

## 脊髄内ニューロンの変性に伴う 神経化学的変動の研究

藤田保健衛生大学

大学院医学研究科・整形外科専攻（指導教授：吉澤英造）

Ⅲ 井 正 子

### 第1章：筋萎縮性側索硬化症患者脊髄の生化学的分析

#### 序

孤発性筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis；ALS）は、中年以後に発症して、脊髄側索第1次運動ニューロン（上位運動ニューロン）および脊髄前角第2次運動ニューロン（下位運動ニューロン）の変性・脱落に由来して生ずる。症状としては錐体路徴候、筋力低下、筋萎縮、線維束性攣縮、延髄の運動核の変性による球麻痺（嚥下障害、舌の麻痺など）などを呈し、原因不明の進行性変性性神経疾患として古くからよく知られている。ALS患者では原則として他覚的感覚障害、眼球運動障害、膀胱直腸障害、小脳徴候、錐体外路徴候、痴呆などは認められないとされ、通常、発症から3～5年後に呼吸不全で死亡することが多い。この疾患の原因としては、ウイルス、中毒（鉛、アルミニウム、シアン）、内分泌異常、DNAおよびRNA異常、神経栄養因子の欠乏、外傷など種々の仮説が議論されているが、現在までに決定的なものはない。

一方、家族集積性を示す家族性筋萎縮性側索硬化症（familial amyotrophic lateral sclerosis；FALS）は、欧米ではALSの約5～10%を占めるとされ<sup>1</sup>、常染色体優性遺伝形式をとることが知られている。1993年、このFALS患者の一部の家系に、第21染色体長腕に位置するCu/Zn superoxide dismutase

（SOD）1遺伝子の変異が発見された（Rosenら、1993）<sup>2</sup>。このSODは、発生する細胞傷害性のsuperoxide（O<sub>2</sub><sup>-</sup>）イオンを消去し無毒化して、細胞機能を保護する重要な酵素である。Gurney<sup>3</sup>らは、ヒト変異SOD1遺伝子を組み込んだtransgenic mouseを作製し生育させたところ、G93A変異SODの過剰発現により、生後3～4か月から後肢の筋力低下が発症し、その後次第に神経変性が進行して5か月後に死亡することが認められた。これは、ALS患者と極めて類似した経過を示す病態像で、病理学的にも脊髄運動ニューロンの変性・脱落を示すことが報告されている。このような実験結果は、ALS発症の過程で脊髄組織内で発生する細胞傷害性のフリー・ラジカルを積極的に消去して、脊髄運動ニューロンを保護する作用を有するSOD酵素が有効に働かない結果、運動ニューロンの変性・脱落を来たしてALSに特徴的な運動麻痺症状が発生するという因果関係を示唆している。つまりこのSOD酵素がALS発症に重大な関連性のあることが、遺伝子レベルにおいて病因の解明の糸口として明らかにされたわけである。この実験結果は、ALSの原因のひとつとしてSODが密接に関連していることを示す極めて画期的な成果で、大きな注目を集めた。しかしながら、ALS患者の大部分（約80%）を占める散発性（sporadic）ALS患者（SALS）の脊髄組織内superoxide消去系について患者赤血球試料で調べた報告では、

ALS患者と非ALS患者との間に差異を認めるものはみられていない (Robberecht, W.ら, 1994)。

一方、電子伝達系酵素群の異常は、主として神経筋疾患患者の中樞神経組織中に発現することがよく知られている。とくに Parkinson 病や Alzheimer 病 (AD) 患者の脳組織中では第IV複合酵素 (cytochrome c oxidase; CO) 活性減少が報告されている。しかし、今まで ALS 患者脊髄で組織中の CO 活性値の変動を測定した報告は知られていない。

またトランスグルタミナーゼ (TG) は  $Ca^{2+}$  依存性に細胞内タンパクの架橋反応を促進して細胞死を引き起こすので、細胞変性の標識酵素の一つとして近年注目されている。Gilad<sup>5</sup>らは上頸部交感神経節後ニューロンの軸索を切断すると、逆行性に節後ニューロンの変性・脱落が生じて組織内 TG 活性の一過性の上昇が生じ、引き続いてニューロン変性に伴ってその活性が低下するのを示した。そこで第1章では、SALS患者と非ALS患者から死後摘出し凍結した脊髄組織標本について、SOD, CO, および TG 活性値をそれぞれ測定し、非ALS患者脊髄標本で得られた測定値と比較・検討した。そして脊髄内のこれらの諸酵素の活性値の変動がALS患者脊髄内ニューロンの形態的変動とどのように関連しているのかについて検討した。

## 実験材料と方法

### 1) 脊髄標本の摘出

ALS患者7例および非ALS対照患者9例について、家族の了解を得て死後2.5から19時間の間に、脊髄 (頸髄、胸髄及び腰髄) 組織を摘出した。非ALS対照患者脊髄では、形態学的に脊髄病変は見られなかった。摘出した脊髄標本は、生化学的分析を行うときまで冷凍庫内に  $-80^{\circ}C$  で凍結保存した (表1)。

### 2) 試料 (酵素標本) の調製

凍結脊髄組織をドライアイス平面上に置

表1 ALS患者と非ALS患者の年齢、性、罹病期間、病因、死亡から脊髄を摘出し凍結するまでの時間

患者	年齢	性	罹病期間	病因 (死因)	死亡から組織摘出・凍結までの時間
ALS患者					
USU	70	M	2年5か月	ALS 呼吸不全	2.5時間
KON	64	F	5年2か月	ALS 呼吸不全	8時間
MIU	64	M	2年	ALS 呼吸不全	6時間
MAK	56	M	4年	ALS 呼吸不全	7時間
YON	57	F	5年	ALS 衰弱	6時間
ENO	72	F	3年6か月	ALS 呼吸不全	4時間
END	59	M	1年6か月	ALS 呼吸不全	5時間
対照患者					
NOM	70	F		脊髄小脳変性症	7時間
MAT	70	M		口腔癌	7時間
MIZ	68	F		脊髄小脳変性症	19時間
OGI	68	F		悪性リンパ腫	4時間
NII	61	M		白血病	3.5時間
TAC	59	M		白血病	3時間
HOS	58	M		前立腺癌	8時間
OOI	44	M		悪性リンパ腫	15時間
EBI	74	F		白血病	3時間

き、融解直前の状態で3~5mmの厚さに脊髄を横断して組織切片を作り、さらにこの組織を前角 (前索を含む)、側索及び後角 (後索を含む) の3部位に細分割し、それぞれの組織小片を各酵素活性測定用の試料とした。

### 3) SOD 活性の測定

脊髄組織内のSOD (EC 1.15.1.1) 酵素の活性測定には、McCord and Fridovich<sup>6</sup>の原理に基づくSOD-525キット (SOD-525, Bioxytech, France) を用いた。すなわち、脊髄組織湿重量25mgに冷却した超純水0.5mlを加えてから、ガラス・ガラス・マイクロホモジェナイザーを用いてそれを磨砕した。このホモジェネートに冷却したエタノール/クロロホルム混合液 (62.5/37.5) 400  $\mu$ lを加え、Vortex で1分間攪拌した後3,000 rpm で10分間遠心分離して、得られた上清を酵素試料として分析に用いた。SOD試薬 (25% ethylene glycol 含有 dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶液) 30  $\mu$ lと0.11 mM-DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid) 含有緩衝液 (pH 8.8) 900  $\mu$ lを比色計セルに入れ、この溶液中に前述の組織ホモジェネートの上清40  $\mu$ lを加え、よく攪拌して37°Cで正確に1分間インキュベーションした。その後  $3.2 \times 10^{-2}$  M HCl 30  $\mu$ lを溶液中に添加した後に比

色計を用いて、波長 525 nm で吸光度を 15 秒毎に約 2 分間程度測定して SOD 活性値を算出した。

#### 4) CO 活性の測定

脊髄組織中の CO 酵素 (EC 1.9.3.1) 活性は、Wharton<sup>7</sup>の方法に基づいて比色法で測定した。すなわち、まず脊髄組織湿重量 20 mg に 0.25 M 蔗糖液 1 ml を加え、ガラス・ガラスホモジェナイザーで磨砕した。CO 活性の測定は小試験管に超純水 0.83 ml をとり、これに 1% TritonX-100 を含有する 0.1 M-K-リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.1 ml を加えて、5 分間以上 38°C で保温した。つぎに比色計セル内にこの試料溶液を移し、さらに 0.5% ferri-cytochrome c 0.07 ml と脊髄組織磨砕液を添加してよく攪拌した。そして比色計 (Par-macia 社製 Novaspec II) を用いて波長 550 nm での吸光度の変化を 30 秒毎に約 2 分間にわたって測定し、生成された ferrocytochrome c の量を測定した。こうして得られた吸光度の変化から組織中の CO 活性値を算出した。

#### 5) TG 活性の測定

脊髄組織内の TG 活性は、Lorand<sup>8</sup>の方法に準じて測定した。すなわち、0.32 M sucrose と 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液中で磨砕した脊髄組織を酵素標品として用い、その触媒作用によって、N, N' dimethylcasein タンパク分画内に取り込まれた [<sup>3</sup>H] putrescine (1,110 GBq/mmol) の放射活性から TG 酵素活性を算出した。実際には 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol (DTT), 5 mg/ml casein および 0.4 mM (18 KBq) [<sup>3</sup>H] putrescine を含む 50 mM Tris HCl 緩衝液 (pH 7.0) 中に、組織磨砕液より得た上清の酵素標品を添加して 37°C, 30 分間インキュベーションを行い、単位タンパク量あたりに取り込まれた反応基質 ([<sup>3</sup>H] putrescine) の放射活性量から組織 TG 活性値を算

出した。

#### 6) 蛋白質の定量

脊髄組織中の蛋白質量の測定は、ウシの血清アルブミンを標準蛋白として、Bradford の方法に準じて実施した<sup>9</sup>。

### 結果

#### 1) ALS 脊髄組織中の SOD 活性

ALS 患者脊髄組織と非 ALS 患者脊髄組織を前角+前索, 側索, 後角+後索に分けて、SOD 活性を測定した。剖検時に摘出し凍結保存した脊髄組織の SOD 活性値は、前角部で高く、後索部でやや低い値が示された。側索部の値は、前角部と後索部の間にあった。ALS 患者脊髄組織内の SOD 活性は、前角, 側索, 後角とも非 ALS 患者脊髄の酵素活性値と比べ有意差はほとんど認められなかった (図 1)。

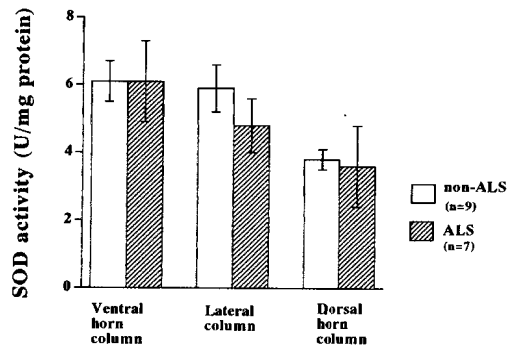


図 1 ALS 患者および非 ALS (control) 患者脊髄組織中の SOD 活性値の比較

#### 2) ALS 患者脊髄組織内の CO 活性値

ALS 患者脊髄組織と非 ALS 患者脊髄組織を前角+前索, 側索, 後角+後索に分けて CO 活性を測定した。ALS 患者脊髄内の組織 CO 活性値は、特に前角+前索では、非 ALS 患者脊髄の値 (287±24.5 nmol/mg protein/min) と比べて 189±18.3 nmol/mg protein/min, -34% と明瞭な低下を認めた (P < 0.01)。脊髄内 CO 活性値は、前角以外での側

索および後角+後索部のいずれの部位でもほぼ同程度の値を示した。そしてALS患者前角+前索以外での側索, および後角+後索部のいずれの部位でも, 非ALS患者脊髄標本に対して-29%のCO活性値で有意な低下を認めた ( $P < 0.05$ ) (図2)。

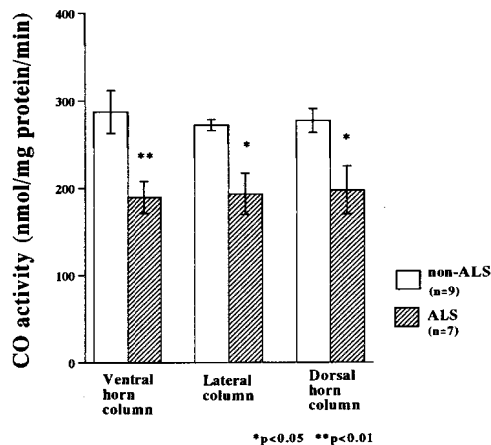


図2 ALS患者および非ALS (control) 患者脊髄組織中のCO活性値の比較

### 3) ALS患者脊髄組織内のTG活性値

ALS患者脊髄組織と非ALS患者脊髄組織を前角+前索, 側索, 後角+後索に分けてTG活性を測定した。ヒト脊髄内の組織TG活性値は, 前角+前索, 側索および後角+後角部のいずれの部位でもほぼ均等に分布して認められた。ALS患者脊髄の前角, 側索および後角+後索のいずれの部分のTG活性値も, 非神経病患者脊髄の値と比べて25~65%の範囲までの著明な低値を示した(図3)。つまり, ALS患者脊髄変性部位である前角や側索にのみ対応してTG活性値が低下しているわけではなかった。

#### 考察

##### 1) ALS脊髄組織中のSOD活性の変動

ALS患者は, 中年以降に発症して次第に筋力低下, 運動麻痺などの症状を呈し, 発病後平均3~5年で死亡する難病としてよく知られている。その症状は主として脊髄内運動ニ

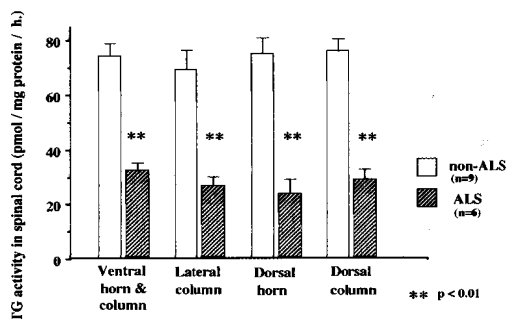


図3 ALS患者および非ALS (control) 患者脊髄組織中のTG活性値

ューロンの選択的変性・脱落による二次的な筋萎縮による運動麻痺発現による。したがって, その病因の主要な局在部位である中枢神経系, 特に直接の原因となる脊髄を検索することは, 非常に重要で有意義なことである。古くから, 病理組織学的研究の結果, 脊髄横断切片標本で前角灰白質内に局在する大型のコリン作動性ニューロン細胞体の変性・脱落, 灰白質の縮小ならびに, 第一次運動ニューロン軸索の下行する側索(皮質脊髄路)の硬化(癍痕化)が, ALSの典型的な像として, 神経内科の教科書に記載されている(図4)。しかしながら, ALS脊髄標本を生化学的に分析した研究は従来ほとんどなされていない状態であった。Nagataらは, 1982年に剖検時に摘出したヒトの脊髄標本(5例)を得て, それを前角+索, 側索, 後角+索の3部に分割した組織片について, 第二次運動ニューロンの神経伝達物質として確定されているアセチルコリンの合成酵素, ChAT活性の分布を調べた。その結果, 非ALS患者脊髄横断標本では, 運動ニューロンが局在する脊髄前部(前角+前索)に, その他の部分と比較してChAT活性が, 特に高いことが示された。一方, ALS脊髄標本では, とくに前角+前索部に限局して選択的にChAT活性の著明な低下が認められた。以上の結果, ALS脊髄標本では形態学的に前角, 前索部のニューロン細

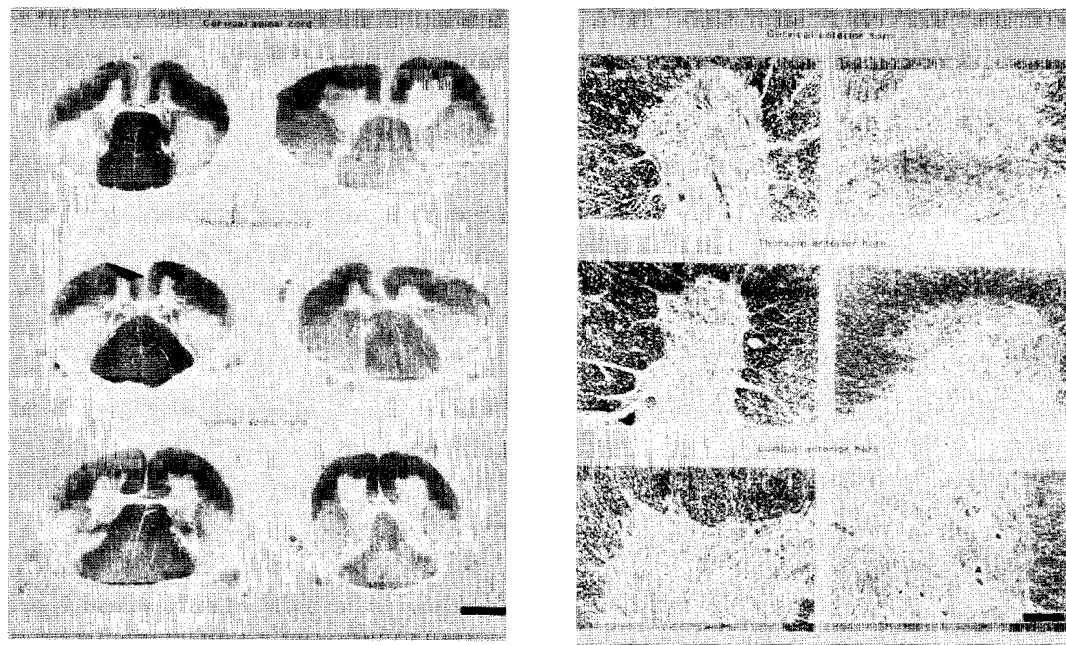


図4 Klüver-Barrera法による髄鞘染色をしたALS患者脊髄と非ALS患者脊髄の横断組織  
 上段：頸髄，中段：胸髄，下段：腰髄  
 ALS患者脊髄では前角部のニューロン細胞体の変性脱落によって萎縮し，下行性軸索が通る側索部は白く抜け細胞変性が明らかである。

胞体および軸索部の変性・脱落したのに対応して，生化学的にも前角運動ニューロン細胞内に高濃液に含まれる伝達物質のACh合成酵素のChAT活性が激減することが示されたわけである。

また，ALSの形態学的特徴である側索硬化（癩痕化）に対応する生化学的変化として，側索を下降する第一次運動ニューロンの神経伝達物質であるアミノ酸類の含有濃度の側索部における選択的減少が考えられる。藤田<sup>11</sup>はALS患者脊髄で興奮性アミノ酸伝達物質のグルタミン酸（Glu）およびアスパラギン酸（Asp）含有量が側索のみならずその他の部位でも有意に減少していることを認めた。さらに彼等<sup>12</sup>は，猿の片側大脳皮質運動領野の除去手術後5週間目に摘出した脊髄組織内で，ニューロン細胞体から出る軸索が下行する反対

側の側索でのみ選択的にGlu濃度の減少を認めた。これらの実験成績から錐体路を形成する第一次運動ニューロンの走行している脊髄内伝導路内では，その神経伝達物質がGluであることが強く示唆された。

また，中枢神経系（脳）に虚血などの負荷が加えられた場合には，脳細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の急激な上昇の結果，過酸化物質やフリーラジカルが過剰に発生して，特に感受性の低い運動ニューロンが選択的に傷害されることが，ALSが引き起こされる原因の一つとも考えられるとする仮説が提出されている（Nowicki<sup>13</sup>ら）。SODは生体内で種々の要因により発生した細胞傷害性の活性酸素O<sub>2</sub><sup>-</sup>を，O<sub>2</sub><sup>-</sup>+O<sub>2</sub><sup>-</sup>+2H<sup>+</sup>→H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>の反応過程を触媒することによって無毒化して消去する酵素である。またSOD以外にもH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を消去

する catalase や glutathione peroxidase (GSH-Px) などの活性酸素消去酵素も生体内には存在して活動している。Gurney ら (1994)<sup>3</sup> は、ミスセンス変異した Cu/Zn-SOD 1 遺伝子を組込んだ transgenic mouse を作製し成育させたところ、生後 3~4 か月より後肢に始まり上肢に波及する進行性の筋萎縮と運動麻痺を呈し、5 か月過ぎには死亡するのを認めた。この運動麻痺発症マウス脊髄の病理学的検索を行ったところ、脊髄前角部の運動ニューロン細胞体の選択的変性・脱落を認めた。これら実験成績から、Nowichi らの仮説の如く脊髄内ニューロンが、細胞傷害性活性酸素基 ( $O_2^-$ ) にさらされた時に、それを消去し無毒化して細胞を保護する SOD 酵素が充分働かない場合には、運動ニューロンの細胞死が選択的に引き起こされる可能性が充分考えられることが示唆された。家族性 ALS (FALS) では、Cu/Zn SOD 1 遺伝子の変異が認められている例も多く報告されている (Nakano ら)<sup>14</sup>。しかし、全 ALS 患者のうち家族性 ALS は 5~10% を占めるに過ぎず、大部分は孤発性 ALS に分類されている。これら孤発性 ALS ではその大部分の症例で SOD 遺伝子の変異は認められないにもかかわらず、運動ニューロンの変性・脱落がみられている原因として、SOD の活性異常のみが主要な病因とは考えにくい。実際、これら孤発性 ALS 患者の大脳皮質組織内では、全く SOD 活性の変化も認められていない (Bowling ら)<sup>15</sup>。一方、Jones らは、孤発性 ALS 患者でも家族性 ALS 患者と同様の Cu/Zn SOD (SOD 1) 遺伝子の異常が観察されたことを報告したが、その後の彼らの実験結果は確認されていない。従って、現在のところ孤発性 ALS と SOD 遺伝子との関係は充分解明されているとはいえない。

今回我々が行った ALS 脊髄組織中の SOD 活性値の分布は、病理組織学的に選択的

運動ニューロン変性・脱落が認められる前角や側索のみならず、あまり変性が認められていない後角+後索部でも、非 ALS 患者脊髄の値と比べて、ほとんど有意差が認められなかった (図 1)。このような測定結果は、孤発性 ALS 患者脳のスOD 活性値が非 ALS 患者脳のスOD 値とほとんど差異が認められなかったとする Bowling らの報告と一致している。ただし、今回の測定で ALS でも非 ALS でも脊髄前角+索部の方が後角+索部よりも SOD 酵素活性はやや高い傾向が示されたが、その理由は不明である。

## 2) ALS 患者脊髄組織内の CO 活性値の変動

脳組織と同様に脊髄組織はその活動を維持していくために必要な生体エネルギー (ATP) を、主としてブドウ糖の好氣的リン酸化反応によって得ているので、他の身体組織と比べて極めて多量の酸素消費を示すことはよく知られている。この好氣的エネルギー産生過程は主として細胞内小器官のミトコンドリア内で効率よく行われていて、これによって活発な神経活動が可能となる。Cytochrome c oxidase (CO) は、ミトコンドリア内膜上にあり、好氣的エネルギー産生過程の電子伝達系を構成している 4 つの酵素複合体のうち第 4 番目に分類される (Complex IV) 代謝酵素である。そして電子伝達系酵素の異常は主として神経筋疾患患者の神経組織に発現することがよく知られている。Kish らは、ALS と同様なニューロンの変性性疾患の Alzheimer 病 (AD) 患者の大脳皮質前頭葉及び側頭葉組織内で、非 AD 正常脳の値と比べて CO 活性値がそれぞれ 26% と 17% にそれぞれ減少したが、被殻や海馬では変化は認められなかったことを報告している。また Simonian らは歯状回と海馬で、Mutisya らも AD 患者大脳皮質で、正常脳と比較して CO 活性値の有意な減少が見られたことを報告している。また、Schapira らは Parkinson

病患者の黒質からミトコンドリアを分離して、ミトコンドリア内電子伝達系酵素の活性値を対照者のものと比較した。その結果、両者の脳組織からのミトコンドリアの回収量には両グループ間で差が見られなかったが、患者より得たミトコンドリアでは、NADH ubiquinone reductase (Complex I) と NADH cytochrome c reductase 活性値が対照と比較して有意に減少していたことを報告している。また、実験的にラット頸動脈を閉塞して脳虚血を生じさせた組織では、虚血負荷の 30 分後に既に CO 活性値が著明に低下している、好氣的エネルギー産生系が低下していることが示されている (Dimlich<sup>21</sup>)。これらの実験結果から、神経組織の変性と病変部位の CO 活性値とは密接な関連性のあることが明白である。

このように虚血などで発生増加するフリーラジカルに対して、ミトコンドリアは特に敏感に反応して障害を受けやすいので、今回我々が測定した組織内 CO 活性値は ALS 脊髄内の前、側、後部のいずれの部位でも低下していた (図 3)。そのうち、前角部で特に CO 活性値の低下が著しかったことは、特に活発なエネルギー代謝活動を営んでいる大型運動ニューロンが ALS 脊髄内では選択的に変性・脱落している結果に対応している可能性も考えられる。また、本研究で分析に用いた脊髄組織は ALS 患者が呼吸筋や呼吸中枢の麻痺の結果死亡したものであるため、脊髄の運動神経の変性・脱落が極度に進行しており、この神経変性の影響が前角のみならず脊髄全体におよんでいる結果を示すのかも知れない。

### 3) ALS 患者脊髄組織内の TG 活性値の変動

温血動物の組織内に広く分布するトランスグルタミナーゼ (TG) は、Ca<sup>2+</sup>依存性に細胞質内タンパクのグルタミン残基とリジン残基あるいは、ポリアミン分子との架橋反応を触

媒する酵素で、その結果生ずる細胞質流動性の低下による細胞機能の失活、ひいては細胞死を招来するので、細胞変性の指標酵素の一つとしてよく知られている。Nagata<sup>10</sup>らは白鼠上頸部交感神経節 (SCG) の節後神経を神経節の極く近傍で切断手術を行った。その後日数を経るに従って SCG 組織内の節後ニューロンの変性が進行するのに平行して、組織内 TG 活性値は一過性に上昇するが、ひき続いて次第に低下して一週間後には術前 SCG の 1/2 以下に減少する経過をとることを示した。Kawashima<sup>22</sup>らは、Alzheimer 病で死亡した患者の脳組織中の TG 活性値は、同年齢で死亡した正常の脳内組織と比べて低値であったことを示した。この測定成績は、今回の我々の ALS 脊髄組織で測定した TG 活性値が非 ALS 脊髄組織の TG 活性値よりも極めて低値であったことと一致している。但し ALS 脊髄内での TG 活性値が ChAT 活性値の分布とは異なり前角+前索部のみならず側索および後角+後索部でもほぼ同様に低下していたことは、TG 活性が運動ニューロンのみに局在するものではなく、他の脊髄内ニューロン内のどこにでも広く分布していることを示唆するものであろう。

### 小活

剖検時に摘出し凍結保存した ALS 患者脊髄組織標本について、活性酸素消去酵素の SOD、ミトコンドリアの好氣的エネルギー産生酵素の CO、および組織変性指標酵素の TG の 3 種類の酵素活性を測定し、以下の結果を得た。

- 1) 今回測定した孤発性 ALS 患者より死後摘出した脊髄組織内の SOD 活性は、非 ALS 患者脊髄と比べて有意差を認めなかった。
- 2) ALS 患者内 CO 活性値は、非 ALS 組織と比べていずれの脊髄部分でも明らかな減少が示された。
- 3) ALS 脊髄内の TG 活性値は、非 ALS と

比べて前角+前索のみならずその他の部分でも非常に減少していた。以上、ニューロンの変性・脱落が生じているALS患者脊髄組織中では、好氣的エネルギー産生系(CO)の減少と細胞変性標識酵素(TG)の低下が認められた。これらの変動は、脊髄内の形態学的変化に対応する生化学的変動の表現としてとらえることが出来よう。

## 第2章：ラット脊髄循環障害後にみられた脊髄組織の生化学的変動

### 序

前章では筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者が死亡した後に摘出した脊髄横断標本を細分割した組織片について生化学的分析を行い、脊髄組織内ニューロンの変性・脱落に伴う物質的背景を求めてその発生原因を探る追求を行った。しかし、得られた材料はALS患者の死亡後摘出されたもので、疾患の最終段階の終末期の標本である。したがって、この運動ニューロン変性の初期で脊髄内でどのような変化が起こっているのか、あるいは、その変化がどのように進行してALSのような運動麻痺の発症に至るのかといった疑問を解決するためには、是非実験動物を用いて各病期で摘出した脊髄標本について分析してみる必要がある。すなわち、実験動物の脊髄に対して外から傷害を加えて、脊髄組織内ニューロンの変性を生じさせる経過中に、その脊髄組織を動物より摘出して、その生化学的分析を行う方法を実施すべきである。

そこでまず、脊髄組織に傷害を加えて脊髄組織内ニューロンに生ずる時間的変動過程を形態学的に確かめ、さらにその部分の生化学的分析を行った。すなわち、成熟ラットを全身麻酔下に背部皮膚を切開して脊髄を露出したのち、脊髄表層を走る後脊髄動脈片側枝に先端の尖った電気メスを用いて焼灼・閉塞手術を行った。その後麻酔から回復させた後に、

経時的に急性期から慢性期にかけて脊髄組織に非可逆性変化を生じさせた標本を作製した。そして、これらの脊髄標本を経時的に摘出してからその生化学的分析をおこなった。測定項目は、ALS患者脊髄組織の生化学的分析の場合に準じて、形態学的検索のほか、好氣的エネルギー産生系ミトコンドリア酵素のチトクローム酸化酵素(cytochrome c oxidase; CO), 細胞傷害性の活性酸素基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)の消去を触媒して保護作用を担う抗酸化酵素のスーパーオキシド・ジスムターゼ(superoxide dismutase; SOD), 組織内の好氣的エネルギー産生系から嫌気性解糖系への転換の程度を示す乳酸脱水素酵素(lactic acid dehydrogenase; LDH)活性および組織変性の標識酵素となるトランスグルタミナーゼ(transglutaminase; TG)活性について、循環障害後の変動について経時的に測定をおこなった。このような実験によって、循環障害による脊髄内ニューロン変性の進行に伴って組織内で変動する上記諸酵素群の活性値を追求して、ニューロン変性の物質的背景を探ろうと試みた。

### 実験材料と方法

1) 後脊髄動脈片側枝の焼灼手術と脊髄摘出  
実験動物としてWistar系成熟白鼠(体重約200g40匹)を用いた。Pentobarbital(40mg/kg体重)をラットの腹腔内に注射し麻酔した後、ラットを腹臥位に固定し、頸部背側皮膚の正中を縦切開して椎骨を露出した。そして、この第6頸髄(C<sub>6</sub>)から第3胸髄(T<sub>3</sub>)部位にかけて椎弓を切除・剝離して脊髄背側部を露出した。実体顕微鏡下で観察しながら脊髄背部表面を走行する後脊髄動脈から出て右方に蛇行して走る後脊髄動脈の片側枝の血管分岐部に先端の尖った電気メス(モノポーラー)を軽く当てて焼灼、閉塞した(図5)。手術終了後は、背側部の皮膚を縫合して麻酔から動物を回復させた。術後1日、7日、お



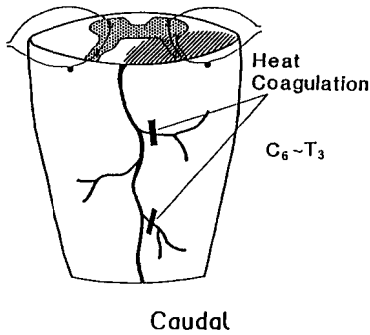


図5 後脊髄動脈焼灼手術の模式図 (Fujita et al.)

よび21日経過した後、それぞれの白鼠を再び urethane 麻酔 (1.5g/kg 体重, ip) 下に断頭した。そしてその背部皮膚を縦切開し、椎弓を背部より除去し脊髄手術部位を中心にして、その頭方および尾方の脊髄組織を小型メスとはさみを用いてなるべく傷つけないように注意深く摘出した。脊髄組織は断頭後約5分以内に摘出し、正中裂に沿って左右に分割し右側を手術側, intact な左側を対照側として分割した。また、別のラットから摘出した無傷の脊髄組織についても同様の生化学的分析に用い、測定と比較基準値として利用した。これらの脊髄標本は、摘出後生化学的検索まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

### 2) 病理標本の作製

Pentobarbital 全身麻酔下に、電気メスでラット脊髄背側部表層を走行する後脊髄動脈の片側枝を焼灼した。このラットを、麻酔から回復させた後3日目と7日目に再び urethane で全身麻酔後、脊髄を注意深く摘出した。これらの脊髄組織は10%フォルマリン液で環流固定した後、パラフィン中に包埋し、横断面の組織切片を作製した。ガラススライド上に接着した切片の染色は、通常のヘマトキシリンエオジン (HE) 染色と Klüver-Barerra 法による髄鞘染色を施行した。

### 3) 酵素活性の測定

SOD 活性, CO 活性, TG 活性の測定, 蛋白

質の定量は、それぞれ第一章と同様な方法を用いて実施した。

### 4) LDH 活性の測定

組織内 LDH 活性は、LDH 測定キット (Boehringer Mannheim, Germany) を用いて以下の手順で測定した。脊髄組織片約 10 mg に冷却した超純水 1.0 ml を加えてガラス・ガラスホモジェナイザー中で磨砕した。この組織ホモジェネートは、3,000 rpm-10 分間遠心分離した後、その上清を酵素試料として用いた。LDH 測定キット試薬 I (リン酸塩緩衝液 pH 7.5, 50 mM ピルビン酸 0.6 mM 溶液-12  $\mu\text{l}$  0.18 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) 含有) 3 ml を取り、 $25^{\circ}\text{C}$  で1分間恒温水槽中で incubation した。これを比色計のセル (キューベット) 内に入れ、さらに酵素試料上清 30  $\mu\text{l}$  を加えて、吸光度波長 340 nm で 30 秒毎に 3 分間連続測定した値をとり、これを含有蛋白質質量で除して蛋白質質量あたりの LDH 活性を算出した。

## 結果

### 1) 形態学的変化

脊髄横断面の組織像を光学顕微鏡下に観察すると、術後3日目では、 $\text{C}_6\text{-T}_3$  レベルの脊髄組織では、焼灼手術側 (右側) と非手術側 (左側) の間でほとんど形態学的差異は認められなかった。すなわち、灰白質内には左、右側ともにほぼ intact な形態を保っているニューロンが残存して認められ、脊髄の左右差はほとんど認められなかった。しかしながら、術後7日目の脊髄横断組織像では、手術側 (右側) 脊髄の特に背側部では、灰白質は破壊されてほとんど消失し、主に背側脊髄部ニューロンの変性・脱落が、明瞭に示された。しかしこの破壊像は腹側部にもおよび、灰白質と白質との区別は不明瞭であった。また、非手術側 (左側) でもかなり虚血による組織の変性が拡散進行して認められた (図6)。

### 2) チトクローム酸化酵素 (CO) 活性の変動

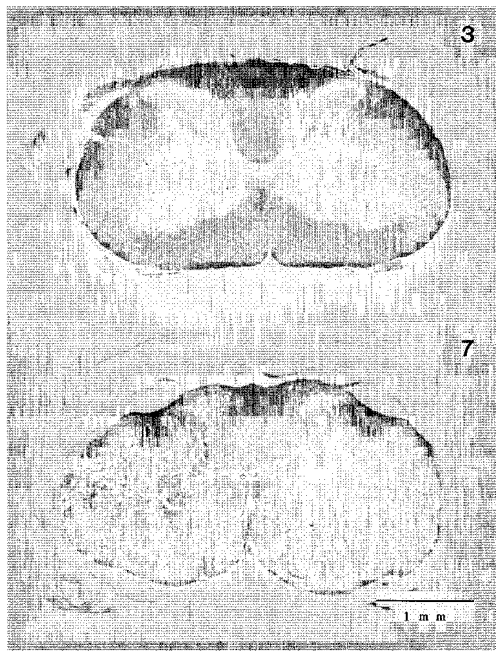


図6 後脊髄動脈枝の焼灼・閉塞手術後3および7日目の脊髄 Klüver-Barrera 染色像  
術後3日目では組織の変性像はみられないが、7日目では手術側（右側）脊髄に顕著な変性像が観察される。  
上図 手術後3日目脊髄組織像  
下図 手術後7日目脊髄組織像

今回は、好气的エネルギー産生系を担当しているミトコンドリア内膜上に配列している電子伝達系複合酵素のうち、チトクローム酸化酵素 (CO; Complex IV, EC 3.6.7.3) の活性を、循環傷害をおこしたラット脊髄標本について測定を行った。すなわち、後脊髄動脈片側（右側）を閉塞した後、経時的に摘出したラット脊髄標本中の CO 活性を測定し、その値の変動の経過を観察した(図7)。術前のラット脊髄組織中の CO 活性は、 $256.1 \pm 19.5$  nmol/mg protein/min であった。この値は Bowling<sup>13</sup>ら (1993) がヒトの死後 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した大脳標本で測定した値、 $567.8 \pm 76.0$  nmol/mg protein/min よりも約1/2程低値であった。後脊髄動脈片側枝分岐部で熱焼灼により片側脊髄組織へゆく血流停止を

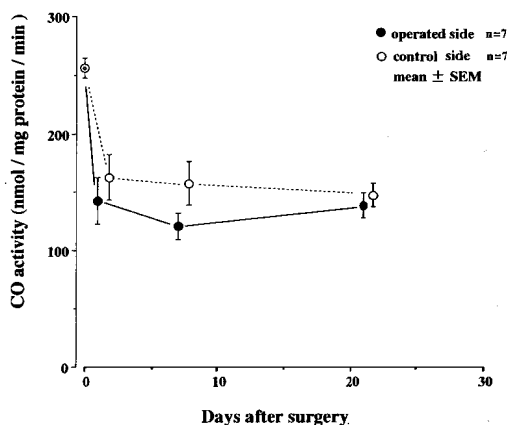


図7 ラット後脊髄動脈半側焼灼閉塞後の脊髄組織内 CO 活性値の経時的変動

行くと術後1日目で焼灼側の CO 活性値は急速に低下した (143.8 nmol/mg protein/min)。その後低下した CO 活性値は7日目から21日目までその低い値に持続して保たれた。一方、非焼灼側脊髄組織内の CO 活性値も術後1日目で162.6 nmol/mg protein/min と傷害側と同様に急激に低下するのが認められ、やはりその低い値が7日目から21日目まで続いた。特に傷害側の術後7日目の CO 活性値は、非手術側よりも有意に低い値が示された。

### 3) 乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性の変動

好气的エネルギー産生系が虚血後に急激に障害されると、代償的に嫌気性解糖系が活性化されるようになって、その結果組織内に乳酸が蓄積する。そこで、組織内に蓄積した乳酸を処理して減少させるために触媒作用を持つ LDH 活性の変動を、ラット脊髄標本で測定しその時間的経過を観察した。脊髄組織内 LDH 活性は、手術前は、5.0 IU/g protein と極めて低値であった。しかし、後脊髄血管の片側枝の閉塞による組織の虚血性変化の発生に伴って、術後1~7日目にかけて閉塞側組織で術前値の3倍以上に急激かつ著明に増大した。一方、非閉塞側脊髄組織中の LDH 活

性値も、閉塞側よりやや程度は少なかったが、やはり同様に増加するのがみられた (図 8)。

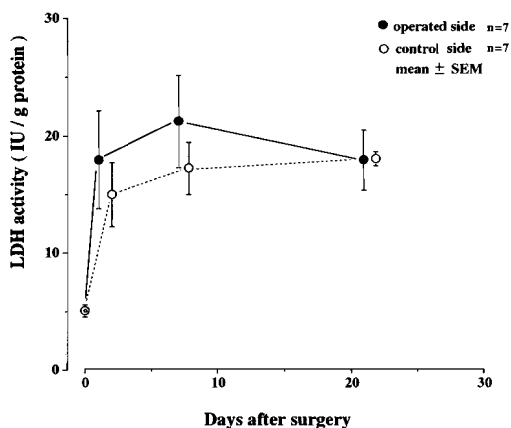


図 8 ラット後脊髄動脈半側焼灼閉塞後の脊髄組織内 LDH 活性値の経時的変動

#### 4) 抗酸化酵素 (SOD) 活性の変動

脊髄内 SOD 活性は、術前は 1.63 U/mg protein と低値であった。血管焼灼閉塞の結果生ずる循環傷害が持続すると、術後 1 日目でこの酵素活性は、急激でかつ著明 (術前値の約 3.3 倍) に脊髄組織内 SOD 活性値の爆発的上昇が認められた。しかし、この急激かつ高度の SOD 活性の上昇は一過性で、7 日目にはほぼ術前の値に戻り、以後は 21 日目までその低値に保たれた。一方、非焼灼側脊髄部分の SOD 活性値は、術後 1 日目に約 1.5 倍の弱い上昇に留まった。7 日目以降の SOD 活性値は、術前値と比べて有意差はほとんどなかったが、手術側脊髄半分よりもむしろ高値に認められ、これが術後 3 週間目まで持続した (図 9)。

#### 5) TG 活性の変動

ラット脊髄組織中の内因性 TG 活性値 (カゼインタンパクを添加しない条件で、脊髄組織内タンパクへの  $[^3\text{H}]$  putrescine の取り込み量; TG 酵素の量的指標) は、ほとんど変化

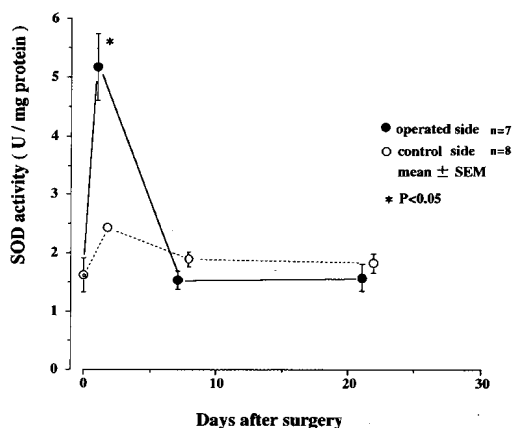


図 9 ラット後脊髄動脈半側焼灼閉塞後の脊髄組織内 SOD 活性値の経時的変動

がみられなかった。術後一日目は、非手術側に対し手術側活性値は、約 1.6 倍まで有意に高値が示され、3 日後でも同様に 1.3 倍の高値が示された。しかし、術後 7 日目には非手術側とはほぼ等しい値まで低下した。そして術後 30 日目には、手術側の TG 活性値は非手術側の値の 60% まで低下するのが観察された (図 10)。

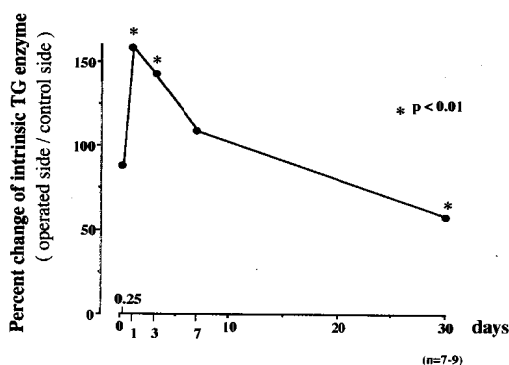


図 10 ラット後脊髄動脈半側焼灼閉塞後の脊髄組織内内因性 TG 活性値の経時的変動  
カゼインタンパクを添加しない条件で、脊髄組織内のタンパクへの  $[^3\text{H}]$  putrescine の取り込みを示すもので、酵素の量的指標となる。この図では、脊髄の非手術側 (左側) の TG 活性値を 100 として、手術側の変動を表している。

カゼインタンパクを添加して測定した脊髄組織中 TG 活性は、術後 6 時間で非手術側が  $153.1 \pm 26.5$  pmol/mg protein/h であり、手術側では、 $190.7 \pm 32.0$  pmol/mg protein/h とやや上昇傾向があったが、統計的有意差は認められなかった。しかし、後脊髄血管片側枝閉塞による脊髄の虚血が持続することによって、手術側脊髄半側の TG 活性値は  $458.4$  pmol/mg protein/h と非手術側の 3 倍以上の有意な ( $P < 0.001$ ) 上昇が示された。その後術後の時間経過に伴って、TG 値は徐々に減少していったが、術後 30 日でも非手術側の約 1.6 倍と依然として有意な ( $P < 0.05$ ) 高値が認められた (図 11)。

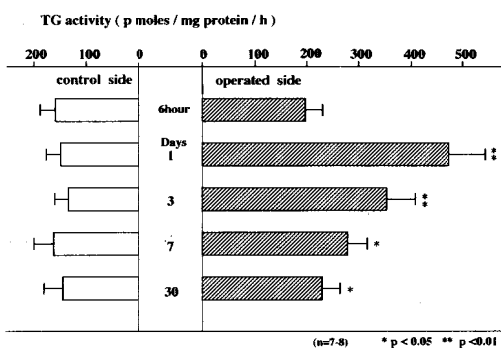


図 11 ラット後脊髄動脈片側焼灼閉塞後の脊髄組織内 TG 活性値の経時的変動  
カゼインタンパクを添加して脊髄組織内 TG 活性値を測定した。

## 考察

実験動物の脊髄に外側から虚血などの傷害を加えることによって組織内ニューロンが変性し破壊され、消失していく過程で、どのような物質的変動が生じて進行しているのかを知ることは、ALS などの運動ニューロン疾患の原因解明に大きな手がかりを与える。そこで、本論文では片側後脊髄血管を電気メスで焼灼・閉塞させて、脊髄半側の組織破壊をひきおこした標本作製して、術後の経過に伴ってどのような生化学的変動が進行していく

かを経時的に観察した。

### (1) CO 活性の変動

組織細胞が血液供給を遮断された場合、最初に重大な傷害を受けるのは、好氣的エネルギー産生代謝系である。特に脳や脊髄のような中枢神経系組織では、ブドウ糖基質の貯蔵量が極めて少なく、好氣的酸化過程が主体となっている。このような循環傷害では、特に細胞内ミトコンドリアの電子伝達系酵素群が最も敏感に反応するのがみられる。今回の実験では、ミトコンドリア内膜に配列している電子伝達系複合酵素のうち、Complex IV のチトクローム C 酸化酵素 (CO) 活性を白鼠脊髄組織で測定した。血管閉塞による組織に傷害を与えた直後 (1 日後) には、受傷側の CO 活性値は極めて急激に低下して術前の 1/2 近くまで達した。このことは、好氣的エネルギー産生系が循環傷害に反応して形態的变化の出現以前に傷害されることを示している。この虚血による傷害は図 2 で示された如く、受傷側に限局せず非受傷側組織にも波及していて、CO 活性の急激な減少として観察された。そしてこの CO 活性の低下は術後 1 週間目の組織形態の変化が示されている時期に最大になり、術後 3 週の観察では術側脊髄でのわずかな回復傾向がみられた。

Almeida<sup>23</sup>らは、脳虚血後再灌流をおこなった脳組織内の CO 活性は、術後 30 分までは変化がみられなかったが、120 分後には明らかに低下したと述べている。この脳虚血後再灌流後の脳組織内 CO 活性の低下は、我々の今回の実験結果と対応している。そして彼らは、虚血後の脳組織内の CO 活性低下の原因として、細胞傷害のフリーラジカル産生に伴う脂質過酸化の影響を考えている。

### (2) LDH の変動

好氣的エネルギー産生系が循環傷害後に急激に傷害され、CO 活性が急激に低下すると、代償的に嫌氣性解糖系が活性化されて、組織

内に乳酸の蓄積が生ずる。この乳酸を処理するために組織内のLDHの活性化がおこる。片側脊髄動脈閉塞による循環傷害は、受傷側のLDHの急激な発生（1日目に3.5倍以上の活性増加）をひきおこし1週間で最大値に達し、以後高い値が持続した。また非受傷側もほぼ同様な経過でLDH活性の活性化が示された。これは循環傷害による好氣的エネルギー産生系障害による嫌気性解糖系の発動が、傷害側半側のみに限局されず、非傷害側にまで波及していることが生化学的にも示された成績である。

### (3) SOD 活性値の変動

Gurney<sup>3</sup>による、変異SOD遺伝子を組み込んだtransgenic mouseが発育に伴って脊髄前角ニューロンの特異的変性と、四肢の麻痺性歩行を発現させたALSモデルの作製実験から、ALSの原因のひとつとして組織内で発生した細胞傷害性の活性酸素基を処理するSOD機能不全が最も注目されている。

Cu/Zn-SODは、主として細胞質に局在しているが、Mn-SODは主にミトコンドリアのマトリックスに存在している。吉田ら<sup>24</sup>によると、脳血管障害、細菌性髄膜炎、脳炎患者のMn, Cu/Zn-SOD値は、いずれも上昇して認められたが、神経変性疾患患者では、Mn-SOD値のみ上昇していたと述べている。神経変性疾患患者髄液中のMn-SOD活性値の上昇は、患者の脳脊髄液関門が種々の物質の通過に制限を加えないとされているので、血液脳関門(BBB)の破壊によって血中Mn-SOD活性が影響されているとは考えがたく、髄液中のこの抗酸化酵素活性値は脳内変性過程を反映したものと考えられる。よって患者髄液中のMn-SOD活性は、神経変性の1つの指標となりうるものと考えられる。

脊髄組織に外傷や虚血などの傷害が加えられ長時間持続した後は、神経細胞の非可逆性の変性、脱落とグリア組織の反応性増殖が

生ずる事がよく知られている。加えられた傷害により脊髄内細胞が破壊される結果、興奮性神経伝達物質のグルタミン酸(Glu)が細胞外に流出してGluレセプターと結合してCa<sup>2+</sup>チャンネルを開放したり、小胞体から動員されたCa<sup>2+</sup>が細胞内で上昇する。その結果、フォスホリパーゼやNOS等の酵素が活性化されて、フリーラジカルが組織内に出現する。そしてこのフリーラジカルを処理するためにSODが活性化される<sup>25</sup>(図12)。今回の実験により血管閉塞後に生ずる循環傷害で、術後1日目で受傷側脊髄内SOD活性値の一過性の爆発的(約3.5倍)増加が認められたが、非受傷対照側ではわずかな酵素活性の増加に留まった。この早期に起こったSOD活性値の一過性の増加は、動脈閉塞後生じた細胞破壊の結果、細胞外にGluが流出し、Ca<sup>2+</sup>が上昇しエンドヌクレアーゼやフォスホリパーゼやNOSなどの酵素を活性化して発生したフリーラジカルを処理するためと思われる。この時期は未だ脊髄組織内形態学的変動が示されておらず、組織内のこのSOD活性値の変動は、形態学的変化に先行して出現するものと考えられる。そして実際に組織破壊が認められた術後1週間目には、SODの変動は術前とほぼ同一レベルに低下していた。したがって以上の経過は、循環傷害により組織内に発生したフリーラジカルの増加に対応して、急激なSOD活性増加が生ずるものの、それにもかかわらず消去しきれないO<sub>2</sub><sup>-</sup>などの傷害が進み、形態学的組織破壊を招来するものと考えられる。

### (4) TG 活性値の変動

組織トランスグルタミナーゼ(TG)は、Ca<sup>2+</sup>依存性に細胞質内蛋白分子間でグルタミン残基の架橋反応を促進する結果、細胞質の流動性を減少させて、ついには細胞の変性壊死を引き起こす標識酵素として知られている。

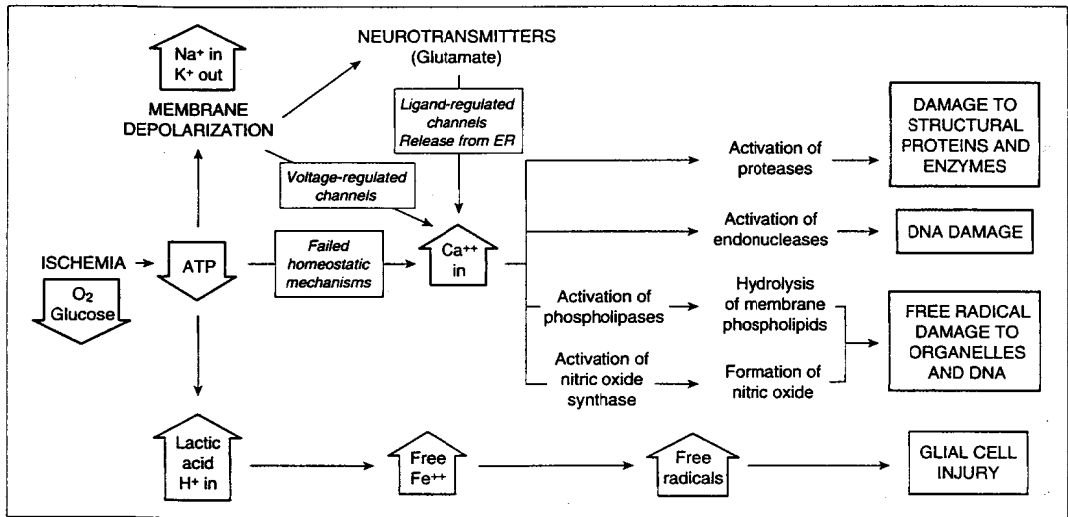


図12 The ischemic cascade (Sci. Am. Sci. Med.より引用 by Pulsinelli, W.)

Ca<sup>2+</sup>依存性酵素である組織 TG 活性の増加は、種々の細胞傷害性の因子が作用した時、細胞内遊離カルシウムイオン濃度の増加によってもたらされた結果と考えられる。Gilad<sup>5</sup>らは、ラット上頸部交感神経節 (SCG) の節後神経切断後 30 分で著明 (約 1.8 倍) な TG 活性の増加を認めている。また、Ando<sup>26</sup>らはやはり同様な一過性の TG 活性値の増加を報告しており、また 1 週間経過後には、SCG 内 TG 活性値が、次第に減少して術前値の 1/2 近くまで減少することを認めている。このような現象は、細胞質内にある流動性のタンパク分子のグルタミン残基の架橋反応が促進されるので、細胞質の流動性が低下して細胞内の機能活動が傷害され、その結果細胞の変性が進行すると考えられている。さらに、局在するニューロン数が変性の進行に伴って減少すると、脊髄内 TG 活性値も減少してくると考えられる。つまり、TG 活性の変動と脊髄内神経組織変性との間には緊密な関係があると思われる。また、当研究グループの藤田らによって、ラット焼灼手術側の脊髄組織内遊離アミノ酸含量 (すなわち脊髄内ガンマ・アミ

ノ酪酸 (GABA)、グルタミン酸 (Glu)、およびアスパラギン酸 (Asp) 含有量は、術後 3 日目では変化がなかったが、7 日後には有意に減少していたことが示されている。そして、これは脊髄組織内のアミノ酸作動性介在ニューロンの変性・脱落の状態を表していると考えられている。

以上より神経変性過程で初期には TG 活性が上昇し、その後組織変性の進行に伴い徐々に TG 活性が低下していくと同時に、脊髄内 GABA, Glu, および Asp 含有量の減少がみられ、これらは神経変性過程の進行度の指標となりうると考えられた。

組織 TG 活性値は、通常外から添加したカゼインタンパクへの<sup>3</sup>H-プトレスチンの incorporation 量として測定される。しかし、生体内にはカゼイン以外のタンパクが TG の反応基質として存在しており、これが内因性 TG 活性値として測定される。内因性 TG 活性は血管閉塞による循環傷害により脊髄内で 30 日後には約 1/2 にまで減少した。しかし、カゼインを加えて判定した TG 活性値は、術後 30 日経過しても依然として高値が示

され、術前値よりも低下するまでにはさらに長期間経過して脊髄内ニューロン変性・脱落が進行すれば、酵素活性の有意な低下が期待されよう。

#### 小括

成熟ラットの脊髄後部表層を走る後脊髄動脈の片側枝を電気メス先端部で焼灼・閉塞手術を行い、脊髄組織半側の破壊を生じさせた標本について、形態学および生化学変動の時間的経過を調べ、以下の成績を得た。

(1) 血管閉塞後7日目、ラット脊髄横断面では、傷害側半分の灰白質および白質の著しい組織破壊が認められた。しかし、非傷害側半分の組織も3日目の組織傷害と比較して明らかにかなりの変化が示された。

(2) ミトコンドリア内電子伝達系複合酵素IVのチトクローム酸化酵素(CO)活性は、傷害側の受傷直後より著明な減少が認められ、3週間持続した。しかし、非傷害側半分でもかなりのCO活性の低下が示されたことから、傷害は受傷側半分に限らず非受傷側にまで波及していることが示唆された。

(3) 組織内乳酸脱水素酵素(LDH)活性は、傷害側脊髄半側で受傷直後より著明な増大が認められ、3週間に亘って高値が保たれた。一方、非傷害側でも同様な経過でLDH活性増大がみられたが、その程度は傷害側よりもやや軽度であった。このことは、循環傷害に伴う嫌気性代謝系の活動が傷害側に局限せず非傷害側にまでおよんでいることを示しているものと考えられた。

(4) 虚血などの傷害により組織内に異常発生する酸素フリーラジカルを消去する抗酸化酵素のスーパーオキシド・ジスムターゼ(SOD)活性は、傷害側で術直後に一過性に爆発的に増大したが、1週間後には元のレベルに戻って、3週間低値に留まった。一方、非傷害側ではほとんど組織内でSOD活性増加は認められず、SOD活性化は傷害された組織内に比

較的限局されて見出された。

(5) 神経細胞変性の標識酵素である組織型Ca<sup>2+</sup>依存性トランスグルタミナーゼ(TG)活性は、傷害直後より上昇し約1週間にわたって高いレベルに保たれたが、以後次第に減少して1か月後には術前の約1/2の値にまで低下した。脊髄内ニューロンの変性・脱落に対応した生化学的変動のひとつとして考えられた。

以上の実験成績から、CO, LDH, SOD, およびTGの各酵素活性は、脊髄に与えられた傷害直後から各々著明な変動を示すことが明らかにされた。これらの生化学的変動は、脊髄の形態学的変化が認められるはるか以前よりひきおこされていることから、細胞変性の初期過程をとらえる重要な変化であると考えられた。

### 第3章：脊髄損傷ラットにみられた脊髄組織の生化学的変動

#### 目的

脊髄損傷による脊髄の病態についてこれまでの実験では、脊髄の循環傷害が注目され、局所の虚血やそれによる低酸素状態が組織内pHを酸性に傾け、発生する浮腫がさらに虚血を増強する悪循環をもたらすと考えられてきた。さらに傷害部にフリーラジカルが生じて、病態の悪化に関与していると考えられてきている。第2章では、脊髄ニューロン変性モデルとして、ラットの後脊髄動脈片側枝を焼灼閉塞手術を行って、脊髄片側の主として後方部の循環傷害をつくり、神経組織の変性過程の進行に伴う種々の生化学的変動を測定した。その結果、ラットの後脊髄動脈片側枝の焼灼閉塞手術による循環傷害由来の脊髄ニューロン変性モデルでは、与える傷害の程度が比較的脊髄背側部で、運動ニューロンが主に局在している脊髄前角部にまで充分傷害が波及しない恐れも考えられた。そこで我々は、

脊髄ニューロン変性モデルとしてより臨床的な脊髄損傷モデルラットを作製して、急性期から経時的に脊髄神経組織の変性過程に伴ういくつかの生化学的変動を測定した。

脊髄損傷モデルの作製方法には、Allen<sup>27,28</sup>による weight dropping method (脊髄硬膜上に一定の高さから重錘を落下させて、脊髄組織に傷害を与える方法で、この場合重錘から脊髄までの落下距離と重錘の重さの積で脊髄損傷の程度を変えることができる)、Rivin and Tator<sup>29,30</sup>や Wallace and Tator<sup>31</sup>による硬膜外クリップ法 (硬膜外から脊髄に直接クリップをかけて組織を圧迫する方法で、この場合クリップの圧迫圧とクリップをかける時間を変えることで脊髄損傷の程度を変えることができる) や、硬膜外に挿入したバルーンを膨らませて脊髄組織を圧迫する方法、硬膜外から直接ネジ式で脊髄を圧迫する方法などの種々の脊髄損傷を与える方法が考案されている。これらの方法のうち、weight dropping method が最もよく使われているが、実際には脊髄組織に対して確実に正確な外力を加えて一定の傷害を発生させるために熟練を要する。そこで、今回われわれは確実に一定の外力が硬膜まで露出した脊髄組織に加えられ、しかも加えた外力の強さを数値化できる硬膜外クリップ法を採用した。

Rivin によると、クリップ圧は inclined place method で 180g/3 秒間から 1 分間では確実に回復がみられたが、180g/5 分間では、ほとんど回復傾向が認められなかった。<sup>29</sup> 予備的検討で、180g 加圧クリップを使用した場合には、組織が切断・断裂されてしまう例があったため、本実験では 120g の加圧クリップで 5 分間の圧迫を脊髄硬膜外より加えて脊髄組織に傷害を与える方法をとることにした。

## 実験材料と方法

### 1) 脊髄損傷モデルラットの作製と脊髄摘出

Wistar 系成熟白鼠 (200g 体重) 50 匹を pentobarbital 麻酔 (40 mg/kg 体重, ip) 下に、頸部背側皮膚を切開して、第 6 頸髄 (C<sub>6</sub>) から第 3 胸髄 (T<sub>3</sub>) 部位の椎弓を剝離して脊髄背側部硬膜を露出した。第 8 頸髄 (C<sub>8</sub>) レベル脊髄硬膜外から 120g の加圧クリップをかけた。クリップをかけて硬膜外より脊髄組織に圧迫を加える時間は 5 分間とした。使用した脊髄圧迫用のクリップは、協和時計工業社製の disposable vascular clip (TKL-1 type, Closing Power/mm<sup>2</sup>120g) を使用した。

ラット脊髄の硬膜外からの加圧終了後は、背側部の皮膚を縫合し動物を麻酔から回復させた。術後 1 時間、6 時間、及び 24 時間経過した後、再びラットに urethane 麻酔 (1.5g/kg 体重, ip) をした後、断頭して、傷害部位周囲を含む脊髄組織を全長にわたって摘出した。クリップをかけた部位を中心に中 (上下) 1 cm にわたる脊髄組織を傷害部とし、その頭側から 1 cm はなれた頭側上方に 1 cm の間の組織を、傷害頭側部とした。そして傷害を加えた部位から尾側に 1 cm はなれた尾側方向の 1 cm にわたる脊髄組織を、傷害尾側部としてそれぞれ摘出した。また、椎弓切除をして硬膜を露出させたが、クリップによる脊髄損傷を与えなかった別のラットから摘出した無傷の脊髄組織を対照とした。これらの脊髄標本は、摘出後生化学的測定を実施するまで -80℃ で凍結保存した。

### 2) 病理組織標本の作製

露出した脊髄に硬膜外よりクリップをかけて圧迫による脊髄損傷を生じさせたラットを、麻酔から回復させた 24 時間後に、再びウレタンで全身麻酔を行ってから脊髄組織を摘出し、直ちにホルマリン固定を行った。それ以後定法にしたがって 2 章と同様な操作により脊髄横断面の病理組織標本作製した。

### 3) 酵素活性の測定

第 1、および第 2 章に記述したものと全く



同様の方法によって、脊髄組織中の CO 活性値, SOD 活性値, LDH 活性値, および蛋白質の定量を測定し, それぞれの測定値を算出した。

## 結果

### 1) 形態学的変化

露出した硬膜外よりクリップをかけて圧迫を加えて脊髄損傷を発生させた後, 摘出・固定し染色した病理組織標本を光学顕微鏡を用いて検索した。受傷後, 15~30 分以内に灰白質の毛細血管外腔へ赤血球の浸潤がおり, 1 時間後その部位に小出血斑が認められた。受傷して 4 時間経過後には脊髄組織切片上で, 灰白質部の虚血, 浮腫, 点状小出血が認められ, これらの病変は次第に進行性の組織壊死へと発展するのが示された。このような脊髄横断面上の灰白質の変性は, 受傷後 3~4 時間後には白質にも波及し, さらに虚血性変化の進行を助長して, 脊髄組織の変性が進むと考えられている<sup>33</sup>。今回行ったわれわれの実験では, クリップによる脊髄組織の部位が挫滅されてしまって組織標本作製にできなかったために, クリップをかけた部位から頭側方向に 3 mm 離れた部位の脊髄横断組織像を観察したが, その部位の背側部にも出血像が認められ, その周辺組織内には小型の細胞浸潤が増加していた。コントロール標本と比較して, クリップをかけた後の脊髄組織内灰白質に存在している神経細胞や間質組織には, この場合明らかな変化は認められなかった (図 13, 14)。

### 2) チトクローム酸化酵素 (CO) 活性の変動

好氣的エネルギー産生系を担当しているチトクローム酸化酵素 (CO; Complex IV, EC. 3.6.7.3) の活性を, 硬膜外よりクリップをかけて圧迫したラット脊髄組織本で測定し, その変動の経過を観察した (図 15)。これをコントロール動物より摘出した脊髄標本と比較した。圧迫受傷した脊髄組織内 CO 活性値は, 障

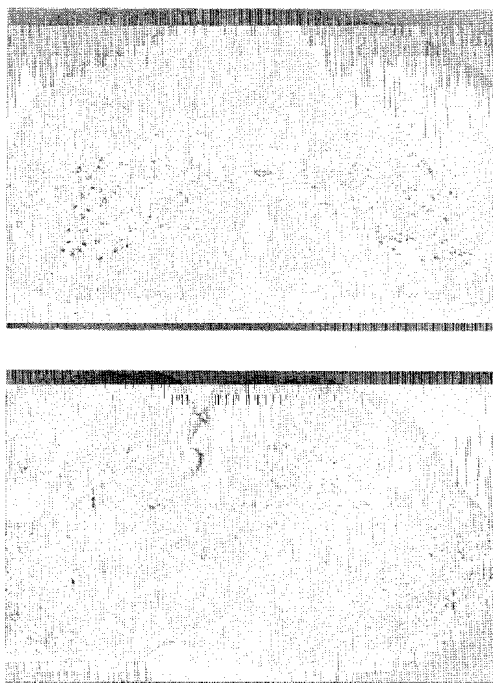


図13 クリップによる脊髄損傷作製24時間後のラット脊髄組織横断面とコントロールラット脊髄 (Klüver-Barrera 法による髄鞘染色) ×10倍  
上図 クリップをかけた部位から頭側方向に 3 mm 離れた部位の脊髄組織横断面  
下図 同部位のコントロールラットの脊髄組織横断面

害部位で術後 1 時間経過時すでに  $138.45 \pm 12.3$  nmol/mg protein/min と有意に低下し, さらに 3 時間経過時には  $103.26 \pm 8.17$  nmol/mg protein/min で, そして 3 時間以後から 24 時間まで CO 活性値はこの低い値が保たれた。受傷部より 1 cm 離れた尾側部の脊髄組織の CO 活性値は, 受傷部と同様, 術後 1 時間で明らかに低下し, 3 時間後でもほぼ同程度の低値であったが, その低下は直接傷害部位の CO 値よりやや少なかった。しかし, 受傷 24 時間後には傷害頭側部脊髄組織内 CO 活性値近くにまで達した。一方, 障害部頭側脊髄内 CO 活性値は, 受傷後 1~3 時間の間ではほとんど減少せず, 6 時間で減少傾向が認められ, 24 時間経過すると回復する傾向が認められた。

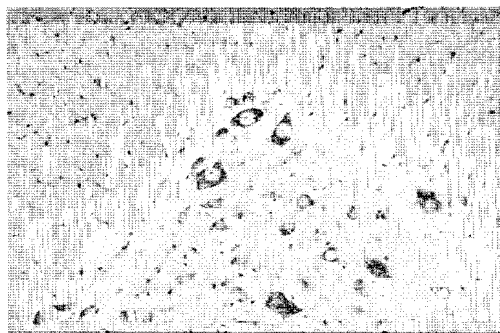


図14 クリップによる脊髄損傷作製24時間後のラット脊髄組織横断面とコントロールラット脊髄 (Klüver-Barrera 法による髄鞘染色) ×200倍 (前角部)  
上図 クリップをかけた部位から頭側方向に3mm離れた部位の脊髄組織横断面  
下図 同部位のコントロールラットの脊髄組織横断面

### 3) 抗酸化酵素 (SOD) 活性の変動

硬膜を露出したがクリップによる圧迫を加えなかった動物より摘出した脊髄内の SOD 活性値は、低い値 ( $1.63 \pm 0.66$  U/mg protein) であった。しかし脊髄圧迫による脊髄組織の損傷を生じさせた脊髄内 SOD 活性値は、受傷後より急激でかつ大きな増加を示し、以後再びゆるやかに減少する変動を示した (図16)。すなわちクリップによる硬膜外より脊髄

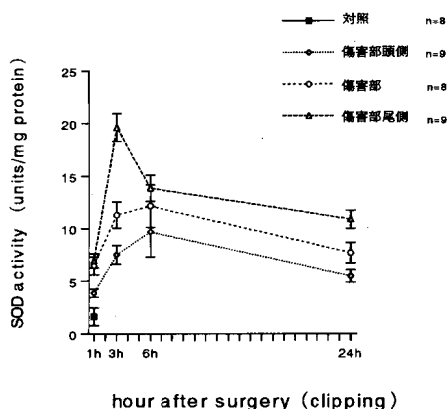


図16 脊髄損傷ラット脊髄組織内 SOD 活性値の経時的変動  
対照に対してすべて  $P < 0.01$  で有意差認める。  
mean  $\pm$  SEM

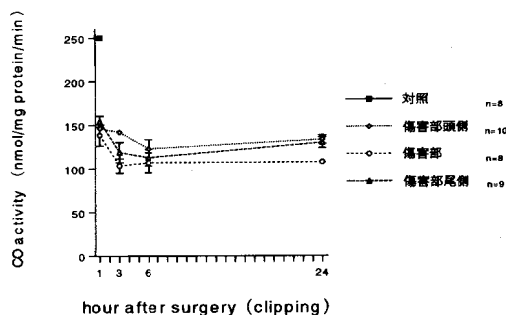


図15 脊髄損傷ラット脊髄組織内 CO 活性値の経時的変動  
対照に対してすべて  $P < 0.01$  で有意差認める。  
(n = 8) mean  $\pm$  SEM

に圧迫を加えた後の受傷脊髄組織内 SOD 活性値は、傷害部では受傷1時間後で急激に ( $6.45 \pm 0.84$  U/mg protein と) 上昇し、3時間にはさらに  $11.3 \pm 1.24$  U/mg protein と SOD 活性の急激な増大が示され、受傷後6時間ではさらに増加したが、以後ゆるやかに減少して24時間後には受傷後1時間での値に近い活性にまで低下するのが認められた。傷害部より尾側部脊髄組織内 SOD 活性値は極めて大きな変動を示した。すなわち、受傷後1時間で約3倍の活性増強がおり、3時間目には受傷前の10倍もの SOD 活性増加が認められた。しかし、6時間目には6~7倍の値

に低下し、以後ゆるやかに低下傾向が示されたが、24時間後でも依然として5～6倍の高値に留まっていた。一方、傷害頭側のSOD活性値はやはり受傷後6時間目までかなり急激な活性増加がみられ、24時間後には次第に下降傾向がみられたが、傷害部や傷害部頭側と比べると、その変動はやや少なかった。

#### 4) 乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性の変動

クリップによる圧迫を加えないコントロール動物より摘出した脊髄組織内LDH活性は、5.0 IU/gproteinと比較的低値であった。クリップによる圧迫を加えた損傷部位脊髄組織内LDH活性値は、1時間後は $3.92 \pm 0.93$  IU/gproteinで、対照脊髄の値に近い低値であったが、受傷後6時間目には $8.53 \pm 0.96$  IU/gproteinと著明に増大した。以後僅かに酵素活性の減少傾向はみられるものの、24時間後でもやはりやや高いレベルに保たれた。一方、傷害部より尾側の脊髄組織内LDH活性値は、受傷後3～6時間で上昇傾向がみられ、24時間後には $12.25 \pm 3.02$  IU/gproteinと受傷前の2倍以上の高い酵素活性が認められた。傷害頭側部脊髄内のLDH活性値は、術後3時間目にわずかに低下傾向がみられたけれども、24時間後までほぼ術前の値が持続して示された(図17)。

#### 考察

##### (1) CO活動の変動

Demopoulos<sup>34</sup>らは、ネコを用いて作製した脊髄損傷例で、脊髄組織内の多価不飽和脂肪酸が減少し、膜中のコレステロール含量も低下し、抗酸化物であるアスコルビン酸量が減少しているという測定結果を得た。このような実験成績を生じた理由として、虚血の経過中組織内で過酸化反応が進行する機序について、以下のような幾つかの考察を行っている。すなわち、①虚血によりミトコンドリア呼吸鎖末端で酸素の供給が欠乏する。②虚血によりO<sub>2</sub>供給が不足して電子伝達系に過剰の電

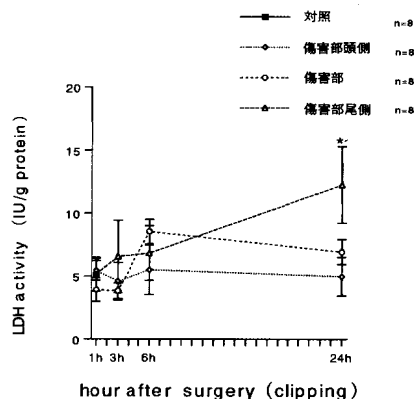


図17 脊髄損傷ラット脊髄組織内LDH活性値の経時的変動

\* p < 0.05

(n = 8) mean ± SEM

子がたまり、コエンザイムQが電子の一つ欠けたフリーラジカルとなる。③コエンザイムQラジカルは膜脂質の多価不飽和脂肪酸から水素原子を奪い、膜内にアルキルラジカルが生成する。④こうして生成したアルキルラジカル基は酸素を補足して過酸化反応が連鎖的に起こると推測される。虚血時には、以上の①から④の一連の化学反応が連続的に進行するため、結果として細胞膜の構造と機能が傷害され、ひいては細胞活動の低下や細胞死が招来されるものと彼らは考えた。

また虚血などの傷害が加えられた時に生ずる脊髄組織の損傷によって、組織内に過剰に発生するフリーラジカルと生体成分との反応を介して、細胞膜を構成しているコレステロールが酸化して生ずる産物や、過酸化脂質などが増加することが知られている。またこれら細胞傷害性有害分子であるフリーラジカルと反応して、それを消去するアスコルビン酸や、トコフェノール、ユビキノールなどの物質濃度が細胞内で減少することも知られている。Hsu<sup>35</sup>らは、動脈壁の収縮や血小板凝集に

たいして拮抗作用を示すトロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)とPG I<sub>2</sub>の比が、組織の虚血負荷の後に増大しているのを報告している。この場合アラキドン酸の遊離量が増加してもPG I<sub>2</sub>が増えないのは、PG合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼがフリーラジカルによって不活化されるものと考えられた。

今回の実験結果で、硬膜外からクリップにより圧迫を加えて脊髄組織障害を与えた短時間後(1時間後)には、圧迫傷害部の脊髄内CO活性値は極めて急激に低下して非損傷標本の1/2近くまで急激に達し、3時間経過時CO活性値はさらに低下し、以後低値が保たれた。そして特に傷害負荷部位の尾側部の脊髄内では、CO活性値の低下は術後3時間目で損傷部と同様に低下したが、24時間後には回復傾向が認められた。一方、損傷を与えた頭側部では脊髄組織内のCO活性値の変動は、最も少なかった。この点については脊髄に分布する血液供給量に差異があるためか、あるいは脊髄内軸索の圧迫によりWaller変性などの変化が尾部脊髄組織に生ずる可能性が考えられうるが、今後検討すべき課題であろう。

## (2) SOD活動の変動

本実験でクリップ負荷直後の早期(1時間)から脊髄傷害部組織のSOD活性値は急激に上昇し、さらに3時間から6時間にかけてゆるやかに上昇し続けた後、次第に低下していく傾向が認められた。傷害直下の脊髄組織内で細胞破壊と脊髄循環不全が生ずる結果、細胞外にGluのような第一次ニューロンの興奮性伝達物質が多量に細胞外に流出し、細胞傷害作用を示すGluなどの細胞外濃度の上昇がおこる。このような変化が、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の異常な上昇を招来して、正常細胞内では不活性化状態にあるエンドヌクレアーゼやフォスホリパーゼや一酸化窒素合成酵素(NOS)など諸酵素の活性化を引き起こすよ

うになると考えられる。その結果、O<sub>2</sub><sup>-</sup>などフリーラジカル基を処理して消去するために、傷害が加えられた直後の早期からSOD活性の増加が起こったと思われる。

林ら<sup>36</sup>は、脊髄損傷を加えたラットの損傷負荷後組織内 $\alpha$ -トコフェノール濃度を高速液体クロマトグラフィー法で解析した。その報告では、フリーラジカルのスカベンジャーである $\alpha$ -トコフェノール値は、受傷前の対照値と比べて受傷後2~3時間目で有意に低下し消耗状態になり、受傷後の一過性の上昇は認められていない。一方でKeynar<sup>37</sup>らは、脊髄損傷ラットで脊髄損傷部および周辺の組織内SOD活性値は、傷害を加えた部位、時間とも有意差は見られなかったが、カタラーゼ(CAT)活性値が傷害部位で高く認められたと報告している。従って彼等は、SODによるO<sub>2</sub><sup>-</sup>処理機構の経過中で生成されたH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が、発生基のO<sub>2</sub>に分解されて生ずる細胞傷害によるものと考えている。いずれにしても、脊髄に加えられたクリップ圧負荷時間の違いや、測定方法が今回のわれわれの場合と異なっている点がある。また彼等の示した脊髄組織内の圧迫負荷により生じたSOD活性の変動の成績は、今回の我々の結果とは異っている。彼らの場合、脊髄圧迫負荷後様々な時間で摘出した脊髄組織の保存温度が-20℃であり、我々(-80℃)の場合よりも高いので、僅かながら酵素活性の不活化が不充分であった可能性も考えられる。

神経変性過程は極めて複雑で、簡単に説明することは困難である。様々な組織変性経路のうち、細胞傷害の除去のために有効とされるいろいろな物質を投与する方策が試みられている。たとえば、in vitroでみられる遅発性神経細胞死の抑制に対しては、ビタミンE投与の有用性が示されている。すなわち、脊髄ラットにビタミンE負荷した場合、脊髄血流量が対照例より高く認められたこと、また

ビタミンEには、血管壁でのPG I<sub>2</sub>の産生を高める作用があり、血小板内のTXB<sub>2</sub>の産生を抑制する作用があることが知られている。<sup>38</sup>したがって、ビタミンE負荷によってフリーラジカルの過酸化作用が抑制される方向に働くために、細胞傷害の程度が減少して神経細胞死が抑えられている可能性が指摘されている。またアミノステロイド剤(U-74006 F)の投与は、脊髄損傷後の脊髄血流量の低下を防止する作用をもつとされており、<sup>39</sup>その脊髄保護作用はこの薬剤の脂質抗酸化作用によるものと考えられている。その他に活性酸素消去系に関する酵素あるいは薬剤としては、CAT, GSH-Px, グルタチオン(GSH), およびallopurinol, oxypurinolなどの合成抗酸化剤などさまざまなものがあり、それぞれの薬剤作用の有効性が注目されている。生体に投与されて血流中に取り込まれ体内を循環する過程で、すぐに糸球体で濾過されないで体内に貯留して循環している時間を長びかせて、血液pHが低下しているのに対応してその局所にその薬剤が濃縮されて集まるようにつくられているSM-SODや、FA-SODなど合成活性酵素消去剤があり、これらを生体に投与した場合の有用性が指摘されている。ヒトの血液中の、SOD濃度は平均約7.5 mg/dlであるので、40~50 mlの血液中には約9,000~12,000 unitに相当するSODが存在することになる。しかしながら、ヒトの組織中では、そのSOD濃度は主として細胞内に分布しているので、細胞外は極めて低いと考えられる。組織中のSOD濃度が高いことがとりもなおさず、外から加えられた細胞傷害刺激に対して果たしてどの程度有効であったかについては、実際に解明されているわけではない。ただ、虚血などの傷害が神経組織に加えられた場合、発生するフリーラジカルのO<sub>2</sub><sup>-</sup>がSODによって処理されてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の発生の増加が起こることは予想がつくことであ

る。また、異常SOD遺伝子のみを実験的に移入して作製したトランジェニックマウスでは、細胞内SOD活性が高く認められており、その結果みられる臨床症状はダウン症患者でみられる神経系の異常に類似した所見が得られている。<sup>40</sup>しかしながらまだ、SODが神経系の機能の変調にどのように関与して働いているかを知る知見については、未だ未知の部分が多い。

今回の実験で、脊髄圧迫後に変動する組織内SOD活性値の変動は、クリップによる圧迫を加えた頭側部脊髄内では、傷害部よりもやや少ない変動が示された。これに対して、傷害部尾側脊髄内では傷害部よりもはるかに大きなSOD活性値の変動が示された。その理由の一つとしては圧迫部より下部脊髄内では、その中を下行する第一運動ニューロンなどの軸索が圧迫されて末端部にWaller変性が生じたために、O<sub>2</sub><sup>-</sup>の発生が増大した可能性も否定出来ない。というのは、クリップで圧迫した脊髄部位は主として側方であるため、その部分を下降する遠心性軸索の変性がより大きくなる可能性が考えられた。

### (3) LDH 活動の変動

好氣的エネルギー産生系が脊髄損傷後、急激に傷害されて、ミトコンドリア内膜上にある電子伝達系複合酵素系のうちCO活性が急激に低下すると、代償的に嫌気性解糖系が活性化されて、組織内に乳酸の蓄積が生ずる。こうして組織内に増加した乳酸を処理するために、組織内のLDHの活性化がおこると考えられる。すなわち脊髄組織の虚血性傷害によって組織内の好氣的エネルギー産生系が傷害されて、それを代償するべく嫌気性解糖系の発動が生化学的にも示されたわけである。

この実験の場合、LDH酵素の活性値の増加としてとらえられる嫌気性エネルギー産生系の増大は、傷害部より頭側ではほとんど変動がみられなかった。しかし、前述のSOD酵

素活性の変動の場合と同様に、このLDH活性も、傷害部より尾側の脊髄組織内で大きく、しかも長期間(24時間)にわたって持続的LDH活性増加として示された。これは前項(2)と同様な可能性が考慮される結果と考えられよう。

#### 小括

Pentobarbitalの腹腔内投与下の全身麻酔下に、ラットの背部皮膚を切開して、脊髄硬膜上よりクリップをかけて直接脊髄に圧迫刺激(120g加圧/5分間)を負荷した後に、時間経過をおって動物を断頭後脊髄組織を摘出して凍結(-80℃)保存した。この摘出脊髄を圧迫した局所(巾約1cm)およびそこから頭側あるいは尾側に約1cm離れた脊髄組織を1cm切断して、それぞれの組織内のCO, SOD, およびLDH活性値の変動を術後24時間まで追求して調べた。

1) 好氣的エネルギー産生系の主要酵素であるチトクロームC酸化酵素(CO)活性値は、脊髄に圧迫刺激を加えて3時間後には傷害部で急速な低下が認められ、以後低い活性値のまま24時間目まで維持された。しかし、頭側脊髄組織内では、CO活性値の変動は比較的僅かな変動に留まったが、一方尾側脊髄では損傷後3から7時間目でCO活性値は、24時間後には回復傾向が認められた。

2) 虚血刺激などの際に急激に発生する細胞障害性の $O_2^-$ を消去するSOD酵素活性は、脊髄圧迫刺激により傷害部では術後6時間目まで急激に増大したが、以後ゆるやかに低下した。この変化は傷害部よりかなり小さい動きであったが、尾側ではより大きな変動が示され、特に術後3時間には一過性に刺激前の数倍にも達した。

3) 脊髄圧迫によるエネルギー代謝系の好氣的から嫌氣的機構への変換は、脊髄圧迫刺激を加えた部位では6時間後には乳酸の蓄積がおこり、LDH活性は24時間目まで高い値が

得られた。しかし、傷害部頭側脊髄ではLDH活性値は圧迫刺激負荷後もほとんど変動がみられなかった。一方、傷害部尾側組織内LDH活性値は、術後持続的に増大を続けて、24時間目には2倍以上の高い活性が示された。

以上のような実験結果から、脊髄に加えられた圧迫刺激は、刺激が除去された後も組織内の細胞内の傷害が持続し、この変化は加えられた局所よりも尾側脊髄でより大きな傷害が残存していることが明らかにされた。

#### 総括

組織内で生じた脊髄ニューロンの変性・脱落の過程に関連して、神経組織内で異常に発生して細胞傷害をひきおこすフリーラジカルの消去を触媒して細胞機能を保護する酵素であるSOD, 好氣的エネルギー産生系電子伝達鎖上の複合酵素であるCO, 機能障害のため効率の良い好氣的エネルギー産生系から効率の悪い嫌氣的解糖系の転換の程度を示すLDH, および $Ca^{2+}$ 依存性で細胞内タンパク架橋反応を促進して細胞死を引き起こす細胞変性指標酵素のTG活性値の変動が、それぞれどのように変動するののかについて、ALSで死亡した脊髄およびラットに循環傷害あるいは圧迫刺激を用いて、経時的に検討した。

第1章では、ヒト剖検時に摘出・凍結した脊髄標本について、上述の各酵素活性値を測定した。その結果今回測定した孤発性ALSの脊髄組織内SOD活性は、非ALS脊髄と比し前角部で高く後索部でやや低かったが有意差はなかった。しかし脊髄横断標本の組織学的検索で、前角ニューロンの選択的変性・脱落と、側索部の瘢痕化(硬化症)が認められ、好氣的エネルギー産生系に関与するミトコンドリア酵素(CO)の減少と、細胞変性標識酵素(TG)の著明な低下が認められた。ALS患者脊髄では、組織学的に明らかに変動がみられた前角、側索部以外でも、TG活性値の低下が認められた。しかし、ALS患者より摘出し

た脊髄標本は、ニューロン変性が完了した終末期の標本といえる。そこで脊髄内運動ニューロン変性が発生し進行するその経時的变化を観察するために動物(ラット)を用いて実験を実施した。

第2章ではラットの後脊髄動脈の片側枝を焼灼・閉塞手術を行って、脊髄半側の組織破壊を生じさせた後、種々の時期で脊髄を摘出して、その形態学的観察ならびに上記各酵素活性値の測定を行い、生じた変動の時間的経過を調べた。血管閉塞後3日目では明らかな脊髄横断面の組織変性を認めなかったが、7日目では傷害側半分の灰白質および白質の著しい組織破壊が認められ一部非傷害側にも波及しているのが認められた。酵素活性の時間的変動では、術後1日目ですでに傷害側脊髄組織内のSOD, LDH およびTG 活性値はいずれも非傷害側と比較して上昇が認められ、CO 活性値は逆に低下を認めた。CO 活性は、傷害側脊髄で受傷直後より著明に減少し、その変化は3週間にわたって持続した。LDH 活性は、傷害側脊髄半側で受傷直後より著明な増大が認められ、3週間高値が保たれた。SOD 活性は、傷害を与えた直後に一過性に爆発的に増大したが、1週間後には、元のレベルに戻った。TG 活性は、傷害側で受傷直後よりも上昇を続け、約1週間高いレベルに保たれたが、次第に減少して1か月後には術前の約1/2の値となった。これは脊髄内ニューロンの変性・脱落に対応した生化学的変動のひとつとして考えられた。

これらの生化学的変動は、脊髄の形態学的変化が認められるはるか以前より認められたことから、細胞変性の初期過程を示す重要な生化学的変化であると考えられた。LDH, CO 活性では非傷害側にも程度は低いが類似の変動を呈したことから、循環傷害が正中を越えて対側におよんでいることが示された。

第3章では、臨床的にみられる圧迫性脊髄

損傷のモデルにしばしば用いられる実験モデルとして、ラットの脊髄硬膜上よりクリップをかけて直接脊髄組織に圧迫を加えた後時間経過を追って摘出して凍結保存した脊髄組織標本作製し、前述のCO, SOD, LDHの各酵素活性値の経時変動を調べた。

好氣的エネルギー産生系のミトコンドリア内主要酵素であるCO 活性値は、脊髄に圧迫刺激を加えて3時間後には傷害部で急速に低下して、以後低い活性値のまま24時間目まで維持された。しかし、傷害部より頭側脊髄内CO 活性値の変動は少なく、尾側組織内酵素活性は24時間後には回復傾向がみられた。細胞傷害性の $O_2^-$ を消去するSOD 酵素活性は、脊髄圧迫刺激により傷害部では術後6時間目まで急激に増大したが、以後ゆるやかに低下していった。傷害部尾側では組織内SOD 活性の変動はより大きく、術後3時間目で一過性の大きな変動を示し、それ以後も高い値に留った。一方頭側部の酵素活性は、傷害後より緩やかな変動がみられた。

脊髄圧迫によるエネルギー代謝系の好氣的から嫌氣的機構への変換を示すLDH 活性値は、脊髄圧迫刺激を加えた部位では6時間後で上昇し酵素活性値は24時間目まで高い値が得られた。しかし、傷害部頭側脊髄ではLDH 活性値は圧迫刺激負荷後もほとんど変動がみられなかった。一方、傷害部尾側組織内LDH 活性値は、術後持続的に増大を続けて、24時間目には術前の2倍以上の高い活性値が示された。

以上のような実験結果から、脊髄に加えられた圧迫刺激は、刺激が除去された後も組織内の細胞内の傷害が持続し、この変化は加えられた局所よりも尾側脊髄でより大きな傷害が残存していることが明らかにされた。これは脊髄軸索のワーラー変性の遮断などが好氣的エネルギー産生系の活動を障害し嫌氣的解糖系を増大させているのかもしれない。しか

し上行する感覚神経軸索のワーラー変性は、クリップ部位よりも頭側に生じる可能性がある。本実験の脊髄クリップは、脊髄両側方から行っているのだから上行性軸索より下行性の運動ニューロン軸索をより多く障害している可能性が考えられる。したがって今回の実験のように脊髄全体を測定するのではなく、さらに脊髄を細分割して測定する必要がある。

稿を終えるにあたり、直接に終始懇篤なる御指導と

御校閲を賜りました藤田保健衛生大学医学部生理学教室、永田 豊教授に深く謝意を捧げます。多大な御指導を頂きました同大学整形外科教室ならびにリハビリテーション医学教室(兼任)吉澤英造教授に深謝申し上げます。また、生化学的測定の御指導・実験の御助言をして下さいました生理学教室の藤田公和博士、安藤正人博士(現愛知学泉大学助教授)、本学生理学の山内理充先生、柴山健三先生、國井修一先生、芳本信子先生、病理組織作製の御指導を頂きました加藤寿章先生ならびに変わらぬ励まし御助言を頂きましたリハビリテーション医学教室才藤栄一助教授に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Mulder, D. W., Kurland, L. T., Offord, K. P., and Beard, C. M. (1986) Familial adult motor neuron disease; Amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 36. 511-517.
- 2) Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H.-X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S. M., Berger, R., Tanzi, R. E., Halperin, J. J., Herzfeldt, B., Bergh, V. D. R., Hung, W.-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D. W., Smyth, C., Laing, N. G., Sonriano, E., Pericak-Vance, A. M., Haines, J., Rouleau, G. A., Gusella, J. S., Horvitz, H. R., and Brown, R. H. Jr. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362. 59-62.
- 3) Gurney, M. E., Pu, H., Chin, A. Y., Canto, D. M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H.-X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R. L., and Siddique, T. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu/Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264. 1772-1775.
- 4) Pobberecht, W., Sapp, P., Viaene, M. K., Rosen, D., Yasek, D. M., Haines, J., Horvitz, R., Theys, P., and Brown, R. (1994) Cu/Zn superoxide dismutase activity in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 62. 384-387.
- 5) Gilad, G. M., Varon, L. E., and Gilad, V. H. (1985) Calcium dependent transglutaminase of rat sympathetic ganglion in development and nerve injury. *J. Neurochem.* 44. 1385-1390.
- 6) McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 244. 6049-6055.
- 7) Wharton, D. C. and Tzagoloff, A. (1967) Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol.* 10. 245-250.
- 8) Lorand, L., Campbell-Wilkes, L. K., and Cooperstein, L. (1972) A filter paper assay for transamidating enzymes using radioactive amine substrates. *Anal. Biochem.* 72. 248-252.
- 9) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72. 248-254.
- 10) Nagata, Y., Okuya, M., Watanabe, R., and Honda, M. (1982) Regional distribution of cholinergic neurons in human spinal cord transection in patients with out motor neuron disease. *Brain Res.* 244. 233-229.
- 11) 藤田公和, 永田 豊, 本多虔夫 (1993) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の脊髄内遊離アミノ酸含量. *臨神経* 33. 985-987.
- 12) Fujita, K., Nagata, Y., Konno, K., Kanno, T., and Selvakumar, K. (1993) Effect of unilateral motor cortex ablation on activity of choline acetyltransferase and levels of amino acid transmitter candidates in the spinal cord of adult monkeys. *Neurochem. Res.* 18. 731-736.
- 13) Nowicki, J. P., Durall, D., Poigenet, H., and Scatton, B. (1991) Nitric oxide mediates



- neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 204. 339-340.
- 14) Nakano, R., Sato, S., Inuzuka, T., Sakimura, K., Mishina, M., Takahashi, K., Ikuta, F., Honma, Y., Fujii, J., Taniguchi, N., and Tsuji, S. (1994) A novel mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200. 695-703.
- 15) Bowling, A. C., Schulz, J. B., Brown, R. H. Jr., and Beal, M. F. (1993) Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 61. 2322-2325.
- 16) Jones, C. T., Brock, D. J. H., Chancellor, A. M., Warlow, C. P., and Swingle, R. J. (1993) Cu/Zn superoxide dismutase (SOD 1) mutations and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 342. 1050-1051.
- 17) Kish, S. J., Bergeron, C., Rajput, A., Dozic, S., Mastrogiacomo, F., Chang, L. J., Wilson, J. M., Distefano, L. M., and Nobrega, J. N. (1992) Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 59. 776-779.
- 18) Simonian, N. A. and Hyman, B. T. (1993) Functional alteration in Alzheimer's disease; Diminution of cytochrome oxidase in the hippocampal formation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52. 580-585.
- 19) Mutisya, E. M., Bowling, A. C., and Beal, M. F. (1994) Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 63. 2179-2184.
- 20) Schapira, A. H. V., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., and Marsde, N. (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54. 823-827.
- 21) Dimlich, R. V. W., Showers, M. J., and Shipley, M. T. (1990) Densitometric analysis of cytochrome oxidase in ischemic rat brain. *Brain Res.* 516. 181-191.
- 22) Kawashima, S., Ihara, Y., and Inomata, M. (1989) Transglutaminase and calcium protease activities in Alzheimer's disease brain. *Biomed. Res.* 10. 17-23.
- 23) Almeida, A., Allen, K. L., Bates, T. E., and Clark, J. B. (1995) Effect of reperfusion following cerebral ischemia on the activity of the mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain. *J. Neurochem.* 65. 1698-1703.
- 24) 吉田英治, 李野謙次, 青木真一郎, 高橋 昭 (1993) 神経疾患患者髄液中のsuperoxide dismutase. *臨神経* 33. 21-25.
- 25) Pulsinelli, W. (1995) The ischemic penumbra in stroke. *Sci. Am. Sci. Med.* 2. 16-25.
- 26) Ando, M., Nagata, Y., and Hammerslag, R. (1991) Time course of plasma T 3 and T 4 levels and tissue transglutaminase activity following injection of thyroid hormones in tadpoles. *Zool. Sci.* 8. 721-727.
- 27) Allen, A. R. (1911) Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *JAMA* 57. 878-880.
- 28) Allen, A. R. (1914) Remarks in histopathological changes in spinal cord due to impact; An experimental study. *J. Nerv. Ment. Dis.* 41. 141-147.
- 29) Rivlin, A. S. and Tator, C. H. (1978) Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg. Neurol.* 10. 39-43.
- 30) Rivlin, A. S. and Tator, C. H. (1978) Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. *J. Neurosurg.* 49. 844-853.
- 31) Wallace, M. C. and Tator, C. H. (1986) Relationship between posttraumatic ischemia and hemorrhage in the injured rat spinal cord as shown by colloidal carbon angiography. *Neurosurgery* 18. 433-439.
- 32) Tator, C. H. (1973) Acute spinal cord injury in primates produced by inflatable extradural cuff. *Can. J. Surg.* 16. 222-231.
- 33) Ducker, T. B. (1976) Experimental injury of the spinal cord. In *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 25. P. J. Vinken and G. W. Bruyn (eds.), pp. 9-26, North-Holland, Amsterdam
- 34) Demopoulos, H. B., Flamm, E. S., Pietronigro, D. D., and Selinman, M. L. (1980) The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 492. 91-119.
- 35) Hsu, C. Y., Halushka, P. V., Hogan, E. L., and Cox, R. D. (1986) Increased thromboxane level