

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500352

研究課題名(和文) 歩行機能回復に作用する中枢歩行制御システムの神経可塑性の解明

研究課題名(英文) Neural mechanisms of functional recovery of hindlimb locomotion after the spinal cord injury in quadrupeds.

研究代表者

松山 清治 (MATSUYAMA KIYOJI)

札幌医科大学・保健医療学部・教授

研究者番号：40209664

研究成果の概要：本研究では中枢部分損傷後の歩行機能回復の神経機序解明を目的とし、下部胸髄半切断を施した除脳ウサギ歩行標本を用いて解析を進めた。この結果、脊髄半切断急性期には脊髄健常側後肢のみに歩行運動が誘発されたが、半切約1週間後には両側後肢に誘発されることを見出した。脳幹-脊髄歩行神経機構における歩行駆動信号の伝達経路の同定や末梢感覚フィードバックの機能的役割に関する解析から、脊髄半切断後の歩行機能回復は、時間経過に伴って脳幹下行性系と脊髄神経機構に生じる可塑性変化による可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：運動系神経生理学

1. 研究開始当初の背景

歩行神経機構は個体発達過程で遺伝プログラムに従って順次形成されることから、すべての哺乳動物において歩行機能は個体発達の初期段階で安定した運動機能として獲得される。一方、歩行機能は疾病や外傷により中枢神経系に部分損傷が加わるだけで、その発現に支障を来すという脆弱性も併せ持つ。

研究代表者は歩行運動の中枢制御機序解明を目的としてネコを用いて研究を進め、歩行パターン発生やその統合に関わる脳幹-脊髄神経機構および歩行の高次制御に関わる大脳皮質及び小脳の出力系について構築

と作動様式の特徴を明らかにしてきた。とくに脳幹-脊髄神経機構については、左右協調歩行パターン形成に関わる脊髄交連ニューロン、脳幹の下行性出力路である網様体脊髄路と外側前庭脊髄路ニューロンに着目し、歩行リズムや歩行運動発現時におけるニューロン発射活動の特徴とこれらニューロン軸索の脊髄支配の形態的特徴を明らかにしてきた。

これより、網様体脊髄路と交連ニューロンの3者が歩行運動に際して基礎システムとして働くことを示唆してきた。この基礎システムを基準として、脊髄損傷など中枢神経系の部分損傷により、歩行運動の発現に如何なる

影響を与えるかを知ること、この実態を明らかにすることは神経可塑性の理解としてだけでなく中枢損傷患者の歩行機能障害の病態理解と機能改善にも繋がる重要なテーマと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では中枢損傷後に歩行機能回復に働く歩行制御系の神経可塑性メカニズムの解明を目的とした。このため、研究代表者が明らかにしてきた脳幹-脊髄内の基礎的歩行制御システムを基準として捉え、脊髄部分損傷後における歩行システムの機能発現様式について、歩行機能回復の程度と対応させて検討を加えた。実験動物には除脳ウサギおよび一部に除脳ネコを用いて、これらに下部胸髄レベルで脊髄片側切断を施した脊髄半切断モデルを作製し、以下の3項目に関して研究を計画した。

(1) 後肢歩行機能回復に関する検討

脊髄半切断された除脳動物の中脳歩行誘発野 (MLR) に微小電気刺激を加えて歩行運動を誘発し、後肢歩行動作と後肢筋群の筋活動から脊髄健常側と損傷側の歩行パターンの相違について経時的に比較・観察した。

(2) 脳幹-脊髄内神経接続に関する検討

歩行運動の基礎的発現に関わる脳幹-脊髄システムにおける歩行駆動信号の伝達経路の同定と末梢感覚 feedback の歩行発現への関わりを明らかにすることを目的とした。このため、除脳動物の脳幹~脊髄内に部分切断を施すと同時に筋弛緩剤静注により運動に伴う末梢感覚 feedback の遮断を行った。

(3) 脊髄交連ニューロンの形態学的検討

神経可塑性に関する形態学的アプローチとして腰髄交連ニューロンに着目し、歩行機能回復前後における軸索や樹状突起などの形態変化の有無について神経標識法を用いて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 後肢歩行機能回復に関する検討

① 脊髄半切断動物モデルの作製： ペントバルビタール深麻酔下で下部胸椎 (T10~T12) 片側の椎弓に小孔を開け、これを通して実体顕微鏡下で胸髄片側に限定した半切断を施した。半切断後に損傷軸索の再連絡を防止するため、切断空隙に脂肪組織を充填した。椎弓の小孔を歯科用セメントで閉鎖し、皮膚縫合して手術操作を完了した。手術後には感染防止のため抗生物質を連日投与する。

② 除脳動物標本の作製： 胸髄半切断を施した動物で、ハロセン-酸素混合ガス麻酔下で頭蓋骨を除去し脳を露出した。脳硬膜切開後に上丘前縁-乳頭体後縁を結ぶ面で上位脳を離断し、除脳動物標本を作製した。

③ 実験手順： 除脳動物の頭部を脳定位固

定装置に固定し、胸腹部をゴムベルトで保持し、四肢先端部をトレッドミル床面に接地する。中脳歩行誘発野 MLR に Wood 合金封入ガラス刺激電極を刺入し、連続微小電気刺激 (50 Hz, 持続 0.2 ms, 強度 10~110 μ A, 5~15 秒間) を加えて歩行運動を誘発した。歩行運動中に左右後肢の複数の伸筋・屈筋から筋電図 (EMG) を導出記録するとともに、歩行動作をビデオ撮影した。これらの記録をもとに、脊髄健常側と損傷側の後肢の歩行パターンの類似点と相違点を比較した。

(2) 脳幹-脊髄内神経接続に関する検討

① 歩行駆動信号の脳幹内伝達経路の同定

除脳動物の MLR 連続微小電気刺激により、歩行運動が誘発されるのを確認した。その後、除脳動物を再度ハロセン麻酔し、下部胸髄や上部頸髄部に半切断を加えた。一部の動物では脳幹内に部分切断を加えるため、ハロセン麻酔下で虫部を含む小脳中央部を吸引除去し第IV脳室底を露出した。その後、脳幹正中矢状面または前額横断面に沿って樹脂フィルム (幅 4~8 mm) を脳幹を貫いて頭蓋骨に達するまで垂直に挿入し、MLR 由来の歩行駆動信号の脳幹内伝達経路を部分遮断した。動物が麻酔から回復した後に MLR に電気刺激を加え、誘発された運動パターンや四肢筋 EMG 活動を記録した。

② 末梢感覚 feedback による影響

動物を除脳後に、筋弛緩剤を静脈注射し非動化した。非動化後直ちに動物を人工呼吸器に接続し呼吸管理を行った。呼吸 CO_2 を 3.5~5% に維持し、直腸温を 35~37°C に維持した。非動化動物に MLR 微小電気刺激を加え、筋収縮を伴わない歩行リズム、fictive locomotion を誘発した。この歩行リズムを観察するため、左右後肢伸筋及び屈筋支配神経にカフ電極を取り付け、electroneurogram (ENG) を記録した。一部のウサギには下部胸髄レベルに半切断を施した。

(3) 脊髄交連ニューロンの形態学的検討

ペントバルビタール深麻酔した脊髄半切断処置動物の腰部を腰椎固定装置に固定し、腰椎椎弓を切除し腰髄硬膜を露出した。脊髄損傷側または無傷側の後肢伸筋 (大腿四頭筋) 支配神経の電気刺激で誘発される脊髄背面電位を硬膜上より記録し、最大振幅値を示す腰髄の硬膜に小孔を開けた。小孔を介して記録電極と神経トレーサー注入用ピペットから成る2連ガラスピペットを腰髄内に刺入し、筋神経刺激で誘発されるフィールド電位の記録から一側腰髄前角のVIII層交連ニューロン層を同定し、ここに神経トレーサー (biotinylated-dextran amine, BDA) を微量 (5-10 nl) 圧注入した。4週間の生存期間後に動物を灌流固定し脊髄を摘出した。腰仙髄部の 50 μ m 連続切片を作製し、逆行性標識ニューロン並びに順行性標識線維を可視化

した。これらの組織標本を光学顕微鏡観察し、交連ニューロンの形態的变化、即ち、軸索や樹状突起などの伸長または退縮などの有無の確認を進める。

4. 研究成果

(1) 後肢歩行機能回復に関する検討

① 脊髄半切断急性期における歩行発現パターン

除脳ウサギの MLR 刺激することで、前肢と後肢に周期性の歩行運動が誘発された。前肢は左右交互運動を示したが、後肢は左右同位相の跳躍運動を示した。後肢の歩行運動パターンは刺激強度の程度に関わらず左右同位相であり、左右交互運動は誘発されなかった。

上記の観察後に動物を再度ハロセン麻酔し、下部胸髄 (T12) に半切断を加えた。麻酔回復後に再び MLR に刺激を加え、誘発された運動を観察・記録した。図 1 の例に示すように、脊髄左半切断後に MLR 刺激を加えると、前肢には左右交互運動が誘発されたが、後肢では脊髄健常側の右後肢にのみ跳躍運動が誘発された。最大強度の電気刺激を与えても脊髄半切側の左後肢には跳躍運動は誘発されなかった。

以上より、脊髄健常側を下行する MLR 由来の歩行駆動信号は、通常、同側脊髄に存在する後肢跳躍パターン発生機構 (CPG) のみを活動させると考えられた。

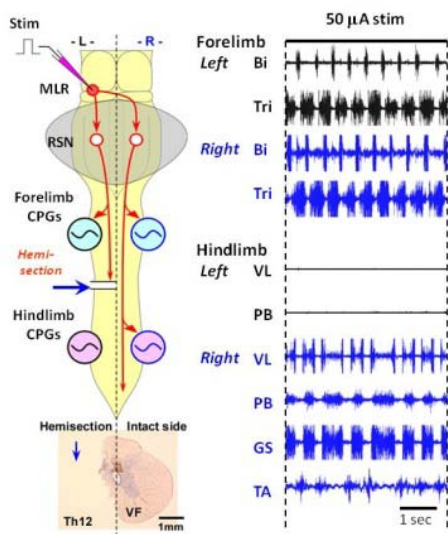


図 1 除脳ウサギの MLR 刺激で誘発された四肢筋活動。この例では除脳後に左下部胸髄部に半切断が施され、その約 1 時間後から MLR 刺激実験が行われた。

② 脊髄半切断慢性期における歩行発現パターン

実験に供する前に下部胸髄半切断処置を施したウサギを作成した。これらの動物を 4~8 日生存させた後に除脳標本とし、MLR 刺激により発現した歩行パターンを観察した。

図 2 には、左下部胸髄切断後 5 日生存させた後に除脳標本とした実験例を示す。この除脳ウサギの一侧 MLR を電気刺激したところ、両側前肢に左右交互運動が誘発され、加えて両側後肢にも左右同位相の跳躍運動が誘発された。即ち、脊髄健常側の後肢に加え、脊髄障害側の後肢にも歩行運動が誘発された。

これは脊髄健常側を一側性に下行する歩行駆動信号が左右腰髄の後肢跳躍パターン発生機構 (CPG) を駆動したためと考えられる。即ち、脊髄半切断急性期の MLR 刺激実験では脊髄健常側後肢のみに跳躍運動が誘発されたことから、半切断後の生存期間内に左右腰髄 CPG を機能的に結び付ける脳幹下行系や脊髄神経機能に可塑性変化が生じたものと推測された。

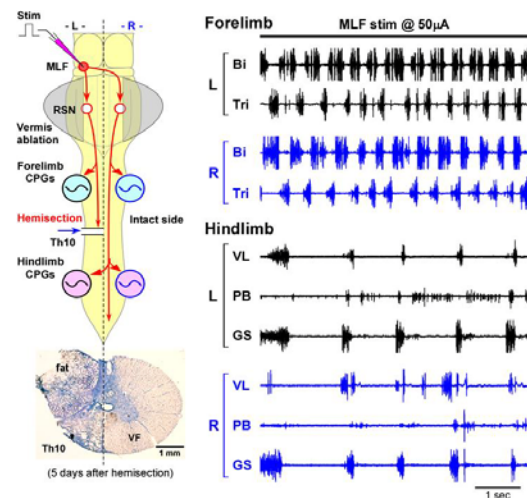


図 2 除脳ウサギの MLR 刺激で誘発された四肢筋活動。この例では左下部胸髄半切断後 5 日間生存させた後に除脳標本とされ、MLR 刺激実験が行われた。

(2) 脳幹 - 脊髄内神経接続に関する検討

① 歩行駆動信号の脳幹内伝達経路の同定

除脳動物の一侧 MLR に電気刺激を加えると両側前肢・後肢に歩行運動が誘発されるが、これは一侧 MLR 由来の歩行駆動信号が脳幹内で両側性に分配され両側脊髄に伝達されるためと推測される。この脳幹内伝達経路を知るため、脳幹及び脊髄に部分切断を加え、MLR 刺激で誘発される歩行パターンの特徴から伝達経路を推定した。

除脳ウサギの左下部胸髄に半切断術を施し、左 MLR を刺激すると、両側前肢に左右交互運動と脊髄健常側の右後肢に跳躍運動が誘発される (図 1 および図 3A)。これは左 MLR 由来の歩行駆動信号の一部が正中を交差し、反対側 (右側) 脊髄にも伝達されるためと考えられる。(1)-①の研究成績から、脊髄を下行する歩行駆動信号は通常では交差性に伝達されないことが示された。従って、片側 MLR から交差性に反対側脊髄に伝達される神経

信号は脳幹内で交差したものに由来すると考えられた。この脳幹交差部位を明らかにするため、除脳ウサギの中脳～延髄レベルで正中矢状断面に沿って垂直に切断を加え、MLR刺激効果への影響について観察した。

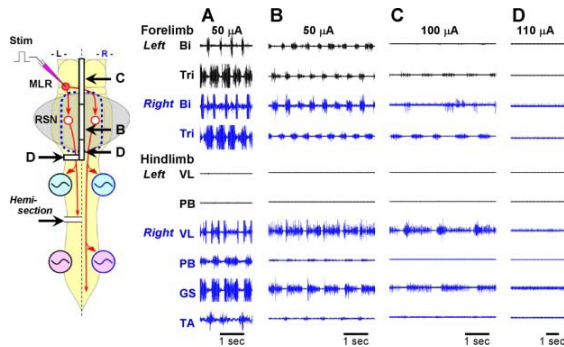


図3 脳幹部分切断による MLR 刺激効果への影響。脳幹部分切断は左図の B-D の順に行った。各々の切断後に MLR を刺激し、誘発された四肢筋活動を EMG トレース B-D に示した。

図 3B-C に示すように、左下部胸髄半切断を施した除脳ウサギにおいて、左 MLR 刺激で誘発された歩行運動に伴う右側前肢・後肢の筋活動の程度は、脳幹正中矢状面に沿って加えられた切断範囲が吻尾方向に広がるにつれて減弱した。さらに下部延髄レベルで正中切断と左半切断を加えたところ、左 MLR 刺激により左右前肢・後肢ともに歩行運動が誘発されることはなかった。

以上より、片側 MLR に由来する歩行駆動信号は同側脊髄に伝達されるとともに、一部の信号は中脳～吻側橋レベルで正中交差し、対側脊髄に伝達されることが示された。この交差性伝達には中脳～延髄にかけて脳幹中央部に広範に広がる脳幹網様体の網様体-網様体投射が関わるものと考えられた。

② 末梢感覚 feedback 遮断による影響

筋弛緩剤で非動化された除脳動物では、MLR 刺激により筋活動を伴わない歩行リズム (fictive locomotion) が誘発される。非動化状態では筋収縮に伴う末梢感覚フィードバックが発生しないことから、fictive locomotion は中枢歩行パターン発生機構 (CPG) が生成した中枢性歩行リズム活動と見なすことができる。

非動化除脳ウサギを用いて、MLR 刺激により誘発される fictive locomotion の特徴について観察した。非動化除脳ウサギはその脆弱性ゆえに、fictive locomotion の誘発には困難を極めたが、一部の例ではこの誘発に成功した。

これらの例の中には、fictive locomotion 中に左右後肢同名筋支配神経 ENGs の発射位相に“ずれ”が認められるものも存在した。

これはウサギの両側後肢に左右同位相の跳躍運動を発現させるためには、運動に伴って発生する末梢感覚 feedback の入力が必要であることを示唆する。

一方、ネコでは左右脊髄を相互連絡する脊髄交連ニューロン機構が、左右交互歩行運動の生成に大きく関わると考えられている。ウサギの交連ニューロン機構の働きを知るために、左下部胸髄半切断を施した非動化除脳ウサギを用いて、左 MLR 刺激による fictive locomotion の誘発について検討した (図 4)

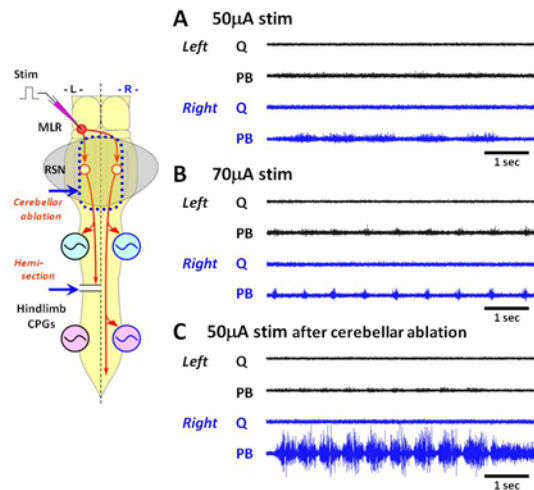


図4 非動化除脳ウサギで MLR 刺激により誘発された fictive locomotion. この除脳標本は左下部胸髄に半切断が施された。C の記録では、脊髄の神経活動性を高めるため、小脳中央部が吸引除去された。

MLR 刺激中に脊髄無傷側の右大腿二頭筋支配神経 ENG のリズム性発射が記録された (図 4A)。MLR の刺激強度をより強め、または除小脳することにより、ENG 発射活動は亢進し、リズム発射頻度は著明に増大した (図 4B-C)。この実験例では、脊髄半切側の左大腿二頭筋支配神経 ENG にもリズム発射活動が認められた。この ENG 発射活動の程度は弱いものであるが、その発射頻度とタイミングは右大腿二頭筋支配神経 ENG 発射と一致していた。

以上の所見から、片側脊髄を下行する歩行駆動信号により、程度は弱いものの、反対側脊髄の後肢 CPG を活動させる可能が示された。これは左右脊髄間の協調活動のために働く神経回路網、即ち交連神経機構が、ウサギにおいても存在し機能していることが示され、脊髄半切断後の歩行機能回復に重要な役割を有するものと考えられた。さらに、両側後肢が協調した同位相性の跳躍運動を発現するためには、交連ニューロンによる交差性連絡に加えて、両側脊髄を同期して下行する歩行駆動信号、さらに実際の運動に伴って発生する感覚 feedback 入力の存在が必須であることも示唆された。

(3) 脊髄交連ニューロンの形態学的検討

本研究項目では中枢神経系内に神経標識物質を注入後、1~3ヶ月の生存期間を要し、さらに脳幹~脊髄組織切片標本の作製にも時間を要することから、当初計画した研究期間内に実験を完了させることはできなかった。このため本研究項目については、研究期間終了後も十分な成績が得られるまで継続して進める計画である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① Kobayashi S, Fujito Y, Matsuyama K, Aoki M. Spontaneous respiratory rhythm generation in in vitro upper cervical slice preparations of neonatal mice. *Journal of Physiological Sciences* (in press) 査読有
- ② Matsuyama K, Ishiguro M, Takakusaki K. Descending routes of locomotor driving signals involved in the generation of coordinated hopping locomotion in decerebrate rabbits. *Proceedings of The 3rd International Symposium on Mobiligence*. p255-258 (2009) 査読有
- ③ 高草木薫, 松山清治. 網様体脊髄路. *Clinical Neuroscience*, 27:752-756 (2009) 査読無
- ④ Boonyarom O, Kozuka N, Matsuyama K, Murakami S. Effect of electrical stimulation to prevent muscle atrophy on morphological and histological properties of hindlimb suspended rat hindlimb muscles. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 88:719-726 (2009) 査読有
- ⑤ Matsuyama K, Kobayashi S, Ishiguro M, Aoki M. Brainstem-spinal cord mechanisms involved in the generation of coordinated hopping locomotion in rabbits. *Proceedings of The 2nd International Symposium on Mobiligence*. p157-160 (2007) 査読有
- ⑥ 松山清治. 歩行と脳幹~脊髄系. *Brain Medical*, 特集「歩行」. 19:23-30 (2007) 査読無

[学会発表] (計11件)

- ① 松山清治, 佐々木健史, 石井貴男, 石黒雅敬, 長峯 隆. 脊髄半切断後の後肢歩行機能の回復: ウサギ跳躍歩行モデルを用いた検討. 第87回日本生理学会大会, 盛岡, 2010年5月19-21日
- ② Matsuyama K, Ishiguro M, Takakusaki K. Descending routes of locomotor

driving signals involved in the generation of coordinated hopping locomotion in decerebrate rabbits. 3rd International Symposium on Mobiligence. Awaji, Japan, November 19-21, 2009.

- ③ 松山清治, 石井貴男, 石黒雅敬. 除脳動物モデルを用いた脊髄部分損傷後の歩行機能回復の検討. 第32回日本神経科学大会, 名古屋, 2009年9月16-18日
- ④ Matsuyama K, Ishiguro M, Kobayashi S, Aoki M. Spinal neural mechanisms in the generation of coordinated quadrupedal locomotion in rabbits. 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), Kyoto, Japan, July 27-August 1, 2009.
- ⑤ Fujito Y, Kobayashi S, Matsuyama K, Aoki M. Respiratory rhythm generation and its raphe modulation in in vitro medullary half-slice preparations of neonatal mice. 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), Kyoto, Japan, July 27-August 1, 2009.
- ⑥ 松山清治, 石黒雅敬, 青木 藩. ウサギ歩行運動時における四肢間協調パターン. 第85回日本生理学会大会, 東京, 2008年3月25-27日
- ⑦ Matsuyama K, Ishiguro M, Aoki M. Descending routes of locomotor driving signals involved in the generation of coordinated quadrupedal locomotion in decerebrate rabbits. 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. San Diego, USA, October 3-7, 2007
- ⑧ 松山清治, 石黒雅敬, 青木藩. 無動化除脳ウサギの中脳刺激により誘発された後肢歩行パターンの特徴. 第30回日本神経科学大会, 横浜, 2007年9月10-12日
- ⑨ 松山清治, 石黒雅敬, 青木藩. 除脳ウサギの四肢協調歩行誘発における歩行駆動経路の部分的遮断の影響. 第87回北海道医学大会生理系分科会, 札幌, 2007年9月8日
- ⑩ 松山清治. 網様体脊髄路の構造と機能. 第22回日本大脳基底核研究会, 旭川, 2007年8月25-27日
- ⑪ Matsuyama K, Kobayashi S, Ishiguro M, Aoki M. Brainstem-spinal cord mechanisms involved in the generation of coordinated hopping locomotion in rabbits. 2nd International Symposium on Mobiligence. Awaji, Japan, July18-20, 2007

〔図書〕（計2件）

- ① 松山清治. 大脳皮質-脳幹-脊髄系. シリーズ移動知. 第2巻 第2章 歩行の神経機構 -実行系- (編者: 土屋和雄, 高草木薫, 荻原直道) オーム社, 東京. p25-43 (2010)
- ② Matsuyama K, Takakusaki K. Organizing Principles of projections of the long descending reticulospinal pathways and their targets' spinal commissural neurons: with special reference to the locomotor function. Handbook on White Matter: Structure, Function and Changes (Editors: Westland T.B., Calton R.N.) Nova Science Publishers Inc. New York. p335-356 (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 清治 (MATSUYAMA KIYOJI)
札幌医科大学・保健医療学部・教授
研究者番号: 40209664

(2) 連携研究者

石黒 雅敬 (ISHIGURO MASANORI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30404586
佐々木 健史 (SASAKI TAKESHI)
札幌医科大学・保健医療学部・助教
研究者番号: 20535562