

令和 3 年 8 月 24 日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01516

研究課題名(和文) 脊髄損傷後のBDNFと呼吸リハビリテーションが呼吸神経回路再構築に及ぼす効果

研究課題名(英文) Effects of BDNF and pulmonary rehabilitation on reconstruction of respiratory neural circuits after spinal cord injury

研究代表者

富田 和秀 (Kazuhide, Tomita)

茨城県立医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：00389793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：頸髄損傷では肋間筋麻痺による呼吸運動障害を併発する。脊髄損傷後の神経回路再構築については不明であり、根拠に基づいた呼吸リハビリテーションの確立には至っていない。本研究では1)脊髄半切慢性動物の作成と2)延髄呼吸中枢の吸索性ニューロンの胸髄軸索投射様式の電気生理学的解析、3) - 連関の実験標本の作製、4)脊髄損傷部へのBDNF増強方法、5)呼吸リハビリテーションの方法に取り組んだ。特に、微小電流刺激法によって、延髄呼吸ニューロンの胸髄軸索側枝の対側性分布様式は、側角から前角にかけての灰白質に多く分布していた。これまで報告されてきた上部腰髄での軸索側枝の分布とほぼ同様であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸髄においては呼吸ニューロンは呼吸筋である内肋間筋を支配する内肋間神経運動ニューロンと興奮性単シナプス結合することが報告されているものの、呼吸ニューロンの胸髄での軸索側枝の分布の詳細は不明であった。本研究(第1研究)では微小電流刺激法によって延髄呼吸ニューロンの胸髄における軸索側枝の対側性分布様式を調べた。胸髄の軸索側枝は側角から前角にかけての灰白質に多く分布しており、吻尾方向では調べたトラックの数と軸索側枝が同定されたトラックの数の割合は $14.8 \pm 12.6\%$ 、広がり方は 1.18 ± 0.6 mmであった。これまで報告されてきた上部腰髄での軸索側枝の分布とほぼ同様であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cervical spinal cord injury is accompanied by respiratory disturbance of the thorax due to intercostal muscle paralysis. Reconstruction of neural circuits after spinal cord injury is unknown, and therefore evidence-based respiratory rehabilitation has not been established. In this study, we studied the following: 1) Creation of chronic animals with spinal cord incision; 2) Electrophysiological analysis of thoracic axon projection of inspiratory neurons in the medulla oblongata respiratory center; 3) Analysis preparation of alpha-gamma linkage; 4) BDNF enhancement method for spinal cord injury; 5) Respiratory rehabilitation. As a result, using the Microstimulation method, the contralateral distribution pattern of the axon side branches of medulla oblongata respiratory neurons was largely distributed in the gray matter from the lateral horn to the anterior horn in the thoracic spinal cord.

研究分野：呼吸理学療法学

キーワード：脊髄半切 延髄呼吸中枢 胸髄軸索側枝投射様式 微小電流刺激法 肋間神経 - 連関 脂肪幹細胞 吸気抵抗負荷 呼吸リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

全国労災病院脊髄損傷者データベースの第3次調査によると、わが国の脊髄損傷者における死因の1位は肺炎であり、頸髄損傷がその87%を占めている。頸髄損傷者では、四肢筋の運動麻痺だけでなく、呼吸筋の運動麻痺も引き起こされる。そのため呼吸機能が低下し、呼吸器合併症を起こしやすくなる。また高位頸髄損傷では横隔膜麻痺による呼吸筋麻痺が生じると考えられており、多くの研究データが蓄積されている。しかしながら、呼吸機能は横隔膜だけの働きでは肺活量全体の約50%しか得られず、肋間筋の働きが加わることで正常な肺活量を維持できることが報告されている (DiMacro et al., 2005)。これまでの臨床知見においても第6胸髄以上の脊髄損傷では肺活量が低下する事が報告されており (Schilero GJ et al., 2009)、肋間筋が正常に駆動していないと肺活量が低下する。

脳と異なり脊髄では障害を受けると軸索は再生しないと考えられてきた。その理由は脊髄では軸索の伸張を阻害する物質が存在すること (Schwab ME et al., 2004)、脊髄損傷によって軸索の伸張を促す神経栄養因子が低いこと (McCall et al., 2012) などが考えられている。近年、脊髄損傷動物モデルに脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) を投与し、運動機能を回復させる研究が進められており、損傷部位への直接投与 (Bregman BS et al., 2002) や頸部筋への投与 (Nakazima H et al., 2008) により運動機能が回復することが報告されている。また、これまで BDNF は体外からの投与が主流であったが、運動療法によっても BDNF が高まると報告されている (Ying Z et al., 2005)。さらに BDNF と運動療法の併用によってラット頸髄半切後の運動機能が回復したことが報告されている (Ying Z et al., 2008)。しかしながら、脊髄損傷後の運動機能回復を裏付ける中枢神経内の神経回路再構築についてはその詳細は明らかにされていない。脊髄損傷後の効果的な呼吸リハビリテーションの確立のためには、中枢神経系の可塑的变化を含めた代償性神経回路再構築を解明する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、脊髄損傷後の胸郭呼吸運動障害モデルを作成し、複雑な神経回路がどのように再構築されながら回復するかを詳細に解明することが可能となる。実験ではネコを用いて肋間筋を駆動する胸髄を対象として延髄呼吸中枢の単一ニューロン活動を直接解析できるガラス管微小電極を用いた電気生理学手法を用い、BDNF と運動療法による機能回復過程を呼吸中枢からの下行路の可塑的变化を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 脊髄半切慢性動物の作成

実験動物は、成猫を用いた。ガス麻酔で十分な麻酔深度になってから胸部で心電図を記録した。気管に挿管チューブを挿入し人工呼吸を施した。手術は無菌的に十分深い麻酔下で行い、実験終了まで深麻酔を維持する。ガス混合気麻酔下にて正中部の頸部背側の皮膚を切開し筋を左右に分け、第2頸椎と第3頸椎正中から一側の脊椎背部を切除し脊髄の背面を露出させた。第3頸髄と第4頸髄移行部の硬膜を切開し脊髄正中部より一側を半切した。半切後、硬膜を閉じて切開した所を縫合し、筋を元の位置に戻して抗菌薬、鎮痛薬を投与して動物を麻酔から覚醒させ、飼育ケージに戻した。術後3日間は抗菌薬・鎮痛薬を投与して注意深く回復過程を観察した。

横隔膜運動単位の記録：術後、脊髄の炎症や感染症等に細心の注意を払って観察・飼育し、半切後3か月経過した時点で、麻酔下にて実験を行った。仰臥位にて腹部を切開し、双極針電極で半切側横隔膜の運動単위를記録した。なお、記録は自発呼吸下にて行った。また、一連の実験において、血圧、体温、心電図、呼気ガス濃度を常時モニターした。呼吸パターン中、吸息相の判別は食道内圧の圧変動が陰圧へ変化するところで判別した。

2) 延髄呼吸中枢の吸息性ニューロンの胸髄軸索投射様式の電気生理学的実験

動物は成猫を用いた。動物はケタミン塩酸塩を臀部に筋注した後、ソムノペンチルを腹腔内投与にて麻酔した。気管切開が施行され、CO₂が4-6%に保持されるように人工呼吸器で管理された。大腿動脈と腕頭静脈は血圧と薬剤投与のためにカテーテルを留置した。麻酔深度は安定した血圧や心拍数、縮瞳により判断し、ケタミン塩酸塩筋肉注射とソムノペンチルムを適時静脈内に投与した。直腸温度が測定され、ヒーターにて37-38℃に管理された。動物はミオブロックの静脈内投与によって不動化された。第5、第6頸髄節由来の一側横隔神経を頸部で剖出、切断して中枢端に電極間距離約2mmの双極カフ電極に装着した。ネコの頭部と腰部を脳定位固定装置に固定し、頭部耳棒を中心として前額面に対して鼻部が20°下方になるように調整した。頭蓋骨尾部を取り除き、尾側小脳組織を温存した状態で開頭、延髄背面を露出させた。第1頸椎から第6頸椎、第8胸椎から第6腰椎の椎弓切除術を施行し、硬膜を切開して脊髄背面を露出させた。36から37の流動パラフィンにて下部脳幹と脊髄を覆い脊髄を保護した。

記録と刺激：呼息ニューロンの記録には、Fast Green を溶解した 2MNaCl 溶液を充填したガラ

ス管微小電極を用いた。単一呼吸ニューロンの活動電位を細胞外記録した。横隔神経発射を増幅器(JB-101J, AB-651J, 日本光電)を用いて記録した。記録周波数範囲は低域遮断周波数 150 Hz, 高域遮断周波数 3 KHz に設定して記録した。横隔神経発射がある相を吸息相とし, 神経発射がない相を呼息相とした。呼息相で発射活動のあり, 吸息相で発射活動が止まる呼吸ニューロンを呼息ニューロンとした。呼息ニューロンの細胞外発射活動電位, 横隔神経の発射活動, 気道内圧はデータレコーダー(PC208Ax, SONY)に記録し, インターフェイス(PowerLab/8Sp, ADInstruments)を用いてコンピューターに取り込み, 解析ソフト(LabChart7, ADInstruments)にて解析した。脊髄の呼息ニューロン主軸索の投射は Ag/AgCl ボール電極を脊髄の腹側に設置して電気刺激装置(SEN-720, 日本光電)とアイソレーター(SS-403J, 日本光電)を用いて持続時間 0.15 msec, 陰性矩形波によって測定した。主軸索の伝導速度は刺激部位と記録部位までの距離と逆行性スパイクの潜時を用いて計測した。逆行性スパイクの同定は自発発火と逆行性に誘発されたスパイク間での衝突試験によって行った。データ取得後, 脳幹における呼息ニューロンの記録位置で記録電極から Fast Green を電気泳動することによりマーキングした(20 μ A 陰性直流電流, 15 分間)。

呼息ニューロンの胸髄における軸索側枝の検索: 胸髄における軸索側枝を検索するために, 先行研究と同様の方法を用いて灰白質に微小電流刺激を加えた。自発呼吸が残存していると, 呼息ニューロンのスパイクの潜時が呼吸に同調して変化が生じるため, 人工呼吸を過換気の状態にして横隔神経発射がほとんど認められない状態にした。軸索側枝を刺激するためにガラス管封入タングステン微小電極(先端直径 10 μ m, 長さ 10-20 μ m)を用いてアイソレーター(SS-104J, 日本光電)を使って微小電流刺激を行った。刺激は持続時間 0.15msec, 陰性矩形波を用いた。軸索側枝を探索するために, 脊髄の灰白質を刺激するトラックは脊髄の尾側から吻側に向かって脊髄長軸方向に沿って試行ごとに 1 mm ずつ移動させた。それぞれのトラックでは背側から腹側にかけて 100 μ m 間隔で刺入と微小電流刺激を行い逆行性スパイクの誘発される部

位において, 誘発に必要な刺激電流の閾値と逆行性スパイクの潜時を計測した。100 μ A で刺激部位延髄呼息ニューロンの胸髄における軸索側枝の対側性分布様式 51 から半径 1 mm の球体の範囲を刺激するとされており, 本研究では刺激の範囲を 200 μ A の刺激を上限とした電流で刺激を行った。本研究では次に示す, 1) 側枝の逆行性スパイクの潜時が脊髄長軸方向での同じ脊髄レベルでの本幹を刺激した時の潜時より長いこと, 2) 主軸索より軸索側枝が分岐する場所と軸索側枝を刺激している部位をスパイクが伝導する時間(X_c)が 0.15 msec 以上であることの 2 点を基準にして軸索側枝の判断を行った。電気刺激によって軸索側枝の単発刺激から誘発されたスパイクの潜時(L_c), 腰髄からの単発刺激にて誘発されたスパイクの潜時(L_t), 軸索側枝の連続刺激によって計測された不応期(R_c), 腰髄を電気刺激しその後軸索側枝の刺激を徐々に短縮させていった時, 誘発されたスパイクが 50%の出現になった時間間隔(I_{tc})より, 次の式 $X_c=1/2(I_{tc}+L_c-L_t-R_c)$ が成り立つ 4, 5, 10)。電気刺激した部位を正確に知るために, 実験中にタングステン微小電極に電流(20 μ A 陰性直流電流, 20 秒間)を通電することで, いくつかの刺激部位で小さな電氣的損傷を作成した。

組織学的解析: 実験終了後, ソムノペンチル致死量を静脈内注射し, ヘパリン加生理食塩水, 次に 10%のホルマリン溶液を大動脈から灌流させた。灌流固定後, 脳幹と脊髄を取り除き, 呼息ニューロンの記録部位と微小電流破壊した厚さ 100 μ m の凍結連続切片を作成し, Cresyl Violet にてニッスル染色を施した。染色した切片より脳幹では Obex および呼息ニューロンの記録部位を, 脊髄では各試行の電極の侵入痕や電氣的損傷の位置をそれぞれ解析した。

3) 脊髄損傷部への BDNF 増強方法の実験

遺伝子改変動物の脂肪細胞を採取し, 専用の基材・培地を使用して脂肪由来幹細胞を分離・培養した。脂肪幹細胞をトリプシン処理して遠心分離した。得られた細胞ペレットの細胞数を測定し, フラスコに継代した。その後, 継代した未分化な脂肪幹細胞を蛍光顕微鏡下で観察した。

4) 呼吸リハビリテーションの負荷方法の開発

実験動物用の吸気筋トレーニング器具の開発を行った。吸気筋トレーニングは, 吸気抵抗負荷による方法を採用した。

開発した吸気抵抗負荷トレーニング器具は, 負荷装置は挿管チューブの先に接続できるようになっており, 主な空気の通り道である本体の通気口と, 本体から出る側管, 側管に取り付けるアダプタの 3 つで構成されている。そして, 呼気時には本体通気口にかぶせてあるゴム製のふたが開き, 主に本体を通して呼気が排出し, 吸気時には本体のふたが閉じ, 側管から吸気が行われる仕様とした。吸気負荷抵抗は, 側管に取り付けたアダプタで変化させた。アダプタは Load1 ~ 4 の 4 種類で, アダプタに空けた直径 0.5 mm の穴の数を変えることで, 吸気負荷抵抗の強度を変化させることができる。実験動物を麻酔下で, 気道挿管チューブを留置した。麻酔下・自発呼吸の実験動物に対して多段階的に吸気抵抗負荷を実施できた。

なお, すべての実験計画は, 茨城県立医療大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

4. 研究成果

1) 脊髄半切慢性動物の作成

半切側の横隔膜運動単位は、吸息相で発射活動を示し、呼息相では発射活動が停止した。脊髄半切後、半切側では横隔神経発射活動の回復が認められた。これにより、脊髄障害によって呼吸中枢の下行路が障害された後も、正常とほぼ同じ活動様式を獲得する可能性が示唆された。また、横隔膜の2つの運動単位を同時に記録すると、吸息相において発射活動が開始する時点は、運動単位によって異なることが分かった。このことは中枢神経系内での回復状況によるものか、あるいは運動単位の性質によることが考えられた。

2) 延髄呼吸中枢の吸息性ニューロンの胸髄軸索投射様式の電気生理学的解析

この実験項目では cVRG からの呼息ニューロンの胸髄における軸索側枝の分布様式を微小電流刺激法によって観察し、4 例の呼息ニューロンから施行した中、13 トラックで軸索側枝を同定した。

(1) 呼息ニューロンの同定

4 例の呼息ニューロンから細胞外記録をした。呼息ニューロンであることは横隔神経発射休止相でニューロン活動が認められることで同定した。脊髄を Ag/AgCl ポール電極で電気刺激して誘発された逆行性スパイクの潜時と、軸索側枝をガラス管封入タングステン微小電極で刺激して誘発された逆行性スパイクの潜時を比較すると、軸索側枝では距離が伸びるため遅延した潜時が観察された。呼息ニューロンの頸胸髄移行部、胸腰髄各髄節レベルにて伝導速度を逆行性スパイクの潜時と伝導距離から測定した。頸髄と胸髄の接続部での平均伝導速度は 54.9 ± 24.6 m/sec、胸髄で 58.9 ± 4.5 m/sec、腰髄で 54.5 ± 5.2 m/sec であり軸索の伝導速度は大きく変化は見られなかった。

(2) 胸髄における軸索側枝の分布の同定

軸索側枝の同定の一例を示す。灰白質の軸索側枝への単発刺激の潜時 (Lc) は 4.7 msec であった。不応期 (Rc) を計測するために軸索側枝に 2 連発刺激を与えると Rc は 0.9 msec であった。腰髄への単発刺激の潜時 (Lt) は 7.6 msec であった。腰髄を電気刺激し、その後に軸索側枝の刺激を徐々に短縮させていった時、誘発されたスパイクが 50% の出現になった時間間隔 (Itc) は、4.3 msec であった。これらを計算すると $Xc=0.25$ となり軸索側枝と確定した。同様の方法にて、4 頭から 13 トラックで軸索側枝を同定した。Xc の平均は 0.44 ± 0.25 msec であった。

(3) 電極刺入部位と逆行性スパイクが誘発された刺激閾値曲線

ガラス管封入タングステン微小電極刺入の深度とスパイクが誘発された刺激閾値曲線変化では、刺激閾値は灰白質の中間質外側から前角外側にて最も刺激閾値の低下が見られた。その他の軸索側枝においても側角から前角にかけての灰白質、または白質との境界付近にて刺激閾値が最も低い値であった。この曲線を軸索側枝と主軸索に分類し、最も刺激閾値が低い点を基準として揃えると、軸索側枝は幅の狭いグラフが描出された一方で、主軸索は幅の広いグラフが描出された。

(4) 軸索側枝の吻尾方向の分布様式

呼息ニューロンの吻尾方向の分布様式は、脊髄吻尾方向で最大で 38mm の範囲での軸索側枝の分布を調べた。軸索側枝を同定することができた施行の割合は $14.8 \pm 12.6\%$ (n=4) であった。また、軸索側枝吻尾方向に 1.18 ± 0.60 mm (n=11) の広がりを見せていた。

(5) 呼息ニューロンの記録部位の組織学的同定

Fast Green で染色された細胞外記録を行った部位は 4 か所同定された。Obex から尾側方向に 3.68 ± 1.26 mm、延髄表面から 2.93 ± 0.38 mm、脊髄の中線から 3.25 ± 0.26 mm の範囲に記録部位は存在した (図 5)。

以上の実験成果より、延髄呼息ニューロンの胸髄での軸索側枝の分布は、これまで報告されてきた上部腰髄での軸索側枝の分布とほぼ同様であることが示唆された。

3) 脊髄損傷部への BDNF 増強方法の成果

幹細胞の投与が脊髄損傷部に到達し、BDNF や glial derived neurotrophic factor (GDNF) などのサイトカインを介したメカニズムで強力な神経保護作用が報告されている。そのため幹細胞を介した BDNF 増強方法を検討した。その結果、今回の脂肪幹細胞を用いた培養方法では、細胞数の増加に課題が残った。今後、他の方法を検討する予定である。

4) 呼吸リハビリテーションの成果

脊髄半切 3 ヶ月後の実験動物を用いて、塩酸ケタミンとペントバルビタールナトリウム麻酔下で気管切開し、気管カニューレを留置した。トレーニング器具は、我々が開発した吸気抵抗負荷器具を使用した。深麻酔自発呼吸下で、気道挿管チューブにトレーニング器具を装着し、吸息時の食道内圧、胸郭運動を観察した。吸息相のみに多段階的に吸気抵抗負荷を加え、段階的に食道内圧の上昇、胸郭運動の増大が確認できた。休息を取りながら繰り返しの吸気抵抗負荷トレーニングを実施し、再現性高く、食道内圧の上昇と胸郭運動の増大を誘発できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 河村健太, 武井亮介, 佐々木一正, 佐々木誠一, 富田和秀1	4. 巻 29
2. 論文標題 延髄呼吸ニューロンの胸髄における軸索側枝の対側性分布様式	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 運動障害	6. 最初と最後の頁 49-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河村健太, 武井亮介, 佐々木一正, 佐々木誠一, 富田和秀
2. 発表標題 延髄呼吸ニューロンの胸髄における軸索側枝の分布様式
3. 学会等名 第57回日本運動障害研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	瀬高 裕佳子 (Setaka Yukako) (20404767)	茨城県立医療大学・保健医療学部・助教 (22101)	
研究分担者	佐々木 誠一 (Sasaki Sei-Ichi) (50153987)	茨城県立医療大学・保健医療学部・教授 (22101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------