

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19591680

研究課題名（和文） ラットの脳性麻痺による痙縮モデルを利用した、中枢神経の病的線維連
の解明

研究課題名（英文） Analysis of pathological formation of fiber connection in a rat model
of cerebral palsy

研究代表者

野村貞宏 (NOMURA SADAHIRO)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20343296

研究成果の概要（和文）：

ラットの脳性麻痺モデルで、バクロフェンによる痙縮の治療を行い脳機能発達を検討した。脳性麻痺ラットは運動能力が低下し、治療により改善した。脳性麻痺ラットは記憶能力が低下し、治療により改善しなかった。脳性麻痺ラットでは脳梁が薄く、治療しても変わらなかった。脳性麻痺では痙縮が運動機能の発達を阻害しており、バクロフェン療法は痙縮による有害な感覚刺激を発達に有効な刺激に変える。ただし高次機能は発達させない。

研究成果の概要（英文）：

Object: Cerebral palsy (CP) arises in the early stages of brain development and manifests as spastic paresis that is often associated with cognitive dysfunction. Available treatments for CP, including rehabilitation, botulinum toxin, selective dorsal rhizotomy, and intrathecal baclofen (ITB), are used for the management of spasticity and do not affect motor weakness or higher cerebral function. In this study, we investigated whether the management of spasticity using ITB can also affect motor function, whether improvement in motor ability by the use of ITB is associated with histological recovery of the damaged brain, and whether the release of spasticity is associated with an improvement in intellectual function.

Methods: Sprague-Dawley rats were placed into 4 groups: control, CP model, and CP model with either early or late ITB therapy. For the CP model, rats on postnatal day 7 (P7) were placed under hypoxic conditions (8% O₂) for 150 min after ligation of the right common carotid artery. In the ITB therapy groups, a spinal catheter was connected to an osmotic pump filled with baclofen and placed in the spinal subarachnoid space on P21 (early) or P35 (late). A daily dose of 12 μg of baclofen was continuously administered until P49, resulting in 28 or 14 days of therapy. Changes in spasticity in the CP and CP with ITB treatment groups were confirmed using an evoked potential in the planter muscle.

Results: In the CP group, the time required to complete a beam walking test on P49 was significantly increased compared with that in the control group (4.09 ± 0.18 sec vs. 2.10 ± 0.13 sec in the control group). This was normalized to 2.26 ± 0.16 sec (early) and 2.52 ± 0.15 sec (late) in the ITB treatment groups. Radial arm maze performance on P49 indicated that spatial reference memory had deteriorated in the CP group (0.85 ± 0.34 points vs. 2.27 ± 0.35 points in the control group), and working memory was also decreased upon induction of CP (0.14 ± 0.18 points vs. 0.64 ± 0.30 points in the control group). These functions did not recover after ITB treatment. On P49, the thickness of the corpus callosum decreased to 147.9 ± 24.6 μm in the CP group; this was significantly lesser than that in the control group (446.1 ± 22.1 μm). The corpus callosum was not restored by ITB treatment.

Conclusions: Management of spasticity using ITB therapy improved walking ability in a rat CP model. This improvement was not due to structural regeneration of the damaged brain but due to functional compensation or adaptation. ITB reduces harmful sensory and motor stimulation caused by spasticity to more optimal levels; this contributes to the recovery of motor function. However, the effect of ITB was not sufficient for intellectual recovery

in the rat CP model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度	0	0	0
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳性麻痺、神経線維、GABA

1. 研究開始当初の背景

脳・脊髄疾患に罹患した患者の多くが高次機能障害と運動障害を主とした後遺症を残す。本研究では、後者の運動障害の解明と治療に焦点をあてた。運動障害を起こす疾患は脳卒中を筆頭に頻度の高いものがあり、乳幼児から高齢者まで、全年齢層に発症する。障害が改善すれば本人の生活の質が向上するのみならず、介助に携わる人の負担が減り、医療費の抑制につながる。現在行われているものには、神経自体を保護する(新生児期にエリスロポエチンを投与し、低体温にして脳傷害から脳を保護する)方法や、失われた神経を再生させようとする試みがある。麻痺肢の動作を支援するロボットスーツの開発も行われている。損傷脳の進行を防止し発達を正常に近づける有効な手段はない。

麻痺は神経細胞の損傷によっても起こるが、神経線維の損傷の方が高頻度である。また麻痺の臨床像は時間の経過とともに変化する。中枢神経障害発症直後の麻痺は弛緩性であり、数日から数週間で痙性に変わり、数ヶ月から数年かけて各関節における屈筋力と伸筋力のバランスが崩れ変形する。このように麻痺とは「瞬時に完成し固定した病態」ではなく、「部分的に改善し、正しくない動きに移行する進行性の病態」ととらえるべきである。神経細胞が直接損傷されておらず、部分的に改善する病態ならば、そこに治療の余地があることを期待させるものである。

2. 研究の目的

脳性麻痺は脳の発達段階の初期の傷害によって発生し、病的には periventricular leukomalacia と呼ばれる大脳白質の広範囲な損傷を呈する。多くの場合脳虚血と低酸素脳症がその原因である。筋伸展等の知覚情報は末梢神経を伝わり脊

髄を上行する一方、反射弓を介して運動神経へも送られる。一次運動ニューロンが障害されると反射性筋収縮は抑制されなくなり、腱反射の亢進や病的反射が現れる。病的な筋収縮亢進状態を痙縮といい、脳性麻痺はその原因の一つである。強い痙縮は不快感と運動機能低下を起こすため治療の対象になる。

脳性麻痺の予防には、新生児期にエリスロポエチンを投与し、低体温にして脳傷害から脳を保護する方法がある。発症後の治療には、筋力を増強し筋の伸展性を維持する理学療法、短縮した筋肉を外科的に伸ばすアキレス腱延長術のほか、痙縮をコントロールするための選択的脊髄後根切除術 (selective dorsal rhizotomy, SDR)、末梢神経切除術 (peripheral neurotomy)、ボツリヌス毒素 A の局所注射が臨床で実践され効果が確立している。本研究で対象とする髄腔内パクロフェン治療も重要な位置を占めている。パクロフェンは選択的な gamma-aminobutyric acid B (GABA-B) 受容体のアゴニストであり、脊髄前角・後角での神経伝達物質の放出を抑制する。現在臨床では埋め込み型ポンプにパクロフェンを充填し、脊髄カテーテルを通じて脊髄クモ膜下腔に持続投与する治療法が行われている。ただしパクロフェン自体には四肢の筋力を増強させる作用はなく、この治療が麻痺を改善させるのか、改善させるとすればどのような機序で改善させるのかは、学術的に分かっていることではない。痙性麻痺の定義は運動機能障害であるが、知能低下をもたらすことも少なくない。上記の通り痙縮の治療が各種存在するのに対し、知的な機能障害に対する治療法はない。近年の報告で、遷延性意識障害の患者の痙縮の治療として ITB 療法を行ったところ、意識障害も改善したという報告が散見される。これは、早期に ITB 療法を開始すれば、脳性麻痺児の知的発達も促

されるのではないかという期待を抱かせる。
本研究では痙縮の治療が運動機能をいかに改善させるか、それは組織学的にも改善させるものか、さらには高次脳機能発達も促進するものか、を動物モデルで検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物、脳性麻痺モデル作成

本実験に当たっては、動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号）および国立大学法人山口大学における動物使用に関する規則（平成20年11月11日規則第110号）を遵守し、山口大学動物使用委員会の許可を得て行った。

妊娠 Sprague-Dawley (SD) ラット (Chiyoda Kaihatsu) を明暗 12 時間 (明 7:00-19:00)、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ の条件下で飼育し、自由給餌、給水とした。出産後も同条件で飼育した。生まれた仔に対して Rice らが示す以下の方法に従って低酸素虚血脳症 (Hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE) を作り、これを脳性麻痺モデルとした。生後 7 日目 (P7) にハロセン吸入麻酔下で右総頸動脈を 10-0 縫合糸 (Ethicon) で結紮後切離した。37°C の恒温槽にて 2 時間の術後回復時間を設け、その後窒素-酸素混合ボックス (N_2 92%, O_2 8%, 37°C) に 2 時間 30 分留置した。処置終了後母ラットの元に戻し、生後 21 日で離乳させた。ラットの P7 はヒトの満期産出生時に相当し、脳性麻痺の発生時期に一致する。

(2) バクロフェン治療

バクロフェン (和光) を 0.9% 生理食塩水 (大塚製薬) で溶解し $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整した。Yaksh らの方法を改変し、以下の通り髄腔内にバクロフェンを持続投与した。ポリエチレンチューブ (PE-5, Eicom) をラットの大槽から尾側に向けて腰椎クモ膜下腔に挿入し、コネクター (PE-10, Intramedic) を用いて浸透圧ポンプ (mini-osmotic pump model 2002, または model 2004, Alzet) と連結させた。浸透圧ポンプには上記調整 Baclofen を充填し、背部皮下に留置した。本手術は P21 または P35 から開始し、これにより $0.5 \mu\text{l}/\text{h}$ ($12 \mu\text{g}/\text{日}$) のバクロフェンが 4 週間、または 2 週間持続髄注された。本処置の 3 日後には術後状態からの回復が観察された。ただし運動機能障害、20% 以上の体重減少、その他のストレス症状を呈したラットは実験から除外した。バクロフェンは GABA-B 受容体アゴニストであり、GABA と同様シナプス後神経細胞に対して抑制性に働く。このため過剰のバクロフェン投与は筋力低下を引き起こす。予備実験で $24 \mu\text{g}/\text{日}$ のバクロフェン投与が正常ラットの歩行速度を低下させることを確認し、本投

与量 ($12 \mu\text{g}/\text{日}$) を採用した。

(3) 誘発筋電図

7 週齢時、左足底筋の誘発筋電図を測定した。ラットを pentobarbital ($40\text{mg}/\text{kg}$, i. p.) で麻酔し、アイソレーテッド刺激装置 (Bioresearch center) を用いて左脛骨神経を刺激し、足底筋の motor evoked potential (M 波) と脊髄反射弓を介した筋収縮 (Hoffmann reflex, H 反射) を検出した。0.1 mA から 10 mA まで刺激強度を変化させ、M 波と H 反射の最大値から H/M 比を算出した。

痙縮および治療効果の評価として誘発筋電図は有効であり、M 波が低下せず H 反射が正常まで低下することが痙縮のコントロールの理想である。

(4) Beam walking test

ラットの運動機能観察のため、Beam walking test を行った。幅 1.5 cm、長さ 100 cm の板の両端にプラットホームを作り、高さ 50 cm に設置した。ラットの嫌悪するホワイトノイズを流し、ラットが一方の端から反対側のプラットホームへ移動するまでの時間を測定した。測定は 1 週間毎、生後 3-7 週に行った。

(5) 放射状迷路 radial arm maze

Balduini らの方法を参考に行った。Radial arm maze (Muromachi Kikai) は中央に直径 50 cm のプラットホームがあり、そこから長さ 50 cm、幅 12 cm の arm が 8 方向に出ている構造である。地上から 30 cm の高さに設定した。カメラを上方に設置してラットの動きを Video tracking System (Muromachi Kikai) で記録した。7 週 0 日齢時に測定を行うため、6 週 0 日目には体重が自由節食時の 85% になることを目安に空腹状態にした。6 週 1 日~3 日目の 3 日間にはすべての arm に餌を置いて 30 分×1 日 3 回の自由節食をさせ、6 週 4~6 日目の 3 日間には 8 arm のうち 4 arm (0 度、90 度、180 度、225 度) のみに餌を置いて 1 日 3 回の自由節食をさせた。餌のある arm の位置を記憶できたラットは、7 週 0 日に行ったテストにおいて餌のある 4 arm のみに入り、餌を置いていない 4 つの arm には入らないはずである。全ての餌を食べるまでに、餌のない arm に進入した回数を空間認識記憶の障害として海馬、側頭葉および頭頂葉の機能の評価に用いた。既に節食した arm に再進入した回数を作業記憶の障害として前頭葉の機能の評価に用いた。

(6) 病理組織学的評価

高次機能の発達したラットでは左右半球間の情報伝達が盛んに行われ、それらを結ぶ神経線維がより多く形成される。本実験では、

Bregmaの断面における脳梁(Corpus callosum, CC)の厚さと前交連(Anterior commissure, AC)の厚さを測定し、それらの厚さを形態学上の脳損傷と再構築の指標とした。

生後8週0日に、ペントバルビタール(40mg/kg)麻酔下で1.0%へパリン加生食を灌流し、その後4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定を行った。脳を取り出し、再度PFAに浸透させた。翌日、10%、20%スクロース置換を行い、3日目に30%スクロース置換、4日目に厚さ50 μm に薄切し冠状断面を作成した。切片を0.3%TritonX100(Sigma-Aldrich)、2%スキムミルク(Wako)加phosphate buffer solution(PBS)に浸して1時間室温下に置いた。一次抗体にはMyelin basic protein monoclonal antibody(Abcam)の100倍希釈液を用い、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。二次抗体にはbiotinylated secondary antibody(Vector labs、200倍希釈)を用い、Diamino benzidine(DAB, MERCK)を用いて発色剤させた。

(7) 解析

上記4検査を4群、各群6個体に行った。正常(対照)ラットと脳性麻痺ラットの差、脳性麻痺ラットと治療ラットの差をMann-WhitneyのUテストで検定した。危険率5%未満を有意の差とした。

4. 研究成果

(1) 誘発筋電図

脳性麻痺ラットには痙縮が発生し、H反射の亢進が観察された。H/M比は 0.38 ± 0.12 に上昇し、これは正常ラットでの 0.07 ± 0.01 に比べて有意に高い値だった。バクロフェン治療によりH反射は低下したもののM波の振幅は低下せず、H/M比は早期治療ラットで 0.08 ± 0.02 秒、晚期治療ラットで 0.15 ± 0.07 に低下した。これらは治療を行わない脳性麻痺ラットより有意に低値であった。本法により痙縮モデルが作成され、それが治療によって改善することが示された。

(2) beam walking test

虚血低酸素刺激による脳性麻痺ラットは運動能力が低下した。beam walking testでは最初の検査を行った生後3週目からコントロール群との差があり、その差はその後も短縮することなく、7週齢での所要時間は 4.09 ± 0.18 秒だった。これは正常ラットの 2.10 ± 0.13 秒より有意に長い値だった。バクロフェン治療の翌週から運動機能が改善し始め、7週齢での所要時間は早期治療ラットで 2.26 ± 0.16 秒、晚期治療ラットで 2.52 ± 0.15 秒に短縮した。これは治療を行わない脳性麻痺ラットより有意に短時間であった。

(3) 放射状迷路

脳性麻痺ラットは餌の入っていないarmに 2.27 ± 0.35 回進入した。これは対照ラットの示した 0.85 ± 0.34 回より有意に多い回数であり、空間記憶能力が低下していることが確認された。この空間記憶能力は早期治療、晚期治療どちらにも改善が見られなかった。

脳性麻痺ラットは餌を食べたarmへの再進入を平均 0.64 ± 0.30 回行った。これは対照ラットの示した 0.14 ± 0.18 回より有意に多い回数であり、作業記憶能力が低下していることが確認された。この作業記憶能力は早期治療、晚期治療どちらにも改善が見られなかった。

(4) 脳梁および前交連

脳性麻痺ラットの脳梁の厚さは $147.9 \pm 24.6 \mu\text{m}$ であった。これは対照ラットの示した $446.1 \pm 22.1 \mu\text{m}$ より有意に薄かった。脳梁の厚さは早期治療、晚期治療どちらにも改善が見られなかった。

脳性麻痺ラットの前交連の厚さは $532.4 \pm 42.5 \mu\text{m}$ であった。これは対照ラットの示した $578.9 \pm 15.2 \mu\text{m}$ と有意な差がなかった。脳梁の厚さは早期治療、晚期治療どちらにも変化が見られなかった。

考察

歩行その他運動機能には筋力の強さと屈筋、伸筋の拮抗運動を調整する能力が必要である。H/M比は痙縮の強さを示し、beam walking testは運動能力を示す。H/M比が正常化し痙縮が治ったとしても、運動能力が改善するとは限らない。特にヒトでは痙縮があるほうが活動しやすいことさえある。痙縮と運動能力の違いを考えたとき、ITB治療によるラットの歩行能力改善効果は目覚しいものであった。ヒトは二足歩行動物で、歩行するにはより強い筋力とバランス感覚を必要とする。四足歩行で体重も軽いラットにとっては、筋力低下よりも痙縮の及ぼす影響のほうが大きく、痙縮を軽減させることが運動能力改善に効果が高いことを示している。

P21とP35のどちらから開始したITB治療でもラットの歩行速度上昇はすぐに現れた。P49では両者の間にわずかの差があり、早期に治療を開始したほうがより速い速度で歩行した。ラットの3週はヒトの1-2歳頃、5週は4-6歳頃に相当する。典型的な脳性麻痺では、2歳ころから痙縮が始まり、筋力の増強とともに4歳ころから筋緊張が強くなる。小学生のころに筋と腱の短縮が始まり、青年期には不可逆的な関節変形や骨変形をきたすようになる。小児の脳は可塑性が高く、機能改善は早期の治療で高くなるといわれる。本研究では組織学的な回復は観察されなかつ

ったが、痙縮の早期治療は機能的な可塑性を促進したものと考えられる。

脳内シナプスの再構築に関与する因子は運動の経験、神経影響因子、神経治療薬、脊髄刺激療法などの外科治療などである。これらの中でも運動に誘発されるシナプス可塑性と運動野、感覚野の再構成が重要である。リハビリテーションは脳内の可塑性機構を刺激するのに有効であるが、痙縮による正しくない運動は有害である可能性がある。四肢および体幹からの適切な入力刺激が機能的な可塑性すなわち代償や適合をもたらすものと考えられる。

脳性麻痺の病理学的特徴は白質損傷であり、これには錐体路、錐体外路、連合線維、交連線維を含んでいる。前2者は運動機能障害、後2者は運動機能と知的機能障害に関与する。知られている5つの交連線維（脳梁、前交連、後交連、脳弓交連、海馬交連）の中で脳梁と前交連以外は小さいため同定することが困難である。脳弓と海馬交連は記憶の回路として重要であるが、本研究では脳梁と前交連の測定を行った。脳性麻痺ラットは空間記憶能力も作業記憶能力も低下し、これらはITB治療では改善しなかった。この結果は脳梁の厚さの変化に相関し、前交連の厚さの変化には相関しなかった。脳梁の厚さは脳性麻痺の程度と知的発達障害の程度に比例するといわれる。脳梁は大腦半球の発達とともに増大し、脳の活動によって形成される。一方前交連は正常人とアルツハイマー病の間で差が無い。前交連は辺縁系を構成する嗅神経や posterior piriform cortexes, perirhinal and rostral cortex、扁桃体を結ぶ線維である。後部の小さい領域を除いて大部分は知的機能に関与していない。アルツハイマー病と同じく脳性麻痺も脳の傷害部位に特異性がある。

遷延性意識障害患者の痙縮改善目的で使用したITB療法が、意識障害を改善させたという報告がある。脊髄GABAニューロンを介した意識改善機序や脊髄から脳への情報伝達が働いたという機序が推測されている。これは知的発達障害をもつ脳性麻痺児にはITB療法が有効である可能性を期待させる。ところが本研究の範囲では記憶能力は改善しなかった。痙縮患者では睡眠の深さや覚醒睡眠リズムの障害が意識障害を悪化させていると考えられ、これをITBで改善させることが、意識回復に影響したものかもしれない。あるいは本研究の運動能力改善機序で示したごとく、適切な運動、感覚刺激が長期的に意識に作用したものかもしれない。

結語

P7ラットに虚血低酸素刺激を行って、脳性麻痺モデルを作成した。筋電図所見変化と歩

行能力変化から、脳性麻痺ラットが痙縮による運動障害をきたし、それがバクロフェンの髄腔内投与によって改善し、運動能力を再獲得する事ができたことを証明した。脳梁幅の測定結果から、この改善は脳の組織学的な再構築変化ではなく、痙縮の有害な刺激を適切な感覚刺激に変えたことによる、脳の機能代償と機能適合であると考えられた。脳性麻痺ラットの空間記憶能と作業記憶能は低下し、これらには本治療の効果は及ばなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① 野村貞宏、香川慶輝、藤井正美、篠山瑞也、井本浩哉、丸田雄一、井上貴雄、木田裕之、井田唯香、鈴木倫保、大和田祐二. ラットの脳性麻痺・痙縮モデルの作成と髄腔内バクロフェン療法の効果測定. 機能的脳神経外科 50:in press, 2011、査読無
- ② 野村貞宏、藤井正美、井本浩哉、鈴木倫保. 選択的脊髄後根切除術における陰部神経誘発電位の有用性. 機能的脳神経外科 46:52-53, 2007、査読無

〔学会発表〕(計5件)

- ① 野村貞宏 痙縮に対する各種治療法 髄腔内バクロフェン療法を中心に. 山口ITBカンファレンス. 2011年3月3日
- ② 野村貞宏、香川慶輝、藤井正美、篠山瑞也、井本浩哉、丸田雄一、藤岡裕士、井上貴雄、木田裕之、鈴木倫保、大和田祐二. ラットの脳性麻痺・痙縮モデルの作成と髄腔内バクロフェン療法の効果測定. 第50回日本定位・機能神経外科学会. 2011年1月23日
- ③ 野村貞宏、藤井正美、井本浩哉、藤岡裕士、梶本まどか、鈴木倫保. 重症痙縮に対してバクロフェン髄注療法が有効だった脳性麻痺例. 第28回日本こども病院神経外科医会. 2010年11月21日
- ④ 野村貞宏、藤井正美、井本浩哉、鈴木倫保. 脳性麻痺後の歩行可能な痙縮例に対する選択的脊髄後根切除術. 第114回日本小児科学会山口県地方会. 2009年7月12日
- ⑤ 野村貞宏、藤井正美、井本浩哉、鈴木倫保. 痙直型脳性麻痺に対する外科的治療. 第110回日本小児科学会山口地方会. 2007年6月10日

〔図書〕(計1件)

野村貞宏. 脳・神経疾患ベストナーシング (改訂版) 学習研究社 pp77-87, 2009

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 貞宏 (NOMURA SADAHIRO)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20343296

(2) 研究分担者

藤井 正美 (FUJII MASAMI)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90181320

(3) 連携研究者

なし