

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591951

研究課題名（和文）：機能的電気刺激の内喉頭筋再支配に対する影響

研究課題名（英文）：Effects of functional electrical stimulation on reinnervation of intrinsic laryngeal muscles.

研究代表者：

片田 彰博（KATADA AKIHIRO）

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：90281899

研究成果の概要：

本研究では、機能的電気刺激の内喉頭筋再支配に対する影響について基礎的な実験成績を収集した。ラット下腿をモデルとした実験では、機能的電気刺激によって1) 脱神経後に生じる廃用性筋萎縮が抑制されること、2) 脱神経後の神経再支配が促進されること、3) 神経再支配が起こったときの神経終末とアセチルコリンレセプターとの機能的接続が増加することが示された。イヌの喉頭を用いた実験では、完全埋め込み型の電気刺激装置と刺激電極によって喉頭運動を回復させることに成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：再生医学、神経科学、機能的電気刺激、喉頭科学

1. 研究開始当初の背景

喉頭は呼吸、気道反射、嚥下、発声など多くの機能を持ち、その運動制御機構は非常に複雑である。このような種々の喉頭機能については、筋電図を用いた運動機能制御に関する研究が国内外で数多くおこなわれている。しかし、反回神経障害後の喉頭機能の回復を目的とした研究はわずかに散見されるのみである。現在、喉頭機能障害に対しては、一部の機能を犠牲にした治療法や手術によって喉頭の形態を変化させることで機能改善を期待する治療が一般的である。例えば喉頭の機能を犠牲にした治療方法としては、両側声帯麻痺に対する気管切開術や、嚥下障害に対する喉頭全摘術などが挙げられる。また形態を変化させることで機能改善を期待する手術としては、発声障害に対する喉頭枠組み手術、嚥下障害に対する輪状咽頭筋切断術と喉頭吊り上げ手術などが代表的治療方法として挙げられる。これらの方法は、問題となる機能に対してはもちろん治療効果を挙げているが、その一方ではこの治療によって必ず犠牲となる機能があることや、患者に与える侵襲、QOLの向上の観点から見ても治療法としての改善の余地があり、またこれらの治療法の欠点を克服できるような新たな治療法の開発が非常に重要と思われる。

喉頭運動を制御する内喉頭筋は迷走神経から分枝する反回神経を介して制御されている。反回神経が外傷や外科手術によって障害されると、喉頭が関与する発声運動、嚥下運動、上気道反射などが障害され、患者のQOLは著しく低下する。元来、末梢神経である反回神経は高い再生能力を持っているので、切断された部位を吻合したり他の神経を移植することによって、反回神経が再び内喉頭筋を支配することはよく知られている。しかし、内喉頭筋の再支配が確立したとしても正常に近い運動機能が回復することは期待できない。これは、内喉頭筋に起こる神経再支配が過誤支配となるためである。

近年、微少な電気刺激によって失われた生体機能を回復する手法である機能的電気刺激が注目されている。我々は以前から、機能的電気刺激を用いた喉頭運動機能回復に関する基礎的な研究に取り組んでいる。まず我々は機能的電気刺激によって失われた喉頭機能の回復を試み、麻痺喉頭の再運動化に必用な至適刺激をあきらかにした。さらに、反回神経切断による一側性の喉頭麻痺をもつネコに発声運動を誘発し、麻痺側の内喉頭筋に至適刺激を加えることによって発声機能を改善させることが可能であ

ることを確認している。

2. 研究の目的

本研究では、機能的電気刺激が持つ新しい治療法としての可能性をさらに追求したいと考えている。すなわち、反回神経障害が原因となっている種々の喉頭機能障害患者に対し機能的電気刺激を応用することで喉頭機能の回復を促進することを最終目標とし、その遂行のために、機能的電気刺激の内喉頭筋再支配に対する影響について基礎的な実験成績を収集することを目的とした。

内喉頭筋が一度神経支配を失ってから神経再支配が確立するまでには少なくとも数週間の時間を要するが、この間に内喉頭筋には神経終末の消失、脱神経による筋萎縮がおこる。この神経支配が失われている間に、筋収縮を誘発するような電気刺激を長期間加えることによって、内喉頭筋の神経終末や筋線維にどのような変化が生じるのかを形態学的に解析した。さらに機能的電気刺激をくわえ続けることで再支配が完了したあとの喉頭運動機能がどのように変化するか検討した。

3. 研究の方法

機能的電気刺激の筋線維に対する影響を確認するために、ラット下腿を内喉頭筋のモデルとして用いた実験をおこなった。ラット下腿の筋は坐骨神経によって支配されているので、坐骨神経を切断して神経支配が消失した脱神経モデルを作成した。神経支配を失った筋に表面電極を用いて体表から電気刺激を加えた。坐骨神経を切断したままの群、坐骨神経を切断し機能的電気刺激をくわえた群、坐骨神経を切断後、神経吻合をおこない機能的電気刺激をくわえた群の3群を作成した。8週間の電気刺激をくわえた後、下腿の筋を摘出し凍結切片を作成した。筋線維の断面積、神経終末の数、アセチルコリンレセプターの数、神経筋接合部の数を3群で比較検討した。また、機能的電気刺激によって筋線維に発現するmRNAの変化についてマイクロアレイを用いて解析した。

さらに、長期間の機能的電気刺激によって内喉頭筋にどのような変化が生じるのかを解明するために、大型でヒトに近い喉頭の形態と機能を持つイヌを用いて実験をおこなった。脳深部刺激用の電極と埋め込み型電気刺激装置を用いて、長期間にわたって内喉頭筋に電気刺激をおこなうことができるシステムを使用した。イヌの一側反回神経を切断して喉頭麻痺モデルを作成し、脳深部刺激用電極を声門開大筋の表面に留置した。効率的に声門開

大が誘発できる刺激条件を確認して、埋め込み型電気刺激装置と接続した。定期的に電気刺激によって誘発される声門開大運動を観察した。6ヶ月の機能的電気刺激をおこなった後に喉頭を摘出し、声門開大筋を採取して筋の形態学的変化を観察した。

4. 研究成果

1) 筋萎縮抑制効果

ラット下腿を用いた実験では、機能的電気刺激を加えることで、脱神経後に生じる筋線維の萎縮が抑制され、筋線維の断面積は正常と同等の大きさが維持されていた。機能的電気刺激は脱神経後に生じる筋萎縮を抑制する効果があると考えられた。

2) アセチルコリン受容体減少の抑制

ラット下腿の筋が脱神経の状態になると筋線維に存在するアセチルコリン受容体は経時的に減少した。機能的電気刺激をおこなった群でもアセチルコリン受容体の数は正常と比較すると減少していたが、刺激をくわえない群と比較すると、アセチルコリン受容体の数は有意に多く、機能的電気刺激は脱神経後のアセチルコリン受容体の減少を抑制する効果があることが確認された。

3) 神経筋接合部減少の抑制

ラット下腿の筋に機能的電気刺激を加えることで、再支配が完了したときの神経筋接合部の数が刺激をおこなわない群と比較して有意に増加していた。筋収縮が誘発されるためには、神経終末とアセチルコリン受容体が機能的に接続し、神経筋接合部を形成することが必要不可欠である。機能的電気刺激によって神経筋接合部の数が増加していたことは、機能的電気刺激が、神経再支配による運動機能の再獲得に効果的に作用することを示唆すると考えられた。

4) 筋線維アポトーシスの抑制

機能的電気刺激をくわえた群の筋線維では、アポトーシスの抑制に関与する valosin-containing protein の mRNA が増加していた。この結果から機能的電気刺激は caspase12 を介した筋線維のアポトーシス経路を抑制していることが推察された。脱神経後に生じる筋線維の萎縮にはアポトーシスが関与し、機能的電気刺激はそのアポトーシスを抑制することによって筋萎縮を防いでいる可能性が示唆された。

5) 長期間の機能的電気刺激による影響

イヌを用いた実験では完全埋め込み型の電気刺激装置と刺激電極を用いて、反回神経切断後の麻痺している内喉頭筋に筋収縮を誘発し、喉頭運動を回復させることに成功した。

機能的電気刺激によって神経切断直後から有効な声門開大運動が誘発され続けていることが内視鏡を用いた喉頭の観察によって確認された。6ヶ月の長期的な経過観察をおこなったが、実験動物には電気刺激による呼吸困難や嚥下困難といった不利益な状態は観察されなかった。刺激装置は観察期間中、正常に作動し続けた。実験終了後に摘出した喉頭の声門開大筋を観察したところ、廃用性の筋萎縮はなく正常と同じ筋線維の形態が維持されていることが確認された。以上の結果から、長期間の機能的電気刺激は筋線維に障害を生じさせないこと、脱神経による筋萎縮を防ぐこと、誘発される声門開大運動が呼吸機能を大きく改善すること、誘発される声門開大運動で誤嚥などの機能障害が生じないことが確認された。大型の動物に対して長期の喉頭電気刺激をおこなった実験は、本邦では過去に報告がなく、障害された喉頭機能の回復に対して機能的電気刺激が有効かつ安全であることを示していた。

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)

1. Katada A, Himbergen DV, Kunibe I, Nonaka S, Harabuchi Y, Huang S, Billante C, Zeale DL. Evaluation of a deep brain stimulation electrode for laryngeal pacing. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*: 117 (8) 621-629, 2008, (査読あり)

2. Katada A, Ota R, Arakawa T, Nomura K, Kunibe I, Billante C, Zeale DL, Harabuchi Y. Laryngeal pacing with an advanced generation implantable stimulator. 15th World Congress for Bronchology (WBC) and 15th World Congress for Bronchoesophagology (WCBE) Proceedings 113-137. 2008 (査読なし),

[学会発表] (計12件)

1. Nomura K, Katada A, Ota R, Kunibe I, Harabuchi Y. Effects of electrical stimulation on neuromuscular junctions in denervated muscles. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, USA. Nov.15-19, 2008.

2. Kunibe I, Bekeny J, Singh V, Himbergen DV, Katada A, Nomura K, Huang S, Harabuchi Y, Billante C, Zeale DL : Rehabilitation of the bilaterally paralyzed canine larynx with an implantable stimulation device. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, USA. Nov. 15-19, 2008.

3. Katada A, Kunibe I, Arakawa T, Ota R, Nomura K, Zeale DL, Harabuchi Y. The effects of chronic electrical stimulation on denervated laryngeal muscles. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting, Washington DC, USA, Nov. 15-19, 2008.

4. 片田彰博, 國部 勇, 野村研一郎, 高原幹, 片山昭公, 坂東伸幸, 林 達哉, 原淵保明. 長期間の機能的電気刺激による内喉頭筋筋線維の変化. 第 60 回日本気管食道科学会 : 11 月 6-7 日, 2008 年. 熊本市

5. Kunibe I, Singh V, Bekeny J, Nomura K, Harabuchi Y, Billante C, Katada A, Zeale DL. Glycogen Depletion for Study of Neuromuscular Connectivity. The 112th Annual meeting of AAO-HNS, Chicago, USA. 9. 21-24, 2008.

6. Nomura K. Katada A, Ota R, Kunibe I, Harabuchi Y. Effects of electrical stimulation on neuromuscular junctions in denervated muscles. 15th World Congress for Bronchology (WBC) and 15th World Congress for Bronchoesophagology (WCBE), Tokyo, Mar. 30-Apr. 2, 2008

7. Katada A, Ota R, Nomura K, Kunibe I, Billante C, Zeale DL, Harabuchi Y. Laryngeal pacing with an advanced generation implantable stimulator. 15th World Congress for Bronchology (WBC) and 15th World Congress for Bronchoesophagology (WCBE), Tokyo, Mar. 30-Apr. 2, 2008

8. Kunibe I, Singh V, Bekeny JR, Huang S, Billante CR, Katada A, Zeale DL. Progressive barbiturate anesthesia and isometric loading insures glycogen depletion of any muscle fiber type when studying neuromuscular connectivity The 37th Society for Neuroscience Annual

Meeting. San Diego. USA, Nov 3-7, 2007

9. Katada A, Himbergen D, Billante C, Kunibe I, Harabuchi Y, Zeale DL. Laryngeal pacing with a new implantable stimulator: acute canine study The 37th Society for Neuroscience Annual Meeting. San Diego. USA, Nov 3-7, 2007

10. 野村研一郎, 片田彰博, 太田 亮, 國部勇, 原淵保明. 機能的電気刺激による神経筋接合部の変化についての検討. 第 59 回日本気管食道科学会 : 11 月 1-2 日, 2007 年, 前橋市

11. 國部 勇, 片田彰博, 野村研一郎, 坂東伸幸, 林 達哉, 原淵保明. 長期的な機能的電気刺激が筋へ及ぼす影響. 第 26 回頭頸部自律神経研究会 : 8 月 23 日, 2007 年, 大阪

12. 片田彰博, 太田 亮, 國部 勇, 原淵保明. 埋め込み型電気刺激装置を用いた喉頭ペーシング. 第 108 回日本耳鼻咽喉科学会総会 : 5 月 17-19 日, 2007 年, 金沢市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片田 彰博 (KATADA AKIHIRO)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 90281899

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し