

ラット脊髄損傷モデルを用いた電鍼療法の神経
機能改善効果メカニズムの検討

(The mechanism of electroacupuncture therapy
to improve neurological function in spinal
cord injury model rats)

2020 年 2 月

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程

動物構造機能学 生体機能学 獣医生理学

DV1607 宋 朦

目次

緒論	3
第一章 神経上行性伝達遮断の電鍼刺激効果に対する影響	6
1. はじめに	6
2. 材料と方法（実験動物承認番号 140902-9）	8
3. 結果	13
4. 考察	15
第二章 電鍼刺激の神経回路修復に対する影響	18
1. はじめに	18
2. 材料と方法（実験動物承認番号 170324-15）	21
3. 結果	25
4. 考察	26
第三章 電鍼刺激頻度の違いが神経活動に及ぼす影響	28
1. はじめに	28
2. 材料と方法（実験動物承認番号 190424-1）	29
3. 結果	31
4. 考察	32
総括ならびに結論	35
謝辞	37
引用文献	38
表および図	47

参考文献.....	76
-----------	----

緒論

脊髄損傷 (spinal cord injury) は、小動物臨床において多く認められる疾患であり、損傷部位によって、様々な神経機能障害を引き起こし、生活の質を著しく低下させる。主な徴候としては、運動障害や痛み、排尿排便障害などが挙げられる。重度脊髄損傷した動物は一生を通じて飼い主の介護が必要になるため、飼い主に負担が掛かり、安楽死を選択することが少なくない。

脊髄損傷では、交通事故や落下事故などにより、脊柱に強力な外圧が加わる外的原因と、脊髄腫瘍や椎間板ヘルニアなどの内的原因による脊髄が傷つく病態に分けられる。損傷原因および損傷部位によって出現した徴候は異なるが、その病理的メカニズムが類似である。

脊髄損傷の病理変化は、一般的に一次的および二次的損傷に分けられる。脊髄に挫傷、裂傷などの機械的障害が生じることで、細胞膜の物理的破損による出血や続発性の虚血、さらには広範囲のニューロンやグリアの損傷を生じる。脱出した椎間板部質や変位した椎体、硬膜外血腫が進行性圧迫を引き起こし、その圧迫は脊髄灌流に影響を及ぼし、ミエリンおよび軸索に直接障害を与える。一次損傷は、組織破壊の拡大を生じる一連の二次的事象のきっかけとなる。ヘム産物には神経毒性があり、出血により組織内圧を上昇させ、血液や脳脊髄液の灌流低下を引き起こす。重度の場合は、血圧に関して全身性の影響を与える。細胞内イオン濃度の急速な変化により、エネルギー障害や以上興奮が発生し、細胞死に至ることもある。また虚血によりフリーラジカルが産生され、炎症などを引き起こし、神経細胞のアポトーシスを誘導する。上述した急性病態変化の後、病変部位が安定化する。アストロサイトで構成するグリア瘢痕が病変部位の境界を生成し、損傷した組織がマクロファージによって除去され、嚢胞腔が残る。時間経過とともに、病変部位における脳脊髄液流の障害が脊髄空洞症を発生する。一方、瘢痕組織が形成されると、神経線維や軸索が容易に通過できないため、脊髄機能の再生は阻害される[1]。

現在、小動物臨床において脊髄損傷の治療としては、手術、保存療法、再生医療、鍼療法・電鍼療法などが挙げられる。その中で、鍼療

法・電鍼療法では各グレード（表 1）の脊髄損傷に対して明らかな回復効果があると経験的に認められている。椎間板ヘルニアの動物に対しては、手術治療をしなくても治癒された症例があり、特に麻酔導入することに危険性がある動物に対しては理想的である。鍼療法・電鍼療法は、副作用がなく安全性が高い治療法とされている。

鍼療法(acupuncture)とは、身体に鍼を用いて刺激を与えることで、多様な疾病への治療的な介入や健康増進を目指す医療技術であり、中国伝統医学で用いられる治療法のひとつである。獣医鍼術の起源は人類が野生動物を馴化し家畜にした原始社会時代に遡る。最初の獣医鍼灸専門書は紀元前 659-621 年に著した『伯楽鍼経』であり、その後、中国伝統医学最初の理論体系として 200 年前後に成立した『黄帝内经』の影響を受け、獣医鍼灸の発展も促進された。したがって、鍼灸療法は臨床経験を積み重ねる上で、形成された物理的な治療法である。そして、電鍼療法(electroacupuncture)は鍼療法に基づいて電気刺激を併用し、鍼のみの刺激に比べてより高い効果を求めている治療法である。近代の小動物臨床において多く利用されている。

鍼の刺激点は穴位という。中国伝統医学では、体の表面には数百個の穴位があり、それぞれの穴位は経絡の途中に分布している。経絡は内臓と体の表面を繋げ、特定の規則（病気によって、作用する穴位と経絡が異なること）に基づいて全身に分布し、体の中の気血榮衛（生きるために必要なもの。例えば、栄養物質、免疫力などのようなもの）を輸送する通路と考えられている。経絡が正常に流れている時は健康であるが、流れが滞ると病気が発生する。穴位を刺激することによって、滞った経絡を疎通し、病気の治療と保健の目的を達することである。

そこで、動物臨床で脊髄損傷の治療に用られている穴位は損傷の部位や症状によって変わるが、その中に後肢麻痺の治療に使われている最も重要な穴位は足三里(ST36)である。ST36 は足の陽明胃経（足から頭までに走行して胃などの消化システムに連絡する経絡）に属す穴位のひとつであり、解剖学的な位置として脛骨の顆結節と腓骨小頭下方の間隙の中で取穴する[2]。中国伝統医学の考えでは、ST36 を刺激すると、消化システム機能を促進することによって全身栄養状態が上がり、全身状態の回復を促進しながら、後肢までの滞った経絡を疎通

し、後肢麻痺などの症状を改善する。

近代の研究により、脊髄損傷に対する鍼療法・電鍼療法効果として痛みおよび炎症の改善[3][4]や神経細胞アポトーシスの抑制、ひいては神経保護効果を発揮している[4]。そして、脊髄微循環の血流増加作用[5]や神経栄養因子の分泌促進作用により、神経修復を促す[6]。しかし、これらの効果が末梢の穴位からどのような経路を通して脊髄修復を促進しているか、さらに、これらの効果は何でコントロールしているかは不明であった。

末梢神経を切断することにより、鍼の作用がみられなくなること[7][8]やMRIで穴位の刺激による脳の興奮の観察[9][10]、また、鍼による鎮痛作用や内臓機能の調節作用、顔面神経機能異常、癲癇に対する治療効果[11][12][13]から、鍼療法と神経システムは深く関連すると考えられている。

したがって、脊髄損傷の治療に対して鍼刺激が末梢神経の興奮を引き起こし、その興奮が上行性に伝わり、中枢神経に達して神経修復を促進する可能性が考えられる。本研究で、この仮説を証明するために、ラットの脊髄損傷モデルを用いてST36で電鍼刺激を行う前に、神経伝達を可逆的に遮断し、それが電鍼効果に及ぼす影響を評価した。そして、電鍼刺激が神経路修復に対する影響を調べるために、神経順行性トレーサー試薬を用いて脳から脊髄への皮質脊髄路(corticospinal tract, CST)の状態を調べた。同時に、軸索再生に関与するサイトカインをタンパク質レベルで評価した。さらに、ノーマルラットを用いて電鍼刺激の効果を影響する要因である刺激頻度の変化による神経誘発電位に及ぼす影響を検討した。

第一章 神経上行性伝達遮断の電鍼刺激効果に

対する影響

1. はじめに

本章では、神経上行性の興奮伝達が電鍼刺激による損傷回復に関与するかを調べるために、薬理的な可逆的神経遮断法を使用し、脊髄損傷ラットに電鍼刺激を実施する際に後肢の神経伝達を遮断した。そして、神経電気生理学および行動学方法でラットの回復状況を評価した。

脊髄損傷の研究に用いるモデルは、臨床相似性や損傷の強さの再現性・安定性が求められている。脊髄挫傷モデルは、安定した後肢の完全麻痺を作成することができる。また、病理学的には組織の挫滅や出血、虚血、炎症および広範な壊死、空洞状態が認められるという点で、臨床に最も近いモデルであると考えている[14]。このような理由で、本研究では脊髄組織を露出した後に上から一定強さの衝撃を与えることで作成する脊髄挫傷モデルを採用した。

薬理的な可逆的神経遮断法は神経切断と比較して、神経組織の連続性が保られる利点がある。したがって、本実験では局所麻酔薬であるリドカインを用いて神経遮断を行った[15]。リドカインは、毒性が弱く、十分な神経遮断効果を発揮するため、広く使用される。一方、ST36の近くに脛骨神経、総腓骨神経、後腓腹皮神経およびその分支が分部している。この三つの神経は、坐骨神経に合流して脊髄に到達する。そのため、坐骨神経を上部から遮断することで、電鍼刺激による神経上行性伝達を遮断できると考えている。

電気生理学的検査は、神経学的検査や画像診断法で検出困難な神経系機能を評価できる重要な検査であり、神経経路や神経機能を敏感かつ客観的に評価することができる。本研究では、損傷された脊髄神経路の機能を調べるために、末梢神経から脊髄背索の体性感覚経路を上行して大脳皮質体性感覚野へ至る感覚神経路の機能を検査する体性感

覚誘発電位 (Somatosensory Evoked Potential, SEP) 検査を利用した。

行動学評価は、Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) テストを使用して後肢運動および体の協調性に関わる項目に着目し、ラットの運動能力を評価した。

一方、リドカイン投与による神経遮断は坐骨神経に毒性を与えるかを確かめるために、脊髓腹角運動ニューロンの全長に渡って評価できる誘発筋電図検査である F 波 (F-wave) 検査を用いて坐骨神経の神経伝導機能を調べた。そして、組織学検査であるヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色で、リドカイン投与部位付近の坐骨神経組織を評価した。

2. 材料と方法（実験動物承認番号 140902-9）

1) 実験動物

本実験は麻布大学実験動物指針に従って行った。オス Sprague Dawley ラット（SPF、7 週齢；日本エスエルシー株式会社、静岡）を実験に供した。麻布大学生物科学総合研究所で飼育した。ラットを 3 匹/ケージ（20cm×38cm×24cm）、室温 23±2℃、湿度 60%±10%、6:00-18:00 の 12 時間照明の環境下で飼育した。水と餌（CRF-1；日本チャールス・リバー株式会社、横浜）は自由に摂取させた。動物の管理は麻布大学の動物実験ガイドライン（2000 年 4 月）に従って行われた。ラットは搬入 1 週間後に実験に供した。

2) 実験の流れ

リドカイン投与による坐骨神経に対する毒性の有無の実験では、ノーマルラットをコントロール群（Control 群、4 匹）と神経遮断群（Lido 群、5 匹）に分けられた。Lido 群のラットにリドカインを毎日 1 回で、14 日間に反復投与した。実験の第 1、3、7、10、14 日目に、Control 群と Lido 群に F 波検査を実施した。また、Lido 群の F 波検査は当日のリドカイン投与前に実施した。実験の最後にラットを安楽死させ、各群にラット 1 匹ずつを用いて HE 染色を行い、リドカイン投与部位付近の坐骨神経組織を観察した。

神経可逆遮断が脊髄損傷ラットに対する電鍼刺激効果への影響の実験では、最初に SEP を記録するための電極をラットに移植した。4～5 日後にすべてのラットに脊髄損傷モデルを作成し、ランダムに脊髄損傷群（SCI 群、6 匹）、脊髄損傷＋電鍼刺激群（SCI-EA 群、6 匹）、脊髄損傷＋神経遮断＋電鍼刺激群（SCI-NB-EA 群、6 匹）に分けた。SCI-EA 群 と SCI-NB-EA 群における電鍼刺激は脊髄損傷直後から毎日に実施した。神経遮断では SCI-NB-EA 群において毎日の電鍼刺激を行う直前に実施した。また、脊髄損傷モデルを作成した 1、3、7、10、14 日目に、各群に SEP 検査および BBB テストを実施した。実験の最後にラットを安楽死させた。

3) 脊髄損傷モデル

脊髄挫傷モデルは、自制ラット脊髄損傷打撃装置を用いて行った(図 1)。1%イソフルラン(MSD アニマルヘルス株式会社、東京)麻酔(MODEL TK-4; 株式会社バイオマシナリー、千葉)下でラットの第 8-9 胸椎の椎弓を切除し、露出した脊髄硬膜の上 20mm から先端直径 2mm、10g のロッドを落下させることで作製した。

4) 電鍼刺激

電鍼刺激はラットを 0.5%イソフルラン麻酔下で、0.2×25mm 鍼(蘇州鍼灸用品有限公司、中国)を使い、ラットの両後肢にある ST36 (脛骨の顆結節と腓骨小頭下方の間隙内、図 2) に刺して低周波治療器(ラスパークス; 株式会社テクノリンク、新潟)に接続し、1Hz の刺激頻度で 20 分間に電鍼刺激を実施した(図 3)。

5) 神経遮断

ラットをイソフルラン麻酔下で横臥位とし、1%リドカイン(ナガセ医薬品株式会社、兵庫)を両側の坐骨神経の通過点(大転子と坐骨結節の間)に 0.5ml ずつ、注射することで、坐骨神経の神経伝導を遮断した(図 4) [15]。

坐骨神経完全遮断の場合は神経興奮伝達が脊髄腹角運動ニューロンに達しないため、F 波が完全に消失することで、神経遮断を確認できる。予備実験より、ラットにリドカインを坐骨神経に注射してから 5 分後から 30 分間は十分に神経伝導が遮断されることを、F 波検査にて明らかにした(図 5)。したがって、本研究では SCI-NB-EA 群において、リドカイン注射の約 5 分後に電鍼刺激を 20 分間に実施することが、電鍼刺激期間に十分な神経遮断効果を維持したと考えられた。

6) 電気生理学的検査

本研究で用いた電気生理学的検査はF波検査およびSEP検査である。

F 波検査

F 波は末梢運動神経の最大上刺激によるインパルスが生理的な伝導方向と逆行性に脊髓腹角運動ニューロンを興奮させた後、再び順行性インパルスを生じ、筋肉まで伝導して誘発される複合筋活動電位であり、運動ニューロン全長の機能を反映する。F 波検査では、神経伝導性や興奮性の評価に有用である（図 5）。末梢運動神経に一回の刺激で全てのニューロンで興奮が生じるわけではなく、毎回の刺激で同じニューロンが興奮しているわけではないため、F 波検査では反復刺激（10 回以上）が必要であり、運動ニューロン細胞体の興奮性が F 波出現率や F 波平均振幅などのパラメーターで評価し、運動線維の伝導性が F 波最小潜時で評価する[16]。本章では、坐骨神経全体の機能を評価するために、F 波出現率および F 波最小潜時の 2 つパラメーターを用いて実験した。

F 波検査は誘発反応測定装置（筋電図・誘発電位検査装置 MEB-9400 シリーズ ニューロパック S1；日本光電工業株式会社、東京）を用いて測定を行った。ラットを 1 %イソフルラン麻酔下で腹臥位させ、測定する足に以下の 3 つの電極が付けられた。記録電極（針電極）を足底表面から骨間筋に挿入し、不関電極（針電極）を第 5 趾の側面に挿入し、基準電極（皿電極）を踵の側面に貼り付けた。刺激針電極から足首の脛骨神経に 1Hz、M 波（M-wave）最大振幅が得られる刺激の 120 %の強度で、ラットの足首を 32 回連続刺激し、F 波を記録した（図 6）。F 波出現率（F-wave occurrence rate）は刺激回数に対して F 波が出現した割合である。F 波最小潜時（minimum F-wave latency）は記録した F 波のうちに潜時が最小のものである。

SEP 検査

SEP は感覚刺激によって誘発され、末梢神経から脊髓背索の体性感覚経路を上行し、大脳皮質体性感覚野へ至り、頭皮上あるいはその走行経路上に設置した記録電極から導出することができる。SEP 検査は、末梢神経から皮質までの体性感覚系経路の機能評価に有用な検査法である[16]。一方、運動路は特異的に調べることはできないが、SEP で

興奮が伝わる感覚路が運動路と隣接している部分が多いため、運動路に関する情報を SEP 検査によって推測できることが多い[17]。SEP は遠隔電場電位であるため、検出する際には複数回（100-1,000 回）の刺激による記録を加算平均処理を行うことで、背景脳波成分が相殺されて消失し、遠隔電場電位だけが記録される。本研究では SEP 振幅 (SEP amplitude) を測定することによって脊髄内の損傷および回復状況を評価した。

SEP 測定の前 3-4 日前に、ラットの頭蓋骨に測定用電極を植え込まれた。手術は 1 % イソフルラン麻酔下で、ラット頭部を剃毛して皮膚を切開し、頭蓋骨膜を切除した。頭蓋骨を露出し、以下の 4 つのネジ電極（±ネジ W 1.4×3.0；株式会社サンニシムラ、大阪）を頭蓋骨に埋め込まれた。不関電極は眼窩に平行する鼻骨に、記録電極は Bregma より尾側に 3mm、両側方に 1mm に、基準電極は頭頂骨の中央部に設置された（図 7）[18] [19]。電極は硬膜または他の脳構造を圧迫しないように、硬膜と軽く接触するように配置された。その後、適量の歯科用セメント（ハイボンド カルボセメント；株式会社松風、京都）を用いて、ネジを頭蓋骨に固定した。

SEP 測定では、ラットの体温を 36.8℃（±0.1℃）に維持し、1 % イソフルラン麻酔導入 30 分後に測定を開始し、測定装置は誘発反応測定装置を用いた。ラットを腹臥位させ、脳に電極を接続後に、足首の脛骨神経を頻度 1Hz、強度 1mA で刺激した。予備実験より、200 回の平均加算が適切であると判断したため、200 回平均加算した波形を 2 つ測定し、これらを 2 つ平均した数値、さらに両足から得た数値を平均して評価の指標とした（図 8）。

7) 運動機能評価

運動機能評価は脊髄損傷の機能回復に対して重要な評価指標である。BBB テストは動物の運動能力（関節運動、後肢運動、ステップ、前後肢の調和、体の安定性、爪と尾の位置）を目視で 0-21 点にスコアリングし、回復状況を早期（BBB スコア 0-7）、中期（8-13）、後期（14-21）に分けられる（表 2）[20]。

ラットを 1 m² のオープンフィールドにて自由活動させ、自発運動を実

験者2名で5分間観察し、その運動能力を目視でスコアリングした[21]。

8) 坐骨神経採材および組織学評価

ラットを1%イソフルラン麻酔下で、大転子と坐骨結節の間付近の坐骨神経を分離して採材し、10%中性緩衝ホルマリン液（富士フイルム和光純薬株式会社、大阪）中で、4℃、一晩に固定した。その後、サンプルをパラフィン包埋を行って、5μmの厚さに薄切し、HE染色を行った。これらの標本を顕微鏡（×400、Axio Scope.A1；カール・ツァイス、ドイツ）で観察された。

9) 統計

全てのデータは平均値±標準誤差で示した。統計分析はExcelのベルカーブで実行した。各群間の比較はpaired Student's t-testまたはBonferroni testで解析を行った。すべての値は $P < 0.05$ で有意差がありとした。

3. 結果

1) 坐骨神経機能検査

F波出現率は32回の連続刺激で、すべてにF波が記録したのを100%とした。14日間のリドカイン反復投与において、投与開始後の3日目 ($P < 0.05$)を除き、Lido群とControl群に比べ、明らかな違いは観察されなかった(図9A)。F波最小潜時では、14日間のリドカイン反復投与において、Lido群とControl群に比べ、明らかな違いが認められなかった(図9B)。

2) 坐骨神経組織学観察

Control群坐骨神経のHE染色によって、正常な坐骨神経の構造が観察された。異なるサイズの有髄神経は大量に存在することを確認した。横断された線維は中心にある点状な軸索とその周りに消失したミエリン鞘で構成され、縦断された軸索は波線として現れ、好塩基性に染めたのはシュワン細胞核であった。さらに、いくつかの小さな血管が神経線維の間に散在した(図10A)。Lido群の組織切片はControl群と同様な組織構造を呈した。炎症性細胞の浸潤や脱髄、空胞変性などの典型的な神経病理学的変化は観察されなかった(図10B)。

3) SEP 検査

脊髄損傷前にSCI群、SCI-EA群およびSCI-NB-EA群のSEP振幅の値は、それぞれ(60 ± 7)、(72 ± 6)および(48 ± 6) μV でした。各群間に統計的な有意差は認められなかった。脊髄損傷による各群のSEP振幅は手術前と比較して著しく低下した。次の7日間で、SCI-EA群のSEP振幅は徐々に回復し、7日目 ($P < 0.05$)、10日目 ($P < 0.01$) および14日目 ($P < 0.01$) のSEP振幅はSCI群およびSCI-NB-EA群と比較して有意に上昇した。一方、SCI群とSCI-NB-EA群との間で、統計的な有意差は認められなかった(図11)。

4) BBB テスト

ノーマルラットにおいて運動能力が正常のため、BBB スコアは 21 である。脊髄損傷を与えた直後に BBB スコアが著しく低下し、すべてのラットの後肢は麻痺して前肢で体を引いて動いた。後肢の自発運動は実験期間内においてすべての群が徐々に改善され、14 日目に一部のラットにおいて歩行が回復した。ただし、前後肢の調和や体の安定性が異なる、14 日目に SCI-EA 群の BBB スコアは SCI 群 ($P < 0.05$) および SCI-NB-EA 群 ($P < 0.01$) と比較して有意に高かったが、SCI 群と SCI-NB 群との間で、統計的な有意差は認められなかった (図 12)。

4. 考察

本章では、ラットの脊髄を背側から物理的に打撃することで脊髄損傷モデルを作成し、ST36 での電鍼刺激による脊髄機能回復を行動学的ならびに電気生理学的で評価した。さらに ST36 電鍼刺激の伝達経路の可能性のある坐骨神経を、リドカインを用いて電鍼刺激の直前に遮断することで、電鍼刺激による脊髄機能改善効果が消失するか否かについても評価した。なお、リドカイン反復投与が坐骨神経に対する作用を確認するために、リドカインを 14 日間反復投与ラットとノーモラルラットを用いて、坐骨神経を電気生理学的および組織学的の違いがあるかを評価した。

リドカインはナトリウムチャネルを可逆的に遮断し、活動電位を不活性化することにより、神経伝達を遮断している。これによって末梢からのシグナルが上位ニューロンへの伝導を可逆的にブロックする。本実験では、リドカインを 14 日間反復投与にわたって F 波最小潜時が投与なしのラットと比較して有意な違いはなかった。そして、F 波出現率がリドカイン反復投与後の 3 日目で変化した。他のすべての日では投与なし群に比べ、統計学的な差は認められなかったため、3 日目においての変化は意義がないと判断している。さらに、組織病理学的分析により、リドカインを 14 日間反復投与後、その注射部位の近くの坐骨神経組織は正常であることを確認した。これらの結果より、14 日間のリドカイン反復投与は運動神経に毒性がないことが示唆された。したがって、リドカインを用いて神経を選択的かつ一過性に遮断する方法は、中長期（14 日間）の研究に信頼できる方法と考えている。

小動物臨床において、脊髄損傷の好発部位は第 1-2 腰椎間が多く見られていると言われるため、予備実験において、ラットの第 1-2 腰椎間の損傷モデルを作ったが、急性期においてもラットの歩行障害が認められなかった。ラットの第 1-2 腰椎が馬尾に近いこと、脊髄損傷モデルの作成は困難であった可能性が考えられている。実際に、ラットの第 1-2 腰椎の脊髄を採材して確認した所、馬尾の形に類似していた（図 13）。一方、本実験の目的に即した論文を参考にして、第 8-9 胸椎を損傷する場所にした。

SEP 検査は X 線や超音波画像診断技術で検出できない神経の機能を、

長期間にわたり繰り返し評価できる電気神経生理学的検査法である。しかし、SEP の測定には環境による影響が大きい。比較的に安定な値を得るため、以下の項目について予備検討を行った。

SEP は麻酔の影響を受けやすいと報告されている[22]。予備実験において、麻酔の深度が深いと時間経過に従い SEP が極端に低下したために、麻酔濃度を 1% とし、麻酔導入後に神経機能が安定するまで 30 分ほどは待機することとした。

ラットの正常体温はおよそ 36.5-37.5℃で、これより低かったり高かったりすると、SEP 振幅の測定値に影響が出た。温度が代謝に影響を及ぼすことで、SEP が変化すると考えられている[23]。予備実験より、体温変動の幅が狭いほど、SEP の測定結果が一定するが、37.0℃を超えると SEP の振幅が小さくなるため、ラットの体温を 36.8℃ (± 0.1℃) に維持して測定した。

末梢の刺激頻度と強度の条件は各研究施設により異なる。本研究では、予備実験より、1Hz の刺激で引き起こされる SEP が最も安定していた。電気刺激強度には明らかな影響がないため、足の反応を見て 1mA で十分であることが明らかとなった (通常 0.5mA-5mA 範囲内で使われている)。

感覚神経機能評価である SEP 振幅および行動学的評価である BBB スコアが脊髄損傷後に著しく低下した。電鍼刺激により、感覚機能および運動機能は徐々に回復し、7 日目から電鍼刺激を受けてないラットより SEP 振幅が著しく上昇した。そして 14 日目に BBB スコアも明らかに高かった。しかし、神経遮断を施したラットでは電鍼刺激を受けてないラットとの違いが観察されなかった。この結果より、電鍼刺激は脊髄機能回復を促進すること、そして、坐骨神経の神経遮断により、その回復効果が消失することを明らかにした。

なお、感覚機能の回復は運動機能より早期に認められた理由は、電気生理学的検査が目視で判断する検査より敏感であること、また脊椎動物の脊髄においては中枢パターン生成器が存在するため、感覚入力や上位中枢からのコントロールがなくても脊髄に局在する神経回路だけで歩くことが可能である[24]。しかし、この場合は上位中枢からのコントロールが欠如のため、前後肢の調和や体の安定性などに関わる

回復後期（BBB スコア：14-21）の特徴が認められなかった。したがって、電鍼刺激は損傷した脊髄と大脳皮質との間に新しい神経回路の形成を促進する可能性があると考えている。

本章では、ST36 を 14 日間電鍼刺激することで神経が回復することや、リドカインによる坐骨神経伝達阻害により電鍼効果が消失することから、末梢の穴位電鍼刺激が少なくとも一部は神経を介して中枢に伝達していることが示唆された。電鍼療法効果に神経興奮伝達が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

第二章 電鍼刺激の神経回路修復に対する影響

1. はじめに

第一章では、電鍼刺激による脊髄損傷ラットの感覚および運動機能の回復が促進されることが認められた。そして、この促進効果は神経伝達と関わることを明らかにした。電鍼刺激による SEP 振幅の回復は末梢神経から大脳皮質までの感覚神経回路の一部が再構築した可能性が考えられた。そこで、第二章では電鍼刺激が神経回路の修復に対する影響を調べるために、脊髄損傷ラットを用いて、電鍼刺激を施す群および施さない群において、神経細胞染色による脳から脊髄への神経回路を比較した。そして、分子生物学的手法によって軸索再生に参与しているいくつかのサイトカインを測定し、電鍼療法メカニズムの一端を調べた。

大脳皮質から運動を支配している神経回路は主に CST であり、大脳皮質の運動野から脊髄を経て骨格筋に至る神経伝導路のことである。脊髄損傷によって CST が破壊されたため、脳からの神経信号は損傷部位より尾側の脊髄段および末梢運動器までに到達できない。電鍼刺激による CST の修復状況を評価するために、神経細胞染色法の 1 つである順行性神経トレーサー法が有用であると考えている。順行性神経トレーサー法は、軸索輸送を利用した神経標識法である。試薬を神経細胞の周辺に注入した後に、神経細胞の細胞体に取り込まれ、軸索内を移動して軸索末端まで到達し、軸索全体を可視化することができる。

ビオチン化デキストランアミン (biotinylated dextran amine, BDA) は順行性および逆行性神経トレーサー試薬であり、高感度のため、神経ネットワークの研究に幅広く使用されている。BDA を神経系に注入した後に、アビジン-ビオチン複合体 (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC) 染色法で染色され、電子顕微鏡で観察する。高分子量 BDA (10k) により、軸索を詳細に観察できる [25][26]。

電鍼刺激によって神経回路が修復された場合は、損傷部位より尾側の脊髄段までに到達した標識神経線維が多くなると考えている。したがって、本章では BDA を脊髄損傷ラットの大脳感覚運動皮質

(sensorimotor cortex) に注入し、損傷部位より尾側に到達した BDA が含まれる神経線維を ABC 法で染色して定量解析を行った。

一方、近代研究では電鍼刺激によって神経栄養因子 (NGF, BDNF など) の分泌が促進されて、神経機能改善作用を示すことを明らかにした [27][28]。神経栄養因子は Akt/mTOR などの経路を介して神経細胞の成長や生存、軸索可塑性などに関連していることが報告されている [29]。それ以外にも、Akt/mTOR 経路を介した軸索再生の信号通路と関わるサイトカインが存在している [30][31][32][33] が、電鍼療法メカニズムとの関係については、まだ研究されていない。

そこで、本章では以下に挙げられている軸索再生の信号通路に参与するサイトカインに注目した。なお、これらのサイトカインと軸索再生との関連性を簡単にまとめた (図 14)。

Nogo-A は軸索伸長抑制および成長円錐を虚脱させる作用を持っている [34]。動物実験により Nogo-A あるいはその下流のシグナルを阻害することにより、脊髄損傷における神経軸索の再生を促すことが示された [35]。また、Nogo-A はシナプス前部と後部の両方に発現し、シナプス可塑性を担う可能性が示唆されている [36]。

PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10) は広く全身の細胞に発現し、PTEN 遺伝子は腫瘍抑制因子として同定されている。PTEN は PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達カスケードの負の制御因子としてゲノムの安定性や細胞の生存、移動、増殖、代謝の維持などの機能制御において重要な役割を果たしている [37]。PTEN 活性の低下はニューロン生存の亢進と関連している [38]。

STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) は神経系細胞において、アストロサイト内で最も強く発現し、脊髄損傷時の反応性アストロサイトの分化を誘導する [39]。反応性アストロサイトはグリア瘢痕を形成し、損傷部を外部環境刺激から守る役割を持っている。一方、グリア瘢痕は損傷部の軸索再生も阻害している [40]。したがって、そのバランスの制御が予後に重要であると考えられる。

また、脊髄損傷後、ラットの大脳皮質において自発的な再構築が発生することが報告された [41] ため、本研究では、ラット脊髄損傷部位および大脳感覚運動皮質、両方のサイトカインをタンパク質レベルで

評価することによって、電鍼療法メカニズムを調べた。

2. 材料と方法（実験動物承認番号 170324-15）

1) 実験の流れ

実験には偽処置群（Sham 群、8 匹）、脊髄損傷群（SCI 群、11 匹）および電鍼刺激群（SCI-EA 群、11 匹）を準備した。電鍼刺激群において脊髄手術後に電鍼刺激を 14 日間行った。CST 観察実験では、各群（Sham 群、4 匹；SCI 群、5 匹；SCI-EA 群、5 匹）の脊髄手術を行った 14 日間後、大脳感覚運動皮質に BDA を注入した。更に 14 日後、損傷部位後部の脊髄を採材し、そこに到達した BDA を ABC 法で染色を行った。軸索再生サイトカインに関与する実験では、各群（Sham 群、4 匹；SCI 群、6 匹；SCI-EA 群、6 匹）の脊髄手術を行った 14 日間後、ラットの大脳感覚運動皮質および損傷部位の脊髄を採材し、ウエスタン・ブロッティング法を用いて Nogo-A、PTEN、STAT3 のタンパク質定量測定を実施した。

2) 脊髄損傷モデル

SCI 群および SCI-EA 群において、脊髄損傷モデルの作成方法は「第一章」に従った。Sham 群では、ラットの第 8-9 胸椎の椎弓を切除し、脊髄硬膜を露出した後に、打撃を行わず、縫合した。

3) 電鍼刺激

SCI-EA 群において、電鍼刺激の方法は「第一章」に従った。

4) BDA 注入

ラットを 1 %イソフルラン麻酔下で、脳定位固定装置（SR-6N；ナリシゲグループ、東京）によって頭部を固定した。頭部を剃毛して皮膚を正中から切開し、頭蓋骨膜を切除した。頭蓋骨を露出し、Bregma を中心に 12 箇所穴を開けた[43]。その後、マイクロシリッジによって大脳皮質の深さ 2mm に、0.5 μ l/所、10% BDA（サーモフィッシャーサ

イエンティフィック株式会社、東京）を緩慢に注入した。マイクロシリンジをそのまま大脳皮質内に 1 分間留置して抜き出した[44]。最後に頭部の皮膚を縫合した（図 15）。

なお、予備実験より、同じ投与方法で、タンパク質を染める試薬である Coomassie brilliant blue R-250（Bio-Rad、USA）を大脳皮質に注入した後、すぐ脳を取り出して解剖したところ、試薬が大脳皮質組織内部に入ったことを確認した（図 16）。

5) 心臓灌流と染色用脊髄の採材

ラットを 1 %イソフルラン麻酔下で開胸し、右心耳を切る同時に左心室からリン酸緩衝液生理食塩水（Phosphate buffered saline , PBS ; pH7.3）を心臓に灌流し、次いで 4 % パラホルムアルデヒド（Paraformaldehyde, PFA）を灌流した。その後、脊髄損傷部位尾側から約 0.5cm の所から、0.5cm の脊髄組織を採材し、4%PFA にて一晩固定後、30%スクロース溶液に浸漬した。48-60 時間後に、ドライアイス上で OCT compound（Sakura FineTek、USA）で包埋した。脊髄標本をクリオスタットにより-20℃下で、20μm の厚さに薄切し、切片を乾燥器内で 37℃、1 時間乾燥し、染色に供するまで-80℃で保存した。

6) ABC 法染色および組織学評価

-80℃で保存した組織切片をドライヤー（冷風）にて風乾した後、温 PBS で OCT compound を洗い取り、流水で 5 分間水洗した。3%過酸化水素水溶液に 5 分間浸漬して、PBS で 5 分間洗った。その後、ABC キット（Vector Laboratories、USA）を使用し、30 分間反応した後、PBS で 5 分間洗って、標識抗体を検出するための発色基質である 3,3'-diaminobenzidine（DAB ; Vector Laboratories、USA）で 10 分間（遮光）処理し、水洗で DAB を完全に取り除いき、封入を行った。これらの切片を顕微鏡（×400、AX80 ; オリンパス株式会社、東京）で撮影し、ImageJ で画像解析を行った。

7) 大脳皮質・脊髄組織の採材およびタンパク質処理

ラットをウレタン(urethane、1g/kg)腹腔内投与によって麻酔し、断頭放血後に、氷の上で bregma を中心に横 5mm、縦 3mm、深 2mm の大脳皮質および損傷部位を中心の 0.5cm 脊髄を採材し、タンパク質抽出に供した。

タンパク質抽出はタンパク質抽出キット (SD-001 ; Invent Biotechnologies、USA) を用いた。以下の流れに沿って行った：

- ① 採材した組織 100mg に、1ml の抽出液 (SD-001) を加えて研磨する。
- ② 30s ずつ 2 回の超音波処理を行う。
- ③ 4℃、15000G、10 分間遠心する。
- ④ 上清を回収し、等量の 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad、USA) + 2-mercaptoethanol (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪) (95:5) と混合する。
- ⑤ 90℃、5 分間加熱変性を行う。
- ⑥ 室温に戻してウエスタン・ブロッティングに供するまで-20℃で保存する。

8) ウエスタン・ブロッティング

抽出したタンパク質溶液を以下流れに沿ってウエスタン・ブロッティングを行った。また、使用した試薬、機器および抗体の情報を表にまとめた (表 3)。データ解析は ImageJ で行った。

①電気泳動

電気泳動ゲルの各ウェルに 10μg のタンパク質サンプル液、または 3μg の Standard を添加する。80V で 2 時間泳動する。

②Membrane への転写

PVDF Membrane を Methanol 溶液に 1 分間親水化処理後に、Transfer Buffer に 30 分間浸し、泳動後のゲルを Transfer Buffer に 10 分間浸

す。タンク式で 25V、30 分間転写する。

③ブロッキング

転写した Membrane を TBST で 5 分間、3 回洗浄後、5% Blocking Buffer(スキムミルクを TBST に加えて混合する)に浸し、室温で 1 時間反応させる。

④一次抗体反応

転写した Membrane を TBST で 5 分間、3 回洗浄後、50-75kD の間に切り離し、それぞれ 5% Blocking Buffer で希釈した一次抗体(Nogo-A、PTEN)を加え、4℃で一晩反応させる。

⑤二次抗体反応

一次抗体反応した Membrane を TBST で 5 分間、3 回洗浄後、5% Blocking Buffer で希釈した二次抗体 (HRP) を加え、室温で 1 時間反応させる。

⑥タンパク質の検出

二次抗体反応した Membrane を TBST で 5 分間、3 回洗浄後、検出試薬 (ECL kit) と 1 分間反応させる。イメージャーアナライザーにより検出する。

⑦抗体除去

検出を行った Membrane を TBST で 5 分間、3 回洗浄後、Stripping Solution に 10 分間反応させて抗体を除去する。

抗体除去後、③に戻り、STAT3 および β -Actin の検出を行う。

9) 統計

統計方法は「第一章」に従った。

3. 結果

1) CST の評価

Sham 群の脊髄切片には大量な茶色に染まれた CST 神経線維が観察された。それに対して、SCI 群および SCI-EA 群では、わずかな点状に染まれた茶色の神経線維が観察された (図 17A)。そして、染色された CST 神経線維の量は、SCI 群と SCI-EA 群の間で、統計学的な有意差は認められなかった (図 17B)。

2) 軸索再生サイトカインの分析

大脳感覚運動皮質において、Nogo-A、PTEN、STAT3 のタンパク質発現量では、SCI 群および SCI-EA 群は Sham 群に対して統計学的な有意差は認められなかった (図 18A)。

一方、脊髄損傷部の Nogo-A、PTEN、STAT3 のタンパク質発現量では、SCI 群および SCI-EA 群は Sham 群に比べ、有意に減少したが、SCI 群と SCI-EA 群の間で、統計学的な有意差は認められなかった (図 18B)。

4. 考察

本章では、脊髄損傷モデルラットを用いて電鍼刺激が CST に対する影響を順行性神経トレーサー試薬である BDA を大脳皮質運動感覚野に注入した後に、組織学染色方法によって評価した。そして、電鍼刺激が軸索再生に関与するサイトカインの調節に対する影響をウエスタン・ブロッティング法を用いて、タンパク質レベルで評価した。

Sham 群のラットの脊髄切片では、大量な茶色に染まれた CST 神経線維が観察された。それに対して、脊髄損傷損傷された二群のラットでは、点状に見られた茶色線維がわずかに観察された。画像解析の結果により、SCI-EA 群に染まれた CST 線維は SCI 群に比べ、多く見られる傾向があったが、SCI-EA 群内では個体差が大きいため、統計学的な有意差は認められなかった。

脊髄挫傷モデルはラットの椎弓を切除し、露出した脊髄硬膜の上から鉄棒を落下させることで作製したため、挫傷が最も重度の部位は下行性 CST が走行している位置である。したがって、損傷がない Sham 群に比べ、CST 神経線維が著しく減少すると考えられた。

脊椎動物の脊髄には中枢パターン生成器が存在するため、脊髄レベルで歩くことが可能であることを第一章に述べた。下行性 CST は大脳皮質から運動神経に指令を伝わる神経路であり、微細運動機能をコントロールしているため、Sham 群に比べて CST 神経線維が著しく減少しても歩くことが可能であった。

また、本研究において刺激した穴位を 1 つのみ使用したため、臨床における多数の穴位を刺激する効果に比べて効果が落ちる可能性がある。そして、電鍼刺激の期間は 2 週間であり、他の研究や臨床現場に比べて、期間が短いことも CST に対する回復効果が弱い原因のひとつと考えられる。

Nogo-A、PTEN、STAT3 のタンパク質発現量では、大脳感覚運動皮質および脊髄損傷部位のどちらにおいても、SCI 群と SCI-EA 群の間に明らかな違いが認められなかった。大脳感覚運動皮質において、脊髄損傷したラットが損傷しなかったラットと比べ、違いがなかったことは、脊髄損傷および電鍼刺激後の 2 週間の時点で、大脳感覚運動皮質の

Nogo-A、PTEN および STAT3 に対して、明らかな影響を及ぼさなかったと考えている。

一方、脊髄損傷部位において、Nogo-A、PTEN、STAT3 のタンパク質の発現量は、脊髄損傷したラットが損傷しなかったラットと比べて明らかに下がった。予備実験より、脊髄損傷の 2 週間後に SCI 群および SCI-EA 群ラットの脊髄損傷中心部位の組織に HE 染色を行ったところ、脊髄空洞、炎症細胞浸潤および灰白質の変性が見られた（図 19）。このことによって、脊髄損傷部位では正常な組織が大量に失い、実験結果に影響を及ぼした可能性があると考えられている。次には、脊髄損傷中心部位より頭側および尾側の組織も調べるべきと考えている。

第三章 電鍼刺激頻度の違いが神経活動に及ぼす

影響

1. はじめに

臨床において電鍼刺激を実施する際に、患者の体質や病状に合わせて穴位の選択や刺激の頻度および強度を考慮する必要がある。穴位の選択では、伝統的な中医学理論に基づいて決まり、刺激の強度は患者の感受や耐性などに応じて調整されている。しかし、刺激の頻度に関しては、伝統的な理論が欠く、刺激頻度が刺激効果にどのようなメカニズムで影響していることについてはほとんど知られていない。

そこで、第一章では電鍼刺激効果に、神経興奮伝達が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、多くの実験動物モデルおよび臨床研究により、電鍼刺激が体性感覚神経や自律神経の神経活動を誘発し、多彩な病理的状态を制御する可能性が示唆された[44][45]。したがって、異なる刺激頻度の電鍼刺激が神経活動に対する影響を調べることは電鍼療法メカニズムの解明にも役立つと考えている。

電気生理学的検査は、神経活動と調査するのに有用である。そこで、本研究では、電気生理学的検査である SEP 検査および F 波検査を用いて、異なる刺激頻度の電鍼刺激が神経活動に与える影響を評価した。

末梢からの電鍼刺激は、SEP および F 波を誘発できるか否かが不明のため、最初に SEP 振幅、F 波出現率および F/M 振幅比 (F/M amplitude ratio、F 波振幅/M 波振幅) の 3 つの電気生理学的パラメーターによって、ST36 の電鍼刺激によって誘発された体性感覚皮質誘発電位および脊髄運動ニューロン誘発電位と直接脛骨神経刺激によって誘発された SEP および F 波をそれぞれ比較した。続いて、同じ電気生理学的検査方法を使用して、電鍼刺激頻度の変化による体性感覚皮質および脊髄運動ニューロン神経活動の変化を評価した。

2. 材料と方法（実験動物承認番号 190424-1）

1) 実験の流れ

実験の 4-5 日前に、すべてのラット（6 匹）に体性感覚皮質誘発電位を記録するための電極を頭蓋骨に埋め込まれた。体性感覚皮質誘発電位と脊髄運動ニューロン誘発電位の実験では異なる日に実施された。体性感覚皮質誘発電位実験および脊髄運動ニューロン誘発電位実験では、1Hz の脛骨神経刺激、続いて 1Hz、2Hz、5Hz の電鍼刺激という順番でそれぞれ実施した。そして、SEP 振幅（体性感覚皮質誘発電位振幅）、F 波出現率（脊髄運動ニューロン誘発電位出現率）および F/M 振幅比（脊髄運動ニューロン誘発電位/M 振幅比）を比較した。

2) 電気生理学的検査

測定方法の詳細内容については、「第一章」に従って行った。

なお、脛骨神経を刺激する際に、刺激電極をラットの足首にある脛骨神経に設置した。電鍼刺激を行う際に、刺激電極を両方の ST36 に挿入された鍼針に接続した。

体性感覚皮質誘発電位実験では 200 回平均加算した波形を記録し、SEP 振幅（体性感覚皮質誘発電位振幅）を測定した。脊髄運動ニューロン誘発電位実験では 20 回の連続刺激で得られた波形を記録し、脊髄運動ニューロン応答の割合が F 波出現率（脊髄運動ニューロン誘発電位出現率）として測定され、その振幅と M 波振幅の割合の平均値が F/M 振幅比（脊髄運動ニューロン誘発電位/M 振幅比）として記録された。

3) 電鍼刺激

電鍼刺激の穴位は両側の ST36 とし、電鍼針を誘発反応測定装置に接続した。

4) 統計

統計方法は「第一章」に従った。

3. 結果

1) 脛骨神経刺激と ST36 電鍼刺激の比較

まずは SEP および F 波検査を使用し、脛骨神経刺激および ST36 電鍼刺激によって、それぞれ誘発された体性感覚皮質および脊髄運動ニューロンの神経活動を評価した。SEP 振幅は体性感覚皮質の神経活動を反映し、F 波出現率（20 回の連続刺激に対する F 波出現率は 100%とする）および F/M 振幅比は脊髄運動ニューロンの神経活動を反映した。

同じ刺激頻度（1Hz）においての ST36 電鍼刺激が脛骨神経刺激と比べて SEP 振幅、F 波出現率および F/M 振幅比では、有意な差が認められなかった（表 4）。

2) 異なる刺激頻度による ST36 電鍼刺激の比較

図 20 では、異なる刺激頻度（1Hz、2Hz、5Hz）においての ST36 電鍼刺激による体性感覚皮質誘発電位振幅の変化を示している。体性感覚皮質誘発電位振幅は、1Hz と 2Hz（ $P < 0.01$ ）および 5Hz（ $P < 0.01$ ）に比べて有意に高く、2Hz は 5Hz（ $P < 0.01$ ）よりも有意に高かった。

図 21 では、異なる刺激頻度（1Hz、2Hz、5Hz）においての ST36 電鍼刺激による脊髄運動ニューロン誘発電位出現率および脊髄運動ニューロン誘発電位/M 振幅比の変化を示している。脊髄運動ニューロン誘発電位出現率は、1Hz と 2Hz（ $P < 0.05$ ）および 5Hz（ $P < 0.05$ ）に比べて有意に高かった。ただし、2Hz と 5Hz の間に有意な差が認められなかった。一方、脊髄運動ニューロン誘発電位/M 振幅比では 1Hz、2Hz、5Hz の間に有意な差が認められなかった。

4. 考察

本実験では、病理状態の影響を排除するため、健康なラットを使用して、電鍼刺激が神経活動に対する影響を調べた。電鍼刺激によって引き起こされる体性感覚皮質および脊髄運動ニューロンの神経活動を直接観察することで、電鍼療法メカニズムが神経興奮に関連しているという理論を裏付けていた。次に、異なる刺激頻度の電鍼刺激が神経活動に対する影響も評価した。

末梢神経刺激による産生した体性感覚信号は、後索路を上行して視床の特殊感覚中継核を通過し、最終的に反対側の体性感覚皮質に入力する。一方、鍼針を穴位に挿入されると、その周りの末梢神経や筋線維、毛細血管などを含まれるさまざまな組織に生理学的反応を引き起こす可能性がある。したがって、電鍼刺激によって誘導された体性感覚皮質の誘発電位は、SEP を含む複合電位である可能性があると考えている。しかしながら、本研究では、体性感覚皮質において SEP に類似する神経活動電位を電鍼刺激によって誘発されたため、電鍼刺激は前述の神経経路を活性化させたことを示した。これは、神経回路の可塑性、さらに損傷された神経路の修復に繋がる可能性があると考えている[46]。さらに、第一章および第三章の結果により、電鍼刺激は大脳皮質レベルの神経機能コントロールに影響を与える可能性があることが示唆された。

F 波は脊髄運動ニューロンとその運動単位の電気生理学的機能を反映している。運動単位とは脊髄の α 運動ニューロンとその運動ニューロンの軸索終末によって神経支配される骨格筋線維のことである。前述と同様に、電鍼刺激によって誘発された脊髄運動ニューロン誘発電位は F 波を含む複合電位である可能性があるが、本実験では、電鍼刺激によって末梢神経刺激と非常に類似した脊髄運動ニューロン誘発電位を記録した。したがって、ST36 の電鍼刺激は脊髄レベルの運動神経活動に影響を及ぼすことが示唆された。

脊髄損傷の治療において、電鍼療法のメカニズムは、神経栄養因子の上調や神経可塑性の促進、発痛物質のコントロール[27][28][46]などに関与しているから、リハビリテーション療法[47]、そして脊髄電気刺激療法[48][49]の効果メカニズムと類似すると考えている。本研

究は、電鍼刺激による引き起こされた大脳皮質および脊髄運動ニューロンの活動が、直接神経刺激との違いがないことを証明したため、神経活動の活性化は脊髄損傷の治療に重要な役割を果たしていると示された。したがって、これからの研究に注目すべきところは、中医治療法と現代治療法の組み合わせで、独自の利点を発揮し、より効果的な治療法を開発する。

さらに、本研究では異なる刺激頻度の ST36 電鍼刺激における体性感覚皮質および脊髄運動ニューロンの神経活性化を比較した。電鍼刺激頻度についての研究では、大幅に違いの刺激頻度(例:2Hz、50Hz、100Hz)に対する効果を比較したのが多く、本研究のように刺激頻度の変化の幅が少ない研究は限られている。最近の研究では、低および高刺激頻度において、中枢神経の応答する受容体が異なる可能性があることが報告されている[50][51]。したがって、幅が狭い刺激頻度の変化についての研究も必要と考えている。

本実験では、電鍼刺激によって引き起こされた体性感覚皮質誘発電位が頻度依存性な振幅変化を示している。体性感覚皮質誘発電位は遠隔電場電位であり、刺激頻度の増加によって、伝導経路内での複数のインパルスの向かう方向の違いや、もしくは体性感覚以外の入力も生じる可能性もあるので、波形が重ね合わせて打ち消しまい、振幅が小さくなると考えている。

脊髄運動ニューロン誘発電位の出現率では、2Hz と 5Hz が 1Hz に比べて下回っていた。そして、脊髄運動ニューロン誘発電位/M 振幅比では、刺激頻度の増加に伴う下降傾向を示したが、ラットによる個体差が大きいため、統計学的な意義が認められなかった。脊髄運動ニューロン誘発電位の出現率および脊髄運動ニューロン誘発電位/M 振幅比は、どちらも脊髄運動ニューロン興奮性の指標として用いられているため、刺激頻度の変化により、脊髄運動ニューロン興奮性を影響すると考えている。

刺激頻度の変化による脊髄運動ニューロン興奮性の変化は、運動神経線維を逆行性、あるいは順行性のインパルスの衝突が起こって誘発電位が出にくくなり、脊髄運動ニューロン誘発電位の振幅や出現率の低下に繋がる。また、脊髄運動ニューロン興奮後に後過分極の半減期が約数十ミリ秒を続き [52][53]、興奮性が低下する。刺激頻度の増加

により、後過分極の運動ニューロンに対する刺激が多くなり、その誘発電位が弱くなる。さらに、介在ニューロンおよび大脳皮質レベルの調節も関与している可能性がある。

本章では、刺激頻度の変化が神経活動に影響をもたらす可能性があるとし唆された。電鍼刺激を実施する際には、特に運動機能回復に関わる治療において、刺激頻度も考慮されるべきであると考えている。しかし、神経活動の調節メカニズムは複雑であり、まだ未知なことが多くあり、刺激頻度の変化による引き起こした神経活動の変化は電鍼刺激効果に影響を及ぼすか否かがまだ分からないため、さらなる研究の価値がある。

総括ならびに結論

本研究では、ラット脊髄損傷モデルを対象として、電気生理学的検査、行動学的検査、組織学的検査および分子学的検査により、電鍼療法の神経機能に対する効果を検討した結果、以下の結論が得られた。

第一章 神経上行性伝達遮断の電鍼刺激効果に対する影響

ラットの脊髄を背側から物理的に打撃することで脊髄損傷モデルを作成し、ST36 での電鍼刺激による脊髄機能回復効果を行動学的ならびに電気生理学的検査により証明した。さらに ST36 電鍼刺激の伝達経路の可能性のある坐骨神経を、リドカインを用いて電鍼刺激の直前に遮断することで、電鍼刺激による脊髄機能改善効果が消失したことを明らかにした。なお、ノーマルラットにリドカインを 14 日間反復投与し、坐骨神経の電気生理学的機能および組織学構造を評価することにより、リドカイン反復投与は坐骨神経に毒性がないことが示唆された。

第二章 電鍼刺激の神経回路修復に対する影響

脊髄損傷ラットの大脳皮質運動感覚野に BDA を注入後、組織学染色で CST 神経線維を定量評価することにより、脊髄損傷ラットの CST 神経線維が大量に減少したことが観察され、電鍼刺激により改善傾向があるが、統計学的の違いは認められなかった。そして、大脳感覚運動皮質および脊髄損傷部位の Nogo-A、PTEN、STAT3 のタンパク質発現量をウエスタン・ブロッティング法で評価した。大脳感覚運動皮質において脊髄損傷および電鍼刺激は以上の 3 種類のタンパク質に影響を及ぼさなかった。また、脊髄損傷部位において脊髄損傷により Nogo-A、PTEN、STAT3 のタンパク質発現量は明らかに減少し、電鍼刺激により改善が認められなかった。以上のことより、2 週間の電鍼刺激期間が脊髄損傷回復に効果が弱い可能性、大脳感覚運動皮質において Nogo-A、PTEN、STAT3 が脊髄損傷および電鍼刺激に関与しない可能性、そして、脊髄損傷部位では正常な組織が大量に失い、実験結果に影響を及ぼす可能性などが考えられる。

第三章 電鍼刺激頻度の違いが神経活動に及ぼす影響

健康なラットを使用し、ST36 で電鍼刺激により引き起こされた体性感覚皮質および脊髄運動ニューロンの神経誘発電位と脛骨神経刺激により引き起こされた SEP および F 波を電気生理学的パラメーターによって比較し、類似する誘発電位を記録した。これは電鍼刺激は神経経路を活性化させることを示した。さらに、異なる刺激頻度の ST36 電鍼刺激における体性感覚皮質および脊髄運動ニューロンの神経誘発電位を比較し、刺激頻度の変化に連れて体性感覚皮質および脊髄運動ニューロン神経の活性も変化することは明らかにした。

以上のことより、本研究では電鍼療法効果に神経興奮伝達が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。電鍼刺激の軸索再生サイトカインに対する影響は、より長期間の観察、あるいは脊髄損傷中心部位より頭側および尾側の組織を用いて再検討する必要がある。末梢の穴位電鍼刺激が少なくとも一部は神経を介して中枢に伝達していることや刺激頻度の変化が神経活動に影響をもたらすことから、電鍼刺激効果は神経回路の可塑性、さらに損傷された神経路の修復に繋がる可能性が考えられる。したがって、電鍼刺激を実施する際に刺激頻度も考慮すべきであることが本研究で明らかになった。しかし、神経活動の調節メカニズムは複雑であり、かつ未知なことが少なくないことから、刺激頻度の変化が電鍼刺激効果にどのような影響を及ぼすかは、さらなる研究が必要である。

謝辞

本研究の遂行ならびに論文の作成にあたり、終始懇切なる御指導と御校閲を賜りました麻布大学獣医学部生理学第二研究室 折戸謙介教授、同学部分子生物学研究室 村上賢教授ならびに同学部病理学研究室 上家潤一准教授に深甚なる謝意を表します。また鍼治療方法を御指導を賜りました北京農学院獣医学部 陳武教授ならびに電気生理学測定方法を御指導を賜りました ACORN 獣医神経病クリニック 奥野征一院長に深謝致します。最後に、本研究に犠牲した動物に感謝と追悼の意を表します。

引用文献

- [1] 最新小動物の脊椎・脊髄疾患 Ronald C. da Costa 著；原康監
訳 2011.12
- [2] 中国獣医針灸学 中国畜牧獣医学会編；竹中良二，高橋貢訳
1988.7
- [3] Choi DC, Lee JY, Lim EJ, et al. Inhibition of ROS-induced
p38MAPK and ERK activation in microglia by acupuncture relieves
neuropathic pain after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*.
2012 Aug; 236(2):268-82.
- [4] Choi DC, Lee JY, Moon YJ, et al. Acupuncture-mediated
inhibition of inflammation facilitates significant functional
recovery after spinal cord injury. *Neurobiol Dis*. 2010 Sep;
39(3):272-82.
- [5] Jiang DX, Lu ZS, Li GB, et al. Electroacupuncture improves
microcirculation and neuronal morphology in the spinal cord of
a rat model of intervertebral disc extrusion. *Neural Regen Res*.
2015 Feb; 10(2):237-43.
- [6] Liu SJ, Zheng SS, Dan QQ, et al. Effects of Governor Vessel
electroacupuncture on the systematic expressions of NTFs in
spinal cord transected rats. *Neuropeptides*. 2014 Aug;
48(4):239-47.
- [7] Villegas-Bastida A, Torres-Rosas R, Arriaga-Pizano LA, et al.
Electrical Stimulation at the ST36 Acupoint Protects against

- Sepsis Lethality and Reduces Serum TNF Levels through Vagus Nerve- and Catecholamine-Dependent Mechanisms. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014; 2014:451674.
- [8] Wang XY, Li XL, Hong SQ, et al. Electroacupuncture Induced Spinal Plasticity is Linked to Multiple Gene Expressions in Dorsal Root Deafferented Rats. *J Mol Neurosci.* 2009 Feb; 37(2):97-110.
- [9] Wu MT, Sheen JM, Chuang KH, et al. Neuronal Specificity of Acupuncture Response:A fMRI Study with Electroacupuncture. *Neuroimage.* 2002 Aug; 16(4):1028-37.
- [10] Na BJ, Jahng GH, Park SU, et al. An fMRI study of neuronal specificity of an acupoint: Electroacupuncture stimulation of Yanglingquan (GB34) and its Sham point. *Neurosci Lett.* 2009 Oct 16; 464(1):1-5.
- [11] Lee IS, Cheon S, Park JY. Central and Peripheral Mechanism of Acupuncture Analgesia on Visceral Pain: A Systematic Review. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019 May 2; 2019:1304152.
- [12] Lai HC, Chang QY, Hsieh CL. Signal Transduction Pathways of Acupuncture for Treating Some Nervous System Diseases. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019 Jul 11; 2019:2909632.

- [13] Lv Q, Wu F, Gan X, et al. The Involvement of Descending Pain Inhibitory System in Electroacupuncture-Induced Analgesia. *Front Integr Neurosci*. 2019 Aug 21; 13:38.
- [14] Zhang J, Cui Z, Feng G, et al. RBM5 and p53 expression after rat spinal cord injury: Implications for neuronal apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015 Mar; 60:43-52.
- [15] Buffenoir K, Decq P, Pérot C. Time Course of the Soleus M Response and H Reflex after Lidocaine Tibial Nerve Block in the Rat. *ScientificWorldJournal*. 2013 Aug 7; 2013:912716.
- [16] 犬と猫の神経病学 長谷川大輔・枝村一弥・齋藤弥代子監修
2016.7
- [17] 誘発電位 下地 恒毅 1992.3
- [18] All AH, Walczak P, Agrawal G, et al. Effect of MOG sensitization on somatosensory evoked potential in Lewis rats. *J Neurol Sci*. 2009 Sep 15; 284(1-2):81-9.
- [19] Canu MH, Langlet C, Dupont E, et al. Effects of hypodynamia-hypokinesia on somatosensory evoked potentials in the rat. *Brain Res*. 2003 Jul 18; 978(1-2):162-8.

- [20] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995 Feb; 12(1):1-21.
- [21] Barros Filho TE, Molina AE. Analysis of The Sensitivity and Reproducibility Of The Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) Scale in Wistar Rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2008 Feb; 63(1):103-8.
- [22] Kortelainen J, Al-Nashash H, Vipin A, et al. The effect of anaesthesia on somatosensory evoked potential measurement in a rat model. *Lab Anim*. 2016 Feb; 50(1):63-6.
- [23] Madhok J, Wu D, Xiong W, et al. Hypothermia amplifies somatosensory evoked potentials in uninjured rats. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2012 Jul; 24(3):197-202.
- [24] Stuart DG, Hultborn H. Thomas Graham Brown (1882--1965), Anders Lundberg (1920-), and the neural control of stepping. *Brain Res Rev*. 2008 Nov; 59(1):74-95.
- [25] Veenman CL, Reiner A, Honig MG. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. *J Neurosci Methods*. 1992 Mar; 41(3):239-54.

- [26] Reiner A, Veenman CL, Medina L, et al. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods*. 2000 Nov 15; 103(1):23-37.
- [27] Manni L, Albanesi M, Guaragna M, et al. Neurotrophins and acupuncture. *Auton Neurosci*. 2010 Oct 28; 157(1-2):9-17.
- [28] Soligo M, Nori SL, Protto V, et al. Acupuncture and neurotrophin modulation. *Int Rev Neurobiol*. 2013; 111:91-124.
- [29] Keefe KM, Sheikh IS, Smith GM. Targeting Neurotrophins to Specific Populations of Neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and Their Relevance for Treatment of Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 3; 18(3). pii: E548.
- [30] Young W. Spinal cord regeneration. *Cell Transplant*. 2014; 23(4-5):573-611.
- [31] Yang P, Qin Y, Bian C, et al. Intrathecal delivery of IL-6 reactivates the intrinsic growth capacity of pyramidal cells in the sensorimotor cortex after spinal cord injury. *PLoS One*. 2015 May 19; 10(5):e0127772.
- [32] Wei D, Hurd C, Galleguillos D, et al. Inhibiting cortical protein kinase A in spinal cord injured rats enhances efficacy of rehabilitative training. *Exp Neurol*. 2016 Sep; 283(Pt A):365-74.

- [33] Renault-Mihara F, Mukaino M, Shinozaki M, et al. Regulation of RhoA by STAT3 coordinates glial scar formation. *J Cell Biol.* 2017 Aug 7; 216(8):2533-2550.
- [34] Yamashita T, Tohyama M. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci.* 2003 May; 6(5):461-7.
- [35] Simonen M1, Pedersen V, Weinmann O, et al. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron.* 2003 Apr 24; 38(2):201-11.
- [36] Lee H, Raiker SJ, Venkatesh K, et al. Synaptic function for the Nogo-66 receptor NgR1: regulation of dendritic spine morphology and activity-dependent synaptic strength. *J Neurosci.* 2008 Mar 12; 28(11):2753-65.
- [37] Lee YR, Chen M, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Sep; 19(9):547-562.
- [38] Shi SH, Jan LY, Jan YN. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell.* 2003 Jan 10; 112(1):63-75.

- [39] Herrmann JE1, Imura T, Song B, Qi J, et al. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2008 Jul 9; 28(28):7231-43.
- [40] David S, Lacroix S. Molecular approaches to spinal cord repair. *Annu Rev Neurosci*. 2003; 26:411-40.
- [41] Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, et al. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci*. 2004 Mar; 7(3):269-77.
- [42] Fonoff ET, Pereira JF Jr, Camargo LV, et al. Functional mapping of the motor cortex of the rat using transdural electrical stimulation. *Behav Brain Res*. 2009 Aug 24; 202(1):138-41.
- [43] Kim D1, Zai L, Liang P, et al. Inosine enhances axon sprouting and motor recovery after spinal cord injury. *PLoS One*. 2013 Dec 2; 8(12):e81948.
- [44] Torres-Rosas R, Yehia G, Peña G, et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. *Nat Med*. 2014 Mar; 20(3):291-5.
- [45] Park JY, Namgung U. Electroacupuncture therapy in inflammation regulation: current perspectives. *J Inflamm Res*. 2018 May 17; 11:227-237.

- [46] Wu JJ, Lu YC, Hua XY, et al. A Longitudinal Mapping Study on Cortical Plasticity of Peripheral Nerve Injury Treated by Direct Anastomosis and Electroacupuncture in Rats. *World Neurosurg.* 2018 Jun; 114:e267-e282.
- [47] Sandrow-Feinberg HR, Houlié JD. Exercise after spinal cord injury as an agent for neuroprotection, regeneration and rehabilitation. *Brain Res.* 2015 Sep 4; 1619:12-21.
- [48] van den Brand R, Heutschi J, Barraud Q, et al. Restoring voluntary control of locomotion after paralyzing spinal cord injury. *Science.* 2012 Jun 1; 336(6085):1182-5.
- [49] Meier K. Spinal cord stimulation: Background and clinical application. *Scand J Pain.* 2014 Jul 1; 5(3):175-181.
- [50] Qi D, Wu S, Zhang Y, et al. Electroacupuncture analgesia with different frequencies is mediated via different opioid pathways in acute visceral hyperalgesia rats. *Life Sci.* 2016 Sep 1; 160:64-71.
- [51] Zhang WT, Jin Z, Cui GH, et al. Relations between brain network activation and analgesic effect induced by low vs. high frequency electrical acupoint stimulation in different subjects: a functional magnetic resonance imaging study. *Brain Res.* 2003 Aug 29; 982(2):168-78.

- [52] Bayliss DA, Umemiya M, Berger AJ. Inhibition of N- and P-type calcium currents and the after-hyperpolarization in rat motoneurons by serotonin. *J Physiol.* 1995 Jun 15; 485 (Pt 3):635-47.
- [53] Beaumont E, Gardiner PF. Endurance training alters the biophysical properties of hindlimb motoneurons in rats. *Muscle Nerve.* 2003 Feb; 27(2):228-36.

表および図

表 1 小動物臨床において脊髄損傷重症度の分類

グレード	歩行	症状
I	○	背中での痛みで神経の機能は正常。階段を上りたがらない、背中がいつもよりアーチ状になっている、抱き上げた時にキャンという、飛んだり跳びねたりしない、などが“背中が痛い”と言う症状として多い。
II	○	両後肢にふらつきがあるものの、体を支えて四肢で歩くことができる。
III	△	両後肢は多少動くものの体を支えることができない。前肢だけで歩くことができる。
IV	×	下半身は全く動かず尻尾も振ることができないが、後肢の感覚は残っている。自力での排泄が不可能なことが多い。
V	×	下半身は完全に麻痺しており、動かすこともできず感覚も全くない。自力での排泄が不可能。

<http://www.samec.jp/owners/common-disease/nerve-muscle/>

表 2 BBB スコア

スコア	ラットの運動能力
0	No observable movement of the hindlimbs.
1	Slight (limited) movement of one or two joints, usually hip and/or knee.
2	Extensive movement of one joint or extensive movement of one joint and slight movement of the other.
3	Extensive movement of two joints.
4	Slight movement of all three joints of the hindlimbs.
5	Slight movement of two joints and extensive movement of the third joint.
6	Extensive movement of two joints and slight movement of the third joint.
7	Extensive movement of the three joints in the hindlimbs.
8	Sweeping without weight bearing or plantar support of the paw without weight bearing.
9	Plantar support of the paw with weight bearing only in the support stage (i. e., when static) or occasional, frequent or inconsistent dorsal stepping with weight bearing and no plantar stepping.
10	Plantar stepping with occasional weight bearing and no forelimb-hindlimb coordination.
11	Plantar stepping with frequent to consistent weight bearing and occasional forelimb-hindlimb coordination.
12	Plantar stepping with frequent to consistent weight bearing and occasional forelimb-hindlimb coordination.

13	Plantar stepping with frequent to consistent weight bearing and frequent forelimb-hindlimb coordination.
14	Plantar stepping with consistent weight support, consistent forelimb-hindlimb coordination and predominantly rotated paw position (internally or externally) during locomotion both at the instant of initial contact with the surface as well as before moving the toes at the end of the support stage or frequent plantar stepping, consistent forelimb-hindlimb coordination and occasional dorsal stepping.
15	Consistent plantar stepping, consistent forelimb-hindlimb coordination and no movement of the toes or occasional movement during forward movement of limb; predominant paw position is parallel to the body at the time of initial contact.
16	Consistent plantar stepping and forelimb-hindlimb coordination during gait and movement of the toes occurs frequently during forward movement of the limb; the predominant paw position is parallel to the body at the time of initial contact and curved at the instant of movement.
17	Consistent plantar stepping and forelimb-hindlimb coordination during gait and movement of the toes occurs frequently during forward movement of limb; the predominant paw position is parallel to the body at the time of initial contact and at the instant of movement of the toes.
18	Consistent plantar stepping and forelimb-hindlimb coordination during gait and movement of the toes occurs consistently during forward movement of limb; the predominant paw position is parallel to the body at the time of initial contact and curved during movement of the

	toes.
19	Consistent plantar stepping and forelimb-hindlimb coordination during gait and movement of the toes occurs consistently during forward movement of limb; the predominant paw position is parallel to the body at the instant of contact and at the time of movement of the toes, and the animal presents a downward tail some or all of the time.
20	Consistent plantar stepping and forelimb-hindlimb coordination during gait and movement of the toes occurs consistently during forward movement of limb; the predominant paw position is parallel to the body at the instant of contact and at the time of movement of toes, and the animal presents consistent elevation of the tail and trunk instability.
21	Consistent plantar stepping and coordinated gait, consistent movement of the toes; paw position is predominantly parallel to the body during the whole support stage; consistent trunk stability; consistent tail elevation.

表 3 ウェスタン・ブロッティング用試薬、機器および抗体リスト

試薬リスト

試薬名	処理方法	メーカー
10x Tris/glycine/SDS running buffer #1610772	10 倍希釈	Bio-Rad、USA
4-20 % precast polyacrylamide gel #4561095	－	Bio-Rad、USA
Dual Color Standards #1610374	－	Bio-Rad、USA
10×High Efficiency Transfer Buffer	10 倍希釈	富士フイルム和光純薬株式会社、大阪
Methanol	－	富士フイルム和光純薬株式会社、大阪
Tris Buffered Saline with Tween® 20 (TBST-10X) #9997	10 倍希釈	Cell Signaling Technology、USA
スキムミルク	－	森永乳業株式会社
ECL Reagent #6883	1:1 混合	Cell Signaling Technology、USA
Stripping Solution	－	富士フイルム和光純薬株式会社、大阪
Transfer Membrane #1212639	－	Maine Manufacturing LLC、USA
Blot Absorbent Filter Paper	－	Bio-Rad、USA

機器リスト

機器名	メーカー
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad、USA
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	
Mini Trans-Blot® Cell	
ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare Life Sciences、England

抗体リスト

抗体名	希釈倍率	メーカー
Nogo-A Antibody #13401	1:1000	Cell Signaling Technology、USA
PTEN (138G6) Rabbit mAb #9559	1:1000	
Stat3 (D1B2J) Rabbit mAb #30835	1:1000	
β-Actin (13E5) Rabbit mAb #4970	1:1000	
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074	1:2000	

表 4 脛骨神経刺激と足三里（ST36）電鍼刺激の比較

	脛骨神経刺激	ST36 電鍼刺激
SEP 振幅 (μV)	27.4 \pm 4.2	21.7 \pm 1.9
F-wave 出現率 (%)	98.3 \pm 1.7	97.5 \pm 2.5
F/M 振幅比	5.1 \pm 0.9	6.3 \pm 1.5

データは平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 6$)。群間の比較は Bonferroni test で解析を行った。

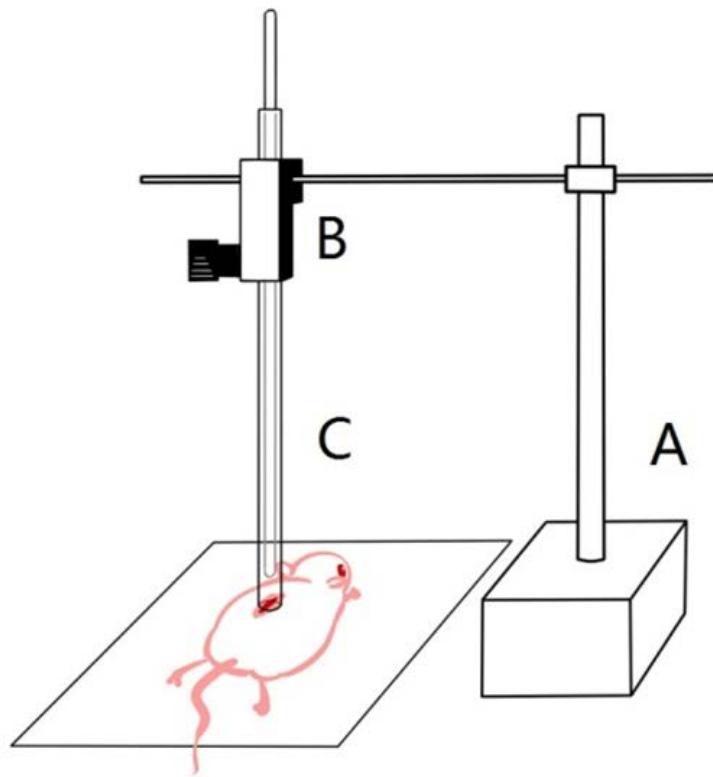


図 1 ラット脊髄損傷打撃装置の模式図

A は固定部分、B は調節部分、C は打撃部分。

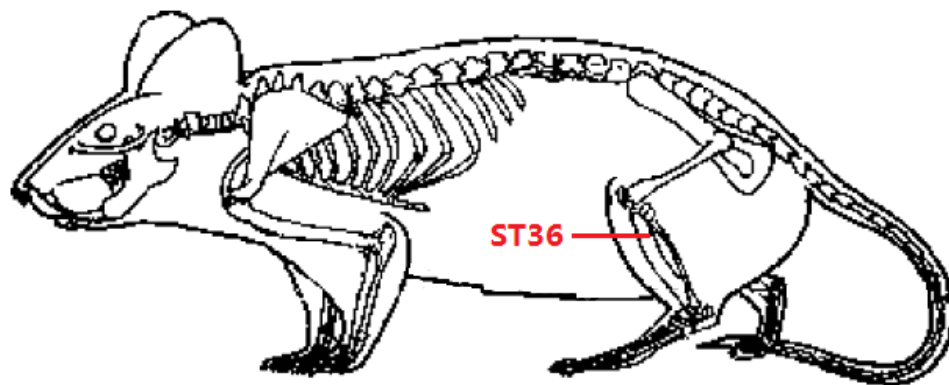


図 2 ラット足三里（ST36）の位置

脛骨の顆結節と腓骨小頭下方の間隙内にある。

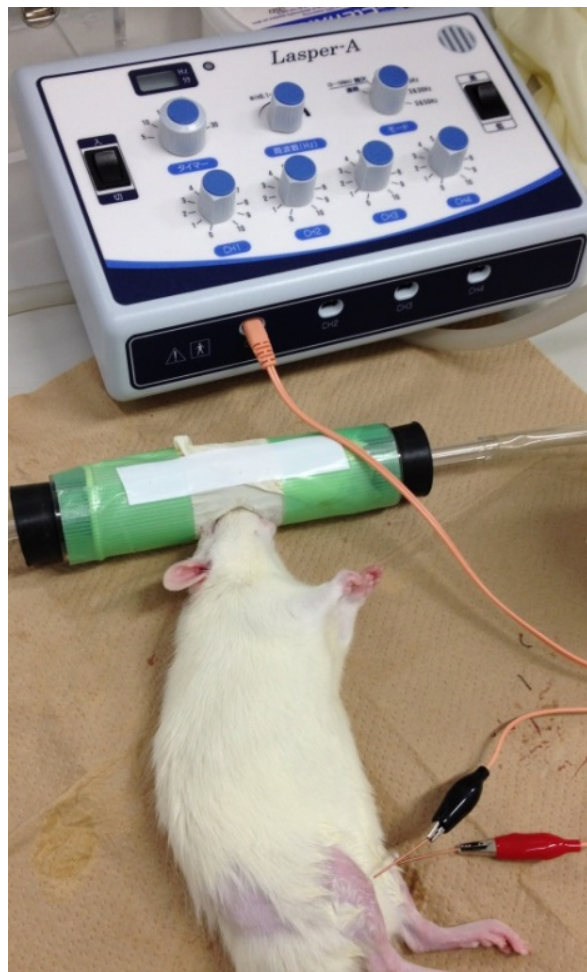


図 3 電針刺激中のラット

イソフルラン麻酔下で低周波治療器により、足三里（ST36）を 1Hz の刺激頻度で、20 分間に刺激した。

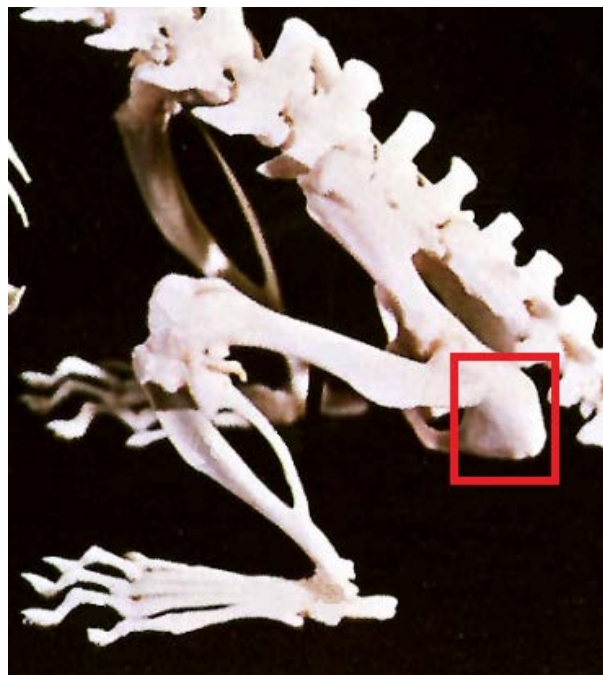
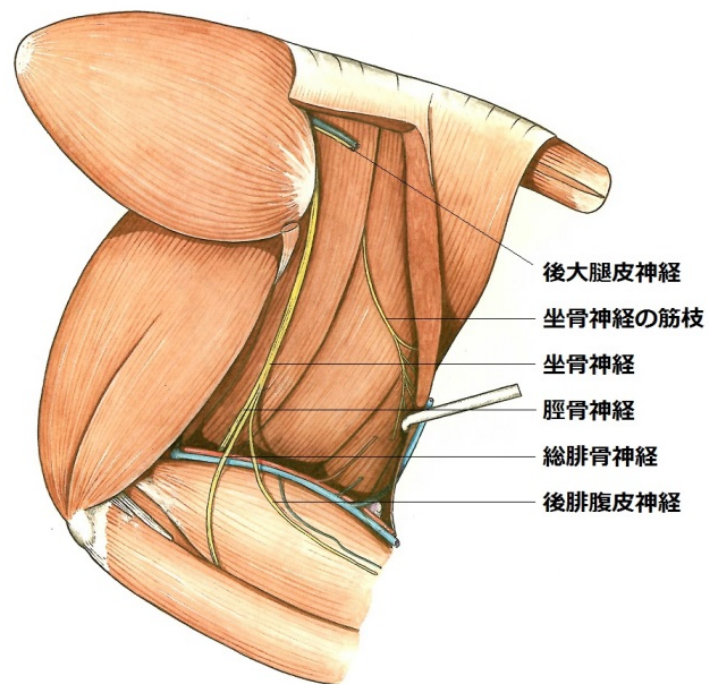


図 4 ラット後肢背側面の神経分部（上）とリドカイン投与部位（下）
大腿神経走行部である大転子と坐骨結節の間（赤枠）にリドカインを投与した。

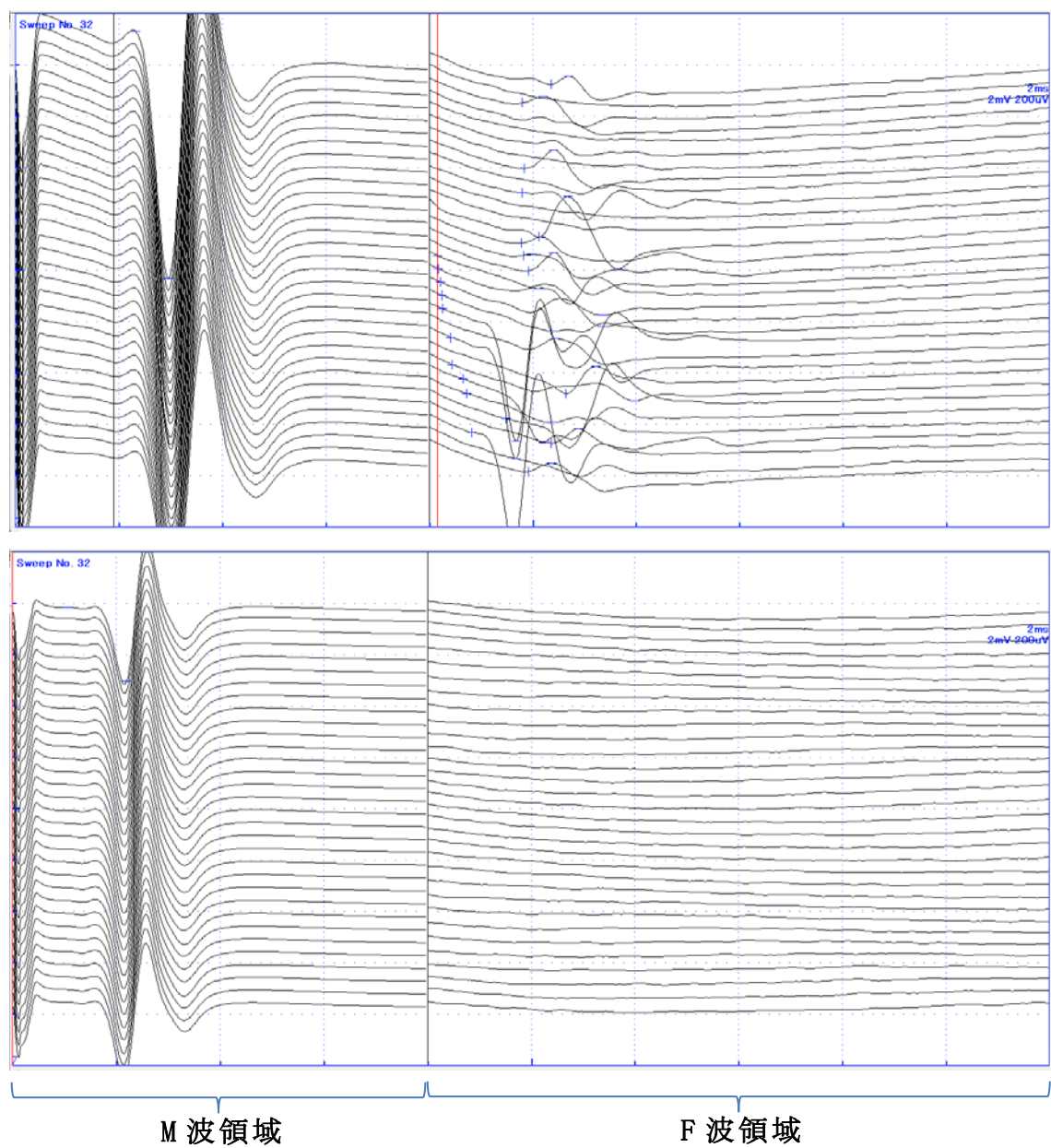


図 4 リドカインによってラットの坐骨神経を遮断前（上）と遮断後（下）の F 波

坐骨神経遮断後に、脛骨神経刺激により発生した F 波が消失した。

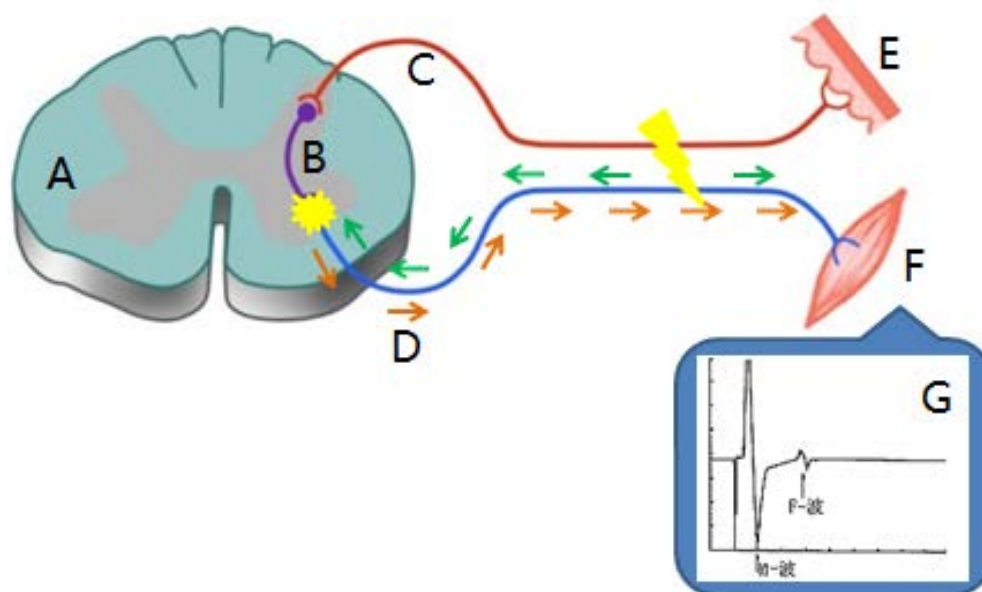


図 5 F 波測定 の 概念 図

電気刺激により運動ニューロンが両向性に興奮し、まず下行性伝導は一回骨格筋を興奮して M 波が発生する。上行性伝導は脊髓腹角運動ニューロンを興奮させ、その下行性伝導はまた骨格筋を興奮させて F 波が発生する。

A: 脊髓断面、B: 介在ニューロン、C: 感覚ニューロン、D: 運動ニューロン、E: 皮膚、F: 骨格筋、G: 電気刺激した際に発生した筋電図。

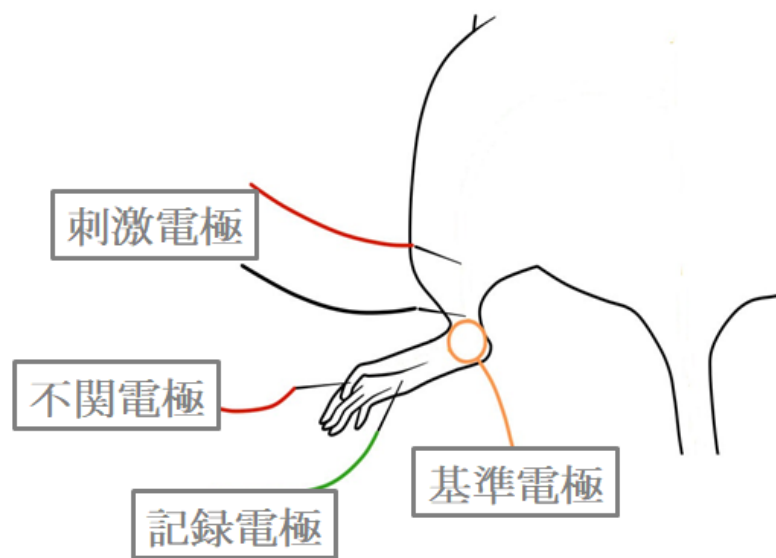


図 6 F 波測定における各電極の位置

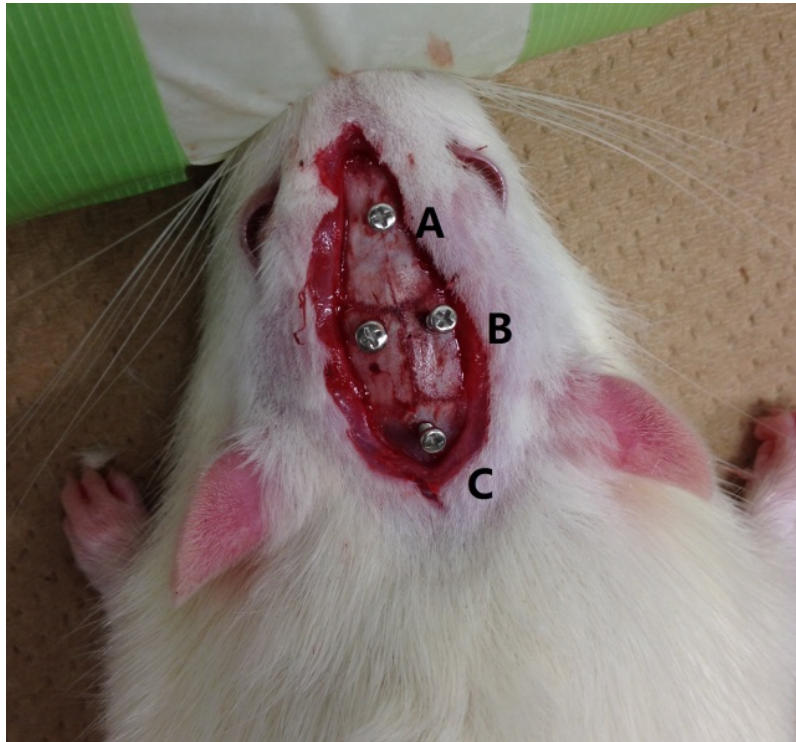


図 7 SEP 検査用電極をラットの頭蓋骨に植入了た写真

A は不感電極、B は記録電極、C は基準電極。ネジの直径は 1.4mm である。

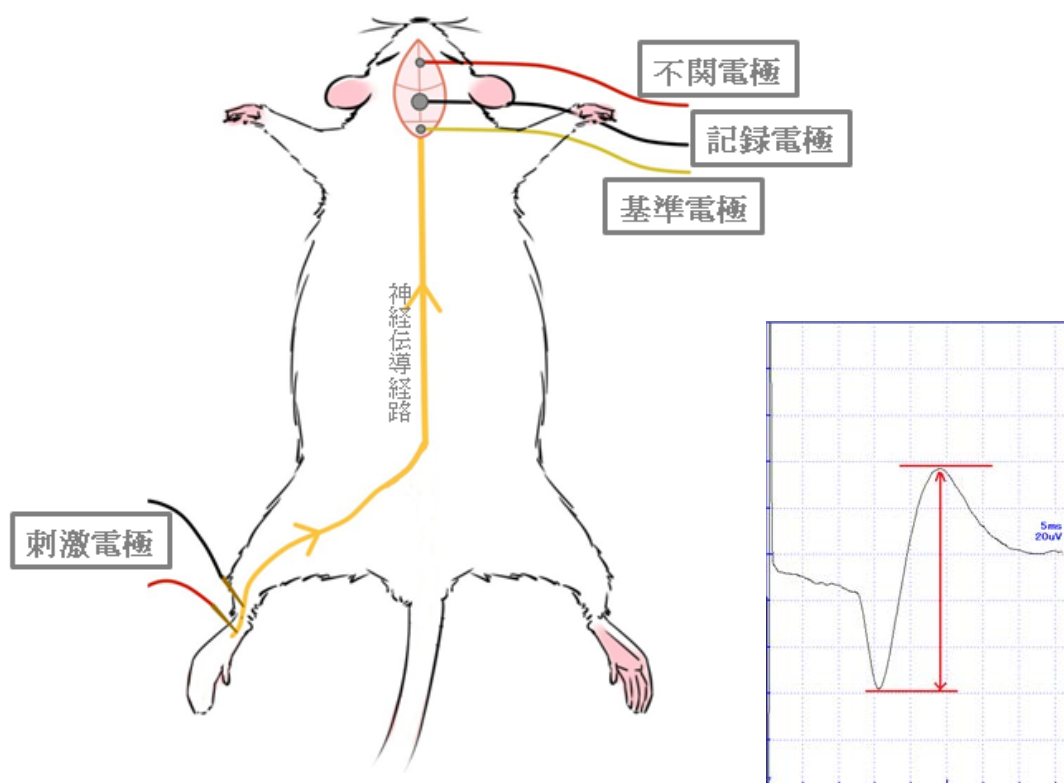


図 8 ラット体性感覚誘発電位（SEP）検査の各電極の位置（左）および代表的な波形（右）

赤の矢印で示した箇所が評価の対象とした振幅である。

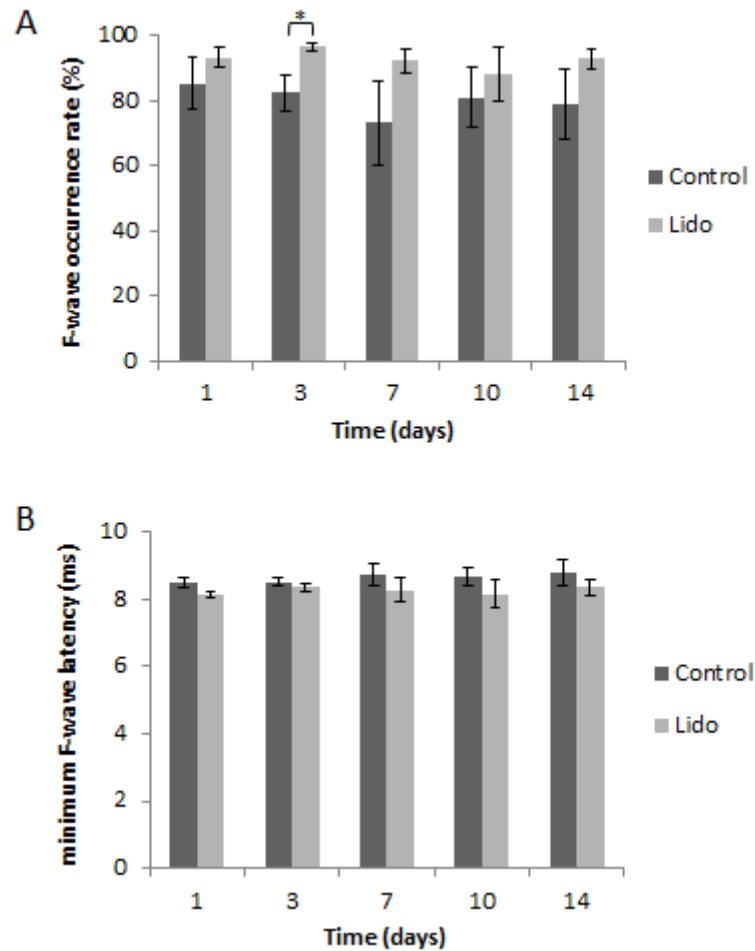


図9 リドカイン反復投与によるF波パラメーターの変動

AはF波出現率（F-wave occurrence rate）の経時的変動。リドカイン反復投与後の3日目に、Lido群のF波出現率はControl群に比べて有意に高かった。その以外の日には、Lido群とControl群に比べて差はなかった。BはF波最小最小潜時（minimum F-wave latency）の経時的変動。14日間のリドカイン反復投与において、Lido群とControl群に比べて差はなかった。

データは平均値±標準誤差で示した（Control $n = 4$; Lido $n = 5$ ）。群間の比較はBonferroni testで解析を行った。 $*P < 0.05$ とした。

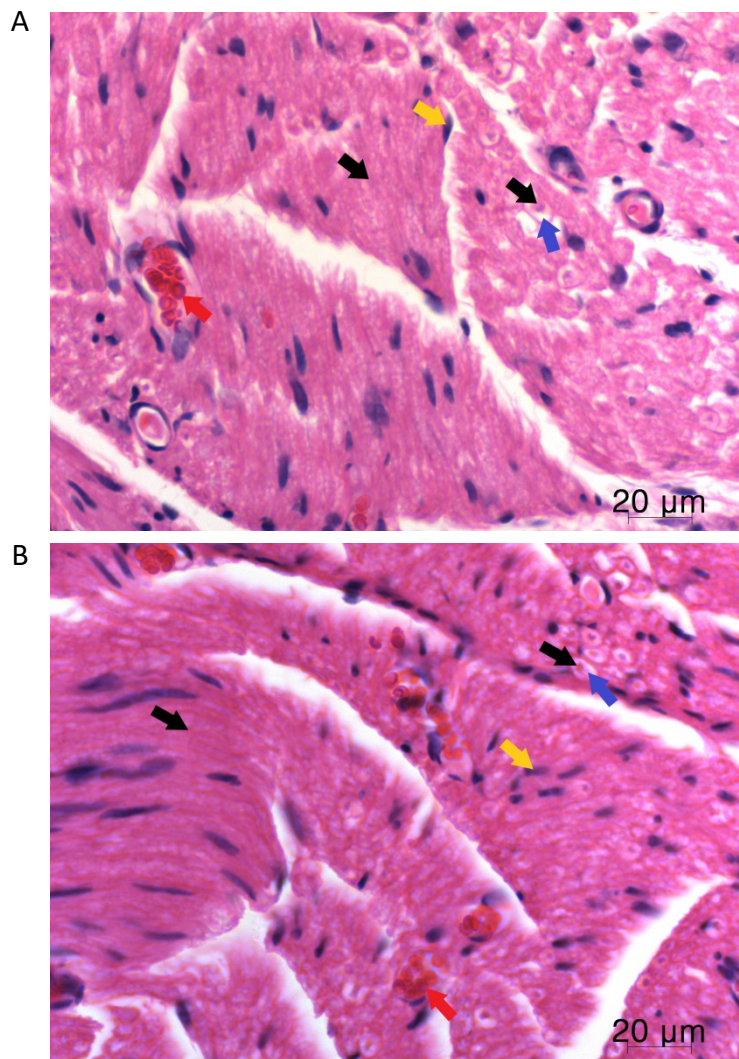


図 10 坐骨神経ヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色画像 (×400)

A は Control ラットの正常坐骨神経組織。異なるサイズの有髄神経が大量に存在し、いくつかの小血管が神経線維の間に散在した。B は Lido ラットの坐骨神経組織。Control ラットと同様な組織構造を呈し、炎症性細胞の浸潤や脱髄、空胞変性などの典型的な神経病理学的変化はなかった。

黒矢印：軸索の横断面または縦断面、青矢印：脂質ミエリン鞘、黄矢印：シュワン細胞核、赤矢印：血管。

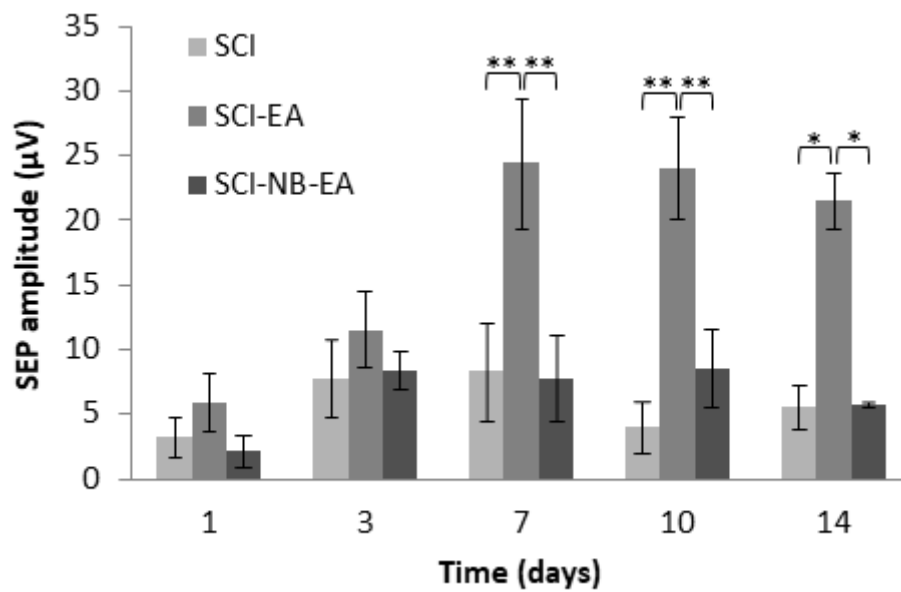


図 11 SEP 振幅 (SEP amplitude) の経時的変化

脊髄損傷による各群の SEP 振幅は著しく低下した。脊髄損傷後の 7 日目から、SCI-EA 群の SEP 振幅は SCI 群および SCI-NB-EA 群に比べて有意に上昇した。SCI 群と SCI-NB-EA 群の間に差はなかった。

データは平均値 ± 標準誤差で示した (SCI n = 6; SCI-EA n = 6; SCI-NB-EA n = 6)。各群間の比較は Bonferroni test で解析を行った。

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ とした。

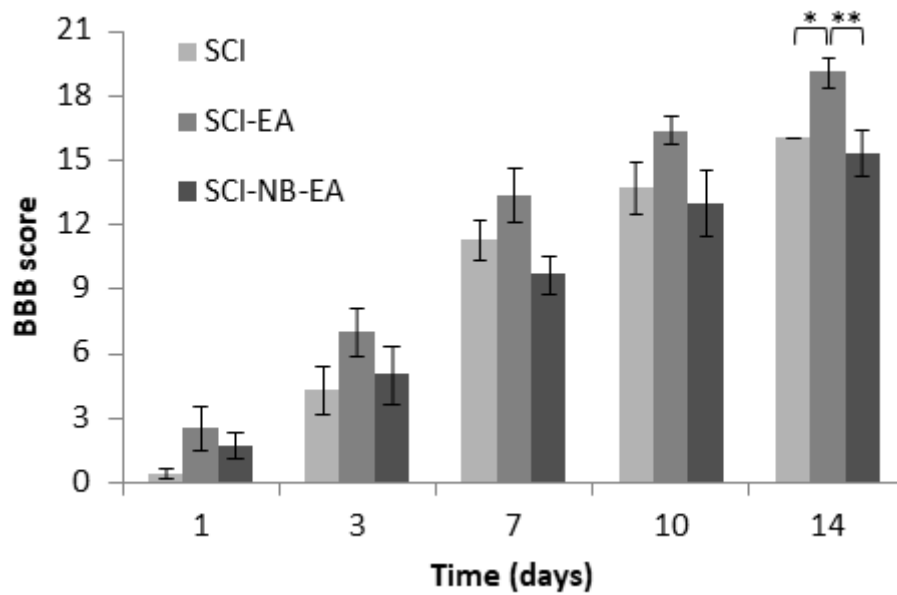


図 12 BBB テストの経時的変化

脊髄損傷による各群の BBB スコアは著しく低下した。脊髄損傷後の 14 日目に、SCI-EA 群の BBB スコアは SCI 群および SCI-NB-EA 群に比べて有意に高かった。SCI 群と SCI-NB-EA 群の間に差はなかった。

データは平均値±標準誤差で示した (SCI n = 6; SCI-EA n = 6; SCI-NB-EA n = 6)。各群間の比較は Bonferroni test で解析を行った。

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ とした。



図 13 ラットの第 1-2 腰椎部脊髄

尾側（写真上部）が脊髄神経の束となっている。

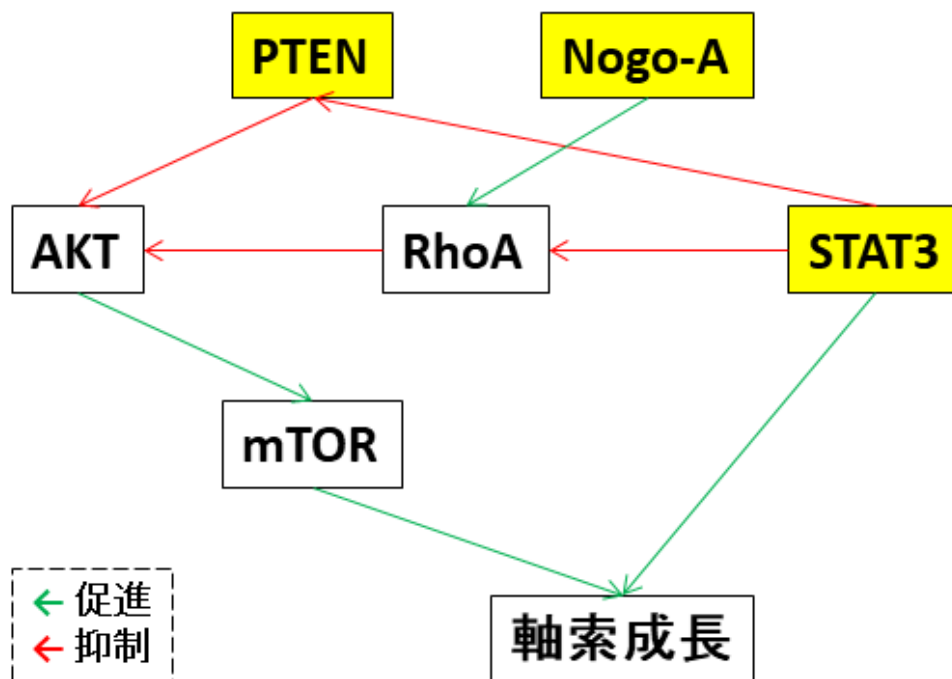


図 14 Nogo-A、PTEN、STAT3 の軸索成長信号通路



図 15 ラットにビオチン化デキストランアミン (biotinylated dextran amine, BDA) を大脳皮質感覚運動野に注入時の写真

左上は Bregma を中心に注射用穴を 12 個開けた。右下はマイクロシリ
 ンジで大脳皮質に注射。右上は実験中の全体像。右下は頭部皮膚の縫
 合。



図 16 タンパク質染色試薬を大脳皮質注入による染色

タンパク質染色試薬である Coomassie brilliant blue R-250 を BDA 脳内注入と同じ方法で大脳皮質に注入した後、脳の解剖によって大脳皮質内が染められること（青）を確認した。

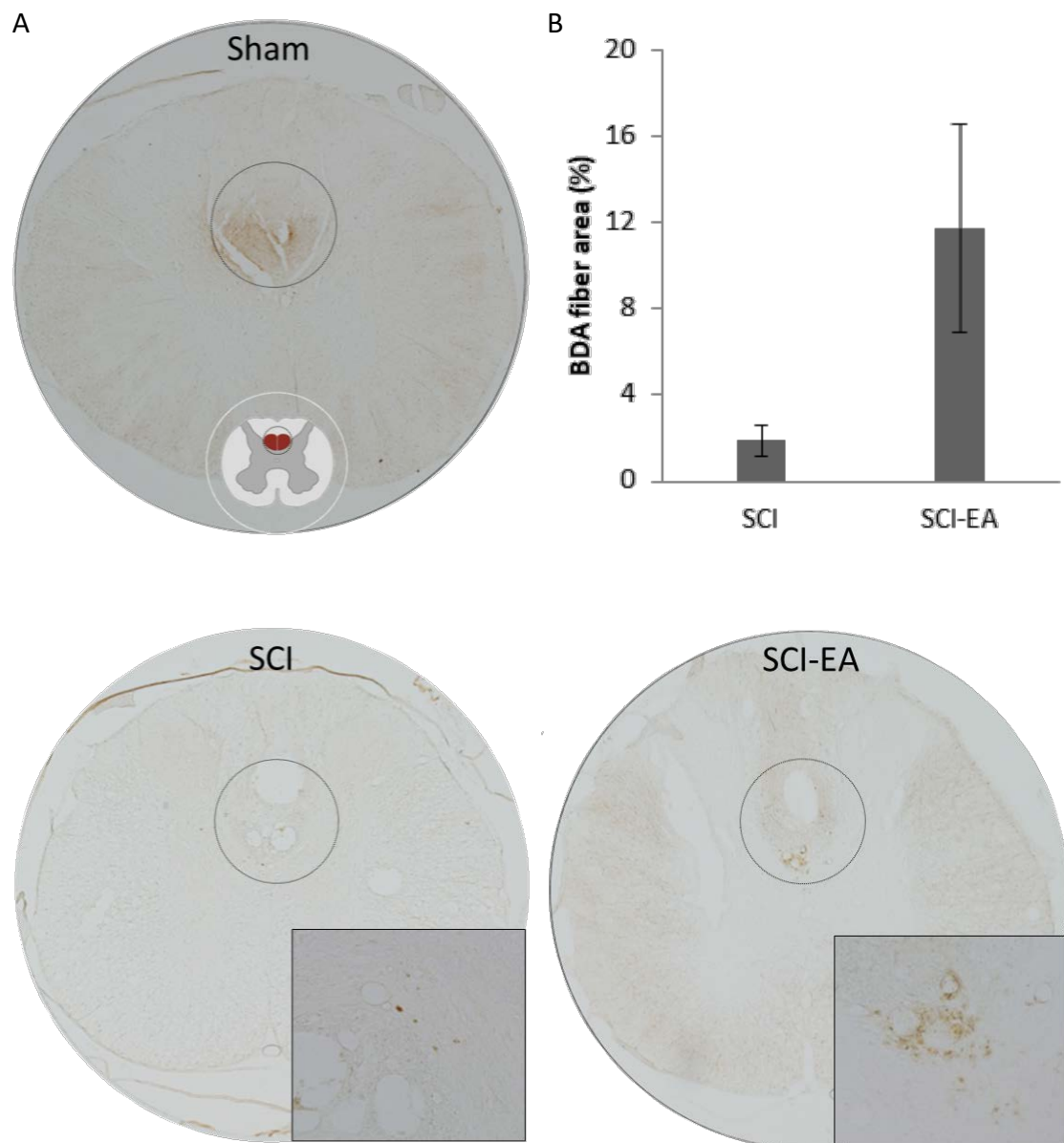


図 17 ラット皮質脊髄路 (corticospinal tract, CST) の評価

順行性神経トレーサー試薬であるビオチン化デキストランアミン (biotinylated dextran amine, BDA) をラットの大脳感覚運動皮質に注入することによって CST の評価。A は各群代表的な染色像。丸い点線内に茶色で染まれた CST 神経線維である ($\times 400$)。B は imageJ によって CST 神経線維の面積を定量化した結果。Sham 群の値は 100% とし、SCI 群と SCI-EA 群の間に差はなかった。

データは平均値 \pm 標準誤差で示した (Sham $n = 4$; SCI $n = 5$; SCI-EA $n = 5$)。群間の比較は paired Student's t -test で解析を行った。

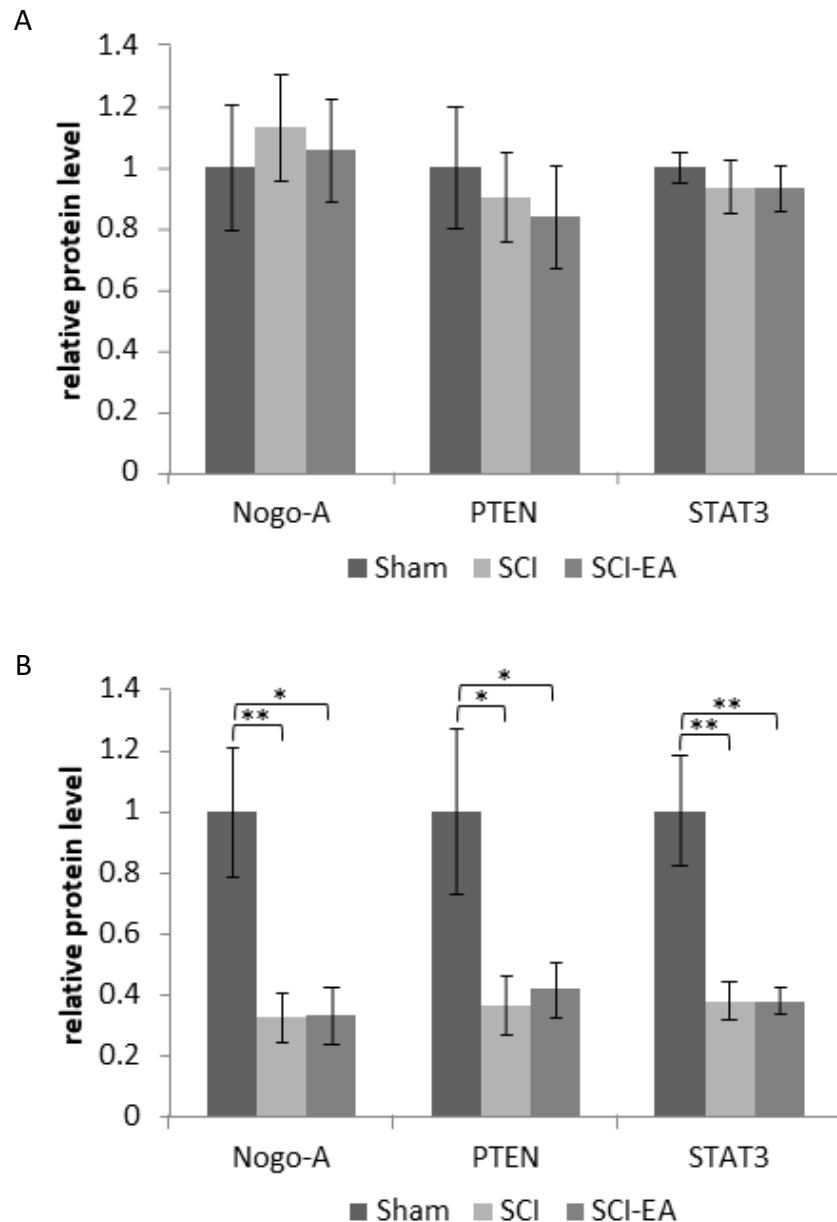


図 18 Nogo-A、PTEN、STAT3 相対タンパク質発現量

A は大脳感覚運動皮質において Sham 群、SCI 群、SCI-EA 群の間に差はなかった。B は脊髄損傷部において SCI 群と SCI-EA 群が Sham 群に比べて有意に減少した。SCI 群と SCI-EA 群間に差はなかった。

データは平均値±標準誤差で示した (Sham n = 4; SCI n = 6; SCI-EA n = 6)。群間の比較は paired Student's t-test で解析を行った。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ とした。

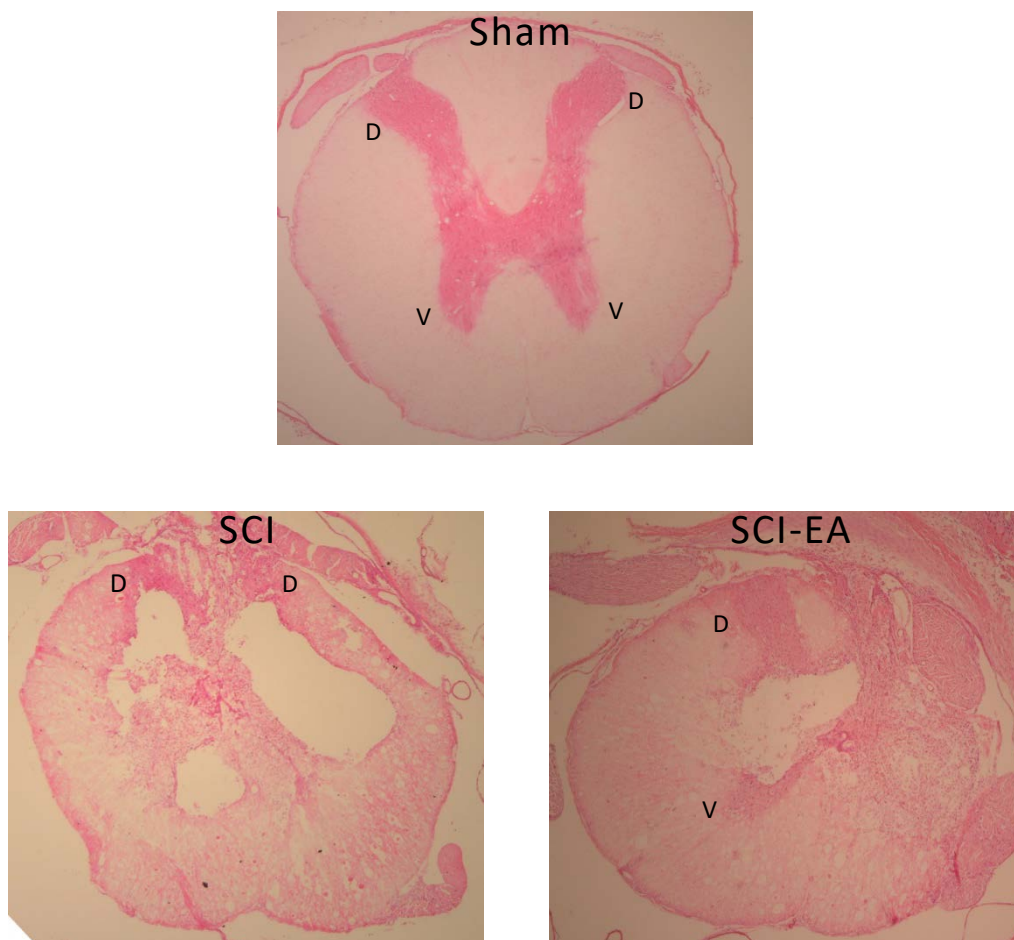


図 19 ラット脊髄へマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色画像 (×400)

各群の代表的な HE 染色像 (D : 背角、V : 腹角)。Sham 群と比べ、SCI 群と SCI-EA 群では、脊髓空洞、炎症細胞浸潤及び灰白質の変性が見られた。

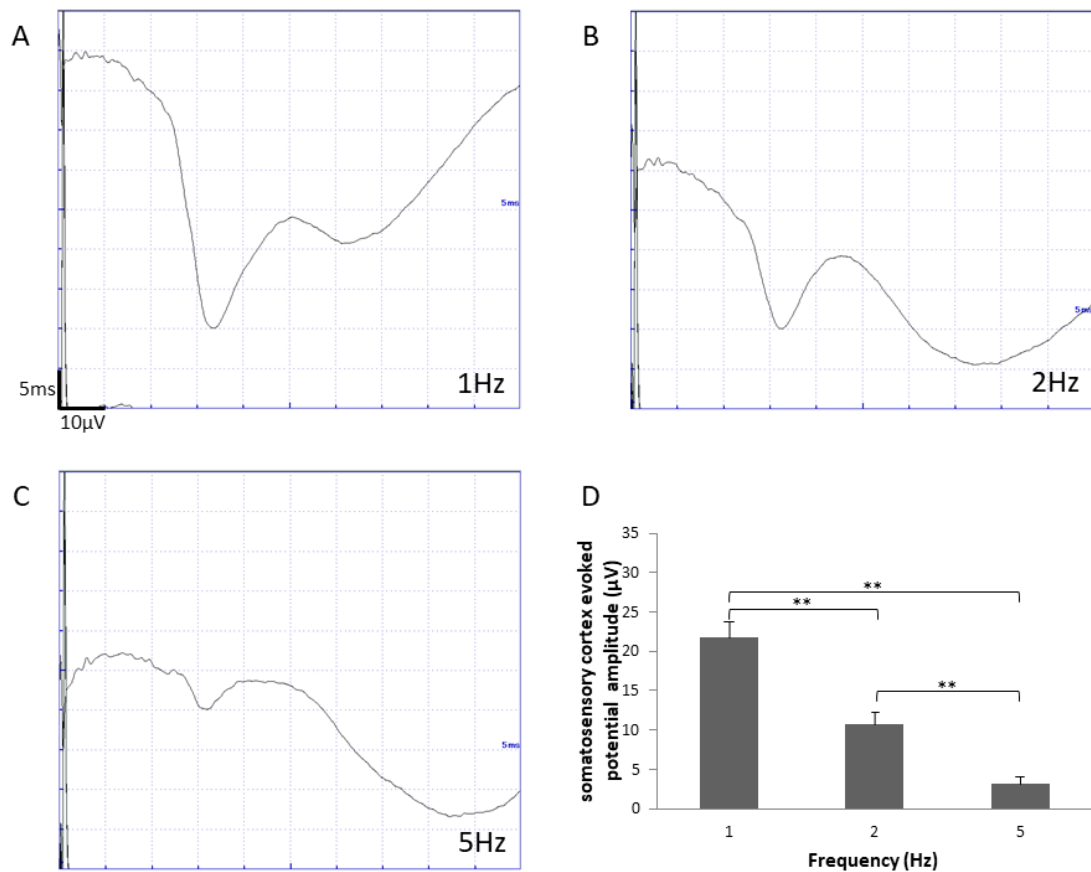


図 20 異なる刺激頻度（1Hz、2Hz、5Hz）において足三里（ST36）電鍼刺激による体性感覚皮質誘発電位振幅の変化

A-C は各刺激頻度の体表的な体性感覚皮質誘発電位の波形。D は各刺激頻度において ST36 電鍼刺激による体性感覚皮質誘発電位の振幅。1Hz は 2Hz と 5Hz に比べて有意に高く、2Hz は 5Hz に比べて有意に高かった。

データは平均値±標準誤差で示した（ $n = 6$ ）。各群間の比較は Bonferroni test で解析を行った。 $**P < 0.01$ とした。

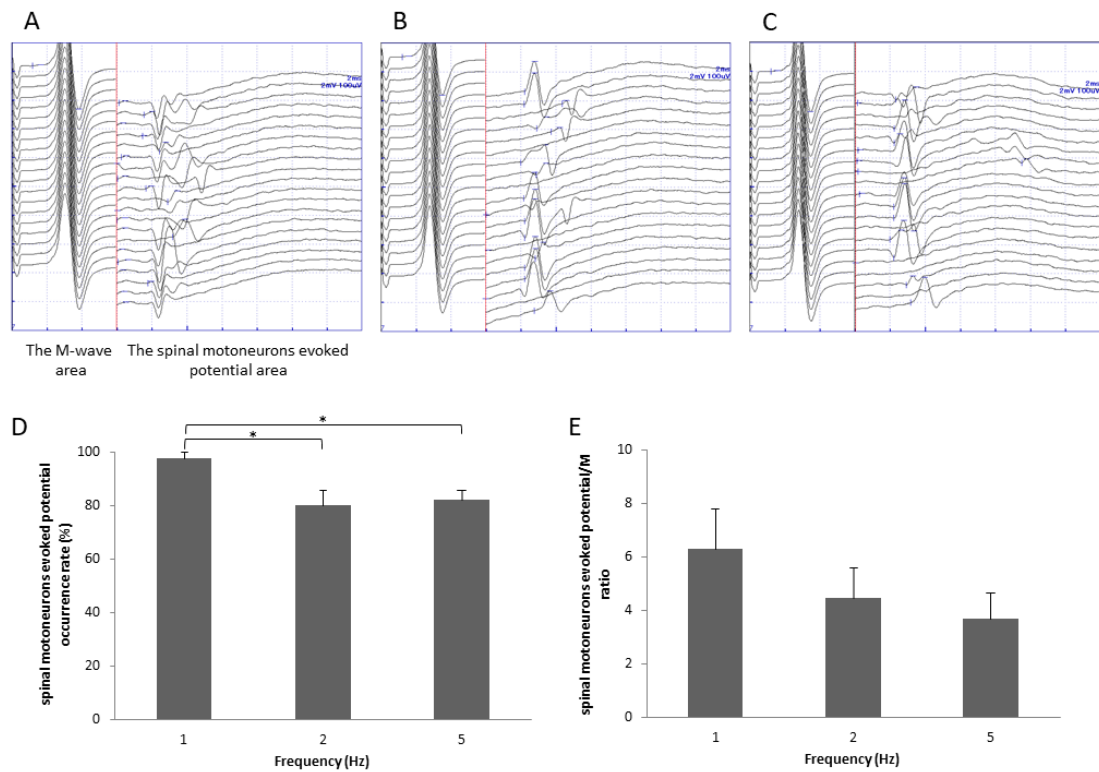


図 21 異なる刺激頻度（1Hz、2Hz、5Hz）において足三里（ST36）電鍼刺激による脊髄運動ニューロン誘発電位パラメーターの変化

A-C は各刺激頻度の体表的な脊髄運動ニューロン誘発電位の波形。D は脊髄運動ニューロン誘発電位出現率。1Hz は 2Hz と 5Hz に比べて有意に高く、2Hz と 5Hz の間に差はなかった。E は脊髄運動ニューロン誘発電位/M 振幅比。1Hz、2Hz、5Hz の間に差はなかった。

データは平均値±標準誤差で示した（ $n = 6$ ）。各群間の比較は Bonferroni test で解析を行った。 $*P < 0.05$ とした。

参考文献

本論文の一部は、以下に公表した。

1. Song Meng, Chen Wu, Kamiie Junichi, Okuno Seiichi, Orito Kensuke: Electroacupuncture improves neuronal function by stimulation of ascending peripheral nerve conduction in rats with spinal cord injury. J Tradit Chin Med, 39(4):509-515, 2019