

機関番号：23903
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590086
 研究課題名 (和文) 脊髄損傷の電気生理学的機能評価法の確立と薬効評価
 研究課題名 (英文) Spinal Cord Injury: Establishment of Measurement for Electrophysiological Function and Pharmacological Evaluation of Drugs
 研究代表者
 小野 秀樹 (ONO HIDEKI)
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
 研究者番号：00080200

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、1) 脊髄損傷に有効な薬物がまだないことから、すでに臨床で使用されている医薬品から有効な薬物を探索すること、2) 脊髄損傷における神経の障害とその再生を、神経電気生理機能のレベルで評価できる系を確立すること、3) 探索された薬物が神経電気生理機能のレベルで、脊髄損傷の予防・治療に有効であるかを明らかにすることを目的とした。糖尿病治療薬ピオグリタゾンが、運動障害の回復を促進し、慢性痛の発現を抑制すること、さらに電気生理学的評価により、脊髄運動系における下行性セロトニン神経の機能障害を予防または回復することが示された。

研究成果の概要 (英文)：

This study aimed 1) to search effective drugs for the treatment of spinal cord injury (SCI) from clinically used therapeutics, 2) to establish evaluation method of nerve degeneration and/or reinnervation after SCI in electrophysiological function, and 3) to study effectiveness of selected drugs on protection and/or treatment of SCI in physiological function. The antidiabetic pioglitazone recovered motor disorder and prevented the appearance of neuropathic pain, and it prevented or recovered the electrophysiological function of descending serotonergic fibers to spinal motor systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脊髄損傷、運動機能評価、電気生理学的機能評価、脊髄反射、セロトニン、神経再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦の脊髄損傷の患者は 10 万人以上にのぼり、さらに毎年 5 千人以上が交通事故などにより脊髄を損傷している。脊髄損傷に

は完全損傷と不完全損傷がある。完全損傷では運動と感覚の機能が消失し、不完全損傷では反射機能の亢進と痙性麻痺があり、感覚機能が亢進して慢性疼痛が生じる。これらは脊

髓の上行性と下行性神経の切断およびその後の変性によって生じる。損傷の部位により呼吸・自律神経・排尿・性機能などにも障害が生じる。これらの障害により患者の行動が著しく妨げられ QOL は著しく低下する。

(2) 唯一の薬物療法として受傷直後のステロイド大量療法があるが、さほど有効ではない。神経幹細胞やグリア幹細胞を移植する再生医療があるが、これを促進するための戦略としての有効な薬物療法の開発が必須である。PPAR- γ アゴニスト、スタチン類、タクロリムスなどに神経保護作用があることから、これらが脊髄損傷の発症を予防し回復する可能性がある。一方、脊髄損傷からの回復においては、最初に生じる下行性セロトニン神経の再生が重要と考えられている。セロトニン神経は再生しやすい神経であり、他の神経は再生したセロトニン神経に沿って再生する可能性が高い。

(3) 脊髄損傷の動物での研究は、行動学的、組織学的、生化学的評価法によるものがほとんどであり、電気生理学的機能評価法によるものは非常に少ない。特に脊髄反射電位を測定するものは皆無であった。また脊髄損傷治療のための新薬は探索されてはきたが、臨床応用まで至ったものはなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、BBB または BMS スコアによる行動評価に加えて、電気生理学的手法により、脊髄損傷における障害と、薬物を用いた回復を、神経生理機能のレベルで評価できる系を確立することを目的とした。特に、下行性セロトニン神経の生理機能が評価できる系の確立を目的とした。

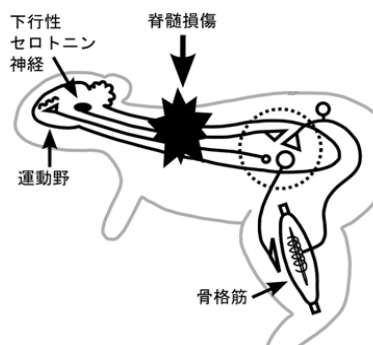
(2) 脊髄損傷を有効に回復する薬物がなかったため、動物で神経障害性疼痛への効果を示されている数種類の薬物（糖尿病治療薬ピオグリタゾン、高脂血症治療薬アトルバスタチンとシンバスタチン）の脊髄損傷の運動障害と慢性疼痛への効果を行動試験により評価した。

(3) 最終年度においてはラット脊髄損傷モデルを用いて、ピオグリタゾンの下行性セロトニン神経機能への改善作用の有無を電気生理学手法により評価した。

3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷モデル動物の作製：雌のラットまたはマウスを麻酔し、第8胸髄の脊椎骨を露出し、露出部に重錘を落下させ、脊髄を圧迫損傷させた。損傷後 14~28 日まで飼育した。排尿障害がある動物では、1日2回人

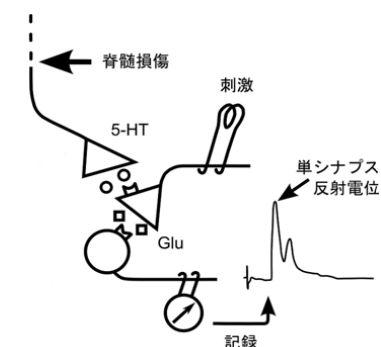
為的に排尿させた。



(2) 行動評価と感覚機能評価：後肢運動機能の評価にはラットは BBB スケールをマウスは BMS スケールを用いた。さらに、前後肢の協調性、荷重歩行の能力も経日的に評価した。感覚機能評価として、慢性痛の状態を後肢基底を機械刺激する von Frey test で評価した。

(3) 脊髄反射電位の測定：損傷 21 日後の対照群および薬物処理群のラットを用いて脊髄反射を測定した。ラットを麻酔し、脳と脊髄の連絡を絶つために頸髄 C1 レベルで脊髄を切断した。腰仙髄の脊髄を露出し、L5 後根を刺激し L5 前根から単シナプス反射と多シナプス反射電位を記録した。

(4) ラットにおける下行性セロトニン神経の生理機能評価：脊髄単シナプス反射経路のシナプス前部および後部に下行性セロトニン神経の終末がシナプスを形成している。セロトニンは興奮性伝達物質グルタミン酸の放出を減少し、単シナプス反射を抑制すると考えられる。



セロトニン (5-HT) は単シナプス反射を抑制する。

①セロトニン放出薬 (p-クロロアンフェタミンなど) はセロトニン神経の終末からセロトニンを放出し、単シナプス反射を抑制する。セロトニン神経が消失すると、p-クロロアンフェタミンは作用できない。②末梢投与されたセロトニン前駆物質-5-hydroxy-tryptophan (L-5-HTP) は、脊髄へ移行した後アストロサ

イトなどで脱炭酸されてセロトニンに代謝される。下行性セロトニン神経が正常であると、セロトニンはシナプス前部へ取り込まれ、シナプス間隙の濃度が低下するため、単シナプス反射は変化しない。脊髄損傷によりセロトニン神経が障害されるとセロトニンの再取り込みがなくなるため、単シナプス反射が抑制される。

すなわち、セロトニン放出薬またはセロトニン前駆物質を静脈内投与することにより、下行性セロトニン神経の生理機能が正常であるのか障害を受けているのかが評価できると考えられる。

(5) 誘発筋電図の測定：麻酔マウスを筒状のホルダーに入れて、後肢を露出した。下腿の腓腹筋に双極電極を刺入し、脛骨神経を刺激した。足底筋から筋電図 (M 波、F 波、H 波) を記録した。

(6) HPLC を用いた脊髄モノアミン量の測定：脊髄損傷マウスの脊髄セロトニン、ノルアドレナリン含量を、HPLC により定量した。

4. 研究成果

(1) マウスモデルを用いた候補薬物の探索：①下行性のセロトニン神経内には神経栄養物質である Thyrotropin releasing hormone (TRH) が伝達物質として含有されている。TRH や TRH の安定アナログは神経成長作用があるので、TRH アナログの脊髄損傷改善作用を評価したが、有効性は認められなかった。②糖尿病治療薬であるピオグリタゾン (5 および 10mg/kg, i. p.) は 28 日間の投与で行動評価において有意な運動障害の改善作用を示し、さらに神経障害性疼痛の発症を完全に予防した。HPLC を用いた定量により、脊髄損傷後の脊髄セロトニンとノルアドレナリン含量の減少が有意に改善した。③高脂血症治療薬であるアトルバスタチンとシンバスタチン (5 および 10mg/kg, p. o.) は運動障害を改善した。アトルバスタチンは神経障害性疼痛の発症を抑制したが、シンバスタチンには改善作用がなかった。シンバスタチンは用量が高すぎた可能性があるため、0.1 および 1mg/kg を用いたところ、運動障害を改善し、神経障害性疼痛の発症を軽減した。

(2) ラットにおける下行性セロトニン神経機能の評価法の確立：損傷程度の異なる脊髄損傷モデルラットを作製し、セロトニン放出薬である p-クロロアンフェタミン、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) であるフルボキサミンおよびセロトニンの前駆物質である L-5-HTP が脊髄単シナプス反射に及ぼす作用を検討することにより、脊髄損傷後の下行性セロトニン神経の損傷状態を機能的

に評価する手法の考案を試みた。各種薬物は損傷の 14 日後に投与した。①p-クロロアンフェタミン (10mg/kg, i. v.) は脊髄損傷群では単シナプス反射を 40%抑制したが、シヤム手術群でも軽度の抑制 (15%程度) を生じた。p-クロロアンフェタミンはセロトニン作用に基づかない単シナプス反射抑制作用があることが示唆されたので、セロトニン神経の機能評価に用いることはできないと判断した。②セロトニン選択的再取り込み阻害薬とされるフルボキサミン (10mg/kg, i. v.) は単シナプス反射を抑制し、この作用は 5-HT1D 受容体拮抗薬である BRL15572 で拮抗された。セロトニン枯渇薬 PCPA 前処理で抑制作用は消失し、反対に増強作用が現れた。フルボキサミンはセロトニンを放出または取り込み阻害することにより単シナプス反射を抑制することがわかったが、セロトニンの放出を介さない未知の作用が存在すると判断された。③セロトニン前駆物質の L-5-HTP を末梢投与すると、脊髄のアストロサイトなどの脱炭酸酵素より生成したセロトニンはセロトニン受容体へ到達できる。しかし、正常な脊髄では、下行性セロトニン神経終末のトランスポーターがセロトニンを取り込むため、シナプス間隙のセロトニン濃度は上昇しない。脊髄損傷でセロトニン神経が損傷すると、シナプス間隙のセロトニン濃度が上昇し、単シナプス反射が抑制されると考えられる。本研究において L-5-HTP (10mg/kg, i. v.) はシヤム手術群においては反射を抑制しないが、脊髄損傷群では反射を抑制し、その程度は BBB スコアが 8 以下の群 (高障害群) で最大 50% 抑制、9 以上の群で最大 20%抑制であった。脊髄腰部膨大部のセロトニン濃度は BBB スコアが 8 以下の群は 9 以上の群とくらべて有意に減少し、L-5-HTP の効果と相関があった。

以上の結果から、用いた 3 つの薬物の中で、L-5-HTP が下行性セロトニン神経の機能評価に適していると考えられた。

(3) ラットモデルを用いたピオグリタゾンの行動評価：ピオグリタゾン (10mg/kg, i. p.) を術後 21 日まで投与した。BBB スコアは術後 3 日から有意に増加し、溶媒投与群とくらべて有意な運動障害の改善が見られた。また、脊髄損傷によって発症した神経障害性疼痛はピオグリタゾンの投与により有意に改善された。

(4) ラットモデルを用いた下行性セロトニン神経の生理機能評価：脊髄損傷後 21 日間溶媒またはピオグリタゾンを投与したラットを麻酔し、脊髄単シナプス反射電位を記録した。溶媒投与群では L-5-HTP (10mg/kg, i. v.) は単シナプス反射を抑制したが、ピオグリタゾン群では抑制は見られな

かった。すなわち、脊髄損傷手術後のピオグリタゾンの投与により、セロトニン神経の変性を予防したか、変性したセロトニン神経を回復したことが考えられた。今後損傷後の早期の時点での検討が必要であると考えられる。

(5) 誘発筋電図法を用いた脊髄損傷モデルマウスの反射機能評価：脊髄損傷マウスから、経目的にM波、F波およびH波を測定することが可能であった。急性期・亜急性期の損傷マウスにおいて、Hmax/Mmax比、Fmax/Mmax比が増強しており、運動ニューロンの興奮性の増大が示唆された。また、H波のrate depressionが低下傾向にあった。この手技を用いて、薬物の反射機構への改善効果を経目的に評価することが可能である。

(6) 脊髄損傷後の神経障害性疼痛の薬物治療：脊髄損傷マウスの機械痛覚過敏をガバペンチンとプレガバリンが緩解した。これらの薬物は脊髄損傷の疼痛への対症療法として有用と考えられる。

(7) 脊髄後角における神経障害性疼痛発症の機序：セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬（SNRI）ミルナシプランなどの抑制作用を研究した。

以上、本研究において、①脊髄損傷後の運動障害と痛覚異常を改善する薬物として、すでに臨床に用いられている医薬品の中から、ピオグリタゾン、アトルバスタチンおよびシンバスタチンを見出した。②脊髄損傷からの回復に重要な役割を有するとされる下行性セロトニン神経がシナプス伝達のレベルで機能しているかを知るための評価系を確立した。③この手法を用いて、ピオグリタゾンが脊髄損傷後のセロトニン神経の障害を予防するかまたはその再生を促進する可能性を見出した。本手法は、脊髄損傷の進行や回復に重要な役割を果たすセロトニンシナプスにおけるプレのセロトニン神経の機能の障害を電気生理学に評価するに適している。

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4件)

- ①Ohnami S, Tanabe M, Shinohara S, Takasu K, Kato A, Ono H, Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in spinal long-term potentiation of C-fiber-evoked field potentials. Pain. 152(3):623-631

(2011).

- ②Takasu K, Ono H, Tanabe M, Spinal hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels at primary afferent terminals contribute to chronic pain., Pain. 151(1):87-96 (2010).
- ③田辺光男、高須景子、小野秀樹、ガバペンチンの上位中枢を介する神経因性疼痛緩解作用、日本薬理学雑誌、134(6):299-303(2009)
- ④Tanabe M, Ono K, Honda M, Ono H, Gabapentin and pregabalin ameliorate mechanical hypersensitivity after spinal cord injury, Eur. J. Pharmacol., 609, 65-68 (2009)

[学会発表] (計3件)

- ①大波壮一郎、小川公一、加藤晃、小野秀樹、田辺光男、脊髄後角での長期増強誘導後および神経障害性疼痛発症後におけるC-線維誘発静集合電位に対する選択的セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬ミルナシプランの作用、第31回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(名古屋)2010年8月
- ②宮辺裕輔、山本昇平、大澤匡弘、小野秀樹、リゾフォスファチジン酸誘発アロディニアの起因となる知覚神経の同定、第84回日本薬理学会年会(大阪)2011年3月
- ③山本昇平、福田昂一、田辺光男、小野秀樹、マウスにおける脊髄損傷の筋電図法による評価、第83回日本薬理学会年会(大阪)2010年3月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 秀樹 (ONO HIDEKI)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：00080200

(2) 研究分担者

山本 昇平 (YAMAMOTO SHOHEI)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：90433226

田辺 光男 (TANABE MITSUO)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：20360026
(2008, 2009)

(3) 連携研究者

なし