

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10922

研究課題名（和文）完全脊髄損傷モデルに対する硬膜外電気刺激療法と免荷トレッドミル歩行による歩行再建

研究課題名（英文）Combinational rehabilitation with epidural spinal cord stimulation and body weight support treadmill training for severe spinal cord injury model

研究代表者

村田 淳（Murata, Atushi）

千葉大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20344997

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：重度脊髄損傷モデルラットを作成し、硬膜外電気刺激とトレッドミルトレーニング併用リハビリテーションの効果を行動学的および組織学的に評価した。硬膜外電気刺激を併用した群では下肢痙性の有意な改善を認め、組織学的評価において腰膨大部のGAD65が高い傾向を示した。GAD65は神経終末部に豊富に存在することが知られており、抑制性シナプス伝達を担うGABA合成に関与すると考えられている。本研究では硬膜外電気刺激を併用した群でGAD65が高い傾向を認めており、GAD65の増加を介し脊髄損傷に伴う下肢痙性の改善が得られた可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下肢の重度の運動感覚麻痺を伴う脊髄損傷患者に対し硬膜外電気刺激を行うことにより、下肢の随意運動が可能となることが報告されたが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では、重度脊髄損傷モデルラットの腰膨大部に硬膜外電気刺激を行い、行動学的、組織学的に有効性を検討した。組織学的検討においてグルタミン酸脱炭酸酵素GAD65の発現が高い傾向を示した。GAD65はリズムカルな歩行運動との関連が報告されている。GAD65は電気刺激による歩行機能再建の機序の1つであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We evaluated efficacy and molecular mechanism of spinal cord stimulation with treadmill training. In the spinal cord stimulation group, spasticity of hind-limb significantly reduced and histological assessment revealed that expression of GAD65 tended to increase. GAD65 is mainly found in membranes and nerve endings and may synthesize GABA for vesicular release. Therefore, upregulation of GAD65 is one of the possible mechanisms underlying the spinal cord stimulation induced attenuation of spasticity.

研究分野：脊髄損傷、脊椎脊髄病、リハビリテーション、脊髄再生

キーワード：脊髄損傷 リハビリテーション 脊髄電気刺激療法 グルタミン酸脱炭酸酵素 GAD65

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性期脊髄損傷患者に対し硬膜外電気刺激療法を施行したところ、刺激下における下肢随意運動が可能となったという臨床研究が報告された。脊髄損傷に対する硬膜外電気刺激療法について、モデル動物を用いた行動学的解析を行った先行研究はあるものの、組織学的にメカニズムを解析した報告はなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、完全脊髄損傷モデルに対する腰膨大部硬膜外電気刺激療法と免荷トレッドミル歩行トレーニングによる歩行再建の効果およびその作用機序を明らかにすることである。従来、脊髄はひとたび損傷されると再生することは無く、完全脊髄損傷に対する有効な治療法はないとされてきた。近年、脊髄腰膨大部の硬膜外電気刺激により、脊髄完全損傷症例においても下肢随意運動が確認されたとの報告がなされた。本研究では完全脊髄損傷モデルに対して腰膨大部硬膜外電気刺激療法と免荷トレッドミル歩行トレーニングを組み合わせ、その効果及び作用機序を探ることとした。免荷トレッドミル歩行により誘発される歩行様後肢運動に対し硬膜外電気刺激療法が与える影響について検討した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 慢性期完全胸髄損傷動物モデルの作成

研究には10匹の8-9週齢雌性SDラットを用いた。全身麻酔下に第8-9胸椎椎弓切除を施行し、同部位にて脊髄髄節を長軸方向に3-4mmの長さで切除し、脊髄完全切断による脊髄完全麻痺モデル(両下肢の対麻痺)を作成した。脊髄損傷後急性期においてラットは重度の排尿障害を呈するため、排尿反射が回復するまでの間(およそ1-2週間前後)用手的導尿を施行した。鎮痛薬としてアセトアミノフェンシロップを経口投与し、尿路感染・手術創感染等の予防に抗生剤としてセフメタゾールを生理食塩水にて溶解し術直後から1日1回皮下注射を3日間施行した。ラットにおいては脊髄損傷後4週ほど経過すると組織学的に空洞・瘢痕形成が生じることが知られている。空洞形成は病態が慢性期に移行しつつあることを示唆する所見である。本研究ではモデルとして損傷後4週のラットに対して治療介入することを計画した。

#### 2) 電気刺激療法

損傷後4週目のラットに対し再び全身麻酔を施行した。第2-3腰椎椎弓切除を行い、硬膜外電極を挿入した。硬膜外電気刺激装置はMedtronic社のN'visionを用いた。電極リードは同社のPIECES-QUAD Leadを用い、刺激部位がL2レベルとなるよう電極を設置した。電極の装置に接続する側の盲端は肩甲骨内側付近の皮下より体外に出して、刺激する際に刺激器と接続できるよう準備した。ラットを「電気刺激群」「コントロール群」の2群にランダムに分類した。電気刺激群ではリハビリテーション(後述)施行中、硬膜外電極と電気刺激装置を接続し電気刺激を加えた。電気刺激はDuru(Duru, J Neurosci Res, 2015)らの報告を参考にして設定し、電圧:0.5-2.0V、刺激感覚:240 $\mu$ s、周波数:40Hzとした。これはトレーニングの際に後肢運動が電気刺激によって生じる閾値より低い設定であった。すなわち、本研究の電気刺激は、刺激自体が直接的に下肢の随意運動を引き起こしている訳ではない。コントロール群は電気刺激を施行せず、リハビリテーションのみ施行した。リハビリテーションはラットを体幹支持ハーネスで懸垂型免荷装置より懸垂し、免荷を行ったうえで、トレッドミル歩行トレーニングを施行した。リハビリテーションは1日20分間、週5日、4週間とした。

#### 3) 行動学的評価

脊髄損傷後1週毎にBasso-Beattie-Bresnahan scale (BBB)スコアによる行動学的評価を行った。また下肢の痙性評価目的に、下肢完全伸展位における(他動的屈曲動作に対する)抵抗力を評価した。行動学的評価はリハビリテーション開始後4週間継続した。

#### 4) 組織学的評価

電気刺激の随意運動獲得に対する効果は痙性のコントロールにあると考え、神経系では抑制性のマーカーであるグルタミン酸デカルボキシラーゼ、グルタミン酸脱炭酸酵素(Glutamate decarboxylase, glutamic acid decarboxylase: GAD))の1つであるGAD65について、腰膨大部の脊髄の組織切片を作成し免疫染色を行った。

### 4. 研究成果

先行研究として、健常ラットの腰膨大部にヒト用硬膜外電気刺激電極を挿入し、電極挿入手技が行動に与える影響がないことを確認した。次に、脊髄損傷モデル(切断モデル)を作成し、硬

膜外電気刺激およびトレッドミルトレーニングの手技を確立した。当初は損傷後4週での治療介入予定であったが、完全脊髄損傷モデル(切断モデル)のため、経時的に全身状態が悪化し研究に組み入れられない個体が多く発生した。このため、適切な実験動物組み入れの観点から、当初の予定を変更し、損傷後2週での治療介入へ変更した。行動学的評価として、両群の後肢運動機能をBBB scoreにて評価した。脊髄切断後よりBBB scoreは全てのラットで0点となった。損傷2週後より治療介入を行ったが、最終観察時までの4週間、電気刺激群5匹全例、コントロール群5匹全例でBBBスコアの改善は認めなかった。下肢の痙性評価では、治療介入1週後より電気刺激群はコントロール群に比し有意に他動的運動に対する抵抗力の低下、すなわち痙性の低下を認めた。

組織学的評価では電気刺激群でGAD65が増加する傾向を示した。GAD65はグルタミン酸脱炭酸酵素の1つである。GAD65は神経終末部に豊富に存在することが知られており、GAD65が抑制性シナプス伝達を担うGABA合成に関与すると考えられている。脊髄損傷モデル動物においては抑制性のシナプス伝達による下肢深部腱反射や痙縮性麻痺との関連性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jyunya Saito, Takeo Furuya, Masao Koda et al
2. 発表標題 Combination of epidural spinal cord stimulation and body weight support treadmill training for severe spinal cord injury
3. 学会等名 The 35th Annual National Neurotrauma Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齊藤淳哉、古矢丈雄、國府田正雄 ほか
2. 発表標題 硬膜外電気刺激と吊り下げ式免荷トレッドミルトレーニングを併用した重度脊髄損傷歩行再建の試み
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齊藤淳哉、古矢丈雄、國府田正雄 ほか
2. 発表標題 硬膜外電気刺激と吊り下げ式免荷トレッドミルトレーニングを併用した重度脊髄損傷歩行再建の試み
3. 学会等名 第52回日本脊髄障害医学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古矢 丈雄  (Furuya Takeo)  (00507337)	千葉大学・医学部附属病院・講師    (12501)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	國府田 正雄  (Koda Masao)  (50361449)	筑波大学・医学医療系・准教授       (12102)	