

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592199

研究課題名(和文) ラット脊髄損傷後の機能的神経筋電気刺激治療モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of a rodent model of functional neuromuscular stimulation for motor therapy after spinal cord injury

研究代表者

寒竹 司 (KANCHIKU, Tsukasa)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30464324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄再生治療後に併用可能な低侵襲な機能的電気刺激(FNS)治療モデルを考案し、脊髄不全損傷ラットでの三次元動作解析によるキロヘルツ(kHz)刺激治療の効果の評価を行った。成熟雌Fischerラット20匹を用いた。脊髄不全損傷後7日目から3日間のFNS治療を施行した。三次元歩行解析は損傷後14日目に評価した。FNS治療75 Hz群、8 kHz群、損傷コントロール群、正常群(各5匹)の4群間で比較検討した。BBBスコアは有意差を認めなかった。三次元歩行解析では損傷コントロール群に比較して、75Hz群で左右後肢の共同運動の改善傾向を認め、8kHz群では有意な改善を認めた。

研究成果の概要(英文)：We examined the effectiveness of functional electrical stimulation with kHz in gait rhythm stimulation therapy. Tests were performed using 20 mature female Fischer rats. FNS was administered for three days from seventh day post-injury. Rats were divided into four groups (5 rats/group), including the FNS treatment 75 Hz group (iSCI FNS 75Hz), 8 kHz group (iSCI FNS 8 kHz), injury control group (iSCI-NT), and normal group (Normal-CT), and compared. There was no significant difference in BBB scores at any point between the four groups. In 3D gait analysis, compared with the injury control group, the 8 kHz group showed a significant improvement in synergistic movement of both hindlimb. We suggest that kHz stimulation is effective in gait rhythm stimulation using NMES.

研究分野：脊椎脊髄外科

キーワード：脊髄損傷 リハビリテーション 機能的電気刺激

1. 研究開始当初の背景

脊髄完全損傷は運動機能の改善に乏しく、その機能改善には単独の治療では限界があり、いくつかの有効な治療を組み合わせる併用療法が必要である¹⁾。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¹⁾。臨床的にはロボット援助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と考えられている^{2,3,4,5)}。しかし動物実験で脊髄再生治療との併用療法としてのリハビリテーションの効果を検討した報告は比較的少なく、適切な動物実験モデルの開発を含めて、今後研究が必要な領域である^{1,6)}。

機能的神経筋刺激治療モデルとしては Jung らが過去にラットを用いた電気刺激モデルを作成し、各下肢関節の主動筋のモーターポイントに埋め込んだ刺激電極を刺激して、歩行時の各関節の協同運動に必要な刺激条件の基礎的実験を行い^{7,8,9)}、脊髄不全損傷ラットの FNS 治療により、短期での有意なトレッドミル歩行での後肢共同運動の改善を報告している¹⁰⁾。FNS 治療は損傷後急性期からの使用も可能であるが、このモデルは埋め込み型の電極であるため、手術侵襲が大きく、脊髄再生治療との併用療法の効果を検討するためにはより低侵襲なモデルが必要となる。

2. 研究の目的

我々は過去に経皮的針電極を使用したより低侵襲な機能的神経筋刺激モデルを作成し¹¹⁾、Jung らのモデル同様に短期での運動機能改善効果について報告した¹²⁾。本研究ではより効果的な刺激条件の検討を行うために、刺激条件の違いによる運動機能に与える

影響について検討した。

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。

成熟雌 Fisher ラット 15 匹(体重 160 ~ 175g)を用いた。損傷コントロール群(損傷 Cont)、機能的神経筋電気刺激治療(Functional neuromuscular electrical stimulation: FNS)群に分け、さらに治療群は刺激周波数 75Hz (FNS-75Hz)と 8333Hz (FNS-8kHz)の 2 群に分け、計 3 群(各群 n=5)で検討した。FNS 治療は脊髄損傷後 1 週間目から行い、一日 15 分、3 日間行った。運動機能の評価は BBB スコアと三次元歩行解析により行った。

脊髄損傷の作成は、麻酔下(ケタミン 25 mg + キシラジン 1 mg 筋注)に、自発呼吸下で行った。作成には IH-Impactor (Precision Systems and Instrumentation, LLC, Lexington, KY, USA)を使用し、第 9 胸椎レベルで、150kdyn の Force で中等度の脊髄圧挫損傷を作成した。

FNS 治療のための、刺激電極には針電極を使用し、刺激筋には足関節の主動筋である前脛骨筋(Tibialis anterior:以下 TA)と腓腹筋(Gastrocnemius:以下 Gc)を選択した。刺激電極の挿入は吸入麻酔下で行った。ラットを専用のプラットフォーム上に固定し、両側の TA と Gc に経皮的に電極を挿入した¹¹⁾。各筋のモーターポイント近傍に挿入するため、解剖学的なモーターポイントを参考にして、刺激電極に低電流(周波数 = 75Hz, パルス幅 = 40 μ sec, 振幅 = 1mA, 持続時間 = 200msec)

を流して、経皮的に刺激を行い、目的筋の最大収縮が得られる部位に挿入した¹¹⁾。刺激装置にはアイソレーテッド 4ch 刺激装置[®] (STG2004 , Multi Channel Systems , Cytocentrics) を使用した。刺激条件は過去の報告を参考にして設定した。パルス幅=40 μ sec , 振幅=パルス幅 40 μ sec での Visual twitch 最小閾値電流の 1.5 倍とした⁷⁾。刺激周波数の違いによる影響を検討するため、75Hz と 8333Hz の 2 つのパターンに設定した。各筋の刺激のタイミングは正常ラットのトレッドミル歩行の筋電図データを基にして¹³⁾ , 左右の足関節主動筋を歩行のリズムで刺激した。刺激中の足関節の関節可動域 (以下 ROM) の経時変化を評価するため、三次元動作解析を行った。三次元動作解析システムは KinemaTracer[®](KISSEI COMTEC CO.,LTD.Japan) を使用した。両側後肢の関節に設置したカラーマーカー (マーカーは両側の腸骨部 , 股関節部 , 膝関節部 , 足関節部 , 足部 MP 関節部皮膚上に設置) を 4 つの CCD カメラで撮影し , 動作解析ソフトを用いて足関節の ROM を算出し , 刺激直後 , 5 分後 , 10 分後 , 15 分後の経時的な変化を評価した。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[®](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 (図 1) 。

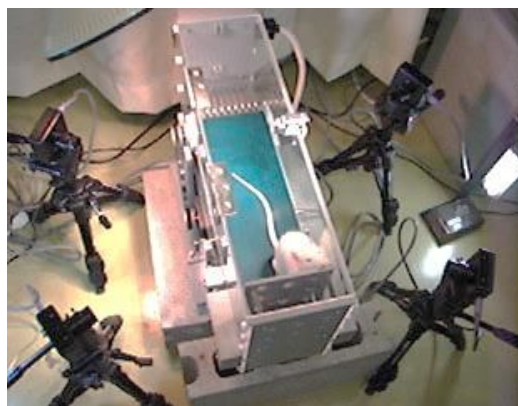


図 1 . 三次元歩行解析

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

機能的神経筋電気刺激 (FNS) 治療中の足関節の三次元動作解析

両側足関節の平均 ROM の経時変化をみたグラフでは , 刺激直後には良好な ROM が得られているが , 5 分後には有意な ROM 減少を認めている (図 2) 。刺激開始直後の刺激 1 cycle (100%) の左右の足関節の平均角度の軌跡のグラフでは , 左右の足関節角度の軌跡から , 歩行刺激のタイミングに合わせて良好な歩行様関節運動が得られていることが分かる (図 3) 。

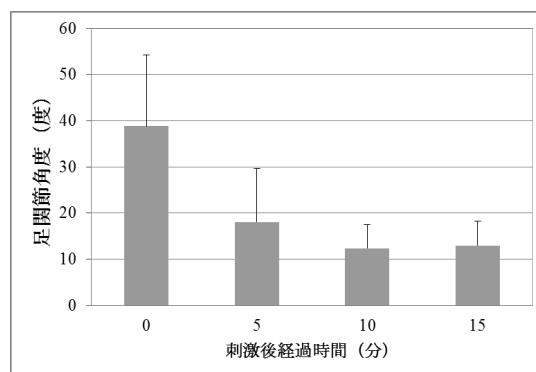


図 2 . 刺激治療中の平均足関節 ROM の経時変化

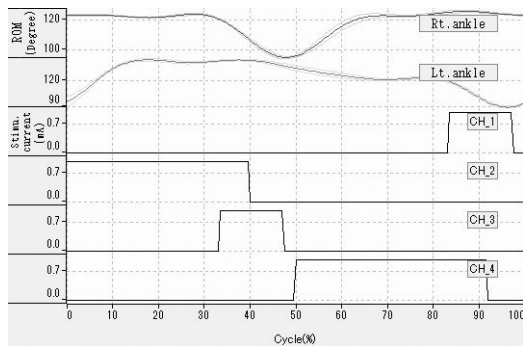


図3 . 刺激中の下肢スティック画像と左右の平均関節角度の軌跡

運動機能評価

BBB スコアは各群間でいずれの時点でも有意差は認めなかった。三次元歩行解析では、歩行周期に各群間での有意差は認めなかったが、左右後肢の接地の位相は、FNS 75Hz 群で改善傾向を認め、FNS 8kHz 群では有意な改善を認めた。また、足関節角度の平均化グラフの軌跡では、治療群において、前額面方向の成分の足関節 ROM の軌跡では、特に FNS 8kHz 群において、遊脚期において正常のパターンに近づいており、Toe clearance の改善を認めた。

<引用文献>

- 1) Ramer LM, Ramer MS, 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, et al. Tapping into spinal circuits to restore motor function. Brain Res Brain Res Rev 1999;30:27-51.
- 3) Field-Fote EC. Combined use of body weight support, functional electric stimulation, and treadmill training to improve walking ability in individuals with chronic incomplete

spinal cord injury. Arch Phys Med Rehabil 2001;82:818-824.

- 4) Perez MA, Field-Fote EC, Floeter MK. Patterned sensory stimulation induces plasticity in reciprocal Ia inhibition in humans. J Neurosci 2003;23(6):2014-8.
- 5) Wirz M, Zemon DH, Rupp R, et al. Effectiveness of automated locomotor training in patients with chronic incomplete spinal cord injury: a multicenter trial. Arch Phys Med Rehabil 2005;86:672-680.
- 6) Bouyer LJ. Animal models for studying potential training strategies in persons with spinal cord injury. J Neurol Phys Ther 2005;29(3):117-25.
- 7) Ichihara K, Venkatasubramanian G, Abbas JJ, et al. Neuromuscular electrical stimulation of the hindlimb muscles for movement therapy in a rodent model. J Neurosci Methods 2009;176:213-224.
- 8) Jung R, Ichihara K, Venkatasubramanian G, et al. Chronic neuromuscular electrical stimulation of paralyzed hindlimbs in a rodent model. J Neurosci Methods. 2009;183(2):241-54.
- 9) Kanchiku T, Lynskey JV, Protas D, et al. Neuromuscular electrical stimulation induced forelimb movement in a rodent model. J Neurosci Methods 2008;167:317-26.
- 10) 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 2009;6(5):055010(Epub).

- 11) 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; 35: 162-9.
- 12) 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)* 2015
- 13) Thota AK, Watson SC, Knapp E, et al. Neuromechanical control of locomotion in the rat. *J Neurotrauma* 2005;22(4):442-465.

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)

寒竹 司、鈴木 秀典、今城 靖明、吉田 佑一郎、守屋 淳詞、末富 裕、西田 周泰、高橋 洋平、田口 敏彦. 急性期ニューロリハビリテーションの確立を目指したラット脊髄損傷後の機能的神経筋刺激治療モデルの開発. 関節外科、査読有、Vol.34,2015,178-185

<http://www.medicalview.co.jp>

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.*, 査読あり, 35(3):162-9., 2012

DOI: 10.1179/2045772312Y.000000009

[学会発表](計4件)

寒竹 司、鈴木 秀典、今城 靖明、吉田 佑一郎、守屋 淳詞、末富 裕、西田 周泰、高橋 洋平、田口 敏彦. ラット脊髄損傷後の機能的神経筋電気刺激治療モデルの確立: 急性期ニューロリハビリテーションの確立に向けて. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会. 2014年10月9日~10日, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

寒竹 司、鈴木 秀典、今城 靖明、吉田 佑一郎、守屋 淳詞、末富 裕、西田 周泰、高橋 洋平、田口 敏彦. ラット脊髄損傷後の機能的電気刺激治療モデルの確立: 再生治療後の急性期ニューロリハビリテーションの確立に向けて. 第41回生体電気物理刺激研究会. 2014年4月5日, 横浜シンポジア(神奈川県横浜市)

Kanchiku T, Imajo Y, Yoshida Y, Moriya A, Suetomi Y, Nishida N, Takahashi Y, Taguchi T. Short-term recovery of interlimb coordination during locomotion in incomplete spinal cord injury rats after less invasive neuromuscular electrical stimulation therapy. 52nd Annual Meeting of International Spinal Cord Society. 2013年10月28日~30日, イスタンブール(トルコ)

Kanchiku T, Suzuki H, Imajo Y, Yoshida Y, Taguchi T. Short-term recovery of interlimb coordination during locomotion in a rodent model with incomplete spinal cord injury after less invasive neuromuscular electrical stimulation therapy. *Neuroscience* 2012. 2012年10月12日~17日, ニューオリンズ(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〕

なしホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寒竹 司 (KANCHIKU, Tsukasa)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30464324

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし