

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350646

研究課題名(和文)リハビリ治療効果を脊髄で評価する基盤研究：In vivoパッチクランプ法を用いて

研究課題名(英文)Scientific research for evaluation of the impact of rehabilitative training in the spinal cord

研究代表者

土井 篤(Doi, Atsushi)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：60619675

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)：ギプス固定した右後肢に対する振動刺激はギプス抜去後の他動的な右足関節背屈可動性、右膝関節の動的機能、歩行能力を改善した。正常マウスの右後肢で痛覚閾値を測定し、左後肢に振動刺激を加えると痛覚閾値の上昇が見られた。生体動物の脊髄後角から単一神経細胞を記録した条件で右後肢にピンポイント痛覚刺激を行うと、抑制性シナプス電流の増加部位は興奮性のそれよりも大きく、その範囲はより近位方向に広がっていた。また、下降性抑制系の一つであるノルアドレナリンは、痛覚刺激による興奮性シナプス電流の増加を有意に抑制した。これらのことは、特に感覚系の定量的改善効果を脊髄後角レベルで確かめるための基盤になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：At first, we investigated the effects of a vibratory stimulus on the sole for motor, sensory, and locomotive function using a mouse cast model. The sole vibration increased the ankle dorsiflexion range and active movement of the knee joint, but not passive knee joint motion and sensory threshold. In the second experiments, two minutes left side vibration modulated the pain-related A-fibers sensory thresholds of the right side. In the third experiments, the area of spontaneous inhibitory post-synaptic currents (sIPSCs) enhancement had much wider than that of spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSCs). In last experiments, we showed noradrenaline had more inhibitory effect for the pinch-evoked sEPSCs enhancement than that of air-puff-evoked sEPSCs enhancement. These results suggested that both quantitative evaluation and intervention-induced improvement can be observed at in vivo patch-clamp methods and behavior ways.

研究分野：神経生理学

キーワード：運動評価 感覚閾値評価 行動評価 キャスト固定モデル動物 治療効果 in vivo パッチクランプ法  
脊髄後角

## 1. 研究開始当初の背景

リハビリテーション医療において、その評価は主観的なものが主であり、特に感覚の定量的評価、運動や物理的刺激に対する効果の検証が定量的評価として十分になされているとは言い難い。

## 2. 研究の目的

そこで生体動物を用いて電気刺激や熱刺激による疼痛閾値の定量化、キャスト固定モデル動物を用いた物理的刺激の定量的効果検証を行うと共に、脊髄後角への感覚入力を単一神経細胞記録法 (*in vivo* パッチクランプ法)を用いて、触覚刺激や痛覚刺激など物理的感覚刺激を加えた時に起こる感覚応答の違い、脊髄後角における各種刺激による興奮性入力と抑制性入力の相違、各種刺激に対する下降性抑制系を介した抑制程度の違いについて検討した。これらの実験により、リハビリテーション領域での治療効果を脊髄後角で評価する基盤研究とした。

## 3. 研究の方法

3-1 動物を用いた電気・熱刺激による定量的疼痛閾値測定と振動刺激による疼痛閾値の影響を検討すること。

3-2 脊髄後角内の単一神経細胞応答を *in vivo* パッチクランプ法を用いて記録し、脊髄後角における感覚入力の違いや興奮性及び抑制性入力の違いを明らかにし、ノルアドレナリンによる下降性抑制系の影響が感覚入力の違いによる変化の検討すること。

## 4. 研究成果

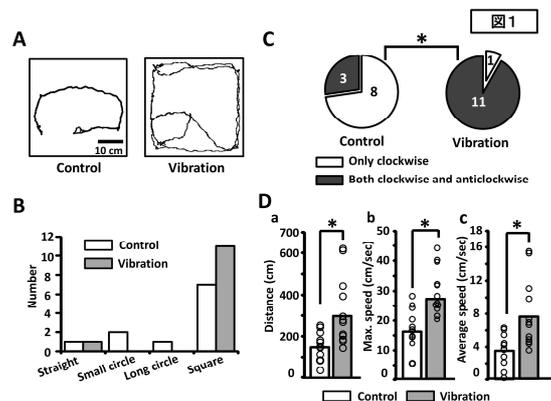
4-1 動物を用いた電気・熱刺激による定量的疼痛閾値測定と振動刺激による疼痛閾値の影響

### 4-1-1 振動刺激がキャスト固定マウスの関節可動域と感覚閾値に及ぼす影響

右後肢にキャスト固定した間に、右後肢の足裏に振動刺激を行なう群 (vibration 群) と振動刺激を行なわない群 (control 群) の 2 群に分け、右後肢の膝関節伸展可動性と感覚閾値の変化を検討したが、振動刺激はそれらに対して改善効果を示さなかった (図は発表論文 4 を参照の事)。

### 4-1-2 振動刺激がキャスト固定マウスの行動に及ぼす影響 (図 1)

Vibration 群は control 群に比し、明らかに動きが良かった (図 1 A)。歩行軌跡の形を分析すると、control 群と vibration 群では変化が無かったが (図 1 B)、control 群は時計回りと反時計回りの両方向に動く例が全体の 27% (11 例中 3 例)であったのに対して、vibration 群では 92% (12 例中 11 例)と統計学的に有意な差があった (図 1C、 $p = 0.002$ )。またマウスが



歩行している間の距離 (図 1 Da) 最大速度 (図 1 Db) 平均速度 (図 1 Dc) を比較すると、vibration 群が control 群に比し統計学的に有意な高い値を示した ( $p = 0.002-0.003$ )。

### 4-1-3 振動刺激がキャスト固定マウスの立脚相、遊脚相、足底面に及ぼす影響

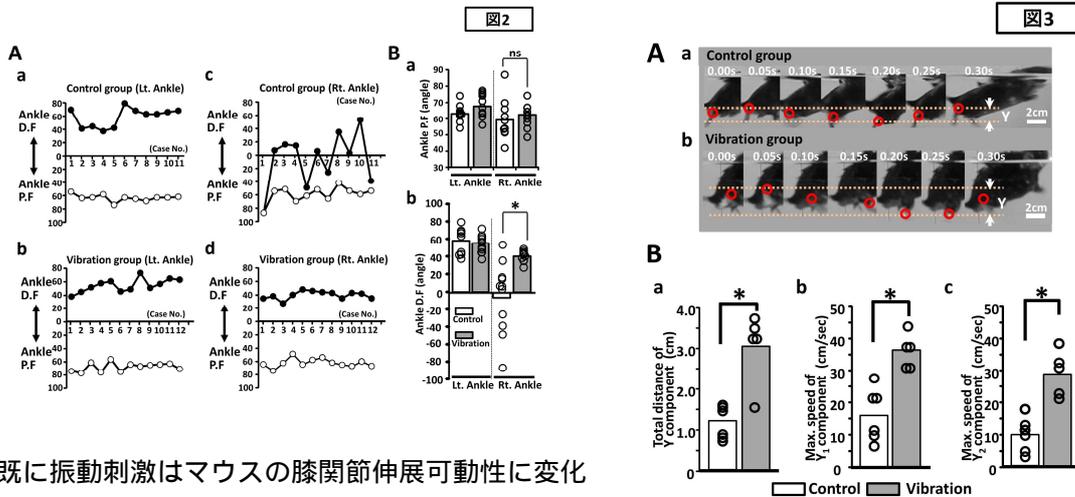
Control 群、vibration 群ともに、右後肢が左後肢に比し遊脚相の割合が高かった ( $p = 0.03$ )。左足底面積に対する右足底面積の割合 (%) は、vibration 群が control 群に比し、有意に大きな値を示したが、一步の歩幅は変化がなかった ( $p = 0.117$ ) (図は発表論文 4 を参照の事)。

### 4-1-4 振動刺激がキャスト固定マウスの足関節可動性に及ぼす影響 (図 2)

Control 群の足関節背屈角度が vibration 群に比し、有意に低い値を示していることがわかっ

た (図 2、 $p = 0.001$ )。

#### 4-1-5 振動刺激がキャスト固定マウスの膝関節の動的可動性に及ぼす影響 (図 3)



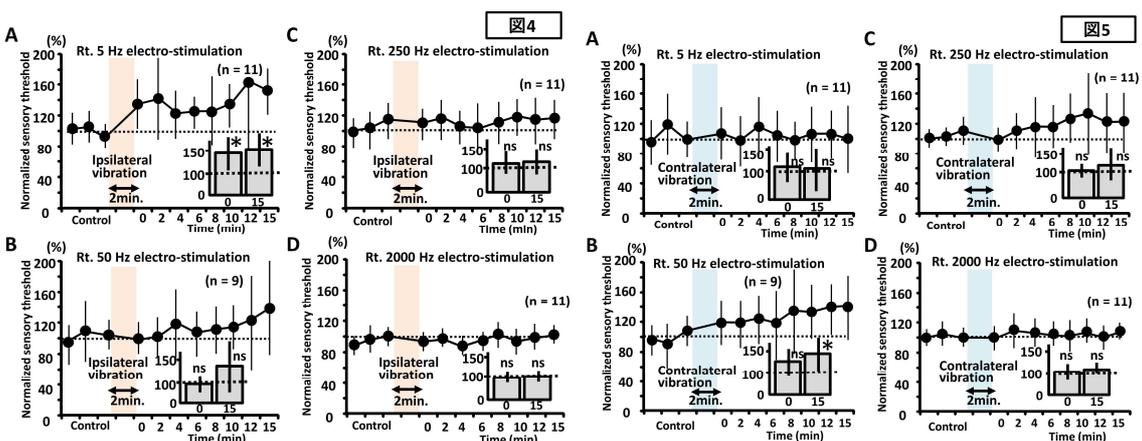
既に振動刺激はマウスの膝関節伸展可動性に変化をもたらさないことは示したが、膝関節の動的

可動性に違いがあるかもしれないと考え、評価を試みた。しかしながら、歩行動作においては足関節の背屈可動性の違いがあるために、マウスに水泳動作を行わせ、その間の膝関節の動的可動性を評価した (図 3A)。その結果、マウスの伸展動作及び屈曲動作の速度、及び上下方向の最大距離に有意な差が認められた。それ故、右後肢の足裏に対する振動刺激は、マウス右後肢の膝関節における動的可動性に働きかけていた (図 3B,  $p = 0.01-0.007$ )。

#### 4-1-6 正常マウスにおける電気周波数の違いによる感覚閾値の変化

キャスト固定マウスに対して、振動刺激は感覚閾値に影響を与えないことは前述した。しかしながら、キャスト固定マウスに用いた電気刺激は 2000Hz の周波数であり、この周波数は触刺激に関わる A 線維を刺激している可能性がある。それ故、今回は 5Hz、50Hz、250Hz そして 2000Hz の 4 種類の電気刺激周波数を用いて感覚閾値の測定を行った。その結果、2000Hz の電気刺激による感覚閾値のみが有意に高いことがわかった (図は発表論文 1 を参照の事)。

#### 4-1-7 右側と左側後肢に振動刺激を加えた前後での右側後肢の感覚閾値変化 (図 4、図 5)



正常マウスの右後肢で感覚閾値を測定し、右後肢に振動刺激を加えた時、5Hz の電気刺激における感覚閾値が有意に上昇していたが (図 4A) 他の電気刺激 (50Hz、250Hz、2000Hz) では感覚閾値の変化は無かった (図 4B-D)。次に右後肢で感覚閾値を測定し、左後肢に振動刺激を加えた時、50Hz の電気刺激における感覚閾値が有意に上昇したが (図 5B) 他の電気刺激 (5Hz、250Hz、2000Hz) では感覚閾値変化は無かった (図 5A、5C-D)。

#### 4-1-8 熱刺激を用いた定量的感覚閾値測定方法の確立

レセルピンの投与による線維筋痛症モデル (FM) マウスを用いて、熱刺激による定量的感覚閾値の測定を試みた。レセルピン投与前に比し、FM マウス作製後の方が有意に感覚閾値が低下していた (論文準備中のため、詳細なデータと図は示していない)。

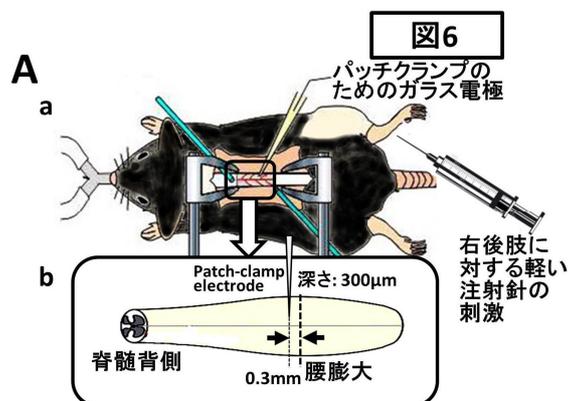
##### 研究成果 4-1 のまとめ

当初、振動刺激は固定側の他動的な膝関節伸展可動性と感覚閾値に改善効果があると予想したが、全く効果がなかった。キャスト固定マウスにおける固定側後肢に対する振動刺激は行動に変化をもたらしたが、それは足関節背屈可動性の改善と共に、膝関節の他動的な伸展可動性ではなく膝関節の機能的な動きの改善にも寄与していることが水泳動作の解析を行わうことで解明された。さらに右側のみならず左側末梢部の振動刺激による右側感覚閾値の上昇は、中枢神経系にも作用していることを示すものである。以上の結果は、疾病を有する入院患者に対して早期から足底部に振動刺激を行うことが社会復帰あるいはスポーツ復帰への手助けをするかもしれないことを示唆するものである。

#### 4-2 脊髄後角における感覚入力の違いや興奮性及び抑制性入力の違いを明らかにすると共に、ノルアドレナリンによる下降性抑制系が感覚入力の違いによって影響するのか検討する。

##### 4-2-1 生体マウスの脊髄後角における興奮性シナプス後膜電流と抑制性シナプス後膜電流の測定確立と単一細胞における後肢支配領域の違いについて (図 6)

マウスを麻酔下にての脊髄背側部を露出した条件下で、脊髄後角にある 1 個の神経細胞にガラス電極を当て、興奮性シナプス後膜電流 (sEPSCs) 抑制性シナプス後膜電流 (sIPSCs) を別々に測定することができる (*in vivo* パッチクランプ法) (図 6)。それら 2 種類の電流を別々に記録中、注射針で右後肢を刺激すると sEPSCs の増加した右後肢支配領域に比較し、sIPSCs の増加した後肢支配領域の面積の方が大きく、且つ中枢方向に広がっていた (論文提出中のため、詳細なデータと図は示していない)。



##### 4-2-2 触刺激に対する EPSCs 振幅の増強とノルアドレナリンによる修飾作用

EPSCs の記録条件下で、エアパフ刺激 (触覚) とピンチ刺激 (痛覚) の 2 種類刺激を用いた。触刺激に対する EPSCs 増強作用が下降性抑制系の 1 つであるノルアドレナリン (NA) の投与に対してどのようにその増強作用が修飾されるのかを検討した。その結果、NA 投与が触刺激に対して EPSCs 増強作用を抑制する例が 43%、増強作用をより強くする例が 43%、変わらない例が 14%であった (論文提出中のため、詳細なデータと図は示していない)。

##### 4-2-3 痛み刺激に対する sEPSCs 振幅の増強とノルアドレナリンによる修飾作用

ノルアドレナリン投与が痛み刺激による EPSCs 増強作用を抑制する例が 76%、増強作用をより強くする例が 10%、変わらないものが 14%であった (論文提出中のため、詳細なデータと図は示していない)。

##### 研究成果 4-2 のまとめ

ラット脊髄後角に対する *in vivo* パッチクランプ法は 2000 年初頭から精力的に実験が行われて

いたが、マウスの脊髄後角に対するその方法の適応はマウス自体の大きさ、呼吸管理の難しさ等の問題から手技自体の難易度が上がり、あまり行われていないのが実情である。今回の結果はピンポイント痛み刺激による興奮性シナプス後膜電流 (sEPSCs) と抑制性シナプス後膜電流 (sIPSCs) 増強部位の違いや反応域、下降性抑制系に関わるノルアドレナリンに対する触刺激応答や痛覚刺激応答の違いを見つけることができた(現在、論文投稿中)。現在、関節可動域制限のあるモデルや有痛性疾患モデルにこの *in vivo* パッチクランプ法を適応し、従来から提唱されている周辺刺激や物理的的刺激による痛みの抑制(所謂ゲートコントロール理論)の解明、興奮・抑制のバランスの変容、物理的的刺激が sEPSCs や sIPSCs 増強に対する反応性の違いを分析しているところである。それらを解明することにより、正常な状態と種々の病的状態、感覚や痛みの回復程度を脊髄後角で定量的に評価することができるのではないかと考えている。

## 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4件)

- 1) Atsushi Doi, Juntaro Sakasaki, Chikato Tokunaga, Fumiya Sugita, Syota Kasae, Keisuke Nishimura, Yushi Sato, Takako Kuratsu, Sariya Hashiguchi, Min-Chul Shin and Megumu Yoshimura: Both ipsilateral and contralateral, localized vibratory stimulations modulated pain-related sensory thresholds on the foot in mice and humans *J of Pain Research* (Accepted)、査読有り、2018.
- 2) 土井 篤: 脊髄後角における感覚伝達とゲートコントロール理論を考える。保健科学研究誌、14巻、2017、16-28  
[https://khsu.repo.nii.ac.jp/?action=pages\\_view\\_main&active\\_action=repository\\_view\\_main\\_item\\_detail&item\\_id=170&item\\_no=1&page\\_id=13&block\\_id=48](https://khsu.repo.nii.ac.jp/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=170&item_no=1&page_id=13&block_id=48)
- 3) 野崎大智、岩切幸一郎、土井 篤: 足関節底背屈等速反復運動による下腿三頭筋の筋硬度上昇は、運動直後の振動刺激によって速やかに低下する。査読あり、保健科学研究誌、14巻、2017、85-94  
[https://khsu.repo.nii.ac.jp/?action=pages\\_view\\_main&active\\_action=repository\\_view\\_main\\_item\\_detail&item\\_id=177&item\\_no=1&page\\_id=13&block\\_id=48](https://khsu.repo.nii.ac.jp/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=177&item_no=1&page_id=13&block_id=48)
- 4) Atsushi Doi, Kazuaki Miyamoto, Yu-shin Nakano, Juntaro Sakasaki, Syota Kasae, Keisuke Nishimura, Min-Chul Shin and Megumu Yoshimura: Sole vibration improves locomotion through the recovery of joint movements in a mouse cast model: *PLOS ONE*、査読有り、2017.  
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0186189>

[学会発表](計 9 件)

- 1) 土井 篤、宮本和明、坂崎純太郎、西村啓佑、笠江省太、吉村 恵: 膝固定マウスに対する足底振動刺激は固定除去後の膝関節可動域に影響を及ぼすのか? 第158回 熊本リハビリテーション研究会 2015年7月(熊本大学)
- 2) 土井 篤、甲斐宏明、岩野寿春、中野優心、宮本和明、坂崎純太郎、西村啓佑、笠江省太、吉村 恵: ギブス固定マウスに対する足底振動刺激は、足関節背屈可動域と行動を変える。第159回 熊本リハビリテーション研究会 2015年12月(熊本大学)

- 3) 土井 篤、中野優心、宮本和明、坂崎純太郎、西村啓佑、笠江省太、園畑素樹、吉村 恵:片側足部への物理的振動刺激によって、マウス両側足部の知覚閾値は上昇する。第8回 日本運動器疼痛学会 2015年12月(名古屋)
- 4) 土井 篤:膝固定モデルマウスに対する足底振動刺激は足関節の動きを改善し、歩行能力に改善をもたらす。第53回 日本リハビリテーション医学会 2016年6月(京都国際会議場)
- 5) 土井 篤、坂崎純太郎、西村啓佑、笠江省太、申 敏哲、中田大揮、吉村 恵:痛覚刺激による脊髄後角膠様質細胞の活動電位は興奮性及び抑制性入力に依存するのか？—シングルケースデューより—。第161回 熊本リハビリテーション研究会 2016年7月(熊本大学)
- 6) 土井 篤、坂崎純太郎、西村啓佑、笠江省太、申 敏哲、中田大揮、吉村 恵:脊髄膠様質細胞における痛覚刺激誘導性の活動電位は興奮性及び抑制性入力に関係するのか？ 第9回 日本運動器疼痛学会 2016年11月25-27日(東京、御茶ノ水ソラシティーカンファレンスセンター)
- 7) 土井 篤、坂崎純太郎、西村啓佑、笠江省太、申 敏哲、中田大揮、吉村 恵:脊髄後角介在細胞に入力する興奮性及び抑制性伝達物質の増強は痛みを誘発させる部位に依存する。第20回 熊本県理学療法士学会 2017年2月26日(熊本保健科学大学)
- 8) 中田大揮、土井 篤、歌 大介、申 敏哲、園畑素樹:Reserpine投与による線維筋痛症モデルマウスへの新規感覚閾値評価および行動評価の試み 第10回 日本運動器疼痛学会 2017年11月17-18日(福島、コラッセ福島)
- 9) 土井 篤、中田大揮、歌 大介、申 敏哲、園畑素樹:線維筋痛症モデルマウス作製後に行う浅い温水内歩行は、早期運動介入方法として有効か？ 第10回 日本運動器疼痛学会 2017年11月17-18日(福島、コラッセ福島)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

土井 篤 (DOI, Atsushi)  
 熊本保健科学大学 保健科学部・教授  
 研究者番号：60619675

### (2)研究分担者

吉村 恵 (YOSHIMURA, Megumu)  
 熊本保健科学大学 保健科学研究科・教授  
 研究者番号：10140641

### (3)研究協力者

園畑素樹 (SONOHATA, Motoki)  
 佐賀大学 医学部 整形外科学教室・准教授  
 研究者番号：50304895

### (4)研究協力者

申 敏哲 (SHIN, Min-Chul)  
 熊本保健科学大学 保健科学部・准教授  
 研究者番号：70596452