

平成 23 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791500
 研究課題名（和文） ラット脊髄損傷モデルに対する嗅粘膜移植治療の有効性～膀胱機能の評価による検討
 研究課題名（英文） Olfactory mucosal transplantation after spinal cord injury improves voiding efficiency by suppressing detrusor-sphincter dyssynergia in rats.
 研究代表者
 高尾 徹也（TAKAO TETSUYA）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：30379177

研究成果の概要（和文）：脊髄損傷モデルラットに対して嗅粘膜移植を行い、その排尿機能を評価した。雌性 SD ラットの脊髄を Th9 レベルで完全離断し、嗅粘膜移植群と脊髄損傷対照群に分けた。膀胱内圧測定検査において、嗅粘膜移植群では対照群と比較して術後 2 週、4 週目において残尿量の低下と排尿効率の有意な改善が見られた。外尿道括約筋筋電図では、嗅粘膜移植群は尿道の過緊張が緩和されていた。嗅粘膜移植は高位中枢からの排尿制御能を回復させる可能性と、C 線維求心性神経を介した排尿反射形成を調整し、尿道の過緊張を緩和することで排尿効率を改善させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Several recent studies have shown that the olfactory mucosa transplantation (OMT) after spinal cord injury (SCI) promoted extensive regeneration of the injured spinal cord. We examined the efficacy of OMT for voiding dysfunction following SCI in rats. In adult female rats, complete transection of the Th 9 spinal cord was made, followed by OMT (SCI-OMT) or gelatin sponge filling (SCI-control). Both SCI groups were examined by cystometrograms (CMGs) and electromyograms of the external urethral sphincter (EUS-EMGs). In CMGs, post voided residual urine volume was significantly less, and voiding efficiency was significantly higher in the SCI-OMT group than in the SCI-control group. In EUS-EMGs with simultaneous CMGs, the SCI-OMT group showed more EUS relaxation in voiding phase. OMT may modify the emergence of the spinal micturition reflex after SCI. OMT may also induce the new axons to grow in the transplant site, which implies the possible existence of interneuron bridging across the injured spinal cord.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
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、泌尿器科学

キーワード：脊髄損傷、排尿、嗅粘膜移植

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脊髄神経の完全断裂は、それ以下の運動・感覚神経の不可逆的な障害をきたす。ヒトでも脊髄損傷患者は、損傷の重症度や麻痺レベルにより種々の機能障害を有する。その中で下部尿路機能障害の合併は高率であり、不適切な尿路管理は、腎機能低下を引き起こし、またQOLの低下を招く。そのため、尿路感染の予防、尿禁制の対策として適切な排尿管理が求められ、現状では患者の多くが生涯、自己導尿やカテーテル留置による排尿管理を余儀なくされているのが実情である。脊髄損傷に対する根本的な治療は、その多くがまだ研究段階であり、画期的な治療の開発が期待される。多能性幹細胞(iPS細胞)や胚性幹細胞(ES細胞)を用いた再生医療などが検討されているが、免疫の問題、腫瘍化の問題、倫理的問題など、解決しなければならない課題は多い。近年、ラット脊髄損傷モデルに対し嗅粘膜移植の研究が行われている。嗅球から鼻腔内の嗅粘膜に至る嗅神経系は、生涯を通して神経再生がみられる特異な部位で、嗅粘膜は神経幹細胞である基底細胞や、NGF、BDNFなどの神経栄養因子を分泌する嗅神経鞘細胞を含んでおり、神経軸索の伸展を促していると考えられている。嗅粘膜移植治療により脊髄軸索の部分的な再生が見られ、下肢の運動機能が回復することが明らかになってきている。またヒトでも少数例ではあるが脊髄損傷に対する自家嗅粘膜移植治療の臨床応用が開始され、下肢運動機能の改善効果がみられるとの報告もある。我々は、ラット脊髄損傷モデルにおいて嗅粘膜細胞移植が膀胱機能にどのような影響をもたらすのかを検討し、またその機序の解明をすすめることにより脊髄損傷に対する嗅粘膜移植

治療の膀胱機能改善に対する可能性を検討した。

2. 研究の目的

ラット脊髄損傷モデルにおける嗅粘膜細胞移植による膀胱機能の改善の程度を、代謝ケージ、膀胱内圧測定、尿道括約筋筋電図を用いて評価する。また膀胱、脊髄の組織学的変化を検討し、これらの結果から、脊髄損傷による排尿機能障害に対する嗅粘膜移植の効果に対する機序の解明を行う。

3. 研究の方法

脊髄損傷モデル作成と嗅粘膜移植

雌性SDラットに対して第9胸椎レベルの脊髄を完全離断し、2mmの間隙を作成。損傷直後にこの間隙に、同系統ラットから採取した嗅粘膜を0.5mm大に細片化し移植した。脊髄損傷コントロールモデルとして、損傷脊髄間隙にゼラチン製剤を充填した。

術後は1日2回程度、手圧にて排尿させ管理する。

排尿機能評価

術後経時的(4日、2週、4週)に膀胱内圧測定、尿道括約筋筋電図や代謝ケージを用いて、排尿機能の評価を行う。膀胱内圧測定は、イソフルレン気化吸入にて麻酔し、下腹部正中切開創よりPE-50カテーテルを膀胱内に挿入。閉腹後、ラットをボールマンケージに格納し、膀胱瘻より生食を注入しながら、膀胱内圧、排尿間隔、1回排尿量、残尿量を測定する。同時に尿道括約筋に針電極を挿入し、排尿時の尿道括約筋の状況を測定する。また、代謝ケージにラットを格納し、24時間にわたって排尿間隔、1回排尿量を電子秤にて計測する。膀胱機能検査終了後、ペントバルビタール過剰腹腔内投与下(150 mg / kg)に採血、採

尿をし、無痛的に還流固定を行い、脊髄、後根神経節、膀胱を採取する。

機序の解明

高位脊髄損傷後にはC線維求心性神経を介した排尿反射路が形成され、排尿筋過活動や排尿筋一括約筋協調不全(DSD)が出現すると考えられている。これらが、嗅粘膜移植によりどのように変化するかを検討した。そのために脊髄や後根神経節について組織学的評価の評価を行う。移植部位については、グリア瘢痕のマーカーとしてGFAP、神経軸索のマーカーとしてTUJ-1で、二重免疫染色した。脊髄はL6, S1レベルの求心性神経の入力部位で軸位断した標本を、C線維神経のマーカーとしてCGRP、新生神経のマーカーとしてGAP43で二重免疫染色した。

4. 研究成果

嗅粘膜移植（あるいはゼラチン充填）術後、4日目のCMGでは両群とも溢流性の排尿とそれに伴う膀胱内圧のわずかな上昇、下降がみられたのみで、明らかな排尿反射を思わせる波形は見られなかった。術後2週目には両群ともに排尿反射を示唆する波形、すなわち排尿と同期する膀胱内圧の急峻な上昇と下降が見られ、術後4週目にはそれぞれ排尿間隔の延長、1回排尿量の増加がみられた。また、嗅粘膜移植群では排尿収縮開始から終了までに要する時間の短縮も見られた。脊髄損傷コントロール群においては、排尿筋-外尿道括約筋協調不全(DSD)を示唆するEUS-EMGの過剰なburstingがみられたが、嗅粘膜移植群ではこれが抑制されていた。組織学的な検討では、GFAPとTUJ-1の二重免疫染色の結果、対照群では損傷部位に軸索の再生は認めず、瘢痕組織をみるのみだが、嗅粘膜移植群では損傷部位に軸索の新生所見を認めた。腰仙髄排尿中枢については、L6, S1レベルの

求心性神経の入力部位で、脊髄損傷対照群では、CGRP、GAP43陽性部位が、正常と比較して著明に広く、嗅粘膜移植群ではそれが緩和されていた。嗅粘膜移植群では脊髄損傷対照群と比較して、CGRPの新規入力有意に抑えられていることが認められた。

高位脊髄損傷後にはC線維求心性神経を介した排尿反射路が形成され、排尿筋過活動や排尿筋一括約筋協調不全(DSD)が出現すると考えられている。今回の結果より、嗅粘膜移植群は対照群と比較してDSDが抑制され、排尿効率が改善していることが示唆された。

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. Nakayama J, Takao T, Kiuchi H, Yamamoto K, Fukuhara S, Miyagawa Y, Aoki M, Iwatsuki K, Yoshimine T, Ueno M, Yamashita T, Nonomura N, Tsujimura A, Okuyama A. Olfactory mucosal transplantation after spinal cord injury improves voiding efficiency by suppressing detrusor-sphincter dyssynergia in rats. J Urol. 184(2): 775-82, 2010 (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

1. 高尾徹也, 中山治郎, 辻村 晃, 木内寛, 奥田英伸, 山本圭介, 福原慎一郎, 松岡庸洋, 宮川 康, 野々村祝夫: フロンティア企画「泌尿器科の未来を拓くバイオ技術」脊髄損傷モデルにおける、嗅粘膜移植による排尿障害改善の試み、第99回日本泌尿器科学会総会、名古屋、2011.4.24
2. 中山治郎, 高尾徹也, 奥田英伸, 山本圭介, 福原慎一郎, 木内 寛, 宮川 康,

辻村 晃, 奥山明彦: 高位脊髄損傷ラットに対する嗅粘膜移植治療の脊髄軸索新生効果と排尿反射形成に関する検討、第 98 回日本泌尿器科学会総会、盛岡、2010. 4. 28

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高尾 徹也 (TAKAO TETSUYA)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 30379177

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: