

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号: 18001

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2010~2012

課題番号: 22591742

研究課題名(和文) 脊髄虚血後の痙性対麻痺に及ぼす $\alpha 2$ アドレナリン受容体アゴニストの鎮痙作用

研究課題名(英文) POTENT SUPPRESSION OF STRETCH REFLEX ACTIVITY AFTER SYSTEMIC OR SPINAL DELIVERY OF TIZANIDINE IN RATS WITH SPINAL ISCHEMIA -INDUCED CHRONIC SPASTIC PARAPLEGIA

研究代表者

瀧上 竜也 (FUCHIGAMI TATSUYA)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 10381211

研究成果の概要(和文): 本研究ではTizの全身およびくも膜下(IT)投与の虚血による痙性対麻痺ラットの伸展屈曲反射(SRA)に及ぼす効果と効果部位を検討した。方法: 10分間の一過性脊髄虚血によって痙性対麻痺を呈したラットに (i)Tiz全身ないしくも膜下に単回投与、(ii)Tiz投与後に、希釈液のみないし各種アドレナリン受容体(AR)拮抗薬を全身投与、(iii)Tizくも膜下投与後に $\alpha 2a$ AR拮抗薬投与を行った。結果: 全身およびくも膜下Tiz投与は伸展屈曲反射を有意に抑制した。 $\alpha 2a$ AR受容体拮抗薬はこのTizの効果をも有意に拮抗した。脊髄標本の免疫蛍光染色では、 $\alpha 2a$ AR発現の増加とアストロサイトの活性化が観察された。

研究成果の概要(英文): The aim of this study was to evaluate the therapeutic potency of Tizanidine (Tiz) on stretch reflex activity (SRA) in animals with ischemic spasticity, and to delineate sites of Tiz action. Animals with increased SRA were divided into several experimental subgroups and treated as follows: (i) Tiz administered systemically or Intrathecal (IT) delivered; (ii) treatment with systemic Tiz was followed by vehicle, or by various adrenergic receptor(AR) antagonists; (iii) treatment with IT Tiz was followed by the IT injection of selective $\alpha 2A$ AR antagonist. Results: systemic and/or IT treatment with Tiz significantly suppressed SRA. This Tiz-mediated anti-SRA effect was reversed by $\alpha 2A$ AR, but not $\alpha 2B$ AR antagonists. Immunofluorescence staining of spinal cord sections showed upregulation of $\alpha 2A$ receptor in activated astrocytes.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード: (1)虚血性脊髄障害 (2)対麻痺 (3) $\alpha 2$ アドレナリン受容体 (4)イミダゾリン受容体 (5)痙性 (6)脊髄運動神経細胞 (7)アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

虚血および外傷性脊髄障害は時間依存性に筋肉の痙攣(Spasticity)と拘縮(rigidity)を来すことがある。痙性は加速度によって増加する筋肉の緊張で、筋肉の伸展速度が増すほどに筋の抵抗も増加する。臨床研究では36%の外傷性脊髄障害患者で筋肉の痙攣(Spasticity)と拘縮(rigidity)を生じるとされる。

様々な実験動物を用いたこれまでの研究で虚血時間によっては脊髄の分水嶺に存在する抑制性介在ニューロンの選択的な喪失が起きることが報告されている。選択的な抑制性介在ニューロンの喪失は、典型的な痙攣(Spasticity)と拘縮(rigidity)を来す。脊髄虚血患者でも、同様な筋肉の痙攣(Spasticity)と拘縮(rigidity)が報告されている。

我々は大動脈内バルーン閉塞によるラットの一過性脊髄虚血モデルを作成した。このモデルを用いて、我々は①10分間の一過性虚血後にはGABA作動性介在ニューロンの選択的な喪失と α 運動神経の残存、②有意な運動誘発電位(MEP)とH反射の増加、③コンピュータ制御での足関節屈曲に対する抵抗の測定方法、④ニコペチン酸などのGABA再取り込み阻害剤やGABA_B受容体作動薬のバクロフェン、AMPA受容体阻害薬であるNGX424のIT投与による痙攣(Spasticity)と拘縮(rigidity)、H反射の抑制を報告してきた (Marsala et al., 2004; Kakinohana et al., 2006)。また同様のモデルで、バクロフェン持続IT投与によるバクロフェン耐性を確認し、このバクロフェン耐性ラットに対するAMPA受容体阻害薬(NGX424)ITないし全身投与の鎮痙作用を報告した (Hefferan et al., 2007; Oshiro et al., 2010)。

臨床でのITないし全身投与でのバクロフェンの鎮痙作用に加えて、Tizの全身投与が類似の作用を持つことが報告されている。Tizの鎮痙作用にはシナプス前抑制、屈曲反射の抑制、 α 運動

ニューロンの直接的な抑制などがその機序にあげられている。神経因性疼痛ないし内臓痛の実験動物モデルでも、IT投与によるTizの鎮痛作用が証明され、機序には脊髄への直接作用が指摘されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、虚血性脊髄障害による痙性に及ぼす、TizのITないし全身投与の効果をSRAを用いて検討し、上位中枢ないし脊髄のTizの効果部位を明らかにすることである。

3. 研究の方法

SD系ラット300-350gを用いた。

Taira & Marsala(1996)の方法で10分間の一過性脊髄虚血を行い痙性対麻痺を来したものを用いて以下の実験を行った。

ラットの痙性は、Spasticity meterを用いてヒラメ筋のSRAを40° /3秒で足関節を屈曲させたときの抵抗と筋電図変化として測定した。

H反射測定を右後肢で行った。脛骨神経刺激(0.1-10mA, 0.1Hz, 0.2ms)で第4-5骨間筋で筋電図の振幅を測定した。

ITカテーテルをYaksh & Rudy(1976)の方法で留置し薬剤投与経路とし虚血後10-15日目に薬理学的な実験を行った。

その後、麻酔下に脊髄組織を採取し免疫染色を行ない(GFAP=グリア細胞、NeuN=神経細胞、Syn=シナプス、各種 α 2アドレナリン受容体)、共焦点走査型蛍光顕微鏡で観察した。

薬理学的検討は以下のように行った。

Study A(n=6), Tiz 1mg/kg i.p. (腹腔内全身投与)

Study B(各群n=6), 10 or 50 μ g IT(くも膜下投与)

Study C(各群n=6) Tiz 1mg/kg i.p., 各種拮抗薬

を投与。(i) 生食, (ii) Yohombine; Yoh 3mg/kg (非選択性 α 2 アドレナリン受容体(AR)およびイミダ

ゾリン受容体(I)拮抗薬), BRL44408; BRL 5mg/kg (α 2A AR拮抗薬), ARC239; ARC 5mg/kg (α 2B AR拮抗薬), Efaroxan; Efa 1mg/kg(非選択性ARおよびI1受容体拮抗薬), Idazoxan; Ida 1mg/kg(非選択性ARおよびI2受容体拮抗薬)

Study D(n=6), Tiz 50 μ g IT \rightarrow atipamezole (Ati; 50 μ g)選択的 α 2A選択的拮抗薬

4. 研究成果

虚血性脊髄障害による痙性反射の亢進; ①10分虚血後の4~10日に屈曲伸展反射が亢進した。②反射亢進はコンピュータ制御で0° ~40° 屈曲させたときの筋電図EMGの活動電位で測定した。(対照群; Fig.1A、虚血群; B)。Tiz 1mg/kg全身投与は足関節屈曲中の底屈反射(SRA)を抑制した(Fig.1C)。関節固縮など器質的な機序を除外するため、イソフルレン麻酔下での底屈反射時のEMGを測定した。虚血にしていない対照群のラットのみで0.1~0.5mVと低いEMG活動電位を測定した(Fig.1A,D)。非虚血ラットでは6~10gを越える底屈反射時のEMG活動電位を計測した。

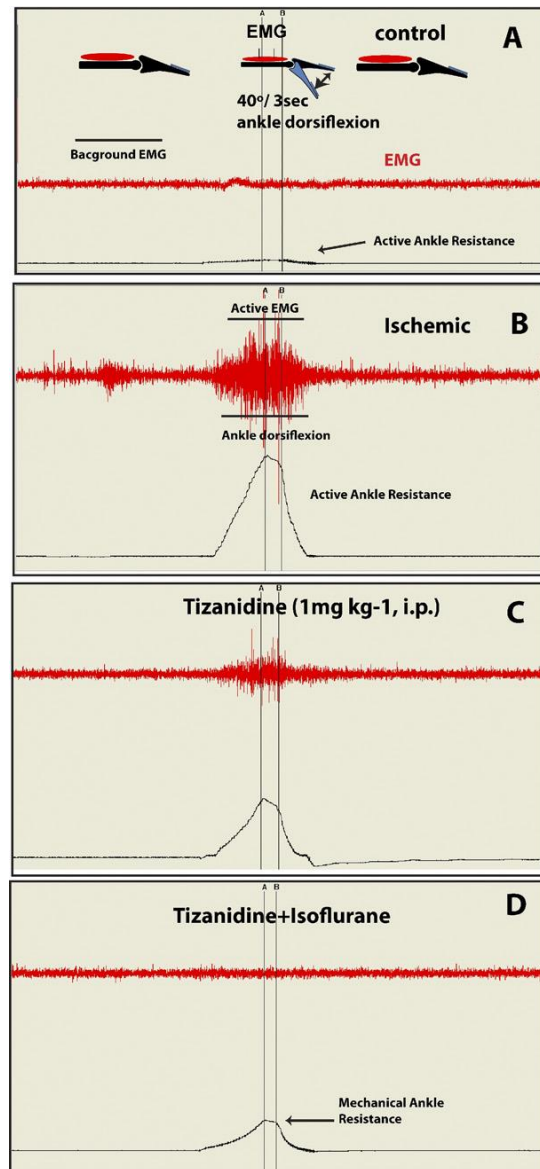


Fig.1 一過性虚血後痙性対麻痺ラットのSRA測定

Tizの全身およびIT投与での鎮痙作用; Tiz

1mg/kg腹腔内投与は、SRA中の筋電図変化を有意に抑制した。有意な鎮痙作用は薬剤投与後10分で明らかとなり60分後まで持続した(Fig.2A, B)。くも膜下Tiz(10 μ g ないし50 μ g)投与でも同様の効果がみられた。投与24時間後には、いずれの治療群でもSRAは投与前値に戻っていた。

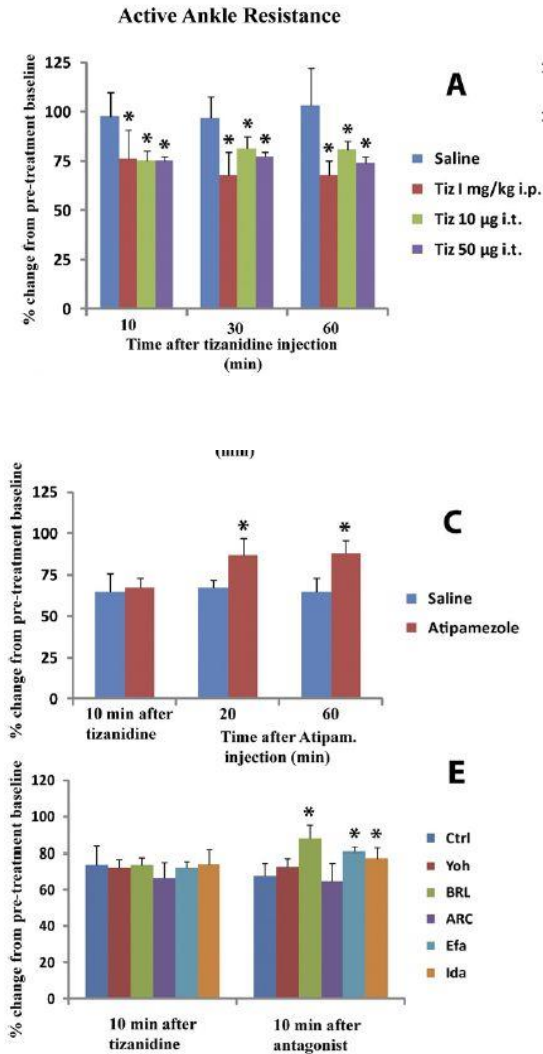


Fig. 2A, C, E: 各薬理的検討における足関節SRAの抵抗値の変化。

α 2アドレナリン受容体拮抗薬によるTizの鎮痙作用の拮抗; Tiz 50 µg IT投与の鎮痙効果はAti 50µg IT投与で拮抗された(Fig.2C, D)。

Tiz 1mg/kg腹腔内投与は、BRL 5mg/kg、Efa 1mg/kg、Ida 1mg/kg全身投与で有意に拮抗された。Yoh 3mg/kg、ARC 5mg/kgでは有意な拮抗作用はみられなかった(Fig. 2E, F)。

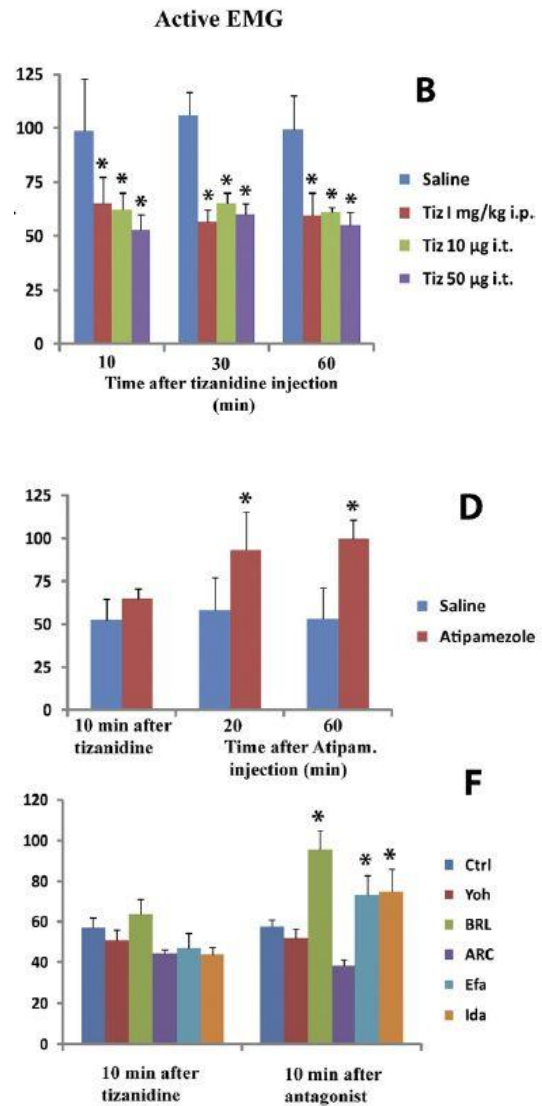


Fig. 2B, D, F: 各薬理的検討におけるSRA測定中のヒラメ筋EMGの変化。

Tizおよびインフルラン全身投与による脊髄反射(H反射)の抑制; 脊髄虚によってH反射は対照群のラットと比較して亢進する(H/M ratio, 0.24 ± 0.03 vs 0.35 ± 0.05 mV; Fig. 3A, B, Table 1)。Tiz 1mg/kg全身投与はホH反射の亢進を有意に抑制した(Tiz投与後のH/M比 0.23 ± 0.03 , Fig. 3C, Table 1)。生食投与の対照群ではH反射を抑制できなかった。Tiz投与なしでもインフルラン2%吸入でH反射は有意に抑制された(H/M比 0.35 ± 0.05 vs 0.20 ± 0.04 mV; Fig. 3D, E, Table 1)。

Table 1. Changes in H-reflex activity before and after tizanidine treatment

	Naive Ctrl	Spastic Pre	Spastic Tiz*	Spastic Iso**
M max (mV)	8.61±0.36	11.22±1.10	9.39±0.85	9.68±1.03
H max (mV)	2.06±0.26	3.94±0.22	2.15±0.33	1.95±0.32
H/M ratio	0.24±0.03	0.35±0.05*	0.23±0.03**	0.20±0.04***

* Tizanidine was administered i.p. (1 mg kg⁻¹).

** Animals were anesthetized with 2% isoflurane.

*P<0.05 vs. Naive control rats.

**P<0.05 vs. spastic nontreated animals.

***P<0.05 vs. spastic nontreated animals (t-test with Bonferroni correction).

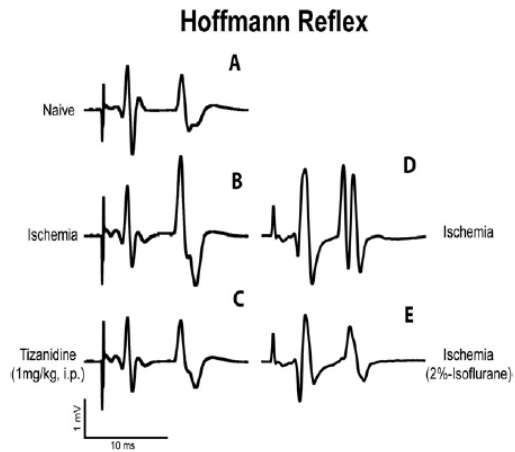


Fig. 3. Systemic treatment with tizanidine or isoflurane anesthesia suppresses Hoffmann reflex activity in animals with spinal ischemic injury. (A, B) In comparison with control naive animals (A), rats with spinal ischemic injury, which showed increase in stretch reflex activity, had significantly increased H-wave response after electrical stimulation of the tibial nerve (see Table 1 for details). (C) In animals with spinal ischemic injury, systemic administration of tizanidine (1 mg kg⁻¹, i.p.) effectively suppressed otherwise increased H-wave response (Table 1). (D, E) In animals with spinal ischemic injury, but without tizanidine treatment, isoflurane anesthesia (2%) lead to a potent reduction in H-reflex amplitude (Table 1).

SRA 亢進ラット脊髄での活性化されたアストロサイトでの $\alpha 2A$ 受容体の増加; 対照の正常ラットの脊髄横断切片では、 $\alpha 2A$ 受容体の C 末端に対する免疫染色では、小型から中型の介在ニューロンと α 運動神経の陽性所見がみられた (Fig. 4A)。同切片での GFAP 抗体を用いてアストロサイトに着目した $\alpha 2A$ 受容体の C 末端に対する免疫染色では弱い抗原性を示すのみであった。対照的に虚血ラットでは、明らかに $\alpha 2A$ 受容体の C 末端に対する抗原性が増加した。この抗原性の増加は虚血部位周辺の活性化されたアストロサイトで多くみられ近隣の α 運動神経は虚血後も残存していた (Fig. 4D~H)。

$\alpha 2A$ 受容体-m 抗体を用いた免疫染色では、 α 運動神経と介在神経表面に受容体が存在することがわかった。 $\alpha 2A$ 受容体-m 抗原は介在神経と運動神経の両方に発現していた。対照ラットと虚血ラットで染色パターンに違いはみられなかった。共焦点顕微鏡では $\alpha 2A$ 受容体-m 抗原と

サイナプシンが colocalize する像がみられた (Fig. 5A-F)。

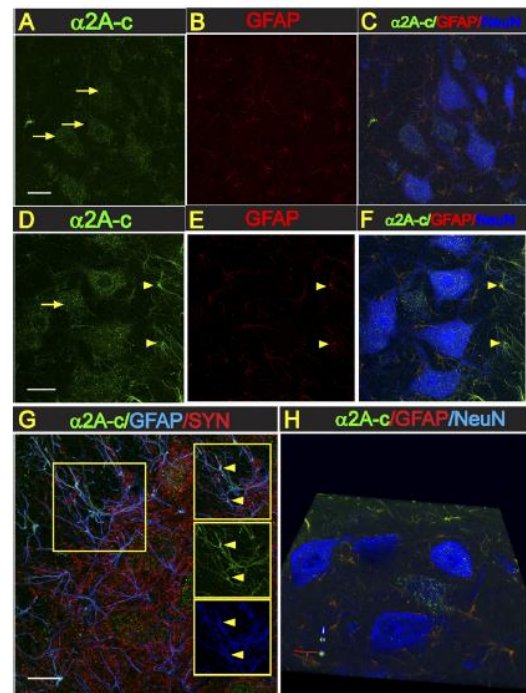


Fig. 4

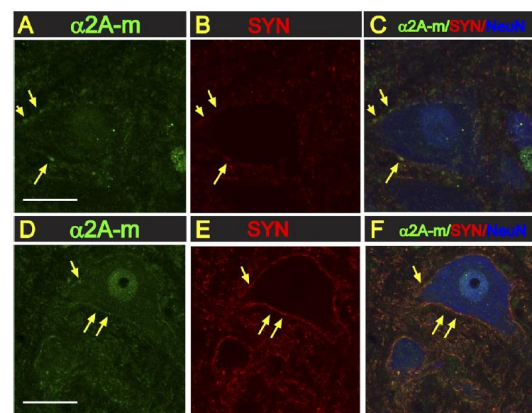


Fig. 5

結論として、今回の結果から Tiz の鎮痙作用が証明され、作用機序として $\alpha 2A$ AR および $\alpha 2B$ AR を介した可能性が示唆された。作用部位としては脊髄あるいは上位中枢の神経細胞の $\alpha 2A$ AR が主座で、他に活性化されたアストロサイトも考慮された。

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 1 件)

(1) T. Fuchigami (研究代表者), O.Kakinohana, M. P. Hefferan, N. Lukacova, S. Marsala, O. Platoshyn, K. Sugahara, T. L. Yaksh, AND M. Marsala. Potent suppression of stretch reflex activity after systemic or spinal delivery of tizanidine in rats with spinal ischemia-induced chronic spastic paraplegia. *Neuroscience 2011; 194: 160-9* (査読あり)

[学会発表] (計 0 件)

[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

淵上 竜也 (FUCHIGAMI TATSUYA)
 琉球大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号:10381211

(2)研究分担者

垣花 学 (KAKINOHANA MANABU)
 琉球大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号:20274897

照屋 孝二 (TERUYA KOJI)

琉球大学・医学部・助教
 研究者番号:50437985

(3)連携研究者

なし