

氏 名（本籍）	宋 朦（中華人民共和国）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	甲第 161 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	（主査）折 戸 謙 介 （副査）村 上 賢 上 家 潤 一

論 文 内 容 の 要 旨

【背景と目的】

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る。犬において、落下事故や腫瘍、椎間板ヘルニアなどにより生じる脊髄損傷は、炎症、神経組織の破壊により四肢、内臓麻痺などの機能障害を引き起し、生活の質を著しく低下させる。

電鍼療法（electro-acupuncture）は中国伝統医学の鍼灸療法に基づいて電気刺激を併用し、より高い効果を求める治療法である。犬脊髄損傷に対して四肢麻痺の改善など、高い有効性を示すことが経験的には認められている。しかし、その効果メカニズムについてはまだ完全に明らかにされていない。

本研究では、電鍼療法と神経活動との関連性に視点を当て、その効果メカニズムの一端を解明し、臨床応用のための科学的根拠を明確にすることを目的とした。第一章では、ラット脊髄損傷モデルにおいて電鍼療法による神経機能改善効果を客観的に評価する方法を確立した。さらに電鍼部位と脊髄の間の神経伝導路（坐骨神経）を遮断することにより、電鍼刺激の神経機能改善効果に対する影響を評価した。第二章では、電鍼療法の神経回路修復に対する影響を調べるため、神経順行性トレーサー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。そして、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。第三章では、足三里（ST36）の電鍼刺激が脛骨神経の神経刺激と同様に神経活動を誘発するかを調べた上で、電鍼刺激頻度の違いによる神経誘発電位の変化を評価した。

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

【方法】

実験にはSDラット（オス, 7週齢）を用いた。初めに局所麻酔薬であるリドカインの反復投与による末梢神経に対する毒性の有無を確認するために、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、Lido 群のラットにイソフルラン麻酔下で、ラットの両側坐骨神経の通過点（大転子と坐骨結節の間）にリドカイン（1%, 0.5mL）を1回/日、14日間注入した。実験の第1、3、7、10、14日目に、Control 群と Lido 群において誘発筋電図検査（F波検査）を実施し（Lido 群は、リドカイン投与直前に実施）、末梢神経機能を評価した。そして、14日目にリドカイン投与部位付近の坐骨神経を採材し、各群のラット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の電鍼刺激効果へ及ぼす影響を観察する実験では、最初に体性感覚誘発電位（Somatosensory Evoked Potential, SEP）を記録するための脳波表面電極をラットの頭蓋骨に取り付けた。4・5日後に、すべてのラットにおいて第8・9胸椎の椎弓を切除し、脊髄硬膜を露出した箇所に10gのロッドを20mm上から落下させることで脊髄損傷を引き起こした。これらの脊髄損傷ラットを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 群および SCI-NB-EA 群では、脊髄損傷の直後から、イソフルラン麻酔下で、ST36にて刺激頻度1Hz、20分間/日で14日間電鍼刺激を実施した。神経遮断は、ラットの両足にリドカインを0.5mLずつ、毎日の電鍼刺激を行う直前に坐骨神経の通過点に注入することで実施した（SCI-NB-EA 群）。神経機能検査は、電気生理学的検査である SEP 検査および行動学的機能検査である BBB テスト（Basso Beattie Bresnahan test）を、損傷前および損傷後1、3、7、10、14日目に実施した。

【結果と考察】

リドカインの14日間反復投与は、F波検査および組織学検査により、コントロールとの差は認められなかった。即ち、リドカイン反復投与は、坐骨神経に対して機能的、組織的に影響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た。

脊髄損傷により、ラットの神経機能は著しく低下した。その後、各群ラットの感覚機能および運動機能は徐々に回復し、7日目から SCI-EA 群の SEP の振幅が SCI 群（ $P < 0.01$ ）および SCI-NB-EA 群（ $P < 0.01$ ）と比較して有意に高かった。また、14日目の 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。しかし、SCI 群と SCI-NB-EA 群の間にはこの差異は認められなかった。以上の結果より、電鍼刺激は脊髄機能回復を促進すること、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が明らかとなった。以上のことから、電鍼療法メカニズムとして神経上行性伝達が関連することが考えられた。

第二章 電鍼刺激の神経回路修復に対する影響

【方法】

実験にはラットの偽処置群 (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) を用いた。Sham 群では、第 8-9 胸椎の椎弓を切除し、脊髄硬膜を露出した後に、打撃を行わずに縫合した。SCI 群および SCI-EA 群において、「第一章」と同じ方法で脊髄損傷モデルを作成した。SCI-EA 群において、脊髄損傷モデルを作成後に電鍼刺激を 14 日間行った。

CST 観察実験では、脊髄損傷モデルを作成した 14 日後、大脳感覚運動皮質に、マイクロシリンジで 10% ビオチン化デキストランアミン (biotinylated dextran amine, BDA) を注入した。更に 14 日後に、損傷部位後部の脊髄を採材し、そこに到達した CST 線維をアビジン-ビオチン複合体 (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC) 染色法により染色した。

軸索再生サイトカインに関する実験では、脊髄損傷モデルを作成した 14 日後に、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、ウェスタン・ブロッティング法を用いて Nogo-A (Neurite outgrowth inhibitor A / Reticulon 4A)、PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10)、STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) のタンパク質定量測定を実施した。

【結果と考察】

Sham 群の脊髄切片に、染色された CST 神経線維が観察された。これに対して、SCI 群および SCI-EA 群の CST 線維染色像は、わずかな点状に散見されるのみであった。画像解析の結果では、SCI-EA 群の CST 線維染色領域は、SCI 群に比べ多い傾向にあったが、統計学的有意差は認められなかった。

Nogo-A、PTEN、STAT3 のタンパク質発現量は、大脳感覚運動皮質において、SCI 群および SCI-EA 群と Sham 群を比較し、明らかな違いは認められなかった。脊髄損傷部位において、SCI 群および SCI-EA 群が Sham 群に比べ、有意に少なかったが、SCI 群と SCI-EA 群間に明らかな違いは認められなかった。

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われたことが実験結果に影響を及ぼす可能性などが考えられた。

第三章 電鍼刺激頻度の違いが神経活動に及ぼす影響

【方法】

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取り付けた。電極の埋め込み、電気生理学的検査および電鍼刺激は「第一章」と同じ方法で行った。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の実験は、異なる日に実施した。

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。

【結果と考察】

脛骨神経刺激と ST36 電鍼刺激を比較する実験において、同じ刺激頻度(1Hz)で ST36 電鍼刺激と脛骨神経刺激を比べると、SEP 振幅、F 波出現率および F/M 振幅比には、有意な違いが認められなかった。

異なる刺激頻度による ST36 電鍼刺激を比較する実験では、体性感覚皮質誘発電位振幅は、1Hz に比べ、2Hz ($P < 0.01$) と 5Hz ($P < 0.01$) が有意に低く、2Hz に比べ、5Hz ($P < 0.01$) も有意に低かった。脊髄運動ニューロン誘発電位出現率は、1Hz に比べ、2Hz ($P < 0.05$) と 5Hz ($P < 0.05$) が有意に低かった。2Hz と 5Hz の間に違い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 の間に差は認められなかった。

ST36 での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、電鍼刺激が神経経路を活性化させることを示唆している。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、刺激頻度を変化させると、体性感覚皮質および脊髄運動ニューロン神経の活性が変化することを明らかにした。

【総括】

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を明らかにした。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。

論文審査の結果の要旨

1. 論文の内容

犬で多く発生する落下事故や腫瘍、椎間板ヘルニアなどによる脊髄損傷に着目し、中国伝統医学的治療法である電鍼治療の効果メカニズムについて、形態的ならびに機能的側面から評価した研究である。「脊髄損傷に対する電鍼療法メカニズムのひとつとして神経刺激が関与している」という仮説を立て、以下の三章で、電気生理学的、行動学的ならびに免疫組織学的アプローチにて仮説を証明した。

第一章では、ラット脊髄損傷モデルを作成し、電鍼刺激による神経機能改善効果を客観的に評価する方法を確立した。電鍼刺激の穴位は、獣医臨床においてヘルニア治療に利用されている足三里（ST36）とした。電鍼刺激による神経機能改善効果は、電鍼部位と脊髄間の神経伝導路（坐骨神経）へのリドカイン投与で消失した。また脊髄損傷による歩様異常も電鍼刺激で改善し、リドカイン投与でその改善効果は消失した。これらの結果より、電鍼治療の少なくとも一部に神経の電気刺激効果が関与していることを明らかにした。

第二章では、電鍼療法の神経回路修復について、神経順行性トレーサーを用いて脳から脊髄への皮質脊髄路の状態を指標に評価した。さらに軸索再生に関与するサイトカインをウエスタンブロット法を用いてタンパクレベルで評価した。その結果、脊髄損傷による皮質脊髄路の障害が、電鍼刺激により回復する傾向が認められたが、有意差は認められなかった。

第三章では、ST36の電鍼刺激が脛骨神経の神経刺激と同様に神経活動を誘発することを明らかにした上で、電鍼刺激頻度の違いによる神経誘発電位の変化を評価した。その結果、1 Hzを基軸として刺激頻度を2 Hz、5 Hzに上げると、運動神経興奮の指標となる脊髄運動ニューロン誘発電位の振幅は頻度依存性に低下し、出現率も低下した。体性感覚皮質誘発電位も、刺激頻度の増加で低下した。これらの結果より、電鍼刺激頻度の増加は、骨格筋収縮を介した上行性知覚神経の活性化や、抑制性神経の活性化などを通じ誘発電位抑制が惹起されることが推察された。

本研究により、電鍼療法効果には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。電鍼刺激による軸索再生サイトカイン活性化については、脊髄損傷の程度の変更や電鍼治療期間の延長など、実験条件の再検討が必要である。電鍼刺激頻度により神経活性化の変化があったことより、実際の電鍼治療においては、疾病に最適な刺激頻度を検討する必要性を提示した。

2. 論文審査

1) テーマの立て方

中国伝統医学である鍼治療は、経験的にはその効果は実証されているものの、その生理学的側面からのメカニズム解明については、いまだ不明なところが多い。この点に着目して、電鍼治療への神経伝達の関与、神経修復因子活性化の可能性を、薬理学的、電気生理学的並びに免疫組織学的側面から解明を試みた。さらには、電鍼治療時の刺激頻度の重要性について、電気生理学的手法を用いて明らかにし

た。このように、形態と機能の両面からの電鍼治療効果メカニズム解明へのアプローチは独創的であり、かつ中獣医療の基盤的研究としての価値が高いといえる。

2) 研究の背景

脊髄損傷は、犬における椎間板ヘルニアや落下事故、腫瘍などにより生じる深刻な疾病である。その治療法として、痛みを和らげる薬物治療や、原因となる腫瘍や髄核の切除、脊髄神経圧迫解除のための椎弓除去術などが実施されている。その他の治療法のひとつとして電鍼治療がある。

経絡は、古代中国の医学において、人体の中の気や血液の通り道として考え出されたものである。その走行は、解剖学的には血管や神経の走行に類似している箇所が多い。本研究はこの点に着目し、脊髄損傷に対する電鍼療法メカニズムのひとつとして神経刺激伝達があるという仮説を立て、その証明に取り組んだ。脊髄損傷についての薬理学的、外科学的治療法について先行文献を多角的に調べることで、明確な目標を立てることができていた。

3) 研究の方法

神経遮断ツールとして Na チャネルブロッカーのリドカインを用い、電気生理学的手法（F 波検査）を用いて神経遮断を客観的に評価している。また、脊髄損傷回復の評価方法として、歩様評価と共に電気生理学的手法（体性感覚誘発電位）を用いている。脊髄皮質路に対する作用は、神経順行性トレーサーを用いて免疫組織学的に評価し、軸索再生サイトカイン活性化については、ウェスタンブロット法を用いて評価している。このように、脊髄の病態の多角的評価を可能としている。

4) 研究の結果

足三里への電鍼刺激が、脊髄損傷を機能的に回復させること、その回復がリドカインによる坐骨神経経路の遮断により消失することを、歩様解析と電気生理学的手法を用いて明らかにした。この成果により、電鍼治療の少なくとも一部は神経刺激による効果であるという仮説を証明できた。一方で神経修復因子の解析では、電鍼刺激の分子メカニズムの解明には至らなかった。この点については、さらなる研究が必要である。総じて適切な実験動物数を用いて実験を行い、得られた結果を、適切な統計学的手法を用いて評価した。

5) 考察と結論

本研究で用いたラットと獣医療対象である犬の神経走行の違いや、電気生理学的手法の特徴をわかりやすく説明した上で、本研究で得られた成果についての考察がされている。

6) 参考文献

本研究において必要である論文を緒言ならびに考察で適切に引用している。

3. 審査結果

本研究成果は、電鍼治療メカニズムの一端を機能的側面から解明しただけではなく、電鍼頻度の違いが神経伝導におよぼす影響を明らかにした。これらの知見は中獣医療と西洋医学を結び付ける拠点となる研究であり、博士（獣医学）の学位に相応しい業績であると判断した。