

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10407

研究課題名(和文) 脊髄損傷後の急性期ニューロリハビリテーションの確立に向けた実験的研究

研究課題名(英文) Development of a neurorehabilitation system for effective functional recovery after spinal cord injury

研究代表者

寒竹 司 (KANCHIKU, Tsukasa)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30464324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：12週齢Fisherラット25匹を使用し、NMES治療群(以下NMES群)とトレッドミル歩行訓練群(以下TM群)、併用群(以下併用群)、損傷コントロール群、正常コントロール群の5群(各群n=5)に分けた。NMES治療は損傷後5日目から連続3日間行い、トレッドミル治療群は損傷後7日目から連続5日間行った。損傷後14日目に三次元歩行解析を行い治療効果を評価した。三次元歩行解析では損傷コントロール群と比較してNMES治療を行った2群で、特に両後肢の共同運動、足関節の水平方向の移動で改善傾向を認め、より正常な歩行パターンに近づいていた。体幹動揺性の評価ではTM群を含む全ての治療群で改善傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：We used 25 12-week-old Fisher rats, which were divided into five groups: rats with SCI that only underwent NMES therapy, rats with SCI that underwent gait training on a treadmill, rats with SCI that underwent both these therapies, an SCI control group, and a normal control group. NMES therapy was initiated five days later. The tibialis anterior and gastrocnemius were used for stimulation. The TM group started gait training 15 min a day for five consecutive days seven days after the SCI. The combination group underwent both therapies. The therapeutic effect was evaluated in a 3D gait analysis 14 days after the SCI. We found that the interlimb coordination of both hindlimbs, circular phase, and horizontal movement of the ankle joint, in particular, improved in the two NMES groups compared with the SCI control group, indicating that their gait pattern was almost normal. An improving trend was also seen in all therapy groups, including the TM group, in the trunk movement during gait.

研究分野：脊椎脊髄外科

キーワード：脊髄損傷 ニューロリハビリテーション 機能的電気刺激 トレッドミル歩行訓練

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷後の治療として様々な治療が研究されているが単独の治療では限界があり、有効な治療を組み合わせた併用療法が必要である<sup>1)</sup>。中でもリハビリテーションは神経系の内因性の可塑性を促進することで、脊髄不全損傷後の機能回復を加速することが可能と考えられ、再生治療後の神経回路の再編成を促す治療として期待されている<sup>1)</sup>。臨床的には体重免荷、ロボット支援によるトレッドミル歩行、機能的電気刺激治療の併用による下肢の繰り返しのリズム運動は有効なりハビリテーションと考えられている<sup>2),3),4)</sup>。Treadmill training with partial body weight support (PWBT) has been shown to improve functional recovery mainly after incomplete spinal cord injury (iSCI) both animals and humans<sup>5)</sup>。機能的神経筋電気刺激(以下 NMES : neuromuscular electric Stimulation)治療は、運動機能訓練の一つの手段として用いられ、臨床的には体重免荷トレッドミル歩行との併用の有効性が報告されており<sup>6)</sup>、その運動機能改善のメカニズムとして、リズム運動による筋紡錘やゴルジ腱器官等からの sensory-feedback による中枢神経系の神経回路の再編成があげられているが詳細は不明である<sup>6),7),8)</sup>。詳細な機能改善のメカニズムの解明、脊髄再生治療との併用効果の有効性を検討するためには動物実験を含めた基礎的な研究が必要である。我々は従来の埋め込み型電極を用いたモデル<sup>9)</sup>と比較して、より低侵襲な FNS 治療モデルを作成し、短期での後肢運動機能の改善を報告した<sup>10),11)</sup>。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、このモデルを使用し、NMES 治療と Treadmill 歩行訓練の併用治療の有効性について明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

この研究は、山口大学動物管理使用委員会の審査を受け、「山口大学動物に関する規則」、「動物の愛護及び保管に関する法律」(法律第 105 号)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省告示第 88 号)及び「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71)の規制に基づいて行われた。12 週齢の成熟雌 Fisher ラット(平均体重 160g) 25 匹を使用した。正常コントロール群 5 匹、脊髄損傷コントロール群 5 匹、Treadmill 治療群 5 匹、NMES 治療群 5 匹、Treadmill 治療と NMES 治療の両方を行った併用治療群 5 匹の 5 群に分けた。脊髄損傷は Th9 レベルで IH impactor を用い脊髄を 150kdyne の力で圧挫して作成した。

### ・脊髄不全損傷作成

麻酔は Ketamine 25mg、xylazine1mg の腹腔内投与により行った。ラットを手術台に腹臥位とし背部正中に 2cm の縦皮切を行い、Th9 棘突起を中心に傍脊柱筋を棘突起および椎弓から剥離した。Th8、9 棘突起を切除した後、2mm のエアームを用いて Th9 の椎弓を切除し、硬膜を露出させた。この際、椎間関節を損傷しないよう注意した。これらの操作は顕微鏡(Carl Zeiss AG, Jana, Germany)下に行った。硬膜を露出させた後、Th8、10 の椎弓を撮子で把持、固定した状態で IH impactor (IH-400 : Precision Systems & Instrumentation, KY, USA) を用いて 150kdyne の力で硬膜の上から脊髄を圧挫し脊髄損傷を作成した。閉創は皮膚の縫合のみを行った。術後 2 日目まではケージをホットカーペットに乗せ保温を行った。また 1 日 2 回、用手的に膀胱を圧迫し排尿を行わせた。これを膀胱機能が回復するまで継続した。

### ・Neuromuscular electrical stimulation (NMES) therapy

刺激治療のセッティングは 2%セボフレ

ンでの吸入麻酔下に行った。過去の報告と同様に<sup>10)</sup>、針電極を前脛骨筋 (Tibialis anterior muscle 以下 TA) と腓腹筋 (Gastrocnemius muscle 以下 Gc) のモーターポイントに刺入し、覚醒状態で15分間の歩行リズム刺激を行った。刺激装置にはCytocentrics社 STG2004 Multi Channel Systemsを使用した。刺激条件は過去の実験データを参考に設定した<sup>10)</sup>。すなわち、刺激波形は双極性矩形波で、パルス幅20、40、60、100、200、500 $\mu$ secでの刺激電流をプロットして、強さ-時間曲線 (Strength-duration curve : SD curve) を作成し、刺激電極がMotor point近傍の適切な位置に挿入されていることを確認した。刺激電流はパルス幅40 $\mu$ secでの最小閾値電流の1.5倍とし、刺激周波数は75Hzに設定した。左右のTA、Gcの刺激のタイミングは過去のトレッドミル歩行の筋電図のデータを使用し<sup>12)</sup>、足関節の底背屈を左右交互に行わせ、歩行リズム刺激を行った。NMES治療は術後5日目から1日15分、3日間連続で施行した。

#### ・Treadmill 歩行訓練

Treadmill 治療はラット用のトレッドミル歩行器 (model TMC-100: MELQUEST社, Japan) を使用し、術後7日目から速度13.7cm/secで15分間のTreadmill 荷重歩行を行わせた。NMES治療とTreadmill 治療の併用治療群ではNMES治療3日目に1日目のTreadmill 治療を行った。運動機能評価はBBBスコアと三次元動作解析により行った。BBBスコアは損傷後1, 3, 7, 10, 14日目に行った。また、定量的な運動機能評価を行うため、損傷14日目に三次元歩行解析を行った。三次元動作解析システムはKinemaTracer<sup>®</sup>(KISSEI COMTEC CO.,LTD.) を使用した。両側後肢の関節に設置したカラーマーカー設置し、トレッドミル上を一定の測定で歩行させ、歩行中の様子を4台のCCDカメラで撮影し、得られたビデオデータをデジタル化して解析を行った。各群

間のデータの比較にはExcel統計を使用した。2群間の比較にはWelch'testを使用し、危険率5%で有意差を検討した。

#### 4. 研究成果

##### ・BBB score<sup>13)</sup>

BBB scoreは脊損コントロール群では術後1日目で $0 \pm 0$ 、術後3日目で $0.8 \pm 0.75$ 、術後7日目で $8 \pm 1.1$ 、術後10日目で $11.4 \pm 1.5$ 、術後14日目で $16.4 \pm 1.0$ であった。Treadmill治療群では術後1日目で $0 \pm 0$ 、術後3日目で $0.1 \pm 0.6$ 、術後7日目で $8 \pm 0.6$ 、術後10日目で $13.2 \pm 1.9$ 、術後14日目で $15.6 \pm 1.7$ であった。NMES治療群では術後1日目で $0 \pm 0$ 、術後3日目で $1.2 \pm 0.4$ 、術後7日目で $7.8 \pm 1.2$ 、術後10日目で $12.6 \pm 1.7$ 、術後14日目で $15.6 \pm 1.6$ であった。併用治療群では術後1日目で $0 \pm 0$ 、術後3日目で $3 \pm 2.9$ 、術後7日目で $8.3 \pm 2.1$ 、術後10日目で $12.9 \pm 1.5$ 、術後14日目で $16.1 \pm 1.1$ であった。BBB scoreは各群間で有意差は認めなかった。

##### ・Phase relationships in gait cycle

正常コントロール群では立脚期80.8%、遊脚期19.2%、両脚支持期30.4%であった。脊損コントロール群では立脚期74.3%、遊脚期25.7%、両脚支持期17.5%であった。Treadmill治療群では立脚期68.2%、遊脚期31.8%、両脚支持期18.6%であった。NMES治療群では立脚期71.6%、遊脚期28.4%、両脚支持期20.5%であった。併用治療群では立脚期74.7%、遊脚期25.3%、両脚支持期30.4%であった。歩行周期について各群間での有意差は認めなかった。

##### ・Circular phase

歩行周期における左右の後肢の接地時間の平均をMean、位相のばらつきをr値で評価した (Fig.4)。正常コントロール群ではMean値が $50.3\% \pm 4.3\%$ 、r値は $0.81 \pm 0.03$ であった。脊損コントロール群ではMean値が $49.6\% \pm 11.6\%$ 、r値が $0.77 \pm 0.18$ であった。Treadmill治療群ではMean

値が  $51.7\% \pm 5.5\%$ 、 $r$  値が  $0.85 \pm 0.17$  であった。NMES 治療群では Mean 値が  $50.2\% \pm 3.2\%$ 、 $r$  値が  $0.9 \pm 0.09$  であった。併用治療群では Mean 値が  $50.0\% \pm 11.6\%$ 、 $r$  値が  $0.89 \pm 0.07$  であった。Mean 値、 $r$  値ともに各群間で統計学的有意差は認めなかった。しかし、 $r$  値において NMES 治療を行った 2 群では正常値である 1 により近付いており ( $p=0.06$ ) 改善傾向を認めた (図 1)。

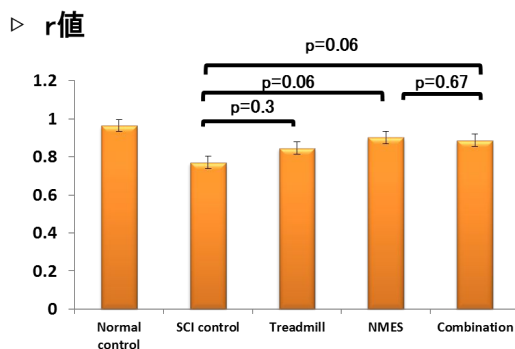


図 1 .  $r$  値

#### ・ Ankle and foot trajectory

足関節、中足骨に設置した蛍光マーカーの軌跡をプロットした。歩幅については正常コントロールと脊髄損傷を作成した群とで明らかな差は認めなかったが、後肢の垂直方向の動きは脊髄損傷を作成した群で小さくなっていた。しかし、治療を行った群では改善傾向を認めた。

#### ・ Normalized ankle joint angles

歩行周期における足関節の xyz 歩行の平均化グラフでは、遊脚期における足関節の角度変化が NMES 治療を行った 2 群で損傷コントロール群に比較して大きく、toe clearance の改善を認めた (図 2)。また、水平面 (xy 平面) 上での足関節外旋角度の変化のグラフでは、正常コントロール群では最大  $107.1^\circ$ 、最小  $22.2^\circ$  で角度変化は  $84.9^\circ$  であった。脊髄コントロール群では最大  $144.4^\circ$ 、最小  $30.4^\circ$  で角度変化は  $114.0^\circ$  であった。Treadmill 治療群では最大  $147.7^\circ$ 、最小  $35.6^\circ$  で角度変化は

$112.1^\circ$  であった。NMES 治療群では最大  $128.1^\circ$ 、最小  $24.6^\circ$  で角度変化は  $103.5^\circ$  であった。併用治療群では最大  $122.3^\circ$ 、最小  $29.6^\circ$  で角度変化は  $92.7^\circ$  であった。NMES 治療を行った 2 群で足関節の外反角が小さくなり正常群に近づく傾向を認めた。

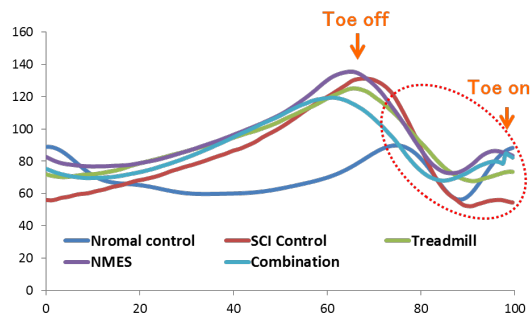


図 2 . Normalized ankle joint angles

#### ・ 歩行時の体幹の動揺性

歩行時の体幹の動揺性を左右の腸骨マーカーを結んだ直線と xy 平面とが成す最大角と最小角の差で評価した。正常コントロール群では  $16.6^\circ \pm 0.6$ 、脊髄コントロール群では  $23.7^\circ \pm 11.1$ 、Treadmill 治療群では  $15.6^\circ \pm 5.0$ 、NMES 治療群では  $18.3^\circ \pm 4.1$ 、併用治療群では  $18.2^\circ \pm 5.8$  であった。統計学的有意差は認められなかったが、全ての治療群で脊髄コントロール群と比較して角度が小さくなる傾向がみられ、歩行時の体幹動揺性が改善していると考えられた (図 3)。

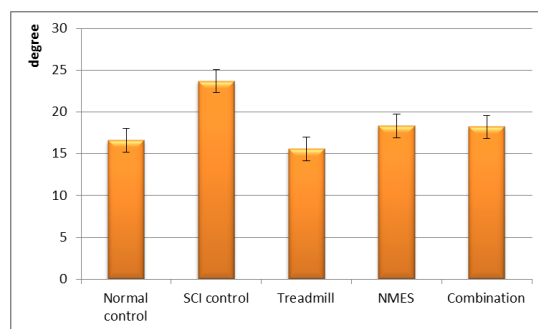


図 3 . 歩行時の体幹動揺性

<引用文献>

- 1) Ramer LM, Ramer MS, and Steeves JD: Setting the stage for functional repair of spinal cord injuries: a cast of thousands: *Spinal Cord*. 2005;43:134-161.
- 2) Barbeau H, McCrea DA, ODonovan MJ, Rossignol S, Grill WM, and Lemay MA: Tapping into spinal circuits to restore motor function. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;30:27-51.
- 3) Wirz M, Zemon DH, Rupp R, Scheel A, Colombo G, Dietz V, and Hornby TG: Effectiveness of automated locomotor training in patients with chronic incomplete spinal cord injury: a multicenter trial. *Arch Phys Med Rehabil*. 2005;86:672-680.
- 4) Beekhuizen KS, Field-Fote EC. Massed practice versus massed practice with stimulation: effects on upper extremity function and cortical plasticity in individuals with incomplete cervical spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair* 2005;19:33-45.
- 5) Barbeau H and Blunt RA. A novel interactive locomotor approach using body weight support to retrain gait in spastic paretic subjects. In: *Plasticity of Motoneuronal Connections*, edited by Wernig A. New York: Elsevier Science Publications, 1991, p. 461-474.
- 6) Field-Fote EC, Tepavac D. Improved intralimb coordination in people with incomplete spinal cord injury following training with body weight support and electrical stimulation. *Phys Ther*. 2002 Jul;82(7):707-15.
- 7) Popovic MR, Thrasher TA, Adams ME, Takes V, Zivanovic V, Tonack MI. Functional electrical therapy: retraining grasping in spinal cord injury. *Spinal Cord* 2006;44:143-51.
- 8) Field-Fote EC: Electrical stimulation modifies spinal and cortical neural circuitry. *Exercise and Sports Sciences Review*. 2004;32:155-160.
- 9) Jung R, Belanger A, Kanchiku T, et al : Neuromuscular stimulation therapy after incomplete spinal cord injury promotes recovery of interlimb coordination during locomotion. *J Neural Eng* 6(5) : 055010. Epub, 2009 .
- 10) Kanchiku T, Kato Y, Suzuki H, Imajo Y, Yoshida Y, Moriya A, Taguchi T, Jung R: Development of less invasive neuromuscular electrical stimulation model for motor therapy in rodents. *J Spinal Cord Med*. 2012 May;35(3):162-9.
- 11) Moriya A, Kanchiku T, Suzuki H, et al. Short-term recovery of interlimb coordination during locomotion in a rodent model with incomplete spinal cord injury after minimally-invasive neuromuscular electrical stimulation therapy. *Exp Ther Med ( In press )* 2014
- 12) Thota AK, Watson SC, Knapp E, Thompson B, Jung R. Neuromechanical control of locomotion in the rat. *J Neurotrauma* 2005; 22:442-65.
- 13) Basso D M, Beattie M S and Bresnahan J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open

field testing in rats J. Neurotrauma  
1995;12:1-21

## 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)

Takahashi Y, Kanchiku T, Suzuki H,  
Imajo Y, Yoshida Y, Moriya A, Suetomi  
Y, Nishida N, Taguchi T. Effect of the  
combination of functional  
neuromuscular electrical  
stimulation and treadmill walking in  
spinal cord-injured rats. Exp Ther  
Med., 査読あり, In press, 2017.  
Kanchiku T, Suzuki H, Imajo Y,  
Yoshida Y, Moriya A, Suetomi Y,  
Nishida N, Takahashi Y, Taguchi T.  
The efficacy of neuromuscular  
electrical stimulation with  
alternating currents in the  
kilohertz frequency to stimulate  
gait rhythm in rats following spinal  
cord injury. Biomed Eng Online 14:98,  
doi: 10.1186/s12938-015-0094-5, 査  
読あり, 2015.

[学会発表](計2件)

Kanchiku T, Suzuki H, Nishida N,  
Funaba M, Taguchi T. The efficacy of  
functional neuromuscular  
stimulation using kHz to stimulate  
gait rhythm in rats following spinal  
cord injury. IFESS 2017. 2017年7  
月19日~20日, ロンドン(イギリス)  
Kanchiku T, Imajo Y, Suzuki H,  
Yoshida Y, Nishida N, Taguchi T. The  
efficacy of functional neuromuscular  
stimulation using kHz to stimulate  
gait rhythm in rats following spinal

cord injury. Society for  
Neuroscience 45<sup>th</sup> Annual Meeting.  
2015年10月17~21日, シカゴ(アメ  
リカ)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

寒竹 司(KANCHIKU, Tsukasa)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 30464324

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし