

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月26日現在

機関番号：82404
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23700659
研究課題名（和文） 脊髄損傷後の痙縮の発生機序および制御機構の解明
研究課題名（英文） Identification of development and regulatory mechanisms of spasticity following spinal cord injury
研究代表者
森岡 和仁（MORIOKA KAZUHITO）
国立障害者リハビリテーションセンター（研究所）・研究所 運動機能系障害研究部・客員研究員
研究者番号：90551466

研究成果の概要（和文）：脊髄損傷後に発生する痙縮によって運動機能回復が障害されるメカニズムを解明するため動物実験モデルおよび痙縮の評価方法を確立した。包括的な解析の結果、損傷後早期の麻痺肢の荷重負荷は痙縮の発生に関与して運動機能回復に影響を及ぼす可能性が示唆され、痙縮の発生メカニズムの知見を深めた。

研究成果の概要（英文）：To identify the mechanism how spasticity, appeared after spinal cord injury (SCI), impairs the recovery of locomotor function, we established the rodent model that develops symptoms of spastic behavior in hindlimb, and developed methods to evaluate spasticity and hyperreflexia. Our findings of a multidisciplinary analysis demonstrated that loss of paretic limb loading early after SCI induced irreversible inhibition of locomotor recovery relating to spasticity, and provided insight into mechanisms in the development of spasticity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：（1）リハビリテーション （2）脳・神経 （3）動物 （4）細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷の患者数は本邦において累計10万人以上と予測され、麻痺による障害をもたらす生活の質の低下を改善する必要性は依然高い。脊髄損傷に対する急性期の治療開発は組織学的修復を目的とした細胞移植や神経再生阻害因子の中和薬剤などを中心に目覚ましい発展を遂げ、臨床応用の実現が期待されている。一方で、慢性期の治療開発は動物実験の段階で広く試みられているが機能回復に対する効果には限界があり、多方面からの治療戦略の検討が必要とされている。その原因の一つとして損傷後に発生する不随意

運動の痙縮が考えられ、残存する随意運動を障害して機能回復が妨げられている可能性がある。痙縮の発生は脊髄前角細胞の興奮性の増大に伴う反射経路の亢進に関与することが知られており、過剰な脊髄の興奮性を抑制するためにGABA作動性薬剤などが臨床で使用されている。しかし、対処的な投与では効果や持続性が不十分なことが多く、髄腔内持続投与ではコントロールが難しいとされている。従って、痙縮の制御を可能にする創薬の基盤技術の開発は慢性期の治療技術の確立に必要と考える。

慢性期の麻痺肢の機能回復に対する現在

の治療は主に運動機能の再獲得を目的としたリハビリテーションであるが痙縮に対する効果は限定的とされている。しかし、痙縮の制御には脊髄の興奮性のバランス調節が重要であるため、リハビリテーションによる適切な脊髄神経系の促進と薬理的なアプローチによる過剰な興奮の抑制の双方が必要と考える。

申請者は上記の背景に加え、これまで脊髄損傷におけるリハビリテーション効果の研究（平成 21, 22 年度 研究活動スタート支援）を行い、損傷後早期より後肢にかかる荷重負荷を除去（免荷）した動物実験モデルにて運動機能回復の不良と共に痙縮の発生を認めた。この結果より、痙縮の発生には損傷後の荷重負荷が関与し、結果として機能回復が障害されることが予想された。そこで本研究ではこの動物実験モデルの痙縮および反射経路の亢進について評価方法を確立して解析を行った。

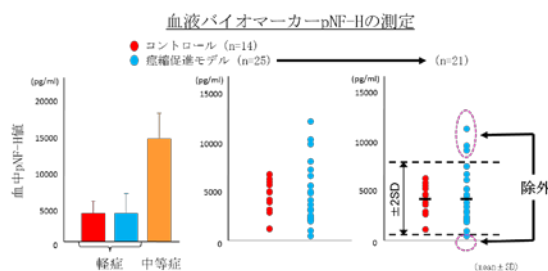
2. 研究の目的

本研究は脊髄損傷後に痙縮が発生する動物実験モデルを確立し、それを包括的に解析することで痙縮の発生要因を解明するとともに、痙縮の制御を通じて麻痺肢の機能回復を可能とする新たなリハビリテーション技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物実験モデルの作成および妥当性の検証

- ① 脊髄圧座不全損傷モデルの作成：雌 SD ラット（8-9 週齢、体重 220-250g）の第 10 胸髄レベルに IH インパクト（Precision Systems 社製）を用いて圧挫による不全損傷を作成した。損傷が重症の個体では自然経過中に痙縮が発生する可能性が高いため重症度を軽症に設定した。
- ② 神経損傷の血液バイオマーカー pNF-H を用いた重症度評価：個体間の重症度のばらつきを抑えるため血中 pNF-H を損傷後 3 日目（免荷施行前）に測定して（Ueno T et al., Spinal Cord, 2011; Hayakawa K et al., Spinal Cord, 2012）、対照群の測定値の平均±2SD の範囲から外れた個体を除外して解析対象を選出した。



- ③ 痙縮促進動物モデルの作成および筋組織への影響評価：Tail-suspension 法（Morey ER et al., Physiologist, 1979）による完全免荷を損傷後早期より施行し、自発運動を奪わずに後肢の荷重負荷を完全に除去した。免荷期間は骨・骨格筋・関節への影響が可逆的に回復する期間に留めた。解除後は通常活動下にて 6 週間飼育して包括的に評価を行った。後肢の筋肉への影響について筋湿重量の変化を検証した。

- ④ 麻痺肢の運動機能回復および歩容の評価：損傷後の運動機能回復について BBB スコア（Basso DM et al., J Neurotrauma, 1996）を用いて評価し、歩容について三次元動作解析装置（キッセイコムテック社製）を用いて評価した。

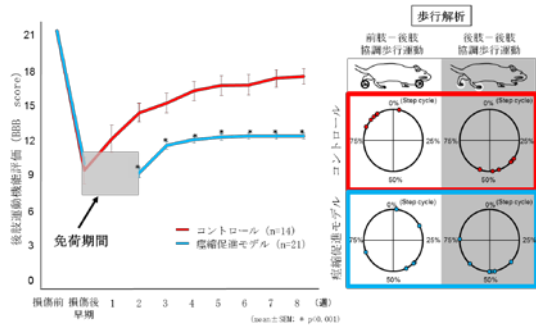
(2) 動物実験モデルが示す痙縮および反射経路の変化に対する評価方法の確立とメカニズムの解明

- ① 行動学的評価：免荷解除後の痙縮の発生の評価として Kick movements（侵害刺激に伴う後肢の不随意運動；van de Meent Het al., J Neurotrauma, 1996）を確認した。さらに痙縮は水泳中に発生しやすいことが報告されているため（Gonzenbach RR et al., Ann Neurol, 2010）、新たな評価方法として試みた。
- ② 神経生理学的評価：脊髄の興奮性の指標の一つである Hoffman 反射（H 反射）を後肢筋で測定し、反射経路の変化を評価した。
- ③ 免疫組織学的評価：痙縮の発生（反射経路の亢進）のメカニズムを検証するため、歩行中枢が存在するとされる腰膨大部における神経細胞やシナプスの関連タンパク質の発現についてウェスタンブロット法により解析した。さらに後肢筋の支配神経領域における運動ニューロンについて逆行性神経トレーサーによる神経回路標識法を用いて解剖学的変化を評価した。

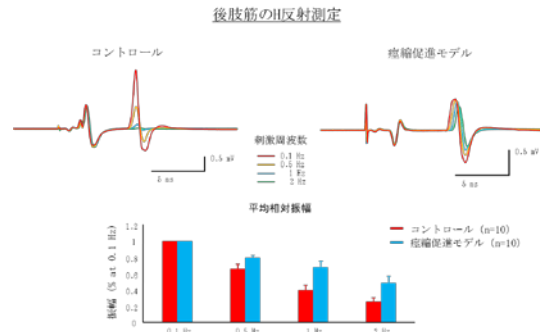
4. 研究成果

(1) 動物実験モデルの作成および妥当性の検証

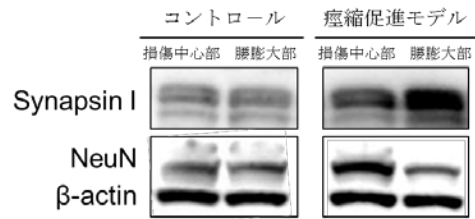
- ① 損傷後の荷重負荷は最終的な運動機能回復に明らかな影響を与えた：痙縮促進動物モデルの最終的な運動機能回復は免荷を施行していない対照群に比して有意に抑制された。歩行機能は特に前肢と後肢の協調歩行運動の回復が不良となり歩容が変化する傾向を認めた。



② 損傷後の免荷による運動機能回復の不良は神経回路の変化に起因する可能性が示唆された： 免荷期間が適切であることを確認するため、痙縮促進動物モデルの後肢の各筋肉の筋湿重量を測定した。その結果、免荷解除直後では抗重力筋のヒラメ筋のみ半減していたが最終的な筋湿重量は回復していた。

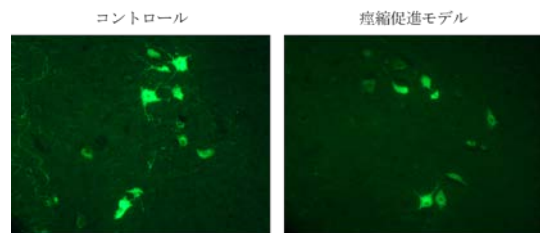


③ 損傷後の免荷による痙縮の発生（反射経路の亢進）に関与する解剖学的変化が示唆された： 痙縮促進モデルの腰膨大部における神経細胞のマーカーNeuNの発現は対照群に比して有意な差は見られず、興奮性シナプスのマーカーSynapsin Iの発現は明らかに増加していた。



さらに痙縮促進モデルの後肢筋の支配神経領域における脊髄前角の運動ニューロンを逆行性に標識したところ、対照群に比して明らかな質的変化が示唆された。

腰膨大部の脊髄前角における運動ニューロン



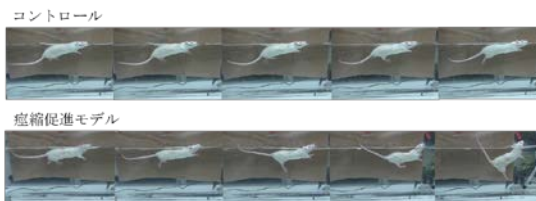
緑：運動ニューロン

研究期間全体を通じて脊髄損傷後の痙縮の発生を認める動物実験モデルを作成して妥当性を検証し、痙縮および反射経路の変化に対する評価方法を確立して痙縮の発生メカニズムの一端を明らかにした。包括的解析の結果、損傷後早期の麻痺肢の荷重負荷は痙縮の発生や反射経路の変化に関与して運動機能回復に影響を及ぼす可能性が示唆された。今回の知見から損傷後早期の至適な荷重負荷やそれを模した知覚刺激は、薬理的アプローチとの融合により痙縮の発生や反射経路の亢進を抑制して運動機能回復を促進さ

(2) 動物実験モデルが示す痙縮および反射経路の変化に対する評価方法の確立とメカニズムの解明

① 損傷後の免荷による痙縮の発生が行動学的に示唆された： 免荷施行前に見られなかった痙縮促進モデルの後肢のKick movementsを免荷解除直後より6週間継続して認めた。水泳中には後肢が強直し下半身が屈曲する間代性発作を示す傾向を認めた。

水泳中の行動学的評価



② 損傷後の免荷による痙縮の発生に伴う反射経路の亢進が神経生理学的に示唆された： 後肢筋のH反射を測定したところ、対照群と比較して高周波連続電気刺激により誘発されるH波が増大することを認めた。

せるリハビリテーション技術の開発に繋がる可能性が考えられる。また、痙縮の発生メカニズムの解明を進めるため比較解析に用いる予定であった痙縮抑制モデルの確立は研究期間内に到達することができなかったが、新たな解析技術を導入するため米国カリフォルニア州立大学サンフランシスコ校脳神経外科中枢神経系再生研究室（Michael S. Beattie 教授、Jacqueline C. Bresnahan 教授、Adam R. Ferguson 助教授）にて解析を継続しており、引き続き基礎的知見を獲得して臨床へフィードバックする所存である。

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 1 件）

- (1) Hayakawa K, Okazaki R, Ishii K, Ueno T, Izawa N, Tanaka S, Toyooka S, Matsuoka N, Morioka K, Ohori Y, Nakamura K, Akai M, Tobimatsu Y, Hamabe Y, Ogata T, Phosphorylated neurofilament subunit NF-H as a biomarker for evaluating the severity of spinal cord injury patients, a pilot study. Spinal Cord, 査読有, 50(7), 2012, 493-496.
DOI:10.1038/sc.2011.184

〔学会発表〕（計 19 件）

- ① Morioka K, Tazoe T, Endoh T, Hayakawa K, Okazaki R, Kawaguchi H, Nakamura K, Ogata T, Load-related afferents assume a critical role in the recovery of locomotor function after spinal cord injury, The 41st Neuroscience, 2011. 11. 15, Washington DC, USA.
- ② 緒方 徹、森岡 和仁、飛松 好子、中村 耕三、赤居 正美、岡崎 廉太郎、早川 謙太郎、上野 高明、血中バイオマーカーによる脊髄損傷の重症度評価の試み、第 48 回 日本リハビリテーション医学会学術集会、2011. 11. 3、千葉。
- ③ 森岡 和仁、岡崎 廉太郎、早川 謙太郎、上野 高明、中村 耕三、赤居 正美、緒方 徹、脊髄損傷後早期のラットの後肢荷重感覚入力歩行機能回復に与える影響、第 48 回 日本リハビリテーション医学会学術集会、2011. 11. 2、千葉。
- ④ 森岡 和仁、早川 謙太郎、岡崎 廉太郎、川口 浩、中村 耕三、赤居 正美、緒方 徹、脊髄不全損傷後早期の後肢荷重感覚入力は運動機能回復に影響を及ぼす、第 26 回 日本整形外科学会基礎学術集会、2011. 10. 20、群馬。

- ⑤ Morioka K, Tazoe T, Endoh T, Hayakawa K, Okazaki R, Kawaguchi H, Nakamura K, Ogata T, The pivotal role of load-related afferent input for the spontaneous recovery of locomotion after incomplete spinal cord injury, The 29th National Neurotrauma Symposium, 2011. 7. 12, Florida, USA.
- ⑥ 森岡 和仁、緒方 徹、岩谷 力、大脳皮質ニューロン活性化と運動療法併用による慢性期脊髄損傷の皮質脊髄路再生誘導に関する研究、第 48 回 日本運動器科学会、2011. 7. 9、新潟。

〔図書〕（計 0 件）

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森岡 和仁 (MORIOKA KAZUHIITO)

国立障害者リハビリテーションセンター

（研究所）・研究所 運動機能系障害研究

部・客員研究員

研究者番号：9 0 5 5 1 4 6 6

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし