

## 実験的脊髄傷害後のラット後肢運動機能回復の神経機序

今井 富裕

札幌医科大学医学部生理学第2講座 (主任 青木 藩 教授)

### Neural Mechanisms Underlying Functional Recovery of the Hindlimb Movements after Spinal Cord Injury in Rats

Tomihiko IMAI

*Department of Physiology (Section 2), School of Medicine, Sapporo Medical University  
(Chief : Prof. M. AOKI)*

**ABSTRACT** This study was performed to clarify the neural mechanisms responsible for functional recovery of hindlimb movements after thoracic spinal cord injury in rats. The aim was two-fold: 1) to evaluate the possibility of plastic changes such as collateral sprouting from the corticospinal fibers in the remaining cord following thoracic spinal hemisection; and 2) to determine which descending pathways play the most important roles in the recovery of coordinated movement in chronically spinal-lesioned rats. Left spinal hemisections (HS) or partial spinal lesions sparing only right ventral (VQ) or dorsal quadrant (DQ) of the spinal cord at the lower thoracic (T9-10) level were performed aseptically under Nembutal anesthesia. Coordinated four-legged locomotion reappeared within 2 weeks in HS rats and within 2-3 weeks in VQ rats, respectively, after the initial operations. However, no recovery of hindlimb movement was observed in DQ rats.

Motor cortical microstimulation as well as WGA-HRP and biocytin injections into the hindlimb motor cortex was performed in recovered HS rats with survival period of 1-2 months. Motor cortical microstimulation on the hemisected side did not show any differences in the thresholds for evoking ipsilateral hindlimb EMG responses in recovered HS rats as compared with uninjured controls. There was no significant increase in the numbers of corticospinal fibers crossing from the intact side back to the hemisected side, nor were growth cones present in the lumbar segments. These results showed no evidence for plastic changes of corticospinal fibers at the lumbar segments in HS rats.

In terminal experiments for VQ and DQ rats, the right brachial plexus (C6-T1) was dissected and mounted on a bipolar stimulating electrode. Interlimb reflex potentials and spino-bulbo-spinal (SBS) reflex potentials were recorded under Nembutal anesthesia and urethane-chloralose anesthesia, respectively. Threshold intensities for evoking interlimb reflexes from bilateral hindlimb muscles were elevated for a week after the initial operation and returned to the normal range within 2-3 weeks in VQ rats. SBS reflexes from bilateral hindlimb muscles under urethane-chloralose anesthesia disappeared for a week after the initial operation and reappeared within 2-3 weeks in VQ rats. On the other hand, the early threshold elevation for interlimb reflexes and the disappearance of SBS reflexes persisted over the one month observation period in DQ rats.

These results demonstrated that the propriospinal (interlimb reflex) pathways and reticulospinal (SBS) pathways are essential for the functional recovery of coordinated four-legged locomotion after spinal cord injury in rats.

(Received February 24, 1993 and accepted March 17, 1993)

**Key words:** Spinal injury, Plasticity, Corticospinal tract, Spino-bulbo-spinal reflex, Rat

## 1 緒 言

哺乳動物の末梢神経線維が切断されると、その神経線維に隣接する健常線維から側芽発生が見られる。機能代償機序の1つと考えられるこの可塑的变化は中枢神経系でも生じ、臨床的にしばしば観察される固縮や痙縮の発現にも中枢神経内の側芽発生が関与すると考えられている<sup>1)</sup>。中枢神経内での側芽発生に関する基礎的研究としては、近年の青木らの研究<sup>2,3)</sup>が挙げられる。彼らはサルの脊髄半切後の後肢運動機能回復の基礎をなすものとして、腰髄レベルで健側下行性経路から傷害側への神経線維接続に着目し、その例として健側皮質脊髄路から傷害側への側芽発生による再交叉線維の増加について報告した。このようにサルを用いた研究では具体的な成果が報告されているが、ラットなどの四足動物において脊髄半切後の健側皮質脊髄路の再交叉線維の増加のような可塑的变化については未だ系統的的研究がなされていない。

一側の下行性経路を切断し、失われた機能の代償機序として、対側下行性経路の可塑的变化を調べる場合、しばしば研究対象として皮質脊髄路が用いられてきた<sup>2-6)</sup>。それは皮質脊髄路ニューロンの細胞体が皮質運動野にあり、その軸索をシナプスを介することなく脊髄まで伸ばしているため、下行路の可塑的变化を生理学的あるいは組織学的手法を用いて解析しやすいためである。また、皮質脊髄路の可塑的变化を観察する場合でも、皮質脊髄路だけを切断するような局所的な傷害<sup>4)</sup>よりも、脊髄半切 (hemisection) のように一側の下行性経路をすべて遮断の方が健側皮質脊髄路に可塑的变化を生じる可能性が高いと思われる<sup>2,3)</sup>。

脊髄半切を施すと、傷害側後肢には皮質脊髄路切断に由来する遠位筋、特に指の巧緻動作障害<sup>7)</sup>ばかりでなく、脊髄腹側を通る脊髄固有路や網様体脊髄路<sup>8-10)</sup>切断に由来する前後肢協調運動障害など、他の下行性経路の機能障害も出現することが予測される。

そこで、本研究では、まず、脊髄半切ラット(以下、HSラット)の後肢運動機能回復の評価を攻緻動作、前後肢の協調など、いくつかの項目に分けて経時的に行い<sup>11)</sup>、それぞれの下行性経路傷害に対応する運動機能異常の検出を試みた。その上で、腰髄レベルでの健側皮質脊髄路の形態的变化を順行性経路のトレーサーであるWGA-HRP (Wheat germ agglutinated horseradish peroxidase)あるいはbiocytin標識法<sup>12)</sup>を用いて調べた。さらに大脳皮質電気刺激により導出される

両後肢筋の筋電図 (EMG) を解析し、健側皮質脊髄路の機能的変化を調べた。

次に、半切によって残存した下行性経路のうち、どの経路が後肢運動機能回復に重要な役割を果たしているかを明らかにするため、半切に加えて脊髄をさらに部分的に切断し、腹側四半分 (ventral quadrant) を残したラット(以下、VQラット)と背側四半分 (dorsal quadrant) を残したラット(以下、DQラット)を作製した。この2群の後肢運動機能回復を比較するとともに、脊髄固有路と網様体脊髄路の機能的な回復過程を、それぞれ四肢間反射と脊髄一延髄-脊髄反射 (Spino-bulbo-spinal reflex; 以下、SBS反射)<sup>13)</sup>によって評価し、両群の後肢運動機能回復との対応を調べた。

このように脊髄の部分的傷害後にどの下行性経路に由来する後肢運動機能が、どのような時間的経過で回復するかを調べ、回復の神経機序として、残存する下行性経路の可塑的变化が関与しているか否かを明らかにすることを目的とした。

なお、本研究の一部はすでに学会抄録として発表済みである<sup>14,15)</sup>。

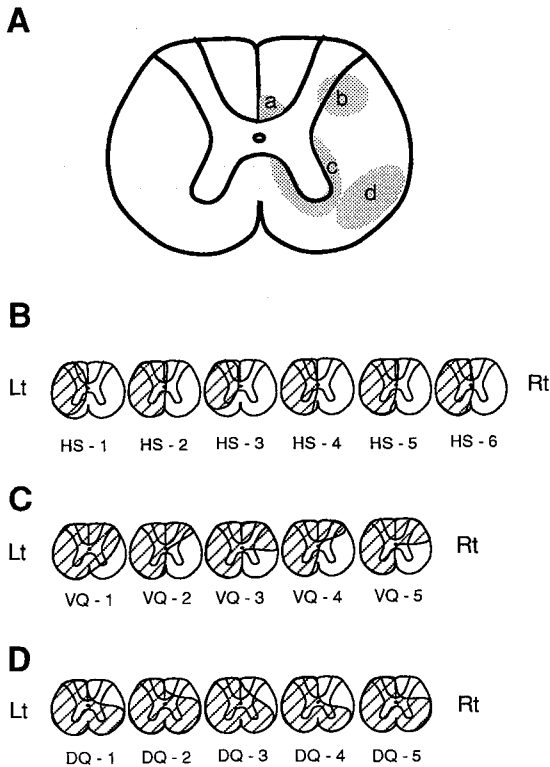
## 2 実験方法

### 2.1 慢性脊髄傷害ラットの作製

実験動物として、Sprague-Dawley系の雄性ラットを用いた(成功例94匹)。そのうち、32匹(350-450g)は各実験の正常対照(以下、Nラット)として用いた。残りの62匹には体重200-350gの時期に慢性手術を施した。ラットをpentobarbital sodium (Nembutal, 60-80mg/kg)により麻酔し、上顎固定装置<sup>16)</sup>にラット頭部を、固定台に四肢を固定した。胸椎T9-10の椎弓を除去した後、硬膜を切開反転し、脊髄後面を露出した。脊髄切断には、刃厚0.1mmのマイクロフェザー刃を用いた。62匹のうち、16匹には切断部位で脊髄の右半分 (hemisection, HS) が、37匹には右腹側四半分 (ventral quadrant, VQ) が、9匹には右背側四半分 (dorsal quadrant, DQ) が残るように脊髄を切断した (Fig. 1)。慢性脊髄傷害ラット(以下、慢性ラット)は脊髄傷害後、飼育ケージに入れ、ラット飼育室(動物実験施設内)にて2か月以内の一定期間生存させ、以下の実験に供した。

### 2.2 慢性手術後の後肢運動機能回復の評価

手術後、以下の5項目について経時的に後肢運動機能回復の評価を行った。平地での評価は、ピンセットで挟んだ際の痛み刺激に対する反応、自発運動、前後



**Fig. 1** Extent of spinal lesion (T9-10). A: major projections of the descending pathways (right side). a: corticospinal tract, b: rubrospinal tract, c: propriospinal tract, d: reticulospinal tract. B: 6 HS rats. C: 5 VQ rats. D: 5 DQ rats.

肢の協調運動および肢位の4項目について行った。さらに、15 cm幅で横木を3 cm間隔で12段に並べた特製のハシゴを60-70°の角度に立て、ラットを登らせた。数回の試行で横木の把握あるいは横木へのplacing(足を正しい位置に踏み置くこと)を観察することによって後肢遠位筋、特に指の巧緻動作の評価を行った。

### 2・3 神経生理学的実験

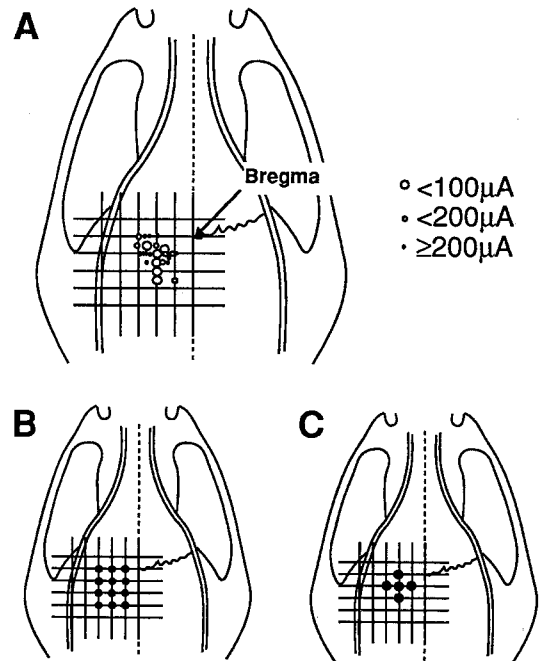
#### 2・3・1 大脳皮質刺激による皮質脊髄路の評価

微小電気刺激<sup>17)</sup>によって大脳皮質運動野後肢領域<sup>18,19)</sup>を同定するためNラット7匹を用いた。両側性EMGの記録にはNラット5匹と生存期間1か月以上のHSラット5匹を用いた。

ラットをNembutal (60-80 mg/kg, ip)により麻酔し、大腿静脈にカテーテルを挿入した。実験中の麻酔深度を維持するため、生理食塩水で2倍に希釈したNembutalを8-10 mg/kg/時で経静脈投与した。上顎固定装置<sup>16)</sup>でラット頭部を固定後、左頭頂部の頭蓋骨を取り除いて運動野を露出し、硬膜を切開反転した。露

出された運動野は35-38℃に温めた流動パラフィンで覆った。刺激電極には、タングステン線(直径125 μm, 長さ40-50 mm)の先端を電解研磨し、先端以外を絶縁塗料(ISONEL-31, 日触スケネクタデイ)で被覆したもの(電極インピーダンス2.0-5.0 MΩ)を用いた。記録電極には、双極ワイヤーフック電極(直径50 μm, 電極間距離10 mm)を用い、両後肢の大腿四頭筋と大腿二頭筋に埋め込んだ。

電気刺激には、トレインパルス刺激(パルス幅0.3 msec, 2 msec間隔の矩形波, 5発)を用い、初めに、刺激部位および刺激強度を変えながら、対側後肢からEMGが記録できる最小閾値を調べた(Fig. 2A)。いずれの部位でも最小閾値を示す深さは皮質表面から1.5-2.0 mmの灰白質内であった。次に、最小閾値を示す刺激部位で刺激電極を固定し、刺激強度を徐々に上げて同側性EMGの導出を試みた。EMGはオシロスコープ(日本光電, VC10)で観察すると同時にデータレコーダーに保存し、後に必要に応じて再生して、記録波形をオシロスコープから直接写真撮影するか、シグナルプロセッサ(日本電気三栄, 7 T 07 A)を用い



**Fig. 2** The hindlimb motor cortex and injection sites of neuronal tracers. Origin of grid is bregma; units are mm. A: the motor cortical thresholds for eliciting EMG responses of the contralateral hindlimb in 7 normal rats. B: twelve injection sites of WGA-HRP. C: five injection sites of biocytin.

て解析し、XYレコーダーで描記した。

EMGの解析は5つの異なった強度(50, 100, 500, 800, 1000  $\mu\text{A}$ )で得られた波形について行った。各強度で連続5波形をXYレコーダーで描記し、それらの面積をプランメータで算出した後、5波形の面積の平均値をその強度でのEMG値として代表させた。

大腿四頭筋の両側性EMGについては、1000  $\mu\text{A}$ での対側(右)大腿四頭筋のEMG値を100%とし、刺激強度の上昇によって両側大腿四頭筋および対側(右)前肢二頭筋(ヒトの上腕二頭筋に対応)のEMG値がそれぞれどのように変化するかを調べた。同様に、大腿二頭筋の両側性EMGについては、1000  $\mu\text{A}$ での対側(右)大腿二頭筋のEMG値を100%として、両側大腿二頭筋および対側(右)前肢二頭筋のEMG値の変化を調べた。

### 2.3.2 四肢間反射電位の記録

本実験には、Nラット5匹、VQラット23匹、DQラット5匹を用いた。2.3.1と同様にNembutalで麻酔を導入維持し、ラットを仰向けにして固定台に頸、四肢を固定した。刺激部位として右前肢神経叢(C6-T1, ヒトの腕神経叢に対応)を剖出した。C6-T1由来の神経を束ねて切断し、陰極が近位となるように電極間距離2mmの銀線双極電極をかけ、ポリエチレンチューブで包んで周りの組織と絶縁した。刺激電極装着後、神経叢を35-38°Cに温めた流動パラフィンで覆った。記録電極には、双極ワイヤーフック電極(直径50  $\mu\text{m}$ , 電極間距離10mm)を用い、両後肢の大腿四頭筋と大腿二頭筋に埋め込んだ。電気刺激には、トレインパルス刺激(パルス幅0.3 msec, 2 msec 間隔の矩形波, 5発)を用い、EMGとして四肢間反射電位が記録できる最小閾値を調べた。

### 2.3.3 SBS反射電位の記録

本実験には、Nラット5匹、VQラット6匹、DQラット4匹を用いた。初期量として uretane 500 mg/kg,  $\alpha$ -D-chloralose 50 mg/kg を腹腔内投与し、維持量として2-3時間後に初期量の1/10を腹腔内投与した。

Nラットでは、刺激部位として右前肢神経叢(C6-T1)と右大腿神経を剖出し、四肢間反射記録時と同様の方法で銀線双極電極の装着、流動パラフィンによる被覆を行って周囲の組織と絶縁した。記録電極には四肢間反射記録と同じ双極フック電極を用い、左前肢二頭筋と左大腿四頭筋に埋め込んだ。電気刺激には、トレインパルス刺激(パルス幅0.3 msec, 2 msec 間隔の矩形波, 5発)を用いた。はじめにSBS反射の

基本的特性<sup>13)</sup>を確かめるため、1) 刺激強度によるEMGの変化、2) 刺激部位によるEMGの変化、3) Nembutalの経静脈投与(5 mg/kg)によるEMGの変化、4) 人工呼吸下で脊髄C1-2レベルを離断した脊髄ラットにおけるEMGの変化を調べた。4)の実験は、脊髄の興奮性を高め、反射を誘発しやすくするために、痙攣を起こさない程度のstrychnine(0.2 mg/kg)を経静脈的に投与して行なった。

VQ, DQラットはそれぞれ半数ずつ回復前後2群に分け、右前肢神経叢に刺激電極を、左前肢二頭筋と両側大腿四頭筋に記録電極を装着し、Nラットと同様の方法でSBS反射電位の導出を試みた。記録波形はデータレコーダーに保存し、2.3.1と同様の手順で描記した。

## 2.4 皮質脊髄路の組織学的同定

WGA-HRP注入には、Nラット(n=5)、HSラット(6)、VQラット(5)を、biocytin注入にはNラット(5)、HSラット(5)、VQラット(3)を用いた。HS, VQラットは術後1か月以上経過した回復期のものを用いた。

### 2.4.1 注入法

#### 2.4.1.1 WGA-HRPの注入

Nembutalを用いて2.3.1と同様の方法で麻酔を導入維持し、上顎固定装置で頭部を固定後、左頭頂部の運動野を露出した。WGA-HRP(東洋紡)は0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.4)で2.5%に調整した。注入は12か所(Fig. 2B)で行った。各部位で、先端を鋭利に研磨したステンレス管(外径0.3 mm, 内径0.1 mm)を硬膜上から刺入し、脳表面から約1mmの深さで固定した。ナノリッターポンプ(WPI, model A1400)を用い、1か所に100 nl/分で100 nl注入し、注入後1分間ステンレス管をその場に留置した<sup>12)</sup>。

#### 2.4.1.2 Biocytinの注入

WGA-HRPの注入と同様の方法で左大脳皮質運動野を露出した。注入部位5か所(Fig. 2C)の硬膜に注入用ガラスピペット(先端径80-100  $\mu\text{m}$ )を通すための小切開を加えた。Biocytin(Sigma)は0.05 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.6)で5%に調整した。ピペット先端を脳表面から1mm刺入した後、0.5 mm戻して固定し、ナノリッターポンプを用いて300 nlを25 nl/分で圧注入した。注入後10分間ピペットをその場に留置した<sup>12)</sup>。

### 2.4.2 灌流固定および凍結切片の作製

注入3日後に深麻酔下で経心臓的に0.9%NaCl 加磷酸緩衝液(pH 7.4, 33-37°C) 50-100 ml および冷却

固定液 500 ml で灌流固定した。固定液には 1% paraformaldehyde, 1.25% glutaraldehyde, 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) の混合液を用いた。灌流固定終了後、直ちに脳脊髄を取り出し、10% 蔗糖加磷酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) に保存した。1-2 日後、マイクロトームで、大脳皮質(注入部位)および脊髄から厚さ 40  $\mu$ m の凍結連続切片を作製し、0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) に保存した。

#### 2.4.3 組織化学反応

WGA-HRP の反応は Gibson *et al*<sup>20)</sup> の TMB 変法<sup>12)</sup> で、biocytin の反応は avidin D-HRP を用いた DAB (diaminobenzidine) 法<sup>12,21)</sup> で行なった。反応切片はゼラチン被覆を施したスライドガラスに貼布し、後染色は、1% neutral red で行い、切片標本を作製した。

#### 2.4.4 標識細胞及び標識線維の観察

WGA-HRP および biocytin 標識の切片標本を明視野顕微鏡下に、40-400 倍で観察し、必要に応じて、写真撮影および camera lucida によるトレースを行った。WGA-HRP 標識では、HS ラットで各髄節毎に再交叉線維数を求め、VQ ラットで傷害部位の再生線維を観察した。Biocytin 標識では、HS ラットで腰髄レベルの側芽発生の有無を観察し、VQ ラットで傷害部位の再生線維を観察した。

#### 2.5 統計処理

2.3.1 の大脳皮質運動野刺激による EMG 値は平均値  $\pm$  標準誤差 (SE) で表示し、2.4 の WGA-HRP 標識による再交叉線維数の測定値は平均値  $\pm$  標準偏差

(SD) で表示した。平均値の有意差検定は Student の t-検定 (unpaired) によって行い、危険率  $p < 0.05$  の場合を有意差ありとした。

### 3 成績

#### 3.1 慢性手術後の後肢運動機能回復

HS ラットの場合、半切側左後肢の運動機能異常はハシゴ登りの拙劣さを除いて手術後 1-2 週以内に回復した (Fig. 3)。右後肢にも自発運動の低下などが手術後一過性に観察されたが、数日以内にすべての項目において正常に復した。VQ ラットの場合、2-3 週以内に運動麻痺が回復し、四肢協調運動が観察されるようになった。

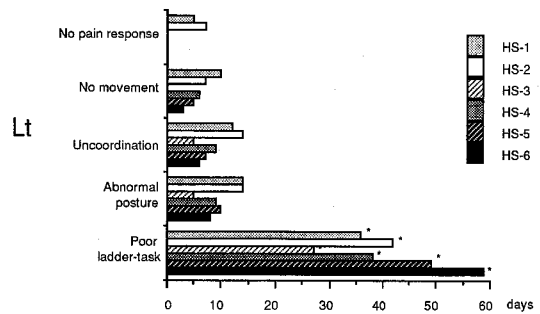


Fig. 3 Abnormal behavior of left hindlimb in HS rats. Asterisks (\*) show the day of sacrifice. Coordinated four-legged locomotion reappeared within 2 weeks after the initial operation. However, poor ladder-task was observed until sacrificed. Functional recovery of the right hindlimb movement was accomplished within a week. No poor-ladder task was observed at the right hindlimb after recovery.

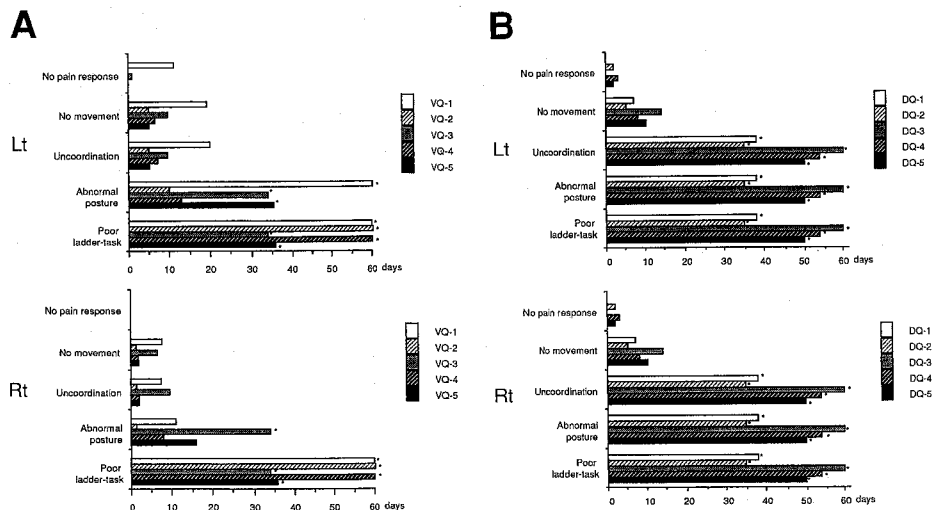


Fig. 4 Abnormal behavior of VQ and DQ rats. A: coordinated four-legged locomotion in VQ rats reappeared within 2-3 weeks after the initial operation. B: no recovery of the coordinated four-legged locomotion was observed in DQ rats. Asterisks (\*) show the day of sacrifice.

た。しかし、ハシゴ登りの拙劣さは全例の両後肢に残存した。3/5例の左後肢と1/5例の右後肢の肢位が完全に回復せず、足底を尾側に向けたままとなった (Fig. 4A)。DQラットの場合、1-2週以内に痛み刺激に対する反応やずり這いの際の自発的な後肢の動きが見られるようになったが、両後肢とも伏臥位で足底を上に向けた伸展位から回復せず、前後肢の協調性もみられなかった (Fig. 4B)。

### 3.2 神経生理学的実験

#### 3.2.1 大脳皮質運動野刺激による後肢 EMG の変化

Nラットでは、潜時 10-15 ms で前肢二頭筋から、潜時 20-25 ms で大腿四頭筋および二頭筋から EMG が導出記録された。1000  $\mu\text{A}$  まで刺激強度を上げることによって、振幅は 120  $\mu\text{V}$  まで、持続時間は 25 ms まで増大した。100  $\mu\text{A}$  以下の最小閾値 (Fig. 2A) を持つ対側大腿四頭筋の EMG 値は刺激強度 50/100/500/800/1000  $\mu\text{A}$  に対して、それぞれ 17.7 $\pm$ 11.1/35.5 $\pm$ 12.2/64.4 $\pm$ 11.0/91.8 $\pm$ 11.5/100.0 $\pm$ 0.0 (mean $\pm$ SE)% とほぼ直線的に上昇した。同側大腿四頭筋あるいは対側前肢二頭筋から EMG が導出される閾値は約 500  $\mu\text{A}$  に上昇し、その EMG 値はそれぞれ 0.0 $\pm$ 0.0/0.0 $\pm$ 0.0/

0.5 $\pm$ 0.6/32.1 $\pm$ 26.5/92.0 $\pm$ 79.0%, 0.0 $\pm$ 0.0/0.0 $\pm$ 0.0/2.0 $\pm$ 2.3/18.4 $\pm$ 17.2/70.2 $\pm$ 42.5% と同じく直線的に上昇した。同様に、100  $\mu\text{A}$  以下の対側大腿二頭筋の EMG 閾値に対して、同側大腿二頭筋と対側前肢二頭筋の閾値は約 500  $\mu\text{A}$  に上昇し、その EMG 値は対側大腿二頭筋で 12.7 $\pm$ 7.2/41.5 $\pm$ 15.2/68.7 $\pm$ 11.5/90.0 $\pm$ 8.5/100.0 $\pm$ 0.0% と、同側大腿二頭筋で 0.0 $\pm$ 0.0/0.0 $\pm$ 0.0/6.7 $\pm$ 7.5/49.7 $\pm$ 31.1/96.8 $\pm$ 65.0% と、対側前肢二頭筋で 0.0 $\pm$ 0.0/0.0 $\pm$ 0.0/3.0 $\pm$ 3.4/51.7 $\pm$ 55.5/106.1 $\pm$ 88.5% とほぼ直線的に上昇した (Fig. 5A)。

HSラットでも、対側大腿四頭筋および二頭筋の EMG 閾値は 100  $\mu\text{A}$  以下であるのに対して、同名筋の同側性 EMG や前肢二頭筋の EMG 閾値は約 500  $\mu\text{A}$  に上昇していた。刺激強度 50/100/500/800/1000  $\mu\text{A}$  に対して、EMG 値は対側大腿四頭筋でそれぞれ 16.2 $\pm$ 7.0/33.6 $\pm$ 8.3/64.8 $\pm$ 6.9/92.7 $\pm$ 4.1/100.0 $\pm$ 0.0% と、同側大腿四頭筋で 0.0 $\pm$ 0.0/0.0 $\pm$ 0.0/3.1 $\pm$ 2.2/54.4 $\pm$ 50.2/64.1 $\pm$ 56.7% と、対側前肢二頭筋で 0.0 $\pm$ 0.0/0.0 $\pm$ 0.0/3.2 $\pm$ 3.1/47.6 $\pm$ 43.0/70.3 $\pm$ 41.8 と上昇した。同様に、対側大腿二頭筋で 15.4 $\pm$ 4.3/34.9 $\pm$

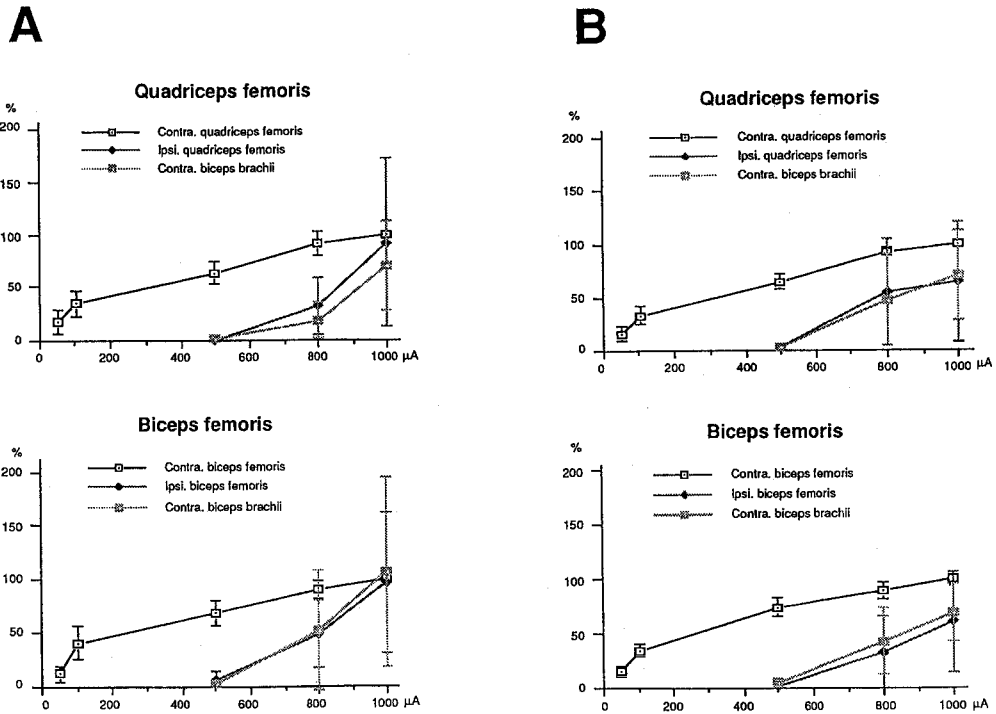


Fig. 5 EMG responses by stimulation of left hindlimb motor cortex. Each point with a vertical bar shows mean $\pm$ SE. The vertical axis represents the contralateral hindlimb EMG response at 1000  $\mu\text{A}$  as 100%. A: 5 N rats. B: 5 HS rats (survival time of 33-60 days).

5.9/74.1±8.5/89.5±7.9/100.0±0.0%と、同側大腿二頭筋で0.0±0.0/0.0±0.0/1.7±1.9/33.3±32.8/60.8±46.1%と、対側前肢二頭筋で0.0±0.0/0.0±0.0/5.0±3.7/42.7±30.6/69.4±26.3%と、EMG値はほぼ直線的に上昇した(Fig. 5B)。いずれの刺激強度でも、NラットとHSラットの対応するEMGの潜時、波形およびEMG値に有意な差は認められなかった。

### 3・2・2 四肢間反射の変化

#### 3・2・2・1 Nラットの四肢間反射

大腿四頭筋および大腿二頭筋からの四肢間反射の現われ方には若干の個体差が見られ、潜時は20-25 ms、持続時間10-20 ms、最大振幅は20-30  $\mu$ Vであった。四肢間反射は常に両側性に見られ、その閾値は20±11.7(mean±SD; n=5) $\mu$ Aであった。

#### 3・2・2・2 VQおよびDQラットにおける四肢間反射の変化

VQラットでは、手術直後から閾値が上昇し、四肢間反射の導出記録が困難となった。しかし、その後、閾値は徐々に低下し、術後2週間を経過したVQラットでは全例正常範囲(Nラットのmean+3SD)内に戻った(Fig. 6A)。これに対して、DQラットでは、術後30日を経過したラットでも閾値の低下は見られず、四肢間反射の導出記録は困難であった(Fig. 6B)。

### 3・2・3 SBS反射の変化

#### 3・2・3・1 NラットのSBS反射

SBS反射の閾値は四肢間反射のそれよりも低く<sup>22)</sup>、20  $\mu$ A以下であった。潜時は右前肢神経叢刺激の場合は、左前肢二頭筋で約15 ms、左大腿四頭筋で約20 msであり(Fig. 7B)、刺激強度を上げるとSBS反射よ

りも短い潜時の四肢間反射が同時に導出された(Fig. 7C)。右大腿神経刺激の場合は、右前肢神経叢刺激の場合(Fig. 7B)よりも潜時が延長し、左前肢二頭筋で約30 ms、左大腿四頭筋で約35 msであった(Fig. 7D)。いずれの場合もSBS反射の持続時間は20-30 ms、最大振幅は100-200  $\mu$ Vであった。Nembutal麻酔に切り替えると、EMGの振幅は減少、持続時間が短縮した(Fig. 7E)。このEMGの潜時は20-25 ms、持続時間10-20 ms、最大振幅は20-30  $\mu$ Vであり、3・2・2・1で示した四肢間反射の特性と一致した。人工呼吸下にC1-2レベルで脊髄を全横断(transection)すると、SBS反射は消失し、strychnine投与によって刺激強度100  $\mu$ A以上で四肢間反射が導出された(Fig. 7F)。

#### 3・2・3・2 VQおよびDQラットにおけるSBS反射の変化

回復前のVQラット(n=3)では、100  $\mu$ A以上に刺激強度を上げて後肢からSBS反射は導出されなかった。術後2週間以上経過した回復期のVQラット(n=3)では、再び20  $\mu$ A以下の刺激強度で両側後肢からSBS反射が導出された。右前肢神経叢刺激の場合、その潜時は左前肢二頭筋で約15 ms、両側大腿四頭筋で約20 msであり、持続時間は20-30 ms、最大振幅は100-200  $\mu$ Vであった(Fig. 8A)。このように、回復したVQラットのSBS反射の特性と3・2・3・1に示したNラットのSBS反射の特性に有意な差は認められなかった。DQラットでは、術後1か月経過しても後肢からSBS反射の導出はできなかった(Fig. 8B)。

### 3・3 皮質脊髄路の組織学的同定

#### 3・3・1 HSラットにおける皮質脊髄路の再交叉線維

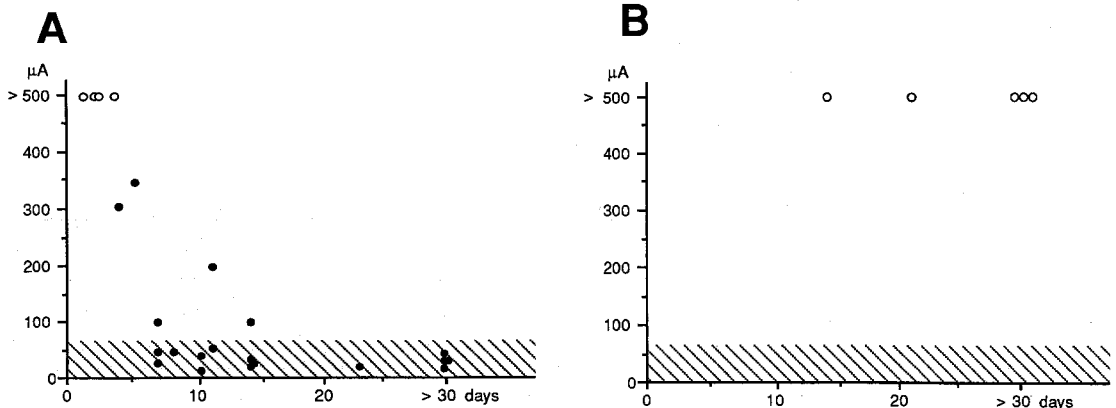
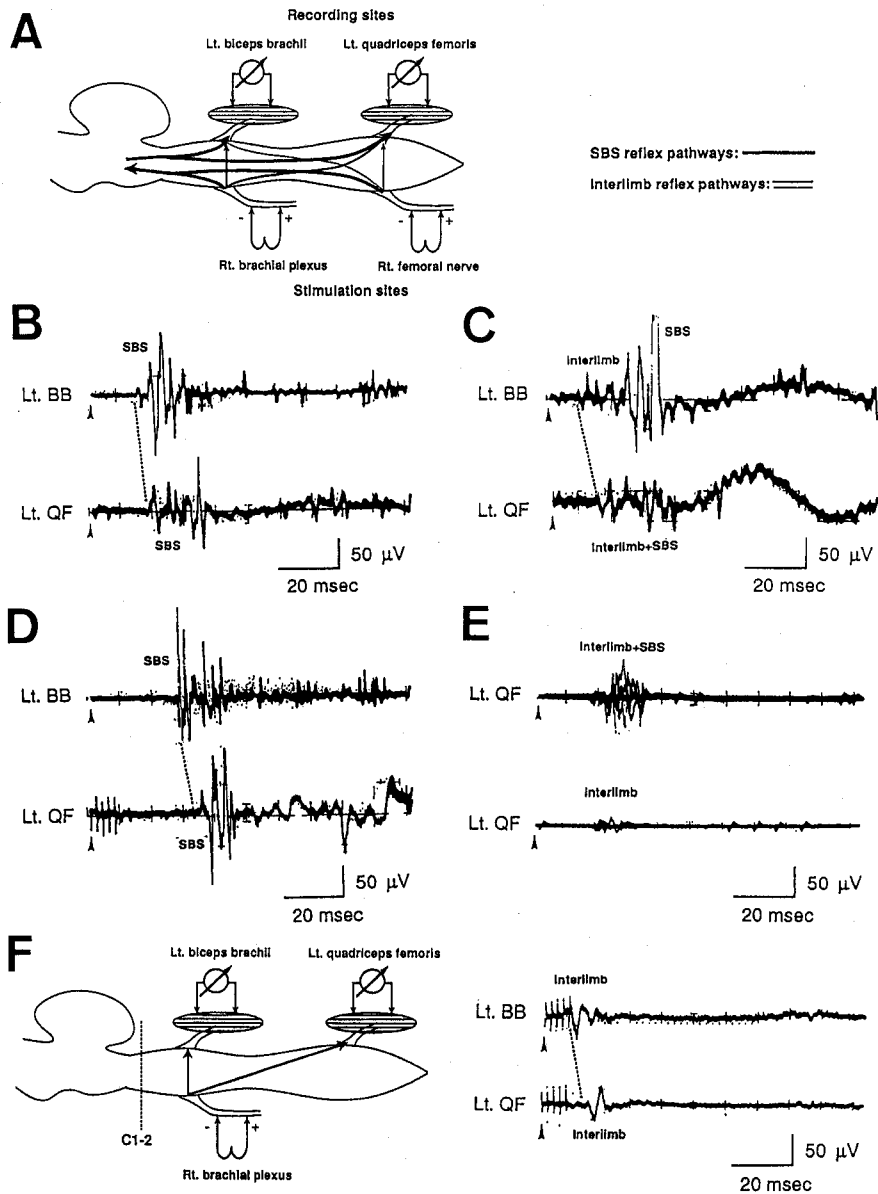
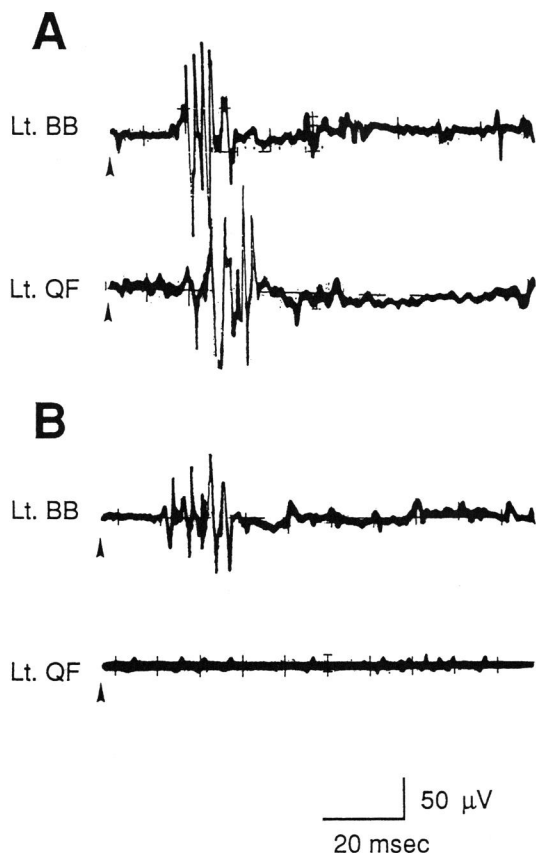


Fig. 6 Threshold of interlimb reflex in VQ and DQ rats. A: thresholds for evoking interlimb reflexes were elevated for a week after the initial operation and returned to the normal range (the hatched area) within 2-3 weeks in VQ rats (n=23). B: the early threshold elevation persisted over the one month observation period in DQ rats (n=5). Open circle means unidentified EMG responses.



**Fig. 7** Characteristics of SBS reflex in N rats. A: SBS and interlimb reflex pathways. EMG responses were obtained from the left biceps brachii (lt. BB) and quadriceps femoris (lt. QF) by the right brachial plexus (rt. BP) or femoral nerve (rt. FN) stimulation under urethane and chloralose anesthesia. B: SBS reflexes obtained from lt. BB and lt. QF by rt. BP stimulation at  $10 \mu$ A. C: interlimb and SBS reflexes obtained from lt. BB and lt. QF by rt. BP stimulation at  $100 \mu$ A. D: SBS reflexes obtained from lt. BB and lt. QF by rt. FN stimulation at  $10 \mu$ A. The onset latency of SBS reflexes evoked by rt. BP stimulation (B) is shorter than that evoked by rt. FN stimulation (D). E: EMG changes by intravenous Nembutal injection ( $5 \text{ mg/kg}$ ). Each trace consists of 3 superimposed sweeps. The upper trace shows interlimb and SBS reflexes by rt. BP stimulation at  $50 \mu$ A before Nembutal injection. SBS reflexes disappeared and interlimb reflexes remain to be recorded after Nembutal injection (lower trace). F: spinal cord preparation under artificial ventilation. The schema shows a transection level (C1-2), stimulation and recording sites. SBS reflexes disappeared and interlimb reflexes remain to be recorded in the spinal cord preparation. The responses are enhanced by a subtetanic dose of strychnine ( $0.2 \text{ mg/kg}$ ) at  $100 \mu$ A.

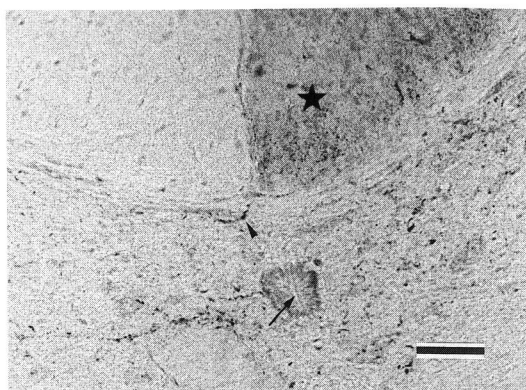




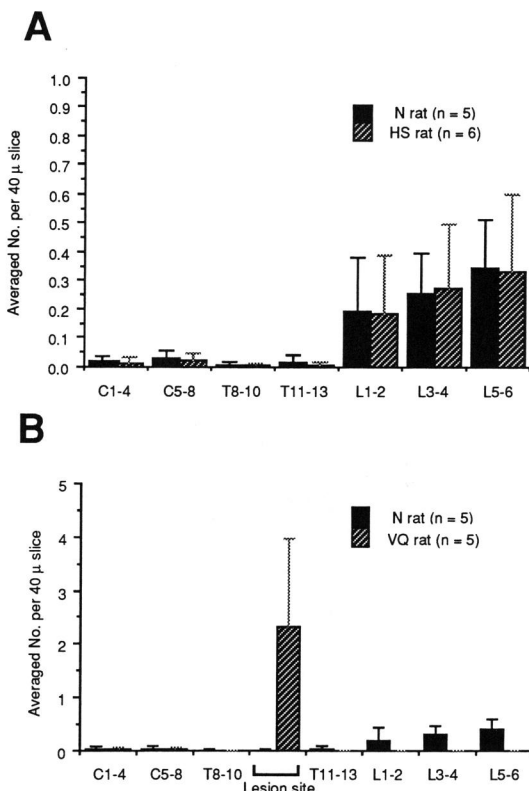
**Fig. 8** SBS reflex in VQ and DQ rats. A: SBS reflexes by rt. BP stimulation obtained from a recovered VQ rat with the coordinated locomotion (one month after the initial operation). There is no significant change in onset latency, amplitude and duration of response compared with those from N rats. B: no response is obtained from Lt. QF in DQ rats with longer survival time (>30 days).

N ラット, HS ラットとも WGA-HRP 標識によって右後索最内側に位置する交叉性の皮質脊髄路が脊髄全長にわたって明瞭に描出され, そこから伸びる再交叉線維が容易に追跡された (Fig. 9). 前索の同側性, 非交叉性の皮質脊髄路は上部胸髄より吻側でのみ描出された。したがって, それ以下のレベルには皮質脊髄路の同側性投射は存在しないと考えられた<sup>23)</sup>。

WGA-HRP 標識の場合, 後索からの再交叉線維数は, N ラット, HS ラットとも胸髄レベルまでは1スライス(40 μm)あたり0.1以下であった。腰髄レベルでは, N ラットの場合, L1-2で0.19±0.19(mean±SD, 以下同様), L3-4で0.26±0.14, L5-6で0.34±0.1であり, HS ラットの場合, L1-2で0.19±0.20, L3-4で0.27±0.22, L5-6で0.33±0.27であった。各レベ



**Fig. 9** An recrossing fiber at C5 level. Corticospinal tract (★) is easily identified in a ventromedial area within the right dorsal funiculus. An arrowhead indicates a recrossing fiber from the right corticospinal tract to the left side. An arrow shows the central canal. Scale bar=50 μm.



**Fig. 10** The number of HRP-labeled recrossing fibers at each level. Columns and bars indicate mean and SD, respectively. A: N rat vs HS rat. There is no significant difference in number between N rats and HS rats at any level. B: N rat vs VQ rat. There is a remarkable increase in labeled recrossing fibers at the lesion site in VQ rats.

ルでの再交叉線維数についてNラット, HSラット間で有意差は認められなかった (Fig. 10A).

Biocytin 標識では標識線維の絶対数が少なく<sup>12)</sup>, 再交叉線維の標識は困難であった. また, 健側皮質脊髓路線維は厚さ  $40\ \mu\text{m}$  の連続切片で連続的に追跡可能であったが, 腰髄レベルで側芽発生の像は観察されなかった.

### 3.3.2 VQラットにおける皮質脊髓路断端から再生線維

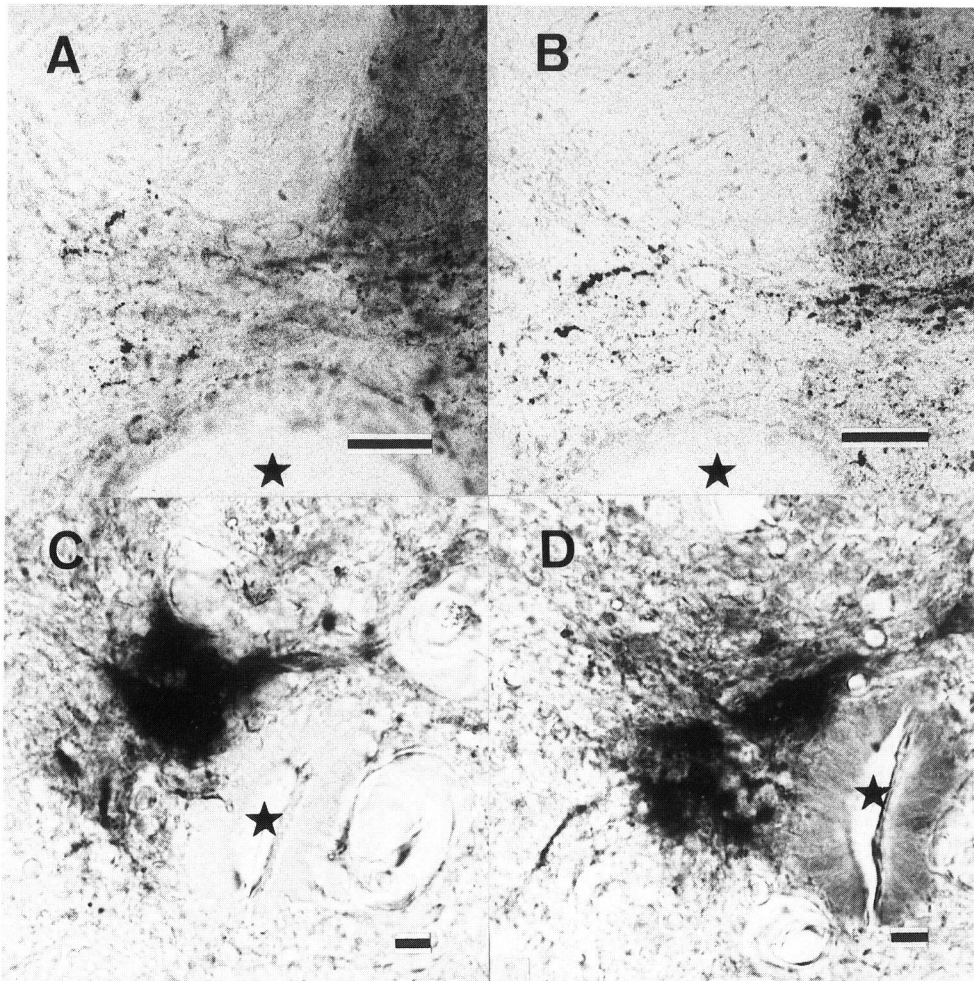
皮質脊髓路断端 (T 9-10) からの再生線維が WGA-HRP によって数珠状に, biocytin によって線状に標識された (Fig. 11). Biocytin の場合は細胞外に放出され

たと異なる biocytin が再生線維の周囲に雲状に標識されていた (Fig. 11C, D)<sup>12)</sup>. 種々の方向に伸びている再生線維のうち中心灰白質を横切る線維に着目してその数を再交叉線維数として表示すると, WGA-HRP 標識で1スライスあたり  $2.34 \pm 1.61$  と著明に増加していた (Fig. 10B). WGA-HRP, biocytin いずれの標識法でも皮質脊髓路から 1-2 mm 以内で再生は止っていた.

## 4 考 察

### 4.1 皮質脊髓路の可塑的变化

Bernstein and Stelzner (1983)<sup>9)</sup> は皮質脊髓路を胸髄レベルで両側性に切断した慢性ラットにおいて放射



**Fig. 11** Regenerating terminals just rostral to the lesion (T9) in VQ rats. A, B: sprouting fibers from the corticospinal tract are labeled as dense granulate patches with WGA-HRP. C, D: sprouting fibers are labeled with biocytin in the cloudy background of the terminal fields (biocytin might have been expelled from the terminals into the extracellular space). Asterisks (★) show the central canals. Scale bars for A, B =  $50\ \mu\text{m}$ ; C, D =  $10\ \mu\text{m}$ .

性アミノ酸を皮質運動野に注入し、胸髄切断部での皮質脊髄路線維の再生の状態を調べた。この中で、標識された再生線維は切断レベルを乗り越えて尾側に伸びることはなく、切断部の髄節内に数 mm 以下の長さに留まっているのが観察されている。本研究と同じように WGA-HRP をトレーサーとして用いた Schnell and Schwab (1990)<sup>9)</sup> の研究でも成ラットの皮質脊髄路が切断された場合の再生は、ミエリン由来の神経成長抑制因子を抑える処置を施さなければ、やはり、数 mm 以内の伸長に留まることが報告されている。これらの再生線維に関する報告と本実験結果を合わせて考えると、皮質脊髄路切断端あるいは腰髄レベルの皮質脊髄路に大きな可塑的变化が生じているとは考えられない。

皮質脊髄路や赤核脊髄路を含む背側が切断された側の後肢運動機能異常はハシコ登りさせた場合にのみ検出された。この運動障害を説明するには下行性経路の切断ばかりでなく、背側を通る上行性経路が切断されていることも考慮しなければならない。つまり、傷害側後肢の感覚入力が大脳皮質感覚野に伝わらないため、位置感覚の異常により後肢(特に足指)の正確な placing (横木に踏み置くこと)ができないことも原因の一つと考えられる。いずれにしても、皮質脊髄路傷害に由来する機能異常は回復せず、逆に、皮質脊髄路だけが残存しても、腹側の経路も同時に残存しなければ皮質脊髄路機能は回復しないと思われる。

#### 4.2 平地四足歩行回復に重要な経路

除脳ネコの反射姿勢は四足歩行の原型とされ、この姿勢の発現には脊髄固有路を介する四肢間反射および網様体脊髄路を介する SBS 反射が重要であると考えられている<sup>24)</sup>。Stelzner and Cullen (1991)<sup>25)</sup> は新生ラットや離乳期のラットの中部胸髄を傷害し、後肢運動機能回復を観察した。その結果、本実験と同様に生後 4 週以降でも片側前角周辺の白質が残存していれば両後肢運動機能に著しい回復が認められることを報告した。また、回復したラットの腰髄に HRP などのトレーサーを注入すると脳幹網様体のニューロンが逆行性に標識されることから脊髄固有路ばかりでなく網様体脊髄路の重要性についても指摘している。

本実験で観察した SBS 反射は主に延髄網様体を反射中枢とする運動反射であり、ネコ、ラットなどの四足動物ばかりでなく、その反射電位はヒトでも導出記録可能である<sup>13)</sup>。本実験で用いた導出記録法のように反射求心路が傷害されていない場合、SBS 反射の回復はその遠心路である網様体脊髄路の機能回復を反映していると考えられる。VQ ラットの網様体脊髄路の機能回復

を評価する目的で、延髄網様体を直接電気刺激する方法も試みられている<sup>26)</sup>。しかし、この場合、網様体脊髄路が機能的にまだ不完全な回復状態でも強い興奮性出力が得られるため、行動観察上の機能回復との対応を論じるのは難しい。本実験のように末梢神経刺激によって SBS 反射電位を導出記録する方がより生理的に近い状態で網様体脊髄路の機能回復を表現していると考えられる。

#### 4.3 腰髄内神経回路の可塑的变化

HS ラットで皮質脊髄路に側芽発生が観察されなかったように、VQ ラットの回復期間を考慮すると、残存する腹側四半分を下行した脊髄固有路や網様体脊髄路から腰髄レベルで反対側への新しい投射が発生するというような大きな可塑的变化が起こっているとは考えにくい。それならば、なぜ、VQ ラットで、2-3 週間の回復期間が必要なのであろうか？

可能性として、次の二つが挙げられる。一つは、傷害部位での病理学的な変化を反映している可能性である。哺乳類の脊髄が外傷を受け、脊髄が部分的に横断された場合、一過性にその髄節レベル全体に浮腫などの病理学的な変化が生じる<sup>27)</sup>。つまり、本実験でも切断された脊髄伝導路の機能の欠落ばかりでなく、急性期には残された伝導路の機能異常が表出してくる可能性がある。しかも、この急性期の病理学的変化は傷害後 2-3 週間以内に消退すると考えられており<sup>27)</sup>、HS あるいは VQ ラットの回復期間とよく一致する。

もう一つの可能性として、腰髄レベルでの局所的な可塑的变化が挙げられる。VQ ラットには左側の網様体脊髄路しか残存していないにもかかわらず、回復期に記録した SBS 反射の EMG には有意な左右差が認められなかった。VQ ラットの場合、両側性 EMG が誘発されるためには腰髄レベルでの交叉性接続が重要であると考えられるが、一般に SBS 反射経路の各髄節レベルでの交叉性接続は弱いと考えられている<sup>13)</sup>。したがって、交叉性線維末端からの終末側枝 (terminal sprouting) や新たなシナプス形成のような局所の可塑的变化によって傷害後に腰髄レベルで交叉性の機能的接続が強まった可能性がある。

最近では、神経線維の再生や成長が起こる際にその神経線維に発現する物質の研究が進んでいる<sup>28)</sup>。中でも、成長関連蛋白質 GAP-43<sup>29)</sup> はその抗体を使って免疫組織染色をすることによって、着目する神経組織の再生成長能力の判定に用いられている。Stelzner and Strauss (1991)<sup>31)</sup> は生後の発達過程でラットの脊髄に発現する GAP-43 を免疫組織学的な手法を用いて半定

量的に調べた。それによると、GAP-43の染色性は生後18-24日で非常に低下し、48-90日の間にほとんど染色されなくなると報告されている。つまり、本研究で用いたような7週齢を越えたラットでは、無傷の場合、脊髄内の神経成長能力は非常に低いと推定される。今後、脊髄傷害後の腰髄内神経回路の可塑的变化について解析する目的で、GAP-43のような成長関連蛋白質が脊髄傷害後に新たに発現してくるかどうかを調べる事が重要になるであろう。

### 要 約

ラット胸髄傷害後の後肢運動機能回復の神経機序を明らかにするため、胸髄下部を部分的に切断し、HS、VQ、DQラットを作製した。各ラットの後肢運動機能回復過程を比較するとともに、HSラットで大脳皮質刺激による後肢EMGの変化を、VQ、DQラットで四肢間反射およびSBS反射の変化を調べた。また、HS、VQラットの皮質脊髄路線維をWGA-HRPおよびbiocytinを用いて標識した。これらの実験から以下の成績を得た。

1) HS、VQラットにおいて、脊髄背側が切断された側の後肢に巧緻動作の異常が残存したが、四足歩行に関してはHSラットで術後2週間以内に、VQラットで2-3週間以内に回復した。DQラットにはそのような回復が認められなかった。

2) HSラットにおいて、腰髄レベルで健側皮質脊髄路からの再交叉線維数の増加や側芽発生は認められず、大脳皮質刺激による同側性EMGの閾値にも有意な変化はなかった。

3) VQラットの皮質脊髄路切断端からの再生線維の長さは1-2mm以内に留まっていた。

4) VQラットでは術後2-3週間で四肢間反射、SBS反射が回復したが、DQラットにそのような回復は認められなかった。

以上のようにラットの皮質脊髄路に大きな可塑的变化は起こらず、その傷害に起因する運動機能異常は回復しなかった。一側の脊髄固有路や網様体脊髄路が残存していれば四足歩行は回復したが、時間的経過から考えて、これらの経路にも新たに神経線維が発生している可能性は低く、主に既存の神経回路の代償機序により回復していると考えられた。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った本学生理学第2講座、青木藩教授に深謝致します。

### 文 献

1. 青木 藩. 脊髄反射. 入来正躬, 外山敬介編. 生理学 1. 東京, 文光社, 1986, 482-506.
2. Aoki M, Fujito Y, Satomi H, Kurosawa Y, Kasaba T. The possible role of collateral sprouting in the functional restitution of corticospinal connections after spinal hemisection. *Neurosci Res* 1986, 3: 617-627.
3. Aoki M, Fujito Y, Kosaka I, Satomi H. Does collateral sprouting from corticospinal fibers participate in motor recovery after spinal hemisection in monkeys? In: Flohr H, editor. *Post-lesion neural plasticity*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 1988, 223-231.
4. Kucera P, Wiesendanger M. Do ipsilateral corticospinal fibers participate in the functional recovery following unilateral pyramidal lesions in monkeys? *Brain Res* 1985, 348: 297-303.
5. Bernstein DR, Stelzner DJ. Plasticity of the corticospinal tract following midthoracic spinal injury in the postnatal rat. *J Comp Neurol* 1983, 221: 382-400.
6. Schnell L, Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 1990, 343: 269-272.
7. Schrimsher GW, Reier PJ. Forelimb motor performance following cervical spinal cord contusion injury, dorsal column lesion, or dorsolateral funiculus lesion in the rat. *Soc Neurosci Abstracts* 1991, 17: 1025.
8. Grillner S. Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction. *Physiol Rev* 1975, 55: 247-304.
9. Claude Ghez. Introduction to the motor systems. In: Kandel ER, Schwartz JH, editors. *Principles of neural science*. 2nd ed. New York, Amsterdam, Oxford, Elsevier, 1985, 429-442.
10. Tracey DJ. Ascending and descending pathways in the spinal cord. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. Vol. 2. Hindbrain and spinal cord. Sydney, Academic press, 1985, 311-324.
11. Weber ED, Stelzner DJ. Behavioral effects of spinal cord transection in the developing rat. *Brain Res* 1977, 125: 241-255.
12. 今井富裕. Biocytinによるラット皮質脊髄路の順行性標識法—WGA-HRP法との比較—. *札幌医誌* 1992, 61: 257-266.
13. Shimamura M, Tanaka I, Livingston RB. Longitudinal conduction systems serving spinal and

- brainstem coordination (spino-bulbo-spinal reflex). In: Shimamura M, Grillner S, Edgerton VR, editors. Neurobiological basis of human locomotion. Tokyo, Japan scientific societies press, 1991, 241-255.
14. Imai T, Aoki M. Functional recovery of hindlimb movement and a role of the corticospinal tract in chronically spinal-hemisected rats (abstract). *Jpn J Physiol* 1992, 42 (suppl): S229.
  15. Imai T, Aoki M. Functional recovery of coordinated hindlimb movement and interlimb reflex in chronically spinal-lesioned rats. *Neurosci Res* 1992, 17 (Suppl): S222.
  16. Erickson RP. Nontraumatic headholders for mammals. *Physiol Behav* 1966, 1: 97-98.
  17. Asanuma H, Sakata H. Functional organization of a cortical efferent system examined with focal depth stimulation in cats. *J Neurophysiol* 1967, 30: 35-54.
  18. Hall RD, Lindholm EP. Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. *Brain Res* 1974, 66: 23-38.
  19. Donoghue JP, Wise SP. The motor cortex of the rat: cytoarchitecture and microstimulation mapping. *J Comp Neurol* 1982, 212: 76-88.
  20. Gibson AR, Hansma DI, Houk JC, Robinson FR. A sensitive low artifact TMB procedure for the demonstration of WGA-HRP in the CNS. *Brain Res* 1984, 298: 235-241.
  21. King MA, Louis MR, Hunter BE, Walker DW. Biocytin: a versatile anterograde neuroanatomical tract-tracing alternative. *Brain Res* 1989, 497: 361-367.
  22. Shimamura M, Mori S, Matsushima S, Fujimori B. On the spino-bulbo-spinal reflex in dogs, monkeys and man. *Jap J Physiol* 1964, 14: 411-421.
  23. Vahlsing HL, Feringa ER. A ventral uncrossed corticospinal tract in the rat. *Exp Neurol* 1980, 70: 282-287.
  24. 田中勲作, 森 茂美, 吉田 薫. 運動の制御. 入来正躬, 外山敬介編. 生理学1. 東京, 文光社, 1986, 507-563.
  25. Stelzner DJ, Cullen JM. Do propriospinal projections contribute to hindlimb recovery when all long tracts are cut in neonatal or weaning rats? *Exp Neurol* 1991, 114: 193-205.
  26. Lee WH, Park YG, Chen A, Kim JH. Effects of reticulospinal input on monosynaptic reflexes in partial spinal injury. *Soc Neurosci Abstracts* 1991, 17: 1062.
  27. Hughes JT. Disorders of the spine and spinal cord. In: Adams JH, Duchen LW, editors. *Greenfield's neuropathology* 5th ed. London, Edward Arnold, 1992, 1083-1115.
  28. Fawcett JW. Intrinsic neuronal determinants of regeneration. *Trends Neurosci* 1992, 15: 5-8.
  29. Gordon-Weeks PR. GAP-43-What does it do in the growth cone? *Trends Neurosci* 1989, 12: 363-365.
  30. Stelzner DJ, Strauss JA. The pattern of GAP-43 immunoreactivity in postnatal rat spinal cord. *Soc Neurosci Abstracts* 1991, 17: 1311.
- 
- 別刷請求先:  
 (〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目  
 札幌医科大学医学部生理学第2講座 今井富裕