

脊髄損傷後発症する痙縮に対する 新たなリハビリテーション治療の確立

名古屋大学大学院医学系研究科 総合保健学専攻
予防リハビリテーション療法学分野
准教授 李 佐知子

(共同研究者)

名古屋大学大学院医学系研究科 総合保健学専攻
予防・リハビリテーション療法学分野 博士前期課程 花崎 拓人

はじめに

中枢神経損傷の一定期間ののち、脊髄反射が亢進することで筋の過度な収縮が生じ、痙縮を発症することが知られている。痙縮は、運動機能回復をはかるリハビリテーション治療の妨げになるとともに、痛みや拘縮など二次障害を引き起こし、患者のQOLを著しく低下させ問題となっている。痙縮治療として、ボツリヌス毒素注射が推奨されている。ボツリヌス毒素は、神経筋接合部の神経伝達物質放出を阻害し、筋収縮自体を抑制することで痙縮を軽減する。そのため、痙縮の軽減とともに、筋の随意収縮も抑制してしまい、運動麻痺を伴う痙縮筋に対する随意収縮を促すリハビリテーション治療は実施できなくなることが問題である。また、痙縮治療の主流として、慢性化し廃用となった痙縮筋に対して治療を行っているが、我々は痙縮発症早期に痙縮を憎悪させない治療が必要と考えている。そこで、痙縮のメカニズムとして知られる脊髄反射の抑制システムの低下に対して、痙縮筋の拮抗筋を支配する末梢神経の電気刺激による相反抑制の強化によって、痙縮による脊髄反射の負のループを軽減し、随意筋収縮を促し神経回路の再構築を促進するリハビリテーション治療法について検討した。

相反抑制を用いた痙縮発症筋に対する拮抗筋（痙縮拮抗筋）電気刺激では、脊髄損傷後の痙縮慢性期に対して、痙縮評価であるModified Ashworth Scale (MAS)や筋電図応答などの痙縮評価では有意な変化はもたらさないものの、伸張反射が誘発される関節角度が有意に減少し、改善したと報告している⁽¹⁾。痙縮抑制を目的とする相反抑制刺激は、痙縮拮抗筋の筋紡錘からのIa求心性インパルスが生じ、脊髄内の抑制性介在ニューロンに連絡し、その後その抑制性介在ニューロンは、痙縮発症筋を支配する α 運動ニューロンへシナプス後抑制を行うことで α 運動ニューロンを抑制し、痙縮発症筋の筋活動を抑制するという機序で作用する。そこで我々は、脊髄損傷後急性期から痙縮拮抗筋に対して電気刺激を行うことで、相反抑制回路が賦活化され、痙縮発症筋に投射する運動ニューロンへの効果的な抑制が可能となり、痙縮が軽減するのではないかと仮説をたてた。また相反抑制刺激によって、痙縮の発症

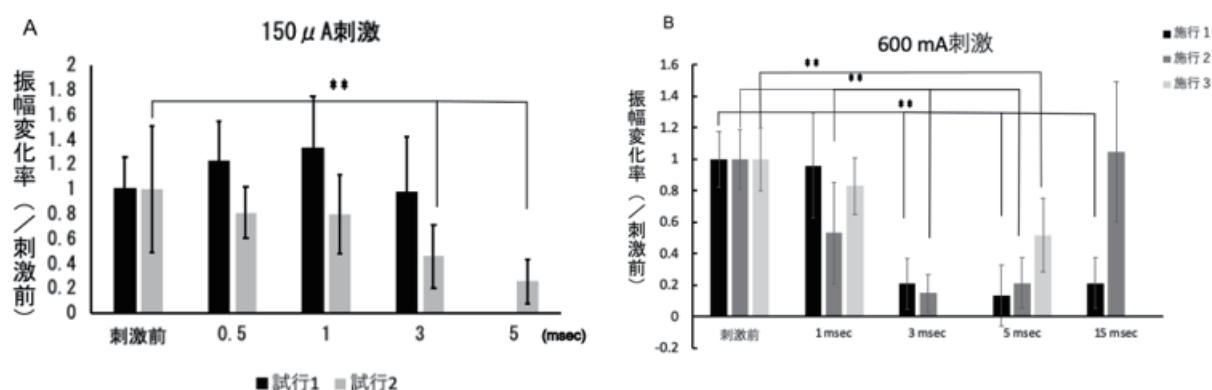
機序として報告されている脊髄抑制性神経回路に可塑的变化を起こせるのではないかと考えた。そこで我々は脊髄損傷モデルマウスにおいて受傷後急性期から痙縮拮抗筋電気刺激を行い、相反抑制賦活化による痙縮軽減効果について検討し、まず相反抑制を賦活化させる拮抗筋電気刺激プロトコルを確立するために最適な拮抗筋電気刺激方法およびその評価法の検討をした。また並行して、脊髄抑制性神経回路の免疫組織化学染色法を用いた解析を行うこととした。

結 果

1) 相反抑制刺激プロトコル確立

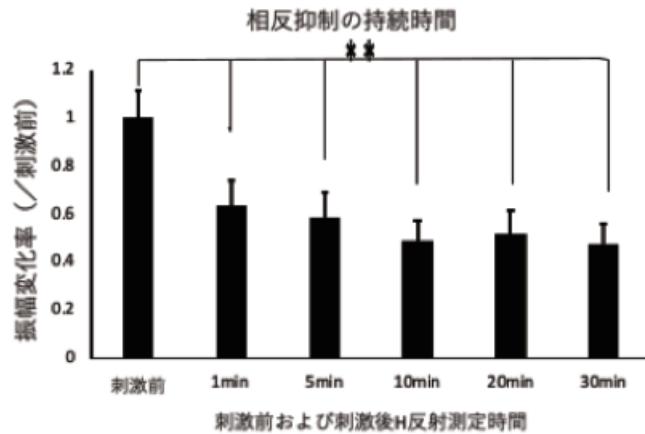
相反抑制は、Chaithanyaら⁽²⁾の評価を参考に、総指伸筋刺激前後のHoffman反射(H反射)の振幅を比較し評価した。また本実験では総指伸筋電気刺激後に小指外転筋のH反射振幅が減弱する場合に相反抑制が誘発されていると定義した。相反抑制刺激のパラメータはパルス幅を200 μ sec、刺激頻度を0.2 Hzとし電気刺激強度は50~200 μ Aで検討した。また、痙縮拮抗筋(本実験の場合総指伸筋)への相反抑制刺激(Conditioning stimulation)と、痙縮筋(本実験の場合小指外転筋)におけるHoffman反射(H反射)の誘発刺激(Test stimulation)の両者の間隔をC-T時間とし、最適なC-T時間の検討を行った。その結果、刺激強度は150~600 μ Aで相反抑制が確認された(図1 A、B)。とくに刺激強度600 μ Aでは目的とする骨格筋の収縮を目視することができた。また、C-T時間は3 msec以降で有意に抑制されることを確認した(図1 A、B)。また相反抑制の持続効果の検討を行ったが、20分間の相反抑制刺激後、1、5、10、20、30分後まで有意に抑制されていることを確認した(図2)。

図1 相反抑制刺激強度およびC-T時間の調節によるH反射振幅変化率



相反抑制刺激は総指伸筋とし、その抑制効果を小指外転筋で測定。縦軸に相反抑制刺激前のH反射の振幅を基準とした変化率。横軸は各施行したC-T時間。平均値 \pm 標準誤差 ** P < 0.01、ANOVA、Tukey-Kramer's post hoc test

図2 相反抑制刺激の抑制持続効果

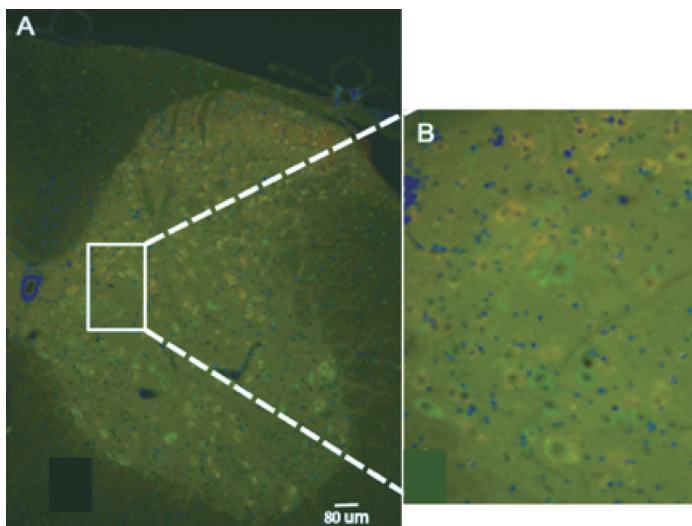


20分の相反抑制刺激を実施後1、5、10、20、30分後のH反射の振幅を刺激前のH反射の振幅を基準とした変化率で表示。横軸は刺激後の時間。平均値±標準誤差 **P < 0.01、ANOVA、Tukey-Kramer's post hoc test

2) 脊髓抑制性神経回路の解析

脊髓損傷後の痙縮機序について、伸張反射亢進は運動神経細胞の過剰な興奮に加え、脊髓抑制性神経回路である前シナプスおよび後シナプス抑制の減弱が一つの要因と考えられている⁽³⁾。前シナプス抑制の抑制性介在神経細胞としてGABA作動性Ptf1a陽性細胞が、また相反抑制の抑制性介在神経細胞としてグリシン作動性EN1陽性細胞が関わるとの報告がある^(4, 5)。抑制性回路の機能減弱については神経生理学的解析による報告があるが、分子生物学的な解析はなされていない。本研究では脊髓損傷後痙縮発症マウスにおいて、脊髓抑制性神経回路の可塑的变化を解析するとともに、脊髓損傷後早期より相反抑制刺激介入を行うことで減弱した脊髓抑制性回路の賦活が生じるかを確認することも目的としている。

図3 抗EN1および抗GAD67抗体の染色像



A) 抗原賦活化条件を検討し染色したEN1 (緑)、GAD67 (赤) のマウス脊髓組織染色写真。(× 10枚倍)白領域：Raxed lamimnae VII領域。B) 白領域の拡大像。(× 40倍) 共局在している細胞は黄色に標識される

免疫組織化学染色法を用い、抗EN1抗体を用いてマウス脊髓組織で染色を試みた。抗原賦活化条件をいくつかふって検討し、結果として10 mMクエン酸バッファー (pH 6.0) を

90度に加温し10分間反応させブロッキング処理した切片に一次抗体としてrabbit anti EN1 antibody (× 200, GTX134013, GeneTex)、mouse anti GAD67 antibody (× 500, K-87, abcam) を反応させたプロトコルで染色像を確認できた(図 3)。Ptf1aや脊髄グリシン作動性抑制性細胞マーカーであるGlyt2の染色条件は抗体の反応条件に制限があり、今後最適な染色条件の検討を実施していく予定である。

考 察

相反抑制の刺激検討結果から、相反抑制刺激の刺激プロトコルが確立した。さらに相反抑制の持続時間は30分までは確認できた。今後は脊髄損傷モデルにおける相反抑制刺激が痙縮軽減に効果があるか、また脊髄損傷後の痙縮による脊髄神経回路の抑制性回路弱化に対して抑制性回路の賦活を起こすことができるかを検討したい。一方、脊髄損傷後の痙縮による抑制性回路弱化の可塑的变化は損傷早期から生じ、さらにそれは慢性期にかけて憎悪することが予想される。このことから、1日20～30分の相反抑制刺激では十分な抑制性回路の賦活がなされない可能性も考えられる。この場合、埋め込み電極による持続的な相反抑制刺激の介入効果についても検討を進めたいと考えている。

脊髄抑制性神経回路の解析については、EN1およびGAD67の染色条件の検討が終了した。抗原賦活化処理を行うことで染色が行えたが、染色条件としては制限が多いことがわかった。今後はPtf1aやGlyt2の染色条件の検討を行う予定であるが、全ての目的タンパク質を免疫組織染色法で確認することは困難な条件と考えられる。また、神経回路の解析には細胞全体を標識する必要がある。抗体を用いた免疫組織化学染色法では抗原を標識することになるため、細胞全体を標識することが難しい。この課題に対して、遺伝子改変動物を用いことで解決できる。今後遺伝子改変動物の導入を検討する。

要 約

本研究は脊髄損傷後痙縮発症に対して、相反抑制刺激による痙縮軽減効果および、脊髄抑制性神経回路の可塑的变化について検討することを目的としている。相反抑制刺激の条件検討として刺激強度の検討とC-T時間の確認を行った結果、刺激強度は600 μ A, C-T時間は3 msecで有意に相反抑制効果を確認することができた。また同プロトコルで20分間の相反抑制刺激介入後30分まで相反抑制を確認することができた。今後は頸髄損傷モデルマウスを用いた相反抑制刺激介入実験を行う予定である。

また脊髄抑制性神経回路の解析について、抗体を用いた染色条件の検討を行った。いくつかの抗原賦活化条件を行うことで染色を確認したが、染色条件としては制限が多いものであった。今後はそのほかに検討している抗体における染色条件を検討するとともに、遺伝子組換え動物なども利用して、神経回路の解析を行えるように検討を予定している。

文 献

1. van der Salm, A., et al., *Comparison of electric stimulation methods for reduction of triceps surae spasticity in spinal cord injury*. Arch Phys Med Rehabil, **87** (2) : p. 222-8. 2006.
2. Mummidisetty, C.K., A.C. Smith, and M. Knikou, *Modulation of reciprocal and presynaptic inhibition during robotic-assisted stepping in humans*. Clin Neurophysiol, **124** (3) : p. 557-64. 2013.
3. Caron, G., J.N. Bilchak, and M.P. Cote, *Direct evidence for decreased presynaptic inhibition evoked by PBSt group I muscle afferents after chronic SCI and recovery with step-training in rats*. J Physiol, **598** (20) : p. 4621-4642. 2020.
4. Bikoff, J.B., et al., *Spinal Inhibitory Interneuron Diversity Delineates Variant Motor Microcircuits*. Cell, **165** (1) : p. 207-219. 2016.
5. Betley, J.N., et al., *Stringent specificity in the construction of a GABAergic presynaptic inhibitory circuit*. Cell, **139** (1) : p. 161-74. 2009.