

研究テーマ：発達段階の違いが脊髄に鈍的外傷を受けた後の運動機能変化に与える影響	
研究代表者（職氏名）：助教 武本 秀徳	連絡先 (E-mail 等) : takemoto@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者（職氏名）：梅井凡子（助教），加藤洋司（講師），小野武也（教授），沖貞明（教授），梶原博毅（広島県医師会・室長）	

【背景と目的】

最近の細胞療法 (Bareyre, 2008) や分子生物学的手法の進歩 (Li ら, 2004) により, 損傷された脊髄の神経回路が修復可能となってきた。しかし, 現時点では, 神経回路を完全には修復できず, 運動機能の回復は部分的に促進されるに止まる。ヒトの脊髄損傷 (SCI) は, 機能的に完全損傷でも脊髄が切断されていることはまれで, 多くが不全損傷である (Bunge と Puckett, 1997)。不全 SCI では, 運動機能に自然回復がみられる (Burns ら, 1997)。よって不全 SCI の機能修復を図る上では, 神経回路の修復だけでなく機能の自然回復をいかに発揮させることができるのが課題となる。

身体の成長や加齢は, SCI 後における運動機能の自然回復に影響を与えられ, そのメカニズムの理解は機能の自然回復を促進させる治療戦略開発の一助となる可能性がある。SCI モデルでは, 生後間もない時期に障害を受けると成熟動物のような著しい運動障害を残さないこと, そして受傷時期が遅くなるにつれて残存する運動機能は漸減することが分かっている (Weber と Stelzner, 1977)。しかし, ヒト SCI の好発期である発達期以降において, SCI を受けた時期が運動機能に影響を与えるのかはほとんど検討されていない。我々の知る限りでは, ラット脊髄を鋭的に側半切した後の歩行機能をいくつかの週齢, 年齢間で比較した Gwak らの研究 (2004a, b) があるのみである。

平成 19 年度の実験において我々は, 神経学的な発達を終えて早期の 4 週齢ラット, そして発達を終えて長期経過した 12 週齢ラットに, ヒト SCI に似た鈍的外力を用いて SCI を作り, その後の歩行と姿勢制御の機能を調べた。その結果, 歩行機能について, 4 週齢ラットの方がより早く回復したが, 週齢の違いは回復程度に差を生まないこと。姿勢制御機能では 4 週齢ラットの方が回復に長期を要したが, より高い程度まで回復することが示された。したがって, 4 週齢ラットの方がより高い神経可塑性を持つことが分かったが, その神経解剖学的な基盤は不明なままだった。

延髄の縫線核から脊髄へ線維を投射するセロトニン (5-HT) ニューロンは, 歩行そして姿勢の制御に関与している (Pflieger ら, 2002; Kiehn と Butt, 2003)。4 および 12 週齢のラットに機能差をもたらすメカニズムとして, 5-HT 神経系の保存に差がある, 5-HT 神経系の保存には差はないが, その可塑性に差がある, 以上 2 点が考えられる。20 年度の実験は, これら 2 つの仮説の是非を明らかにする目的で実施された。

【材料と方法】

19 年度と同じ週齢のラットに対し同じ手順で SCI が作られ, 実験が行われた。用いられた実験動物は, 4 および 12 週齢の Wistar 系雄性ラットである。実験群として, 各週齢のラットに鈍的外傷による SCI を作った。SCI の作成は, T8 レベル胸椎を血管外科クリップにより圧迫 (把持力 25 g, 圧迫時間 60 秒) することで行った。同時に, 無傷の脊髄を持つ各週齢のラットを準備した。

各週齢の実験群, 対照群の歩行機能と姿勢制御機能を実験開始後 42 日まで調べた。歩行機能は

Basso-Beattie-Bresnahan score (Basso ら, 1995) を用いて点数化した。姿勢制御機能は、斜面上において姿勢保持できる最大角度 (Rivlin と Tator, 1977) として調べた。これらのテストから得られたデータは、19 年度の実験におけるデータと合算され、分析された。

腰仙髄へ投射した下行性伝導路のニューロンを可視化するため、まず L1 腰椎レベルの脊髄を切断した。次に蛍光逆行性トレーサー、Fluoro-Gold (FG) をゼラチンフォーム含ませ、これを頭側の断端に密着させることで導入した。FG の導入は、対照群では各週齢群とも 0 または 42 日飼育された時点で、実験群では各週齢群とも 42 日飼育された時点で実施された。7 日後、延髄を摘出し、連続横断切片を作成した。切片に 5-HT 合成の律速酵素、トリプトファン水酸化酵素 (TPH) に対する蛍光免疫染色を施した後、蛍光顕微鏡像を取得し、FG および TPH 陽性のニューロンの数を計測した。

統計学的分析として、実験開始時における週齢の違い、期間の経過、および異なる週齢で与えられた脊髄圧迫が、2 つの運動機能と FG および TPH 陽性のニューロン数に与える影響を検討した。

【結果と考察】

- (1) SCI を持たないラットでは、各運動機能とも、実験開始時の週齢の違い、期間経過の影響はなかった。よって、SCI を受けた各週齢のラットの運動機能に成長あるいは加齢の影響は含まれない。
- (2) SCI 後の運動機能は、歩行、姿勢制御の機能とも 4 週齢ラットの方が 12 週齢ラットより早い経過でより高い程度まで回復した。これらの結果は、発達期以降において SCI の時期が歩行機能の回復に与える影響を鋭的外力による SCI モデルを用いて検討した Gwak らの報告 (2004a, b) と類似する。19 年度の実験では、歩行機能は 4 週齢ラットの方がより早く回復したが、回復程度に週齢の違いは影響していなかった。姿勢制御機能については、4 週齢ラットの方が回復に長期を要したが、より大きな回復を示した。20 年度と 19 年度の実験の結果の間には相違点も見られるが、いずれの年度の実験でも 4 週齢ラットの方が機能に高い可塑性を示すことが確かめられた。19 年度の実験より、さらに多くのラットを用いて得られた 20 年度の実験結果の方がより精度の高い情報を提供していると考えられる。
- (3) SCI を持たないラットでは、実験開始時の週齢の違い、期間経過に関わらず、逆行性トレーシングと 5-HT 合成酵素への免疫染色の 2 つで可視化された腰仙髄に投射する 5-HT 産生ニューロン数は一定だった。これらの結果は、SCI を受けた各週齢のラットのニューロン数に、成長あるいは加齢の影響が含まれていないことを意味する。
- (4) SCI 後 42 日経過した各週齢のラットは、腰仙髄に投射する 5-HT 産生ニューロン数を減少させていた。しかし、SCI を受けた時期に差があっても、残されたニューロン数に差はなかった。したがって、4 および 12 週齢のラットの機能差は、5-HT 神経系の保存程度の差ではなく、その可塑性の差によってもたらされたと考えられた。
- (5) 発達期における SCI では、下行性伝導路線維の新たな伸張が脊髄の脱神経領域で観察されるが、これは SCI の時期が早いほど旺盛で、時期が遅くなるほど抑制される (Wang ら, 1998)。また加齢は、腰髄灰白質における 5-HT 線維を減少させることが知られている (Johnson ら, 1993; Ranson ら, 2003)。異なる時期に SCI を受けることは、これらの現象のため、脊髄の損傷部以下における 5-HT 線維の量に差をもたらす、運動機能の回復パターンに影響している可能性がある。この仮説を検証するため、19 および 20 年度の実験と同じ週齢のラットに同じ SCI を与え、その後の腰髄における 5-HT 線維の量的変化を現在分析中である。