポーツ科学講座 教授の林知也先生に心より感謝を申し上げます。

利益相反：なし。

## 文献

1. 尾崎昭弘：図解鍼灸臨床手技マニュアル，第1版，医歯薬出版株式会社，東京，2011。
2. 吉川恵士：鍼麻醉から鍼通電療法まで。日温気物医誌，57(2): 151-166, 1994。
3. 吉川恵士：低周波鍼通電療法。坂井友実，北小路博司，安野富美子編：図解鍼灸療法技術ガイドI，第1版，株式会社文光堂，東京，pp 72-86, 2012。
4. 兵頭正義：ヒトにおける鍼麻醉及び鍼鎮痛の客観的評価法。全日鍼灸会誌，34(3.4): 165-170, 1985。
5. Menetrey D, de Pommery J, Besson JM: Electrophysiological characteristics of lumbar spinal cord neurons backfired from lateral reticular nucleus in the rat. *J Neurophysiol*, 52(4): 595-611, 1984。
6. Basbaum AL, Fields HL: The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. *J Comp Neurol*, 187(3): 513-531, 1979。
7. Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM: Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurons in the rat. *Pain*, 6(3): 283-304, 1979。
8. 野口栄太郎，小林聰，大沢秀雄ら：鍼通電刺激によるラット骨格筋血流量増加反応の神経性調節機構。自律神経，36(1): 56-63, 1999。
9. Han JS: Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. *TINS*, 26: 17-22, 2003。
10. 高田信二郎，井形高明，高井宏明ら：低周波電気刺激で生じるラット骨格筋の単収縮運動と強縮清収縮運動におけるエネルギー代謝の相違について—<sup>31</sup>P-MRSの応用—。リハビリテーション医学，27: 125-130, 1990。
11. Nagaoka S, Shinbara H, Okubo M, et al.: Contributions of ADP and ATP to the increase in skeletal muscle blood flow after manual acupuncture stimulation in rats. *Acupunct Med*, 34: 229-234, 2016。
12. Shinbara H, Okubo M, Sumiya E, et al.: Effects of manual acupuncture with sparrow pecking on muscle blood flow of normal and denervated hindlimb in rats. *Acupunct Med*, 26(3): 149-159, 2008。
13. 菊池友和，瀬戸幹人，山口智ら：鍼通電刺激が僧帽筋血流量に及ぼす影響—<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> クリアランス法による検討—。日東医誌，61(6): 834-839, 2010。
14. Deveci D, Egginton S: Development of the fluorescent microsphere technique for quantifying regional blood flow in small mammals. *Exp Physiol*, 84: 615-630, 1999。

15. Goldman N, Chen M, Fujita T, et al.: Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. *Nat Neurosci*, 13: 883-888, 2010.
16. Davies M, Lloyd JB, Beck F: The effect of Trypan Blue, suramin and aurothiomalate on the breakdown of 125 I-labelled albumin within rat liver lysosomes. *Biochem J*, 121(1): 21-26, 1971.
17. H.P. ラング, M.M. デール, J.M. リッターら : ラング・デール薬理学, 初版, 西村書店. 東京. pp 192-195, 2011.
18. Hassessian H, Bodin P, Burnstock G: Blockade by glibenclamide of the flow-evoked endothelial release of ATP that contributes to vasodilatation in the pulmonary vascular bed of the rat. *Br J Pharmacol*, 109: 466-472, 1993.
19. 井上基浩, 片山憲史, 北條達也ら : アキレス腱血流に及ぼす鍼通電刺激の影響—ラットのアキレス腱刺激による—. *明治鍼灸医学*, 32: 15-23, 2003.
20. 鶴浩幸, 松本勅 : 家兎前脛骨筋の血流に及ぼす鍼刺激の影響. *全日鍼灸会誌*, 49(1): 6-14, 1999.
21. 竹宮隆, 橋場裕規雄, 橋爪和夫ら : 水素ガスクリアランス法による家兎後肢骨格筋とその腱の組織血流について. *体力科学*, 31: 41-50, 1982.
22. Clifford PS, Hellsten Y: Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 97(1): 393-403, 2004.
23. Gordon JL: Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J*, 233: 309-319, 1986.
24. Burnstock G: Purinergic regulation of vascular tone and remodeling. *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, 29: 63-72, 2009.
25. Shinbara H, Okubo M, Kimura K, et al.: Effects of manual acupuncture with the Japanese traditional needle manipulation technique on skeletal muscle blood flow and arterial blood pressure in rats—a comparison of the techniques—. *JAM*, 1: 1-7, 2011.
26. Hood DA, Gorski J, Terjung RL: Oxygen cost of twitch and tetanic isometric contractions of rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 250(4 Pt 1): E449-456, 1986.
27. De Mey JG, Vanhoutte PM: Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J Physiol*, 316: 347-355, 1981.
28. Challiss RA, Blackledge MJ, Shoubridge EA, et al.: A gated 31P-n.m.r. study of bioenergetic recovery in rat skeletal muscle after tetanic contraction. *Biochem J*, 259(2): 589-592, 1989.
29. Marshall JM: The roles of adenosine and related substances in exercise hyperaemia. *J Physiol*, 583(3): 838-845, 2007.
30. Blank M: Na,K-ATPase function in alternating electric fields. *FASEB J*, 6: 2434-2438, 1992.
31. Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 50(3): 413-492, 1998.
32. Ballard HJ: ATP and adenosine in the regulation of skeletal muscle blood flow during exercise. *Sheng Li Xue Bao*. 66(1): 67-78, 2014.
33. Thomas A. Lang, Michelle Secic : わかりやすい医学統計の報告 医学論文作成のためのガイドライン〈原著第2版〉. 初版, 株式会社中山書店, 東京, 2011.

## Effects of electroacupuncture stimulation on skeletal muscle blood flow in the rat hindlimb

Satomi Nagaoka<sup>1)</sup>, Hisashi Shinbara<sup>2)</sup>, Keisaku Kimura<sup>3)</sup>,  
Tsuyoshi Kawakita<sup>1)</sup>, Kokoro Hino<sup>2)</sup>, Eiji Sumiya<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Graduate School of Acupuncture and Moxibustion, Meiji University of Integrative Medicine

<sup>2)</sup>Department of Basic Acupuncture and Moxibustion, Meiji University of Integrative Medicine

<sup>3)</sup>Department of Health Promoting and Geriatric Acupuncture and Moxibustion, Meiji University of Integrative Medicine

### Abstract

**Aim:** First, to investigate effects of electroacupuncture (EA) on skeletal muscle blood flow (MBF) in the rat hindlimb at two different frequencies. Second, to clarify the contributions of adenosine triphosphate (ATP) and adenosine diphosphate (ADP) to the increase in MBF following EA.

**Animal and Methods:** Male Sprague-Dawley rats (N = 133) were used in this study. Fluorescence microspheres were used to measure the MBF of the right tibialis anterior (TA), plantaris, and gastrocnemius muscles. EA was applied to the right TA for 5 minutes at two different frequencies (2 Hz and 100 Hz), and the dialysate was recovered via a microdialysis probe. High-pressure liquid chromatography was used to analyse the extracellular levels of ATP, ADP, adenosine monophosphate, and adenosine in the dialysate. Suramin (100 mg/kg i.a.) was used as a purinergic type 2 receptor antagonist.

**Results:** EA at both 2 Hz and 100 Hz significantly increased the MBF of TA alone; however, the difference between these temporal changes was not significant. At 30 minutes after stimulation, 2 Hz EA increased the total extracellular levels of ATP and ADP, while 100 Hz EA increased the extracellular level of adenosine. Suramin suppressed the increase in MBF caused by the 2 Hz EA, but not the 100 Hz EA, at 30 minutes after stimulation.

**Discussion and Conclusion:** ATP and ADP may partially contribute to the increase in MBF caused by the 2 Hz EA. This suggests that the 2 Hz and 100 Hz EA utilize different mechanisms.