



Title	脊髄障害を対象とした動物モデルと血液脊髄関門機能に着目した治療方法の開発
Author(s)	五月女, 慧人
Description	配架番号 : 2768
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15450号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15450
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89988
Type	doctoral thesis
File Information	SOTOME_Akihito.pdf



学 位 論 文

脊髄障害を対象とした動物モデルと

血液脊髄関門機能に着目した治療方法の開発

(Research of Spinal Cord Disorders for Development of an
Animal Model and a Therapeutic Strategy via Protection of
Blood-Spinal Cord Function)

2 0 2 3 年 3 月

北 海 道 大 学

五 月 女 慧 人

Akihito Sotome

学 位 論 文

脊髄障害を対象とした動物モデルと

血液脊髄関門機能に着目した治療方法の開発

(Research of Spinal Cord Disorders for Development of an
Animal Model and a Therapeutic Strategy via Protection of
Blood-Spinal Cord Function)

2 0 2 3 年 3 月

北 海 道 大 学

五 月 女 慧 人

Akihito Sotome

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	7 頁
緒言	8 頁
方法	10 頁
結果	20 頁
考察	39 頁
総括および結論	41 頁
謝辞	42 頁
利益相反	43 頁
引用文献	44 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の学術雑誌に現在投稿中である。

Akihito Sotome, Ken Kadoya, Yuki Suzuki, Norimasa Iwasaki

Spinal canal and spinal cord in rat continue to grow even after sexual maturation

International Journal of Molecular Sciences (2022 年 6 月 投稿済み)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 五月女 慧人、角家 健、鈴木 裕貴、遠藤 健、浅野 毅、中川 慎介、前仲 勝美、岩崎 倫政
パパペリンの血液脊髄関門機能維持を介した脊髄損傷後神経保護効果
第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会、2020 年 10 月 15-16 日、オンライン
2. Akihito Sotome, Ken Kadoya, Yuki Suzuki, Takeshi Endo, Tsuyoshi Asano, Katsumi Maenaka, Shinsuke Nakagawa, Norimasa Iwasaki
Clinical antispasmodic drug, Papaverine, is neuroprotective after spinal cord injury by minimizing secondary injury via protection of blood spinal cord barrier function
The 60th International Spinal Cord Society Annual Scientific Meeting, 29 September- 2 October 2021, Vancouver, Canada
3. 五月女 慧人、角家 健、鈴木 裕貴、遠藤 健、浅野 毅、中川 慎介、前仲 勝美、岩崎 倫政
抗精神薬 Brexpiprazole の急性期脊髄損傷に対する神経保護効果の検討
第 36 回日本整形外科学会基礎学術集会、2021 年 10 月 14-15 日、三重県伊勢市
4. 五月女 慧人、角家 健、鈴木 裕貴、遠藤 健、浅野 毅、中川 慎介、前仲 勝美、岩崎 倫政
抗精神薬 Brexpiprazole の急性期脊髄損傷に対する神経保護効果の検討
第 56 回脊髄障害医学会、2021 年 11 月 18-19 日、栃木県宇都宮市

5. 五月女 慧人、角家 健、鈴木 裕貴、岩崎 倫政
Lewis ラットの脊柱管と脊髄は生後 8 週以降も拡大し続ける。
第 95 回日本整形外科学会学術総会、2022 年 5 月 19-22 日、兵庫県神戸市
6. 五月女 慧人、角家 健、鈴木 裕貴、遠藤 健、浅野 毅、中川 慎介、前仲 勝美、
岩崎 倫政
次硝酸ビスマスの急性期脊髄損傷に対する神経保護効果とその機序の解明
第 37 回日本整形外科学会基礎学術集会、2022 年 10 月 13-14 日、宮崎県宮崎市
7. 五月女 慧人、角家 健、鈴木 裕貴、遠藤 健、浅野 毅、中川 慎介、前仲 勝美、
岩崎 倫政
Lewis ラット脊柱管径と脊髄径の成長曲線：慢性圧迫性脊髄症モデル作成の至適
週齢
第 37 回日本整形外科学会基礎学術集会、2022 年 10 月 13-14 日、宮崎県宮崎市

要旨

【背景と目的】

物理的原因による脊髄障害には、外傷による脊髄損傷と、慢性的圧迫による圧迫性脊髄症がある。どちらも、本質的な治療方法はいまだ確立されていない。

急性脊髄損傷の場合、機械的損傷である一次損傷に引き続いて、生物学的反応である二次損傷が起こり、脊髄の障害範囲が拡大する。この二次損傷には、血液脊髄関門（BSCB）の破綻が関与しており、BSCB の破綻を防げば、二次損傷は軽減することが知られているが、未だ BSCB の破綻を防ぐ臨床的手段は確立されていない。我々は先行研究において、培養脳血管内皮細胞を使用した BSCB 保護薬剤のスクリーニング方法確立した。この方法で、既存薬 3,200 薬をスクリーニングした結果、最も高い脳血管内皮細胞保護効果を示す薬剤として、次硝酸ビスマス（Bismuth Subnitrate: BS）が同定された。そこで、本研究では、BS は脊髄損傷後の BSCB 保護効果と神経組織保護効果を持つという仮説を設定した。

圧迫性脊髄症も脊髄損傷と同様に、BSCB の破綻が病態に関与するため、BS による BSCB の保護が病態改善に有効な可能性がある。近年、圧迫性脊髄症のモデルとして、生体内で膨張する人工材料をげっ歯類の脊柱管内に留置する方法が使用されているが、人工材料の膨張速度が速いこと、げっ歯類の脊柱管径、脊髄径の成長曲線が不明で、挿入すべき週齢が不明であることから、再現性や実用性に欠ける問題点があった。そこで、本研究では、ラットの脊柱管径、脊髄径の成長曲線を明らかにすることとした。

以上より、本研究の具体的目的は以下の4つとした。1) Lewis ラットの脊柱管径、脊髄径の成長曲線を明らかにすること、2) BS が BSCB 保護効果を持つか明らかにすること、3) BS が脊髄損傷に対する治療効果を持つか明らかにすること、4) BS の薬理機序を解明すること。

【方法】

1) 4～40 週齢の Lewis ラットに脊髄造影 CT を撮影した。第五頸椎（C5）と第八胸椎（T8）高位の冠状断 CT 画像にて、脊柱管径、脊髄径を計測し、Space available for the spinal cord（SAC）を算出した。

2) 4、8、24 週齢の Lewis ラットの雌を灌流固定し、C5 頸椎の冠状断切片に脱灰組織染色を行った。

3) BS の脳血管内皮細胞保護効果の濃度依存性を確認するため、脳血管内皮細胞（hCMEC/D3）を BS（0～500 μ M）で刺激後、過酸化水素（H₂O₂）負荷を与え、最終的な細胞活性を定量した。

4) ラット初代脳血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトで構成する、in vitro

BSCB 模擬モデルに、無酸素無糖（OGD）負荷後、BS を添加し、経内皮的電気抵抗（TEER）および sodium fluorescein（Na-F）透過性を定量した。

5) C57/BL6 マウスを用いて、BS または control を前日に投与してから外傷性脳損傷を作成し、24 時間後の損傷部周囲の IgG 漏出面積を組織学的に定量した。

6) C57/BL6 マウスを用いて、BS または control を前日に投与してから、C5 頸髄部分切断損傷を作成し、24 時間後の IgG 漏出面積を組織学的に定量した。

7) Lewis ラットの C5 頸髄に圧挫損傷を作成直後に BS または control を腹腔内投与し、2 週後に灌流固定し、脊髄の損傷面積と IgG 漏出面積を組織学的に定量した。

8) Lewis ラットの C5 頸髄に圧挫損傷を作成直後に BS または control を腹腔内投与し、4 週後、8 週後に Electric von Frey 試験とトレッドミル歩行解析試験を行った。損傷 8 週後に灌流固定し、脊髄の空洞面積とグリア瘢痕面積を定量した。

9) hCMEC/D3 に BS または control を投与し、24 時間後の RNA シーケンス解析を行った。

10) RNA シーケンスで、BS による薬理機序候補因子を特定後、その候補因子の発現量を、hCMEC/D3 とラット損傷脊髄で、酵素リサイクリング法を用いて定量した。

11) 特定した候補因子の阻害薬剤を hCMEC/D3 に投与し、BS の細胞保護効果が減弱するか検討した。

【結果】

1) ラットの脊柱管径は 12～20 週齢まで、脊髄径は 20～24 週齢まで拡大していた。圧迫性脊髄症に最も重要な縦径の SAC は 8 週齢以降で変動がなかった。

2) C5 頸椎の脱灰組織評価では、椎体と椎弓の一次骨化核は 4 週齢で既に消失していた。椎弓表面の骨膜は 4 週齢で最も肥厚していたが、徐々に菲薄化し、24 週齢ではほぼ消失していた。

3) BS は hCMEC/D3 の H₂O₂ 負荷に対して、0.25 μ M 以上で、濃度依存性の細胞保護効果を示した。

4) BS は in vitro BSCB 模擬モデルの OGD 負荷に対し、TEER を高値に、Na-F 透過性を低値に保ち、BSCB 機能を保護した。

5) BS は外傷性脳損傷モデルにおいて、損傷後 24 時間の組織評価で高分子タンパクである IgG の漏出を抑制し、BBB 機能を保護した。

6) BS は脊髄部分切断モデルにおいて、損傷後 24 時間の組織評価で高分子タンパクである IgG の漏出を抑制し、BSCB 機能を保護した。

7) BS は脊髄圧挫モデルにおいて、損傷後 2 週の組織評価で、損傷面積を縮小させ、高分子タンパクである IgG の漏出を抑制し、BSCB 保護効果と二次損傷抑制効果を示した。

8) BS は脊髄圧挫モデルにおいて、損傷後 8 週の組織評価で、空洞面積とグリア瘢痕面積を縮小させた。また、損傷後 4 週、8 週の、感覚機能、歩行機能を改善させた。

9) RNA シーケンス解析で、KEGG pathway enrichment analysis を行ったところ、細胞保護作用に深く関与している pathway として、Glutathione metabolism pathway を同定した。

10) BS 投与後の細胞内 glutathione 濃度と、C5 脊髄圧挫後 72 時間の脊髄中の glutathione 濃度を定量したところ、control と比較して有意に glutathione 濃度の上昇をみとめた。

11) Glutathione 産生酵素阻害薬である L-Buthionine-sulfoximine (L-BSO) と BS を hCMEC/D3 に投与したところ、細胞保護効果が濃度依存的に減弱した。L-BSO 自体には細胞障害作用を認めなかった。

【考察】

本研究では、まず、圧迫性脊髄症の動物モデルを作成するための礎となる、ラットの脊柱管径、脊髄径の詳細を明らかにした。ヒトとラットの脊椎、脊髄発達完了時期は全く異なっており、脊髄脊椎疾患の動物モデルに頻用される 8~12 週齢のラットの脊柱管や脊髄は、サイズの増大という点で、未だ発達過程にあると考えられ、これらのラット脊椎脊髄は、必ずしも成人の脊椎脊髄を模擬していないことが判明した。また、ラットの脊柱管の拡大機序には、軟骨内骨化ではなく、膜性骨化が関与し、脊髄の拡大機序には、神経前駆細胞からの分化を介した、神経細胞数、グリア細胞数の増加をその一因として想定している。圧迫性脊髄症モデルをラットで作成する場合の至適週齢は、少なくとも縦径の SAC が平衡に達する 8 週齢以降で、理想的には脊髄の増大が終了する 24 週齢以降が望ましいと考える。

また本研究により、BS はヒト脳血管内皮細胞の細胞保護効果、in vitro BSCB モデルの保護効果、脊髄損傷後 BSCB 保護効果、神経組織保護効果、機能回復効果を持つことが明らかになった。そして BS の脳血管内皮細胞の細胞保護効果は、細胞内 glutathione 濃度上昇を介していた。つまり、BS を脊髄損傷後早期に投与すると、脊髄血管内皮細胞内の glutathione 濃度が上昇し、血管内皮細胞が構成する BSCB 機能が維持された結果、二次損傷が抑制され、最終的な損傷範囲が縮小し、機能回復促進につながったと考える。BS は併用不能な薬剤や使用禁忌疾患がなく、外傷直後や周術期に使用しても問題ないなど、安全性への懸念が乏しい。また、既存薬であるため、新薬と比較して、早期の臨床応用が可能な利点に優れる。以上より、BS の優れた機能改善効果、安全性、既存薬としての利点を踏まえると、BS は急性期脊髄損傷に対する BSCB 保護薬、神経保護薬となる可能性を持つ。また、脊髄損傷以外の BSCB 破綻を呈する

疾患に対しても有効である可能性があり、本薬剤の開発は臨床的意義が高いと考える。

【結論】

ラットの脊柱管径、脊髓径、SAC の経時的推移を明らかにした。ラットの脊柱管径は 12～20 週齢、脊髓径は 20～24 週齢まで拡大し続けるが、縦径の SAC は 8 週齢で平衡に達した。圧迫性脊髓症モデルを作成する場合、最低でも 8 週齢以降、理想的には 24 週齢以降のラットを使用するのが望ましい。また、BS の脳血管内皮細胞保護作用、in vitro BSCB 保護作用、脊髓損傷後 BSCB 保護作用、神経組織保護作用、機能回復促進効果を明らかにした。その薬理機序は、細胞内 glutathione 濃度上昇によることが明らかとなった。BS は脊髓障害に対する神経保護薬、BSCB 保護薬となる可能性を持つ。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ANOVA	Analysis of variance
BBB	Blood-brain barrier
BS	Bismuth Subnitrate
BSCB	Blood-spinal cord barrier
EB	Evans blue
EBM	Endothelial cell growth medium
FC	Fold change
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HE	Hematoxylin-Eosin
L-BSO	L-Buthionine-sulfoximine
Na-F	Sodium fluorescein
NS	No statistical difference
OGD	Oxygen-glucose deprivation
PFA	Paraformaldehyde
RBEC	Rat brain endothelial cells
Reox	Reoxygenation
ROS	Reactive oxygen species
SAC	Space available for the spinal cord
SD	Standard deviation
TEER	Transendothelial electrical resistance
TJ	Tight junction

緒言

高齢化社会の到来と共に、脊髄障害に罹患する患者数が増えている。物理的原因による脊髄障害には、外傷による急性圧迫によって生じる脊髄損傷と、慢性的圧迫によって生じる圧迫性脊髄症がある。どちらも、損傷高位以下の麻痺を生じ、ADL を著しく損なうが、本質的な治療方法はいまだ確立されていない。

急性脊髄損傷の場合、機械的損傷である一次損傷に引き続いて、生物学的反応である二次損傷が起こり、脊髄の障害範囲がより拡大する。この二次損傷には、血液脊髄関門（Blood-Spinal Cord Barrier : BSCB）の破綻が関与している。BSCB は血管壁を形成する血管内皮細胞、BSCB の機能制御や維持を行う周皮細胞（ペリサイト）、血管周囲を被覆するアストロサイトから構成され（Abbott et al., 2010, Daneman and Prat, 2015; Saunders et al., 2014; Sifat et al., 2017; Sweeney et al., 2016; Wong et al., 2013）、脊髄実質と血管内を隔て、イオンや分子、タンパク、細胞などの移動を制御しながら、細胞障害性物質、細胞の神経実質内への流入を防ぎ、脊髄の恒常性を維持している（Abbott et al., 2010; Bartanusz et al., 2011）。この BSCB の破綻を防ぐことによって、二次損傷を軽減させることが可能であり、脊髄損傷患者の予後の改善が期待できる。しかし、BSCB の破綻を防ぐ手段は未だ確立されておらず、脊髄血管内皮細胞保護薬に関する研究も、大きな進展に乏しかった（Bartanusz et al., 2011; Cohen et al., 2009; Rosenberg, 2012; Shlosberg et al., 2010; Sorby-Adams et al., 2017）。我々は、BSCB の主たる構成細胞である血管内皮細胞を用いた High-throughput screening assay を開発し、この assay によって選別した薬剤が、マウス脊髄損傷後の BSCB 機能保護を介して、神経組織を保護し、機能回復を促進することを確認した（Suzuki et al., 2022）。そして、既存薬 3,200 種の薬剤を同様の assay でスクリーニングした結果、次硝酸ビスマス（Bismuth Subnitrate: BS）が、最も高い血管内皮細胞保護効果を示すことを同定した。以上より、脊髄損傷後の BS 投与は、高い BSCB 保護効果と、神経組織保護効果、機能回復促進効果を持つという仮説を着想した。

圧迫性脊髄症は、高齢者の主要な脊椎変性疾患の 1 つであり、年々罹患者が増加し、その薬物治療の確立が求められている。圧迫性脊髄症の病態は、静的圧迫、動的圧迫、虚血などの複合的な要因の関与が推測されているものの、その詳細は未だ不明なままである（Iyer et al., 2016; Vilaça et al., 2016）が、脊髄損傷の二次損傷と同様に、BSCB の破綻が病態形成に関与する報告があり（Blume et al., 2020）、BS による BSCB の保護が、その病態改善に有効である可能性がある。近年、圧迫性脊髄症の病態解明、治療法模索のため、げっ歯類を用いた動物モデルの積極的な開発が行われている。これらの方法は、慢性的に圧迫される脊髄を模擬するために、体内に膨張性材

料や金属のネジを脊柱管内へ挿入して、段階的に脊髄を圧迫するものであるが、いずれも、圧迫の作成速度が速いという問題点があった (Klironomos et al., 2011; Karadimas et al., 2013; Long et al., 2013; Kim et al., 2004; Kurokawa et al., 2011; Ijima et al., 2017; Sun et al., 2017)。また、いずれの研究も慣習的に 8~12 週齢のげっ歯類を用いているが、げっ歯類の脊柱管径、脊髄径の成長曲線が不明で、挿入すべき週齢が不明であり、再現性や実用性に欠ける問題点もあった。そこで我々は、圧迫性脊髄症モデル開発のために、まず、げっ歯類の脊柱管径、脊髄径の詳細を明らかにすることとした。

以上より、本研究は、以下の 4 つの具体的目的の実施を設定した。

- 目的 1 Lewis ラットの脊柱管径、脊髄径の成長曲線と、圧迫性脊髄症モデル作成に至適な週齢の確定
- 目的 2 BS の BSCB 保護効果の確認
- 目的 3 BS の損傷脊髄に対する治療効果検討
- 目的 4 BS の薬理機序解明

一連の研究によって、Lewis ラットの脊柱管径、脊髄径の詳細が同定され、圧迫性脊髄症モデルにおいては、最低でも 8 週齢以降、理想的には 24 週齢以降のラットを使用すべきという知見が得られた。この事実は、今後の圧迫性脊髄症モデルの開発の礎となる可能性が高い。また、BS は *in vitro* BSCB 保護効果を有し、脊髄損傷モデルにおいても BSCB 保護効果、神経組織保護効果を示した。さらに、その薬理機序は Glutathione の上昇による可能性が高いことが示された。BS は急性期脊髄損傷に対する神経保護薬、BSCB 保護薬となる可能性を持ち、臨床への応用が期待できる。ここに、これらの研究の詳細を報告する。

方法

1. 脊髓造影 CT の撮影

Lewis 系ラット (Sankyo Labo Service, Japan) の雄、雌、各 10 匹ずつに対して 4-12 週齢までは 2 週毎、12-40 週齢までは 4 週毎に、脊髓造影 CT を撮影した。ラットは腹臥位とし、ケタミン (75-100 mg/kg, ケタラル, Daiichi Sankyo Propharma corporation, Japan) とメデトミジン (0.5 mg/kg, ドミツール, Orion Corporation, Finland) の混合液を腹腔内投与し、麻酔をかけた。後環椎後頭膜から、造影剤 20~70 ul (Iohexol 300, Hikari Pharmaceutical Company Limited, Tokyo, Japan) を硬膜内に投与し、マイクロ CT (R_mCT2, Rigaku, Tokyo, Japan) を用いて、第五頸椎 (C5) と第八胸椎 (T8) 高位の脊髓造影 CT を撮影した。

2. 体長と体重の計測

麻酔下のラットを腹臥位にし、鼻先から尾部先端までの距離を体長として、全重量を体重として計測した。

3. 脊柱管径と脊髓径の計測

脊髓造影 CT にて撮影した画像を、C5 と T8 高位の椎体に対して、水平断で平行、矢状断で垂直となるように画像を再構成した。再構成した画像のうち、冠状断 CT 画像を用いて、脊柱管径 (縦、横)、脊髓径 (縦、横) を測定した。縦径は正中で計測し、横径は最大幅を計測した。脊柱管径と脊髓径の差を Space available for the spinal cord (SAC) として算出した (図 1)。

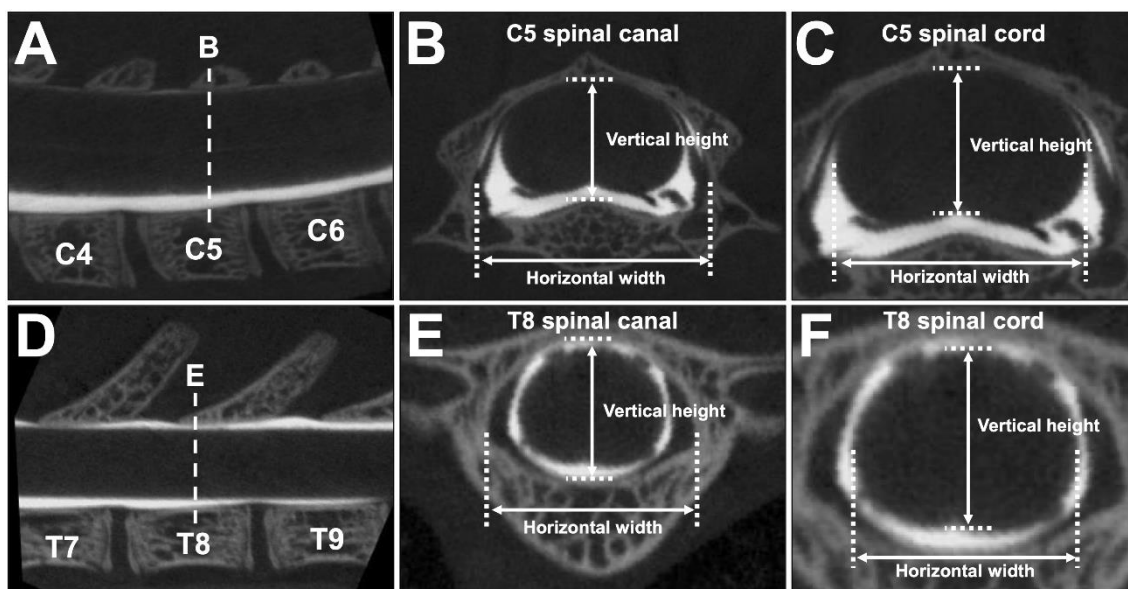


図1：ラットの脊柱管径、脊髓径の計測方法

A：頸椎の脊髓造影 CT の矢状断画像。点線は B、C の冠状断のレベルを指す。B：C5 頸椎高位の脊髓造影 CT の冠状断画像。矢印は脊柱管の縦径と横径を指す。C：C5 頸椎高位の脊髓造影 CT の冠状断画像。矢印は脊髓の縦径と横径を指す。D：T8 胸椎高位の脊髓造影 CT の矢状断画像。点線は E、F の冠状断のレベルを指す。E：T8 胸椎高位の脊髓造影 CT の冠状断画像。矢印は脊柱管の縦径と横径を指す。F：T8 胸椎の脊髓造影 CT の冠状断画像。矢印は脊髓の縦径と横径を指す。

4. 組織染色

4、8、24 週齢の雌ラットを 4% Paraformaldehyde (PFA; Nacalai tesque, Osaka, Japan) で灌流固定し、頸椎を摘出した。5 日間のギ酸脱灰処理を行った後に、パラフィン包埋し、C5 頸椎の冠状断切片に、HE 染色とサフラニン O 染色を行った。組織の観察にはオールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-X800, Osaka, Japan) を用いた。

5. 濃度依存性試験

BS のヒト脳血管内皮細胞 (hCMEC/D3) 保護効果の濃度依存性を確認するため、過酸化水素 (Hydrogen peroxide: H_2O_2) 負荷に対する細胞活性を評価した。96 well plate に hCMEC/D3 5,000 cells/well を EBM-2 培地 (成長因子不含、FBS 不含) とともに播種した。24 時間経過後、BS 含有培地を 20 μ L、 H_2O_2 含有培地を 20 μ L 添加した。6 時間後、PrestoBlue を 11 μ L 添加して細胞活性を評価した。BS の濃度設定は、0 μ M, 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.25 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M で設定した。なお、 H_2O_2 負荷のない条件を 100% として細胞活性を算出した。

6. 無酸素・無糖負荷 (Oxygen-glucose deprivation; OGD) 試験

異なる細胞傷害性負荷での評価をするため、OGD 負荷条件下 (Cowan and Easton, 2010; Sommer, 2017) での BS の hCMEC/D3 保護効果を評価した。

6-1) In vitro 血液脊髄関門 (BSCB: Blood-spinal cord barrier) 共培養モデル

ラット初代脳血管内皮細胞 (RBEC: rat brain endothelial cells) を用いた in vitro BSCB 共培養モデルは、過去の報告と同様に作成した (Deli et al., 2005; Deli, 1997; Nakagawa et al., 2009; Nakagawa et al., 2007; Takeshita et al., 2014) (図 2)。24 well plate 用の Transwell の insert を上下反転させ、collagen をコーティングした insert 下側の polycarbonate 膜にペリサイトを半球状に乗せ (2.0×10^4 cell/cm²)、3 時間培養してペリサイトを接着させた。アストロサイトはプレート の底面に播種した (1.0×10^5 cell/cm²)。一晩かけて接着した後、collagen と fibronectin をコーティングした Transwell insert 上側のポリエステル膜に RBEC を播種した (2.0×10^5 cell/cm²) (day 4)。BSCB 共培養モデルには hydrocortisone 500 nM を含有した RBEC II 培地を用いた。

細胞傷害性負荷として、OGD6 時間と再酸素化 (Reox; Reoxygenation) 12 時間を行った。OGD 負荷には、hydrocortisone 275 nM を含有した DMEM/F12 培地 (糖・血清不含) を用い、Anaero Pack Kenki 5% (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., Japan) を使用して無酸素条件を作成した。OGD 負荷後、hydrocortisone 不含

RBEC I 培地（FBS 2%含有）に交換し、BS を添加した。12 時間の Reox 後、経内皮的電気抵抗（Transendothelial electrical resistance: TEER）および sodium fluorescein（Na-F）透過性でその効果を評価した（N=7/群）。

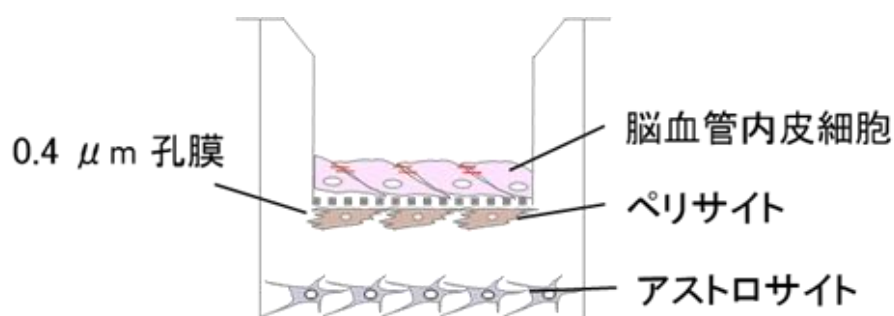


図2. In vitro BSCB 共培養モデルの概念図

ラット初代培養脳細胞を用い、BSCB の構成細胞である脳脊髄血管内皮細胞、周皮細胞（ペリサイト）、星状神経膠細胞（アストロサイト）の3種類の細胞により立体的に構成される。

6-2) 経内皮的電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance: TEER)

TEER は細胞層を通る Na^+ イオンの流れを反映し、バリア機能の評価に頻用されている (Srinivasan et al., 2015)。24 well plate を用い、Transwell insert で培養した RBEC を隔てた TEER を EVOM resistance meter (World Precision Instruments, USA) を使用して測定した。無細胞での抵抗値を補正し、normoxia 条件の control を TEER 100% として算出した。

6-3) Na-F 透過性試験

過去の報告と同様に (Morofuji et al., 2010; Nakagawa et al., 2009)、Tight junction (TJ) を介した傍細胞輸送の指標である Na-F 透過性を、in vitro BSCB 共培養モデルで評価した (Deli et al., 2005; Nakagawa et al., 2007)。細胞培養した前述の Transwell insert を 24 well plate に移し、4.5 g/L glucose、10 mM Hepes を含有した Dulbecco's PBS (assay buffer (pH 7.4)) 0.9 mL を添加した。Insert には、培地に替えて 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Na-F (分子量: 376 Da) 含有 0.5 ml buffer を添加した。Na-F 添加 15、45 分後、insert を assay buffer が入った別の well に移し、Wallac 1420 ARVO Multilabel Counter (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) で 535 nm (励起波長: 485 nm) を計測した。Na-F の透過性は透過係数 P_e (cm/s) で表し、フィックの法則に基づいて計算した (Youdim et al., 2003)。

7. 実験動物

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験の規程に従って実施した。BS の中枢神経損傷後の BSCB 機能保護効果や神経保護効果を、外傷性脳損傷モデル、脊髄部分切断モデル、脊髄圧挫損傷モデルを用いて検証した。外傷性脳損傷モデルと脊髄部分切断モデルには、10 週齢の成体野生型雄性 C57BL/6 マウス (Sankyo Laboratories Service Corporation Inc., Japan) を、脊髄圧挫損傷モデルには 12 週齢の雌性 Lewis ラット (Sankyo Labo Service, Japan) を使用した。なお、実験動物は常に適切な食餌が与えられ、室温管理された specific-pathogen-free 室で飼育された。

実験動物の麻酔には、ケタミンとメドトミジンの混合液を用い、腹腔内投与した。手術後、実験動物は電子保温パッド (37°C) 上で保温し、antisedan (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Zenoaq, Japan) を腹腔内投与して麻酔からの覚醒を行った。

7-1) 血液脳関門 (BBB: Blood-brain barrier)、血液脊髄関門 (BSCB: Blood-spinal cord barrier) 保護効果検証

外傷性脳損傷モデル

脳損傷に対する BBB の保護効果を確認することとした。成体野生型の雄性 C57BL/6 マウスを用い、全ての手技は腹臥位で行った (N=4/群)。過去の報告と同様に、マウスの左大脳皮質に wire-knife transection 法で損傷を作成した (Park et al., 2006)。マウスを stereotaxic frame (David Kopf Instruments, CA, USA) に固定し、頭部正中切開して頭蓋骨まで展開し、前項より左外側 1mm に 0.5mm 径マイクロドリルで開窓した。Wire-knife は左大脳半球の前項より外側 1.0 mm, 深さ 0.5 mm の位置に刺入し、尾側に wire を伸長し引き上げて損傷を作成した。脳白質が完全に切断されていることを確認するため、引き上げた wire-knife の上に脳組織が残存していないことを確認した。BS 500mg/kg または生理食塩水 (control) を損傷作成前日と損傷直後に、腹腔内投与した。損傷作成翌日、4%PFA で灌流固定し組織学的評価を行った。

脊髄部分切断モデル

脊髄損傷に対する BSCB の保護効果を確認することとした。成体野生型の雄性 C57BL/6 マウスを用い、全ての手技は腹臥位で行った (各 N=6/群)。外傷性脳損傷モデルと同様に、マウスを stereotaxic frame に固定した。過去の報告に基づき、マウスの C4 頸椎高位の脊髄後索に wire-knife transection 法で損傷を作成した (Kadoya et al., 2016)。頸椎後方より正中切開して鈍的に展開し、第 4 頸椎椎弓切除術を施行した。C4 頸椎高位の脊髄の正中から 0.5 mm 外側の硬膜に 26 G 針で穴をあけ、同穴より Wire-knife (McHugh Milieux, IL, USA) を 0.5 mm の深さ刺入し、wire を伸長し引き上げて損傷を作成した。脊髄の背側組織が完全に横切されたことを確認するため、引き上げた wire-knife の上に脊髄組織が残存していないことを確認した。BS 500mg/kg または control を損傷作成前日と損傷直後に、腹腔内投与した。損傷作成翌日、4%PFA で灌流固定し組織学的評価を行った。

脊髄圧挫損傷モデル

続いて、実臨床を想定した、脊髄圧挫損傷に対する BS の in vivo BSCB 保護効果を確認することとした。全ての手技は腹臥位で行った (N=6/群)。Lewis 系ラットの頸椎後方より切開を加え、C5 頸椎椎弓切除術を施行した。C5 頸髄高位に Infinite Horizons Impactor (Precision systems and Instrumentation, Lexington, KY) を用いて、200kdyn の圧挫損傷を作成した。脊髄損傷作成直後に、BS 500mg/kg または control を 1 度だけ腹腔内投与した。損傷作成 2 週後に 4%PFA で灌流固定し組織

学的評価を行った。

BSCB 破綻の定量評価

BSCB 破綻の評価には、関心領域での物質の漏出を定量するのが一般的である (Saunders et al., 2015)。漏出物質を定量するにあたり、1) Evans blue (EB) や FITC-Dextran などの色素を外的に投与する方法と、2) 生体内の Albumin や IgG に対して免疫染色をする方法があるが (Chen et al., 1999; Natarajan et al., 2017; Radu and Chernoff, 2013; Saunders et al., 2015)、今回我々は、IgG の漏出を評価方法として選択した。また、脊髄圧挫損傷モデルにおいては、損傷面積の計測も行った。

7-2) 脊髄圧挫損傷モデルを用いた神経保護効果検証

中枢神経損傷後の神経保護効果を検討するため、Lewis 系ラットの C5 頸髄高位に同様の手技で脊髄圧挫損傷を作成した (N=14/群)。脊髄損傷作成直後に、BS 500mg/kg または生理食塩水を 1 度だけ腹腔内投与した。損傷作成前、損傷作成 4 週後、損傷作成 8 週後に Electric von Frey 試験とトレッドミル歩行解析試験を行った。損傷作成 8 週後に脊髄の空洞面積とグリア瘢痕面積を評価した。

7-3) 免疫組織化学染色

4% PFA による灌流固定の後、脳または脊髄を採取し、4% PFA 中に 4°C で一晩固定した。翌日、30% Sucrose/phosphate buffer 溶液に移動し、72 時間以上静置した。マイクロトーム (REM-710, Yamato, Japan) で 30 μ m 厚の切片を作成した。脳損傷モデルは冠状断、脊髄部分切断モデルは矢状断、圧挫損傷モデルは水平断の切片を作成した。脳・脊髄ともに 6 切片毎を各染色に使用した。5% Normal horse serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) および 0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を含有した Tris buffer saline (TBS; pH8.4) で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体含有 TBS に 4°C で一晩、さらに二次抗体含有 TBS に室温で 1 時間浸し染色を行った。一次抗体は、Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (chicken from Genetex at 1:1000) を用い、IgG には Alexa 488 conjugated donkey secondary antibody (1:1000, Jackson immunoresearch, West 14 Grove, PA) を用いた。二次抗体は、Alexa 647 conjugated donkey secondary antibodies (1:1000, Jackson immunoresearch, West 14 Grove, PA) を用いた。切片はスライドガラス (Platinum Pro, Matsunami Glass Ind., Japan) に乗せて乾燥させた後、Mowiol (Sigma-Aldrich, MO, USA) の上にカバーガラス (NEO cover glass, Matsunami Glass Ind., Japan) をして観察した。

7-4) 組織評価

脳損傷モデルは損傷深度が最も深い冠状断切片を用いた。脊髄部分切断モデルは、中心に最も近い矢状断切片を用いた。BSCB 破綻の評価に用いる圧挫損傷モデルは、左右の灰白質の距離が最も近い水平断切片を用いた。神経組織保護の評価に用いる圧挫損傷モデルは、左右の灰白質の距離が最も近いものから順に3つの切片を選択した。オールインワン蛍光顕微鏡で組織の観察を行った。IgG 染色域の評価は、Photoshop CS3 (Adobe, CA, USA) で撮影した画像を白黒に二値化して定量した (Jones et al., 2002; Kadoya et al., 2016)。脳切片では右大脳半球脳皮質を、脊髄切片では損傷より頭側 5 mm の位置を正常組織として基準化した。損傷部位の大きさは、組織が欠損している面積を測定した。損傷範囲の評価には GFAP 染色域を用い、IgG 評価と同様の手法で定量した。すべての定量評価は、スライドを盲検化して行った。

7-5) 痛覚試験 (Electric von Frey 試験)

Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile, Gemonio, Italy) を用いて、ラットの前後肢の感覚機能を評価した。ラットを暗室に入れて 5 分間自由に行動させた。ラットの行動が落ち着いた後に、20 秒かけて 0g から 40 g まで徐々に負荷がかかるように、 $\phi 0.5\text{mm}$ 径のフィラメントを両前後肢に当て、ラットが肢を離すまでの時間を計測した。両前後肢に各 3 回ずつ試験を行い、その平均値を結果として使用した。試験を同個体に行う場合、最低 1 分以上のインターバルを設けた。

7-6) トレッドミル歩行解析試験

DigiGait 歩行解析システム (Mouse Specifics, Inc., Quincy, MA, USA) を使用したトレッドミル歩行解析を行った (Sashindranath et al., 2015)。実際の歩行試験前に、数日間の habituation を行った。また、試験の直前にラットの尾を黒色に、両前後肢を赤色に塗り、動画解析の精度が高くなるようにした。1 分間、ラットをトレッドミル上に静置した後、5cm/s の速さから徐々にトレッドミルの速度を増加させた。10 cm/s の速さで最低 10 歩以上歩行した動画を撮影し、解析動画とした (DigiGait Imaging and Analysis software 12.2, Mouse Specifics, Inc., Quincy, MA, USA)。また、5cm/s から 20cm/s まで、5cm/s ずつ歩行速度を上げ、歩行不能となる速度を計測した。最大 3 回動画を撮影・解析し、最も安定している歩行データを使用した。

8. RNA シーケンス

BS の薬理機序を解明するため、hCMEC/D3 のトランスクリプトーム解析を行った。T75 flask に hCMEC/D3 を 6.0×10^6 cells/flask となるように EBM-2 培地（成長因子不含、FBS 不含）とともに播種した（N=3/群）。24 時間経過後、BS の濃度が 10 μ M となるような BS 含有培地と BS 不含培地（control）を添加した。24 時間後、細胞を回収して 24°C、300g、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去。PBS で 1 回洗浄してから、再度 24°C、300g、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去。Buffer RLT Plus（QIAGEN, Hilden, Germany）を 600 μ l 加えて、ボルテックスを行い、細胞を破碎した。ライセートを十分にピペッティングした後に、gDNA エリミネータースピнкаラムに移し、24°C、8000g、30 秒間遠心分離を行った。回収した溶液に 600 μ l の 70%エタノールを加え、十分にピペッティングし、RNeasy スピнкаラムに溶液を移し、24°C、8000g、30 秒間の遠心分離を行い、フロースルーを破棄した。700 μ l の BufferRW1 を RNeasy スピнкаラムに加え、24°C、8000g、30 秒間の遠心分離を行い、再度フロースルーを破棄した。500 μ l の BufferRPE を RNeasy スピнкаラムに追加し、24°C、8000g、30 秒間の遠心分離を行い、フロースルーを破棄した。再度 500 μ l の BufferRPE を RNeasy スピнкаラムに追加し、24°C、8000g、2 分間の遠心分離を行い、フロースルーを破棄した。残った RNeasy スピнкаラムに、30 μ l の RNase free water を加え、24°C、8000g、1 分間の遠心分離を行い、RNA を抽出した。回収した溶液は、分光光度計（BioSpec-nano, SHIMADZU CORPORATION, Kyoto, Japan）を用いて、RNA の濃度が十分であるサンプルを解析対象とした。

9. 候補因子の定量化

RNA シーケンスの結果から、酵素リサイクリング法を用いて、BS の薬理機序となる候補因子の濃度を定量化した。

9-1) ヒト脳血管内皮細胞株

T75 flask に hCMEC/D3 を 2.0×10^6 cells/flask となるように、EBM-2 培地（成長因子不含、FBS 不含）とともに播種した。24 時間経過後、BS の濃度がそれぞれ 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M となるような BS 含有培地と BS 不含培地（Control）を添加した。24 時間後、細胞を回収して 4°C、300g、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去した。PBS で 1 回洗浄して、4°C、300g、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去。10mM の塩酸を 80 μ l 加え、凍結・融解を 2 回繰り返し、細胞膜を破壊し

た。5%の5-スルホサリチル酸（FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan）を20 μ l、RO水を100 μ l加えたものをサンプルとした（N=3/群）。

9-2) ラット脊髄圧挫組織

ラットの頸椎後方より切開を加え、C5 頸椎椎弓切除術を施行した。C5 頸髄高位に Infinite Horizons Impactor を用いて、200kdyn の圧挫損傷を作成した。脊髄圧挫損傷作成直後に、BS 500mg/kg または control を1度だけ腹腔内投与した。損傷作成72時間後に、ラットにPBSを灌流して瀉血し、C5 損傷部を中心とした1cmの範囲の脊髄を摘出した。また、圧挫損傷をしていない、正常のラットのC5を中心とした1cmの範囲の脊髄も定量の対象とした。5%の5-スルホサリチル酸を1ml加え、組織を十分にホモジナイズし、RO水を9ml加えたものをサンプルとした（N=3/群）。

10. 候補因子の産生阻害

96 well plate に hCMEC/D3 を 5,000 cells/well となるように、EBM-2 培地（成長因子不含、FBS 不含）と、候補因子の産生阻害薬とともに播種した。24 時間経過後、BS の濃度が 10 μ M となるような BS 含有培地と、BS 不含培地（control）を 20 μ l ずつ添加した。24 時間後に H_2O_2 を 20 μ l 添加し、6 時間後に PrestoBlue を 11 μ l 添加し、細胞活性を評価した。また、候補因子産生阻害薬自体の細胞活性に対する影響を確認するため、産生阻害薬と共に細胞を播種した後、 H_2O_2 を負荷せずに細胞活性を評価した。

11. 統計学的解析

ラットの脊柱管径、脊髄径の計測では、全週齢間の有意差検定に Kruskal-Wallis test を行った。Post-hoc test として Steel-Dwass test を行い、以後の週齢と有意差がなくなる週齢を、成長が平衡に達した週齢とした。p 値は 0.05 未満を有意とした。

BS の研究では、2 群間の有意差検定には Student's t 検定（two-tailed）を、3 群間の有意差検定には One-way ANOVA 解析を行い、Post-hoc test として Tukey-Kramer test を用いた。p 値は 0.05 未満を有意とした。

実験データは、平均値 $\pm$ 標準偏差（Mean $\pm$ SD）で示した。すべての統計解析は統計解析ソフト JMP Pro 13（SAS Institute, Cary, NC）を用いて行った。

結果

1. ラットの体長と体重

ラットの体長は、雄では 28 週齢、雌では 16 週齢まで増大し続けた (図 3)。また、体重は雄では 28 週齢、雌では 20 週齢まで増大し続けた。総じて、雄の方が平衡に達する週齢が遅かった。

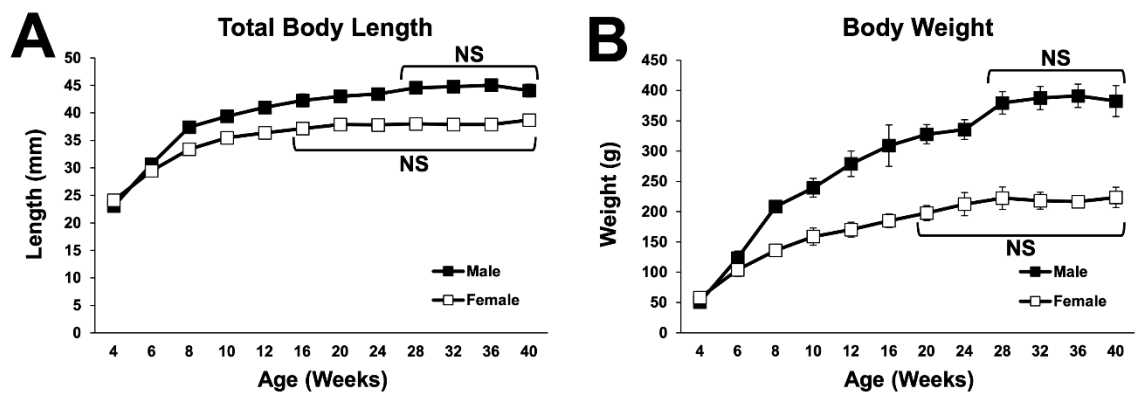


図 3 : ラットの体長と体重の成長曲線

A : Lewis ラットの雄と雌の体長の成長曲線。それぞれ 28 週齢、16 週齢までは増大し続ける。B : Lewis ラットの雄と雌の体重の成長曲線。それぞれ 28 週齢、20 週齢まで増大し続ける。NS: No statistical difference was detected between these time points; Kruskal–Wallis analysis of variance and Steel–Dwass test.

2. ラットの頸椎 C5 の脊柱管径と脊髓径

C5 の脊柱管の横径は雄、雌でそれぞれ 20 週齢、12 週齢まで増加していた（図 4）。性機能が成熟する 6 週齢（Sengupta P., 2013）と比較すると、それぞれ、1.10 倍、1.04 倍まで拡大していた。C5 頸髄の横径は雄、雌共に 20 週齢まで増加していた。6 週齢と比較するとそれぞれ、1.16 倍、1.17 倍まで拡大していた。C5 SAC の横径は雄、雌共に徐々に減少し、それぞれ 6 週齢、12 週齢で平衡に達した。C5 脊柱管の縦径は雄、雌でそれぞれ 20 週齢、12 週齢まで増加していた。6 週齢と比較すると、それぞれ、1.39 倍、1.20 倍まで拡大していた。C5 頸髄の縦径は雄、雌共に 24 週齢まで増加していた。6 週齢と比較するとそれぞれ、1.37 倍、1.33 倍まで拡大していた。圧迫性脊髄症モデルにおいて最も重要な、C5 SAC の縦径は雄、雌共に徐々に増加し、それぞれ 8 週齢、6 週齢で平衡に達した。

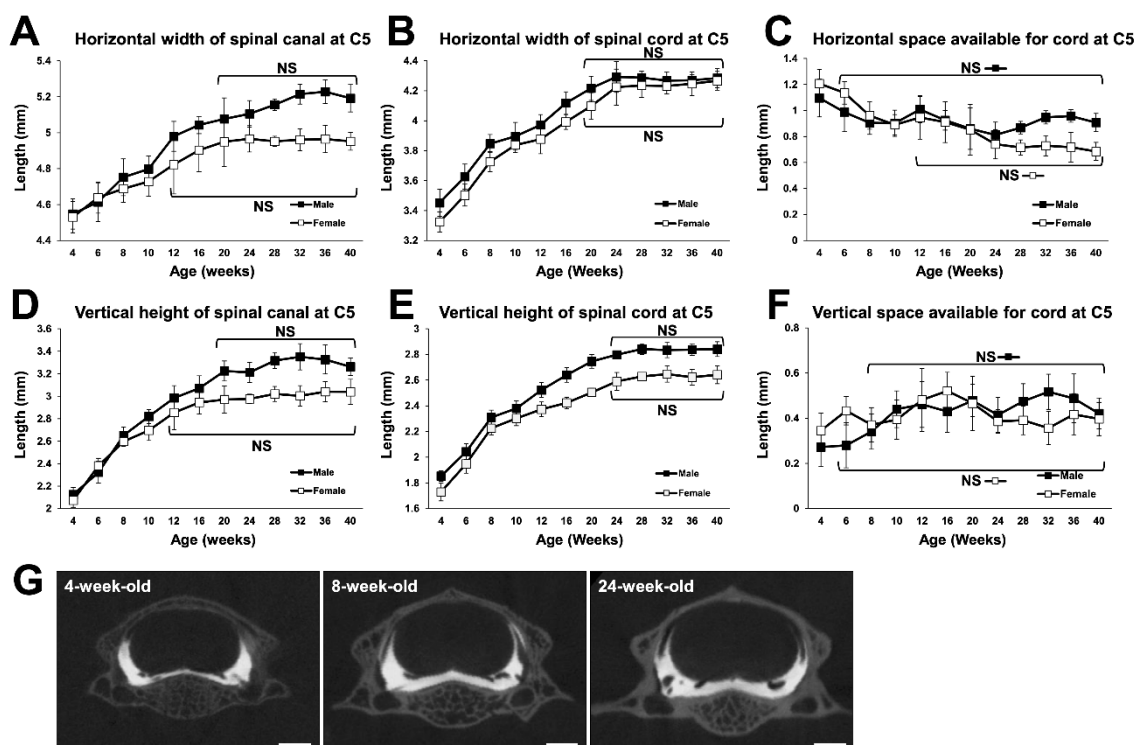


図4：ラットの頸椎 C5 の脊柱管径と脊髓径の成長曲線

A : C5 の脊柱管横径の雄、雌の成長曲線。それぞれ、20 週齢、12 週齢まで増大し続ける。B : C5 の脊髓横径の雄、雌の成長曲線。共に、20 週齢まで増大し続ける。C : C5 横径 SAC の雄、雌の変化。徐々に減少し、それぞれ 6 週齢、12 週齢で平衡に達した。D : C5 の脊柱管縦径の雄、雌の成長曲線。それぞれ、20 週齢、12 週齢まで増大し続ける。E : C5 の脊髓縦径の雄、雌の成長曲線。共に 24 週齢まで増大し続ける。F : C5 の縦径 SAC の雄、雌の変化。徐々に増大し、それぞれ 8 週齢、6 週齢で平衡に達した。G : 4 週齢、8 週齢、24 週齢の、雌の C5 の脊髓造影 CT の冠状断画像。脊柱管、脊髓共に拡大している。All scale bars, 1mm. NS: No statistical difference was detected between these time points; Kruskal–Wallis analysis of variance and Steel–Dwass test.

3. ラットの胸椎 T8 の脊柱管径と脊髓径

T8 脊柱管の横径は雄、雌共に 16 週齢まで増加していた（図 5）。6 週齢と比較すると、それぞれ、1.20 倍、1.19 倍まで拡大していた。T8 脊髓の横径は雄、雌共に 20 週齢まで増加していた。6 週齢と比較するとそれぞれ、1.37 倍、1.34 倍まで拡大していた。T8 SAC の横径は、雄では 40 週齢までずっと変化がなかった。雌では 6 週齢まで増加し、以後平衡に達した。T8 脊柱管の縦径は雄、雌でそれぞれ 20 週齢、16 週齢まで増加していた。6 週齢と比較すると、それぞれ、1.38 倍、1.27 倍まで拡大していた。T8 脊髓の縦径は雄、雌共に 24 週齢まで増加していた。6 週齢と比較するとそれぞれ、1.39 倍、1.31 倍まで拡大していた。圧迫性脊髓症モデルにおいて最も重要な、T8 SAC の縦径は雄、雌共に徐々に増加し、それぞれ 6 週齢、8 週齢で平衡に達した。

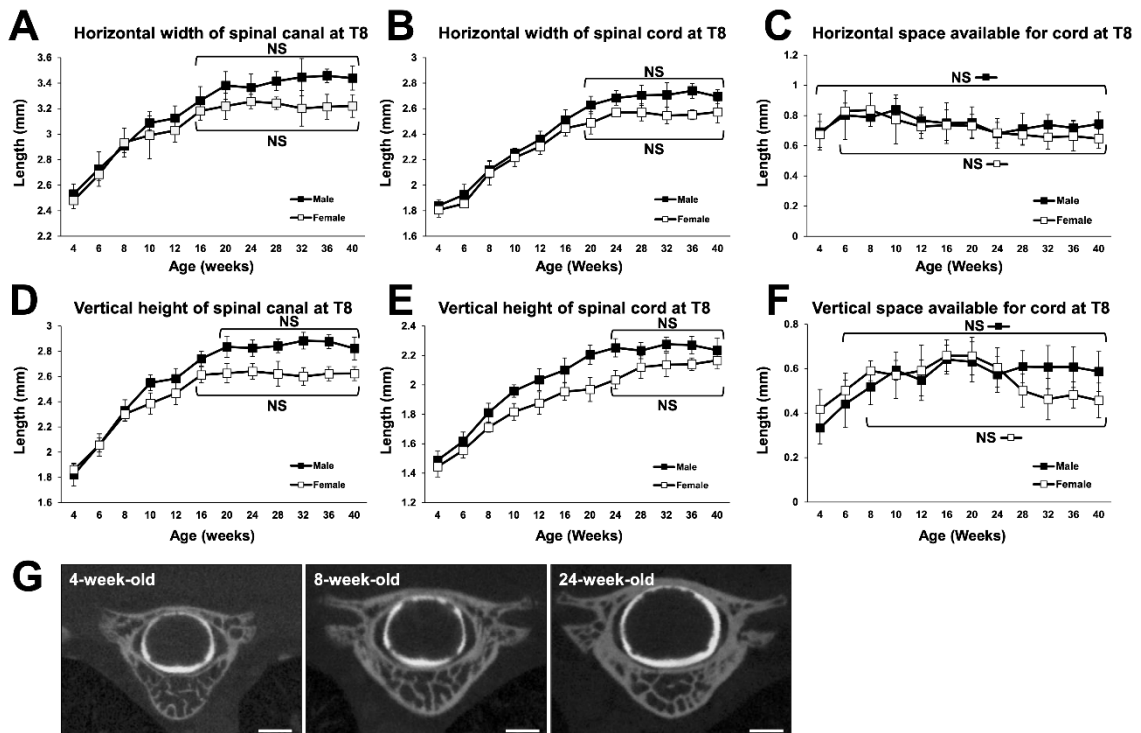


図5：ラットの頸椎 T8 の脊柱管径と脊髓径の成長曲線

A：T8 脊柱管横径の雄、雌の成長曲線。共に、16 週齢まで増大し続ける。B：T8 脊髓横径の雄、雌の成長曲線。共に、20 週齢まで増大し続ける。C：T8 横径 SAC の雄、雌の変化。雄では 4～40 週齢までを通して変化がなく、雌では 6 週齢まで増加し、以後平衡に達した。D：T8 脊柱管縦径の雄、雌の成長曲線。それぞれ、20 週齢、16 週齢まで増大し続ける。E：T8 脊髓縦径の雄、雌の成長曲線。共に 24 週齢まで増大し続ける。F：T8 縦径 SAC の雄、雌の変化。徐々に増大し、それぞれ 6 週齢、8 週齢で平衡に達した。G：4 週齢、8 週齢、24 週齢の、雌の T8 脊髓造影 CT の冠状断画像。脊柱管、脊髓共に拡大している。All scale bars, 1mm. NS: No statistical difference was detected between these time points; Kruskal–Wallis analysis of variance and Steel–Dwass test.

4. 頸椎 C5 脱灰組織の染色

雌の C5 脱灰組織にサフランニン O 染色と HE 染色を行った。サフランニン O 染色では、4、8、24 週齢の全ての週齢で C5 の骨端線が椎体終板近傍に残存していたが、椎体の一次骨化核は 4 週齢でのみ認められ、椎弓の骨化核は 4 週齢の時点ですでに消失していた (図 6)。HE 染色では、4 週齢の時点で肥厚した骨膜を認めたが、週齢が進むにつれて骨膜が薄くなり、24 週齢では骨膜はほぼ消失していた。

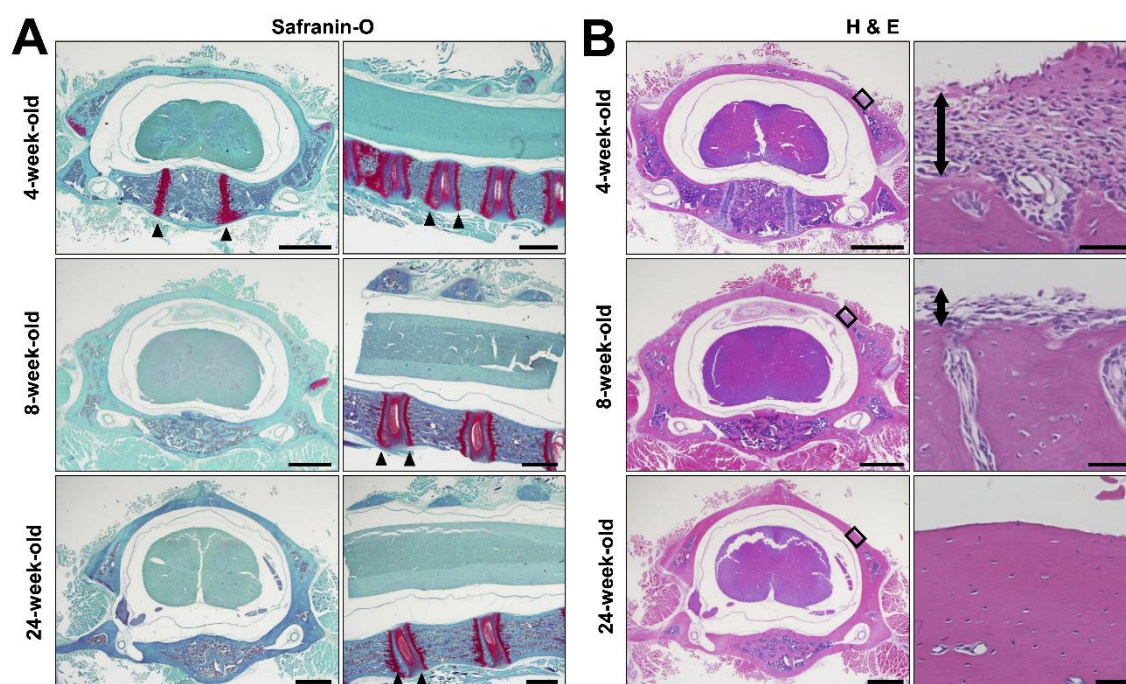


図 6 : 雌ラットの C5 脱灰組織の染色

A : 雌ラットの 4、8、24 週齢の C5 頸椎脱灰組織のサフランニン O 染色。左が冠状断、右が矢状断を指す。椎体終板近傍の骨端線は 4～24 週齢まで残存していたが、椎体と椎弓の一次骨化核は 4 週齢で既に消失していた。B : 雌ラットの 4、8、24 週齢の C5 頸椎脱灰組織の HE 染色。左が低倍率、右が椎弓付近の高倍率画像を指す。週齢が経過するにつれて骨膜が薄くなり、24 週齢ではほぼ消失していることがわかる。All scale bars, 1 mm.

5. BS の H_2O_2 負荷に対する濃度依存性試験

BS の hCMEC/D3 の H_2O_2 の負荷に対する細胞保護効果を検討した。BS は $0.25 \mu\text{M}$ 以上で細胞保護効果を示し、濃度依存性に細胞活性効果を示した (図 7)。

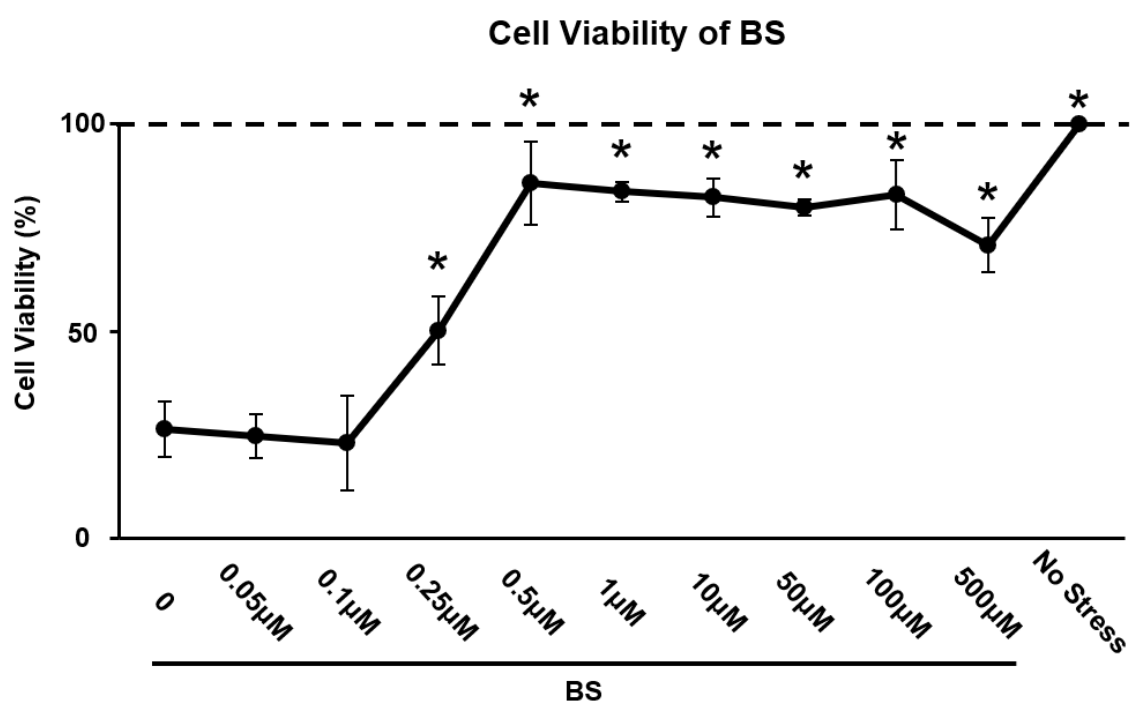


図 7 : BS の hCMEC/D3 の H_2O_2 の負荷に対する細胞保護効果

H_2O_2 負荷のない細胞活性率 (No Stress) を 100% とする BS は $0.25 \mu\text{M}$ 以上で細胞保護効果を示し、濃度依存性に細胞保護効果を示した。* $P < 0.05$ to $0 \mu\text{M}$; One-way ANOVA and Tukey-Kramer test. Data are presented as mean $\pm$ SD.

6. In vitro BSCB 模擬モデルの BS の OGD 負荷に対する保護効果

BS の hCMEC/D3 の OGD 負荷条件下に対する細胞保護効果を検討した。TEER は BSCB が保たれているほど高値に、Na-F 透過性は BSCB が保たれているほど低値となるが、OGD 条件下で、BS は TEER を高値に、Na-F 透過性を低値に有意に保ち、in vitro BSCB 共培養モデルにおいて BSCB 保護効果を示した (図 8)。

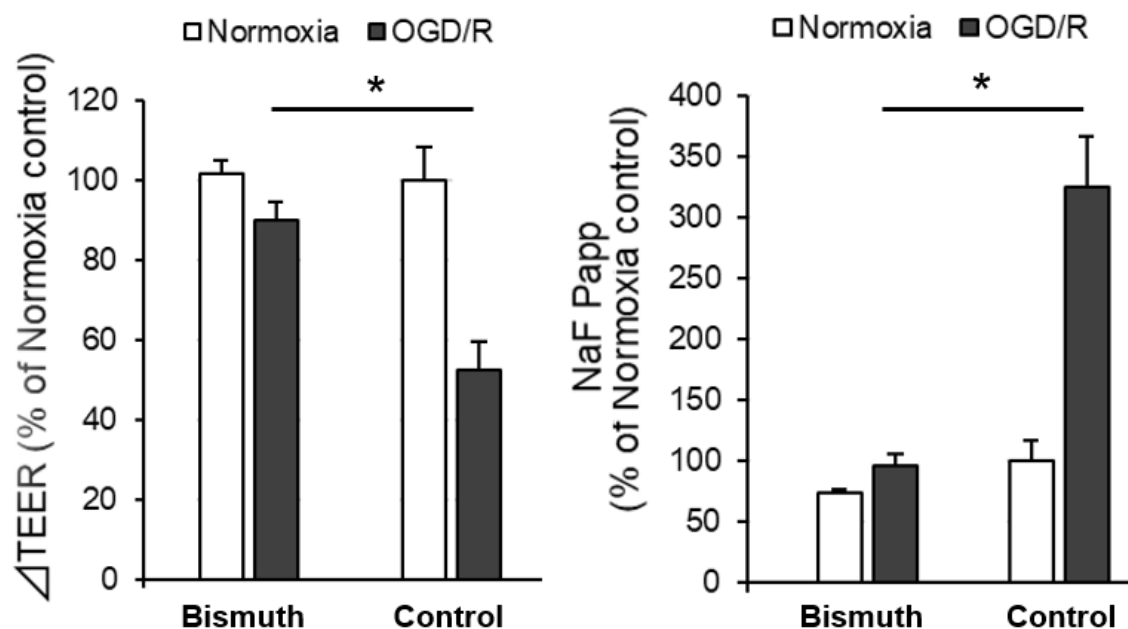


図 8 : BS の OGD 負荷に対する in vitro BSCB 保護効果

BS は OGD 条件下において、Control と比較し有意に TEER と Na-F 透過性を改善した。In vitro BSCB モデルにおいて、BSCB 保護効果を示した。All data are presented as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$; Student's t test.

7. 外傷性脳損傷モデルの BBB 保護効果

脳は BBB によって保護されており、損傷していない状況下においては、IgG などの高分子タンパクは血管内から脳実質内に漏出することはない。BS は脳損傷モデルの IgG の漏出を有意に抑え、BBB 保護効果を示した (図 9)。高分子タンパクである IgG の漏出を抑える事実は、損傷された BBB が保護され、そのバリア機能が保たれていることを示唆している。

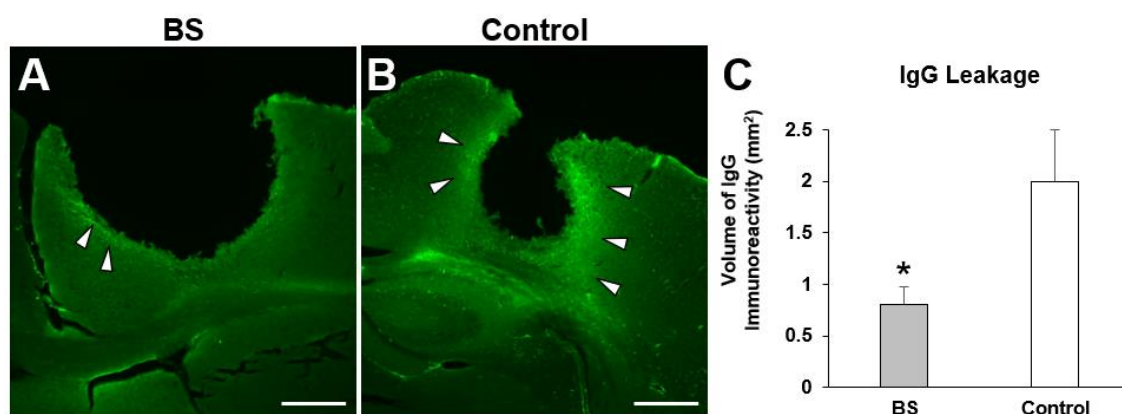


図 9 : 外傷性脳損傷モデルの BBB 保護効果

A : BS の脳損傷後 24 時間の IgG 漏出 (白矢印)。漏出が抑制されている。B : Control の脳損傷後 24 時間の IgG 漏出 (白矢印)。A と比較し、IgG が周囲の脳実質に漏出している。C : IgG 漏出量の定量。BS は有意に IgG の漏出を抑制し、BBB を保護した。All scale bars, 500 μ m. All data are presented as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$; Student's t test.

8. 脊髄部分切断モデルの BSCB 保護効果

脊髄は BSCB によって保護されており、脳と同様、損傷していない状況下においては、IgG などの高分子タンパクは血管内から脊髄実質内に漏出することはない。脊髄部分切断モデルにおいても、BS は IgG の漏出量を減少させ、BSCB 保護効果を認め、そのバリア機能を保護した (図 10)。

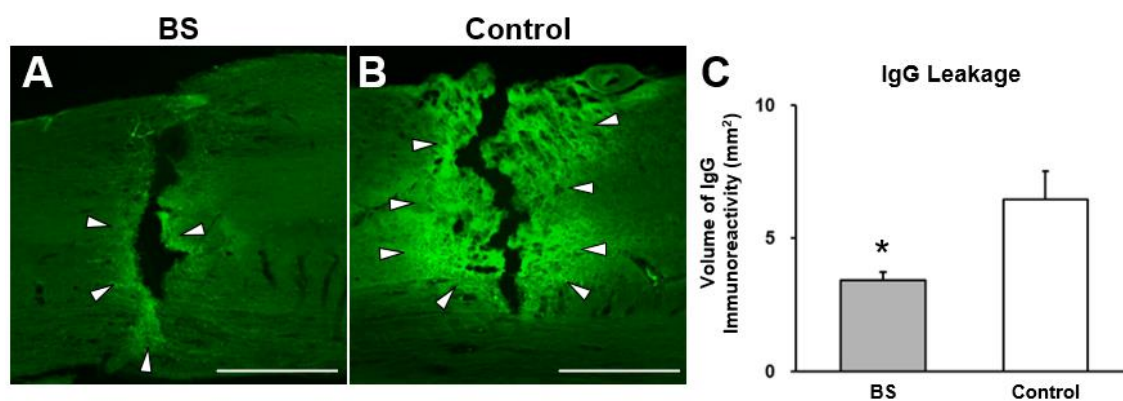


図 10 : 脊髄部分切断モデルの BSCB 保護効果

A : BS の脊髄部分切断後 24 時間の IgG 漏出 (白矢印)。漏出が抑制されている。
B : Control の脊髄部分切断後 24 時間の IgG 漏出 (白矢印)。A と比較し、IgG が周囲の脳実質に漏出している。C : IgG 漏出量の定量。BS は有意に IgG の漏出を抑制し、BSCB を保護した。All scale bars, 500 μ m. All data are presented as mean $\pm$ SD.*P < 0.05; Student's t test.

9. 脊髓圧挫損傷モデルの BSCB 保護効果

圧挫損傷後 2 週時点で、BS は IgG 漏出面積を縮小させた。損傷面積は BSCB が保護された場合、二次損傷が抑制され、面積が縮小するが、BS は損傷面積も縮小させた（図 1 1）。

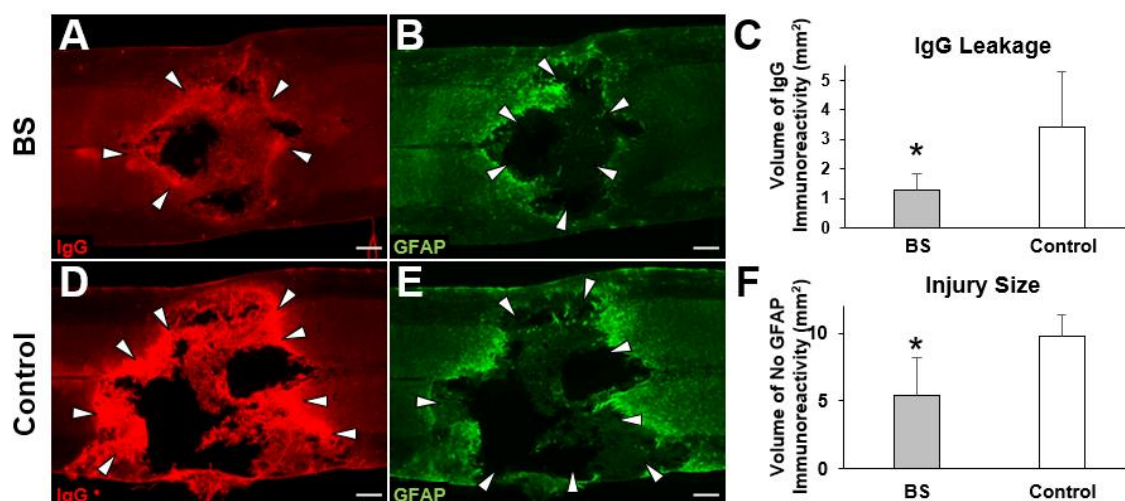


図 1 1 : BS の脊髓圧挫損傷モデルの BSCB 保護効果と二次損傷抑制効果

第 5 頸椎高位の脊髓圧挫損傷部の水平断切片（左：頭側）とその定量結果。A、D : BS と control の IgG 染色領域。白矢印は漏出している IgG を示す。C : IgG 漏出面積の定量結果。BS で漏出量が抑制されている。B、E : BS と control の GFAP 染色領域。染色性がない部分（白矢印）は、損傷後 2 週時点の損傷された面積を示す。BS で損傷面積が抑制されている。F : 損傷面積の定量結果。BS で損傷面積が抑制されている。All scale bars, 500 μ m. All data are presented as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$; Student's t test.

10. 脊髄圧挫損傷モデルの神経保護効果

脊髄圧挫後 8 週の組織検討をするにあたり、損傷部に laterality があると判断した control の個体 1 体を除外した。圧挫損傷後 8 週では、損傷により壊死に至った組織は空洞化する。また、空洞部と正常組織の間には、脊髄組織の再生を阻害するグリア瘢痕が形成される。BS は圧挫損傷後 8 週の空洞面積を縮小させ、グリア瘢痕の面積も縮小させた (図 1 2)。

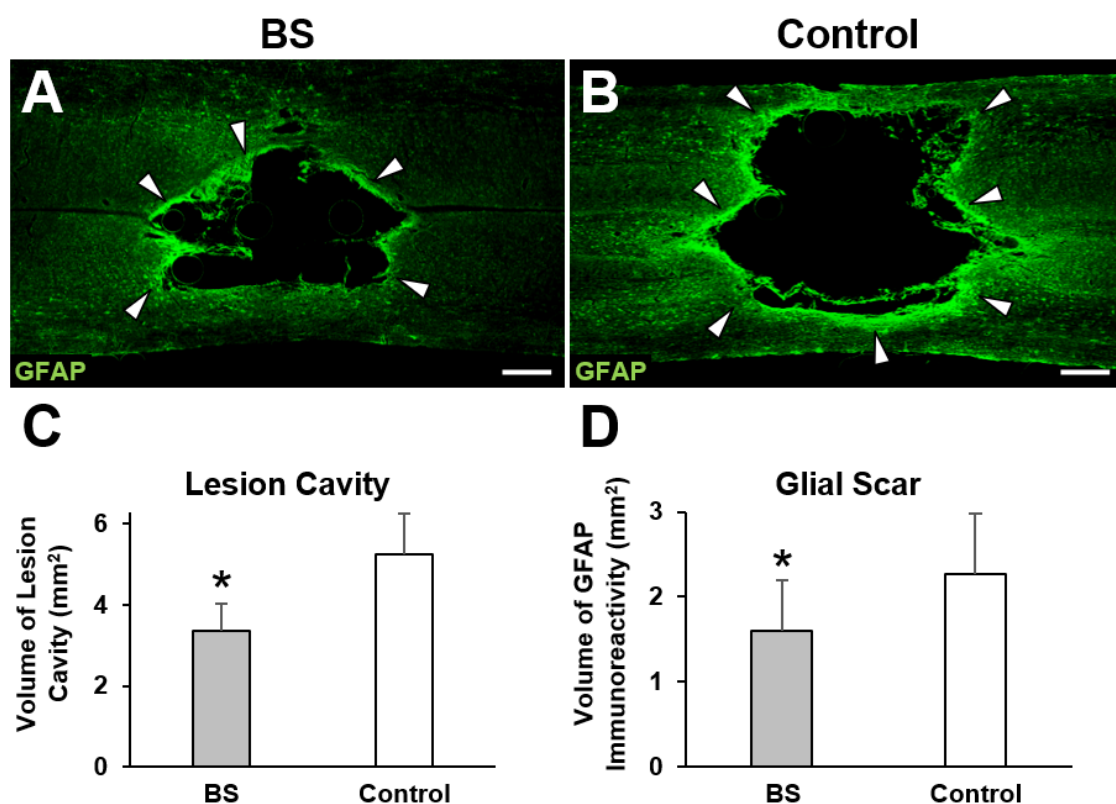


図 1 2 : BS の脊髄圧挫損傷モデルの神経保護効果

C5 頸髄の脊髄圧挫損傷部の水平断切片 (左: 頭側) とその定量結果。A : BS の GFAP 染色領域 (グリア瘢痕)。組織がない部分は空洞部であり、その周囲を裏打ちするようにグリア瘢痕が形成されている (白矢印)。B : control の GFAP 染色領域。C : 空洞面積の定量結果。BS 群でより縮小している。D : GFAP 染色領域の定量結果。BS 群でより縮小している。All scale bars, 500 μ m. All data are presented as mean $\pm$ SD.*P < 0.05; Student's t test.

11. 脊髄圧挫損傷モデルの機能改善効果

11-1) Electric von Frey 試験

圧挫損傷前後の Electric von Frey 試験を評価した。ラットは C5 頸髄損傷後に、前肢の刺激に反応するまでの時間は、痛覚過敏となるため、短縮する。圧挫損傷後、BS 群、control 群共に、圧挫損傷前より反応するまでの時間が短縮していたが、損傷後 4 週時、8 週時共に、control 群でより短縮しており、BS 群ではより改善していた（図 1 3）。BS 群で感覚機能の改善が得られていることを示唆している。後肢に関しては、損傷前後で有意な変化がなかった。

11-2) トレッドミル歩行解析試験：歩行速度

圧挫損傷前後の歩行可能最大速度を計測した。損傷前は全ての個体が 20 cm/s で歩行できたが、損傷後は歩行可能最大速度が低下した（図 1 4）。損傷後 4 週、損傷後 8 週共に、BS 群でより速く歩行できる個体が多く、BS 群で歩行機能が保たれていることがわかる。

11-3) トレッドミル歩行解析試験：歩容解析

圧挫損傷前後の歩容を、DigiGait 歩行解析ソフトを用いて解析した。歩行において重要な部分を占める、1 歩行周期時間、歩幅、1 秒間の接地回数において、損傷前はいずれも差がなかった。損傷後は前肢が麻痺・拘縮するため、1 歩行周期時間は前肢で短縮するが、BS 群は control 群より改善していた。歩幅も同様に前肢の麻痺・拘縮により、損傷後に短縮するが、BS 群で改善していた。1 秒間の接地回数も、損傷後は前肢で頻回になるが、BS 群でより改善していた（図 1 5）。BS の歩行機能改善効果を示唆している。

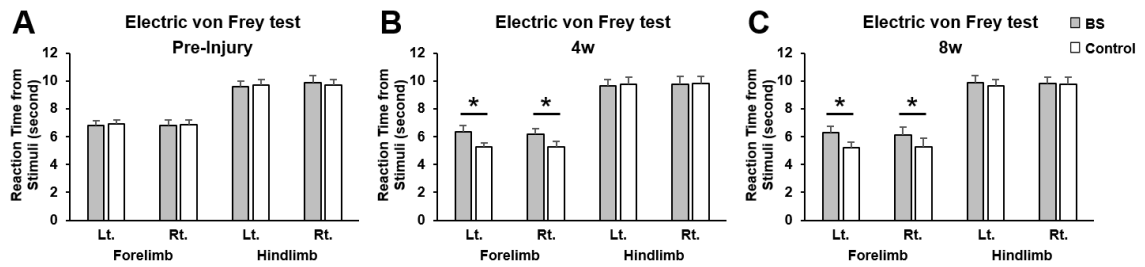


図 1 3 : 圧挫損傷前、損傷後 4 週、損傷後 8 週の Electric von Frey 試験

A : 圧挫損傷前。前後肢共に有意な差はない。B : 損傷後 4 週。損傷前と比較して、前肢で反応までの時間が短縮するが、BS 群で改善している。後肢に関しては、損傷前と比較して変化がない。C : 損傷後 8 週。4 週と同様、前肢で反応までの時間が短縮するが、BS 群で改善している。後肢に関しては、損傷前と比較して変化がない。All data are presented as mean $\pm$ SD.* $P < 0.05$; Student's t test.

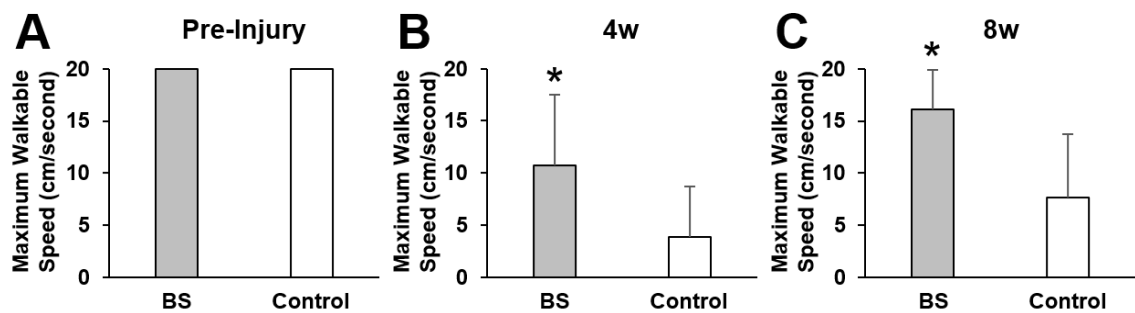


図 1 4 : 歩行可能最大速度

A : 損傷前の歩行可能最大速度。すべての個体が 20 cm/s で歩行可能である。B : 損傷後 4 週の歩行可能最大速度。BS 群の方が速く歩行できる個体が多い。C : 損傷後 8 週の歩行可能最大速度。4 週時と同様、BS 群の方が速く歩行できる個体が多い。All data are presented as mean $\pm$ SD.* $P < 0.05$; Student's t test.

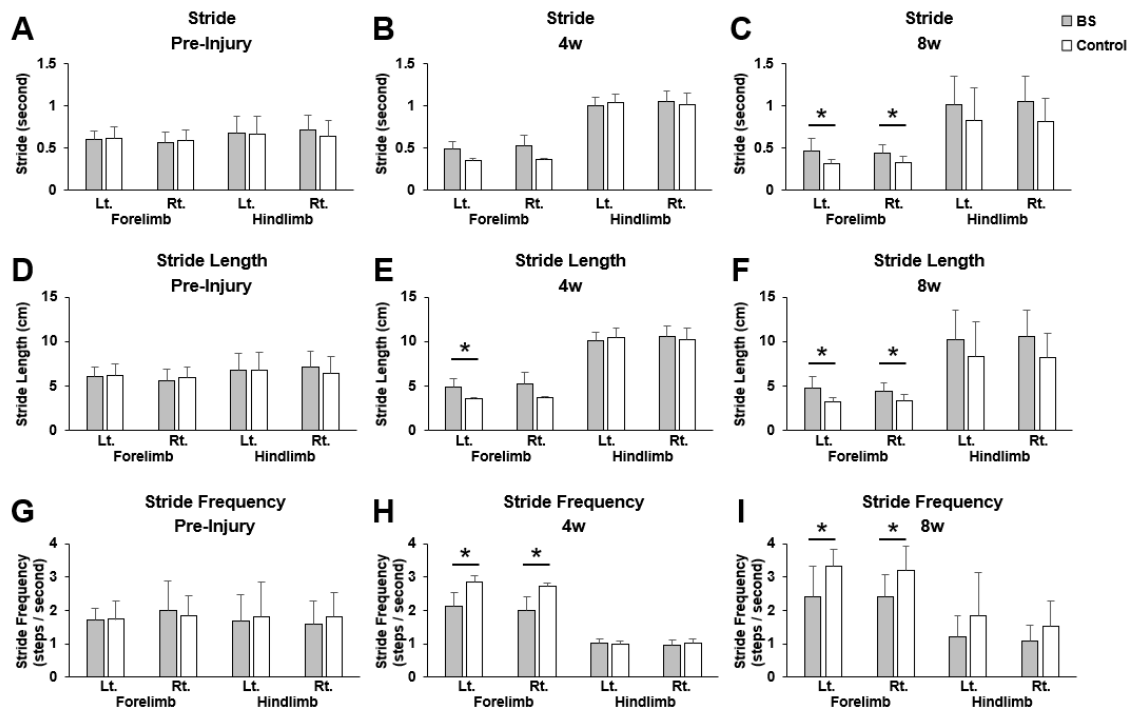


図15：歩容解析

A：損傷前の1歩行周期時間。両群に差はない。B：損傷後4週の1歩行周期時間。両群に差はないが、BS群の両前肢共に正常に近くなっている。C：損傷後8週の1歩行周期時間。BS群の両前肢で改善が見られた。D：損傷前の歩幅。両群に差はない。E：損傷後4週の歩幅。BS群の左前肢で改善が見られた。F：損傷後8週の1歩幅。BS群の両前肢で改善が見られた。G：損傷前の1秒間の接地回数。両群に差はない。H：損傷後4週の1秒間の接地回数。BS群の両前肢で改善が見られた。I：損傷後8週の1秒間の接地回数。BS群の両前肢で改善が見られた。All data are presented as mean $\pm$ SD.*P < 0.05; Student's t test.

12. RNA シーケンス

hCMEC/D3 に BS を投与して 24 時間反応させた後に、細胞を回収して RNA シーケンスを行った。BS と反応させた細胞の性質は、control と全く異なっていた (図 1 6)。KEGG pathway enrichment analysis を行ったところ、p 値 0.001 未満の pathway が 29 見つかった。この 29 の pathway について網羅的に調べたところ、細胞保護作用に深く関与している pathway として glutathione metabolism を同定した。

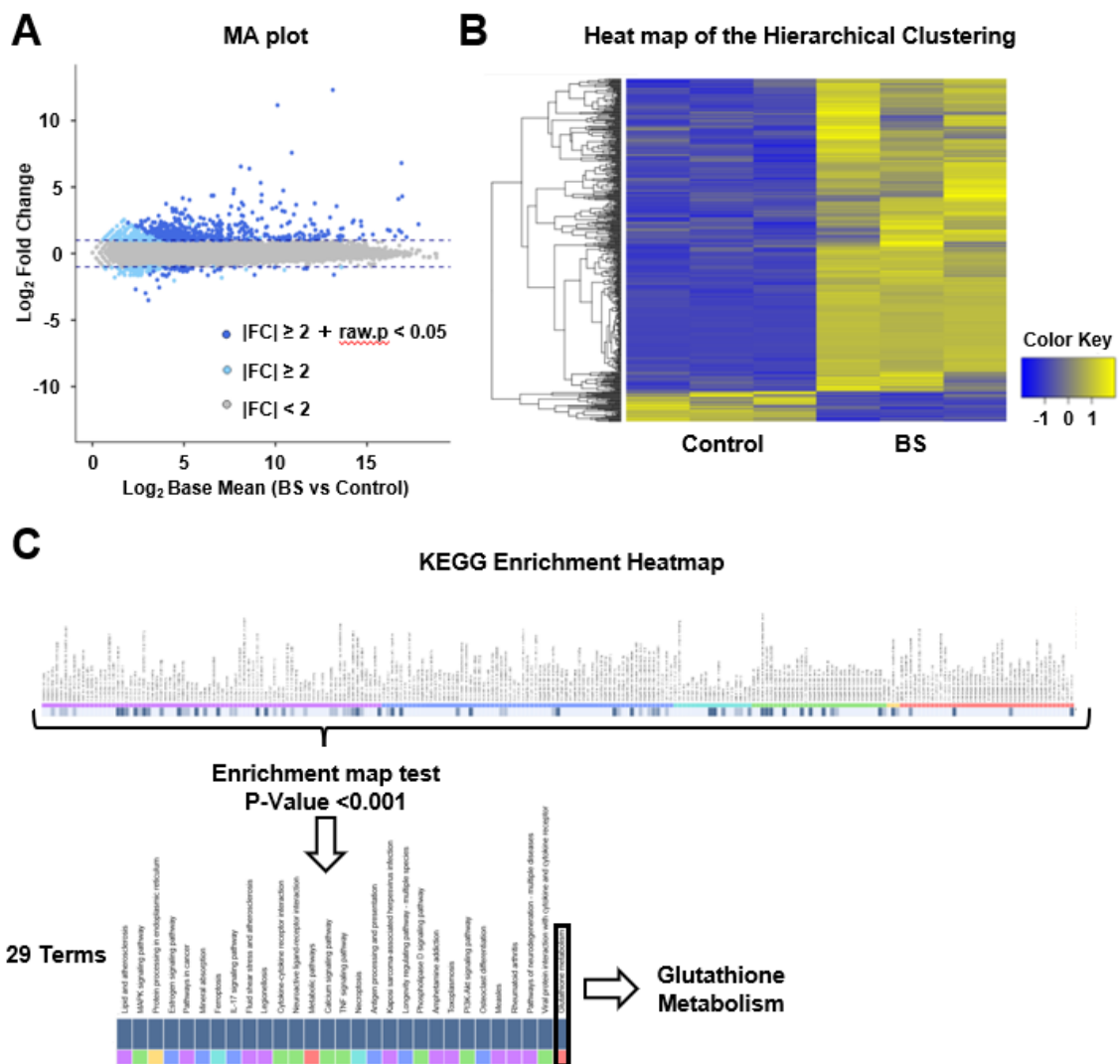


図16 : RNA シーケンス

A : MA plot 解析による、BS の転写発現遺伝子の変化。縦軸は Log₂ の fold change (FC) を、横軸は Log₂ の発現量を示す。Log₂ $|FC| \geq 2$ かつ p 値 0.05 未満群、Log₂ $|FC| \geq 2$ だが p 値 0.05 以上群、Log₂ $|FC| < 2$ で層分けした。B : BS と Control の、Log₂ $|FC| \geq 2$ かつ p 値 0.05 未満群の遺伝子ヒートマップ。黄色が upregulated genes を、青色が downregulated genes を指す。C : KEGG pathway enrichment analysis の結果。P 値 0.001 未満の pathway は 29 あり、その中から最も細胞保護に関与している pathway として glutathione metabolism を同定した。BS の薬理機序として glutathione が関与していると推測した。

13. Glutathione の定量化

これまでの研究で BS は細胞保護効果、BSCB 保護効果、神経組織保護効果を認めたが、その実験系において実際の glutathione の量を酵素リサイクリング法にて定量することとした。hCMEC/D3 細胞株では、control (no drug)、BS 0.1 μ M、BS 1 μ M、BS 10 μ M、BS 100 μ M をそれぞれ反応させた後、細胞内の Glutathione 量を定量した (N=3/群)。脊髄圧挫モデルにおいては、No Injury 群、C5 頸髄圧挫後 control 投与群、BS 投与群、の 3 群に分け、72 時間の脊髄組織内の glutathione 濃度を計測した。細胞内の glutathione 濃度は BS 1 μ M 以上で上昇し、濃度依存性に濃度上昇した (図 1 7)。この結果は、H₂O₂ 負荷アッセイにおいても、BS 0.1 μ M では細胞保護効果を認めず、0.5 μ M 以上で保護効果を認めたことと矛盾しない。また、脊髄組織内の glutathione 濃度は、BS 群で Control 群より有意に濃度が上昇しており、No Injury 群とほぼ同等の濃度であった。

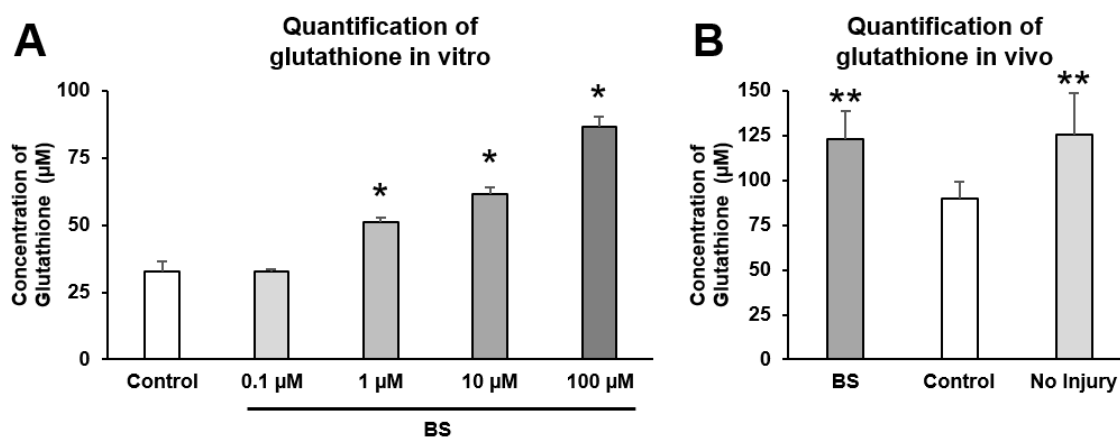


図 1 7 : 細胞内、脊髄組織内 Glutathione 濃度の定量

A : 細胞内 glutathione 濃度の定量。Control と比較して、BS 1 μ M 以上で glutathione 濃度が上昇しており、その効果は濃度依存性であった。B : 損傷脊髄組織と非損傷脊髄組織中の glutathione 濃度の定量。BS 群は Control 群より損傷脊髄中の glutathione 濃度が高く保たれており、No injury 群とほぼ同等の濃度であった。* $P < 0.05$ to Control; One-way ANOVA and Tukey-Kramer test. ** $P < 0.05$ to Control; One-way ANOVA and Tukey-Kramer test. Data are presented as mean $\pm$ SD.

14. Glutathione 産生酵素阻害薬 (L-Buthionine sulfoximine: L-BSO) の投与

hCMEC/D3 を用いた H_2O_2 負荷アッセイにおいて、glutathione の産生酵素である γ -glutamylcysteine synthetase を阻害する L-BSO を投与することで、BS の細胞保護効果が消失するかを検討した。BS の濃度は $10\ \mu\text{M}$ とし、 H_2O_2 負荷をかけない細胞の活性率を 100% とした。L-BSO の投与により BS の細胞保護効果は低下し、その効果は濃度依存性であった。L-BSO が $1250\ \mu\text{M}$ の濃度では細胞保護効果は完全に消失した (図 18)。また、L-BSO 自体が細胞活性に及ぼす影響を検討するため、L-BSO のみを細胞に投与して細胞活性率を評価した。しかし、L-BSO 自体は細胞活性率に影響を与えなかった。このことから、BS の薬理機序の一因として、glutathione の強い関与が示唆された。

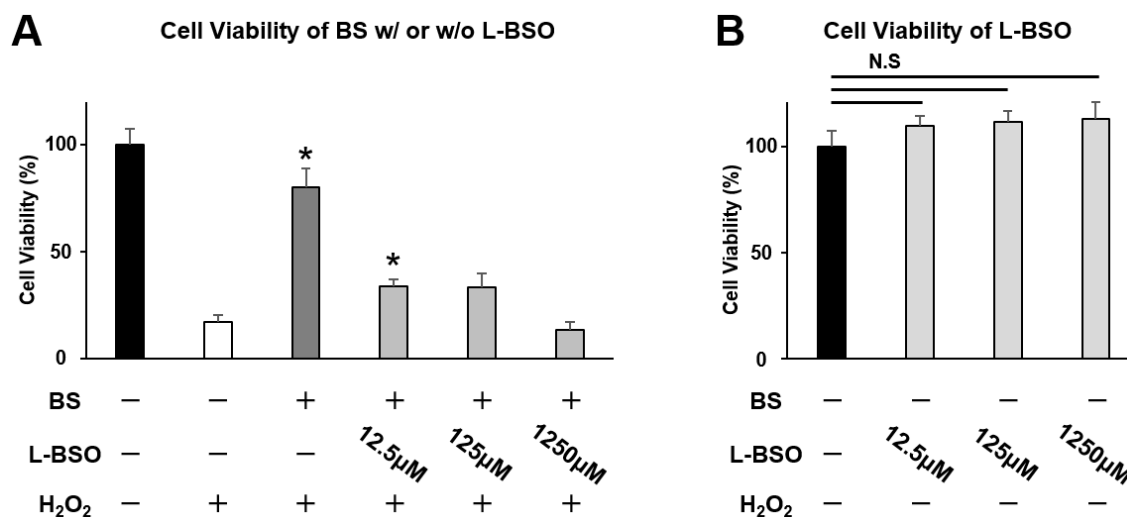


図 18 : L-BSO の投与による細胞活性率の評価

A : L-BSO が BS ($10\ \mu\text{M}$) の細胞保護効果に及ぼす影響。BS の細胞保護効果が、L-BSO の濃度上昇につれて低下し、 $1250\ \mu\text{M}$ では消失していることがわかる。B : L-BSO 単剤が細胞活性率に与える影響。L-BSO 単剤では、細胞活性率は低下しなかった。* $P < 0.05$ to Control (BS-, L-BSO-, H_2O_2 +) ; One-way ANOVA and Tukey-Kramer test. N.S; No significant difference. Data are presented as mean $\pm$ SD.

考察

本研究では、まず、圧迫性脊髄症の動物モデル作成に必要な、ラットの脊柱管径、脊髄径の詳細を明らかにした。ラットの体長や脊柱管径、脊髄径を計測した文献はいくつか散見されるが (Jaumard et al., 1976; Flynn and Bolton, 2007; Matsui et al., 2013; Santiago et al., 2015; Toossi et al., 2021)、渉猟する限り、成長曲線を明らかにした論文は未だない。本研究により、ヒトとラットの脊椎、脊髄発達完了時期は異なることがわかった。ヒトでは、生殖機能が成熟し、成人になるとされるのは 15~17 歳 (Chandar and Freeman, 2014) であり、脊柱管の拡大が停止するのは 6~8 歳 (Markuske, 1977)、脊髄の拡大が停止するのは 4~5 歳 (Chandar and Freeman, 2014) と報告されている。つまり脊柱管、脊髄の拡大が停止した後に、生殖機能が成熟する。一方でラットは、生殖機能が 6~7 週齢で成熟する (Sengupta, 2013) が、脊柱管の拡大が停止するのは 12~20 週齢、脊髄の拡大が停止するのは 24 週齢であり、生殖機能が成熟した後も脊柱管と脊髄が拡大していた。このことから、慣習的に用いられる 8~12 週齢のラットの脊柱管や脊髄は、サイズの増大という点で、未だ発達過程にあると考えられ、8~12 週齢のラット脊椎脊髄は、必ずしも、成人の脊椎脊髄を模擬しているわけではないことが判明した。

ラットの脊柱管の拡大機序だが、椎弓の骨端線が 4 週齢で閉鎖していたにも関わらず、脊柱管径は拡大を続けていた。今回の研究で、椎弓の骨膜が徐々に菲薄化して、24 週齢でほぼ消失していたことを考えると、脊柱管は軟骨内骨化ではなく、膜性骨化を介して拡大すると考える。次に、脊髄の拡大機序だが、高齢ラットでは若年ラットより頸髄の断面積およびその神経細胞が多いことが報告されている (Portiansky et al., 2011)。脊髄が増大する理由は未だ解明されていないが、8~12 週齢のげっ歯類脊髄に神経前駆細胞が残存している事実から (Hornel et al., 2000)、神経前駆細胞から分化する神経、グリア細胞の増殖を主たる機序として考える。

先に述べたように、ヒトの圧迫性脊髄症の動物モデルに用いられるラットの多くは、8 週齢~12 週齢である (Long et al., 2014; Ijima et al., 2017)。今回の研究結果から、ラット脊柱管の拡大が終了するのは、雄で 20 週齢、雌で 12~16 週齢、脊髄の拡大が終了するのは雄、雌共に 20~24 週齢であったが、圧迫性脊髄症のモデル作成に重要な、縦径の SAC は、8 週齢以降変動しなかった。したがって、圧迫性脊髄症モデルのラットの最適な週齢は、最低でも 8 週齢以降であり、理想的には、脊髄の拡大が終了する 24 週齢以降が望ましい。

BS は、ヒト脳血管内皮細胞の細胞保護効果、in vitro BSCB モデルの BSCB 保護効果、脊髄損傷モデルの BSCB 保護効果、神経組織保護効果、機能回復効果があること

が明らかになった。そして BS の薬理学的機序が、抗酸化作用、解毒作用、細胞保護作用を持つ glutathione (Kamencic et al., 2001; Jia et al., 2012) の、脊髄血管内皮細胞内濃度上昇であることも明らかになった。つまり、BS を脊髄損傷後早期に投与すると、脊髄血管内皮細胞内の glutathione 濃度が上昇し、血管内皮細胞が構成する BSCB 機能が維持された結果、二次損傷が抑制され、最終的な損傷範囲が縮小し、機能回復促進につながったと考える。また、脊髄組織中の glutathione 濃度が上昇すると、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) 産生を抑制して、組織保護的に働くことが報告されているため (Lucas et al., 1998; Zeman et al., 2006; Stewart et al., 2022)、BSCB がすでに破綻した組織領域では、BS が脊髄組織中に浸潤し、神経細胞やグリア細胞の glutathione 濃度を上昇させ、ROS による組織障害を軽減した可能性もあると考える。

また、これまで BSCB の機能保護を対象とした薬剤はなく、BS は初の BSCB 保護薬となる可能性がある。圧迫性脊髄症や脊髄損傷に限らず、血液脳脊髄関門の破綻は、アルツハイマー型認知症 (Janelidze et al., 2017)、統合失調症 (Najjar et al., 2017)、脳梗塞 (Abdullahi et al., 2018)、多発性硬化症 (Ortiz et al., 2014)、筋萎縮性側索硬化症 (Kakaroubas et al., 2019) など幅広い疾患に関与していることが報告されている。BS は BBB、BSCB 共に保護するため、これらの疾患に対しても有効である可能性が高い。また、BS は、欧米では *Helicobacter pylori* の標準治療薬であり、日本でも整腸剤として既に臨床応用されているが、併用不能な薬剤や使用禁忌疾患がなく、外傷直後や手術後に使用しても問題ないなど、安全性への懸念が乏しい。また、新薬と比較して、早期の臨床応用が可能であるという利点に優れる。

本研究結果に基づき、今後は、圧迫性脊髄症の動物モデルを確立し、急性期脊髄障害のみならず、慢性的脊髄障害に対する BS による治療効果も判定していく予定である。また、BS の脊髄損傷への臨床応用に向けて、投与形態、投与濃度、投与方法の最適化、安全性の確認などを行っており、BS を応用した中枢神経疾患治療の基盤を築くべく、研究を進めていく次第である。

総括および結論

- 圧迫性脊髄症モデルの至適週齢を特定するため、Lewis ラットの体長、体重、脊柱管径、脊髄径、SAC の成長曲線を明らかにした。
- ラットの脊柱管径は雄で 16～20 週齢、雌で 12～16 週齢、脊髄径は雄、雌ともに 20～24 週齢まで拡大し続けていたが、圧迫性脊髄症モデル作成で重要な縦径 SAC は、8 週齢以降は変動していなかった。
- 脊柱管拡大の機序として膜性骨化の関与が考えられた。
- 圧迫性脊髄症モデルを作成する場合、最低でも 8 週齢以降、理想的には 24 週齢以降のラットを使用するのが望ましい。
- BS の脳血管内皮細胞保護作用、in vitro BSCB 保護作用、in vivo BSCB 保護作用、神経組織保護作用、機能回復促進効果を検討した。
- BS は無酸素無糖負荷下の in vitro BSCB 機能、脊髄損傷後、脳損傷後の BSCB 機能を保護した。
- BS は脊髄損傷後の BSCB 機能を保護することで、二次損傷を抑制し、神経組織を保護し、最終的な機能回復を促進した。
- BS の脳血管内皮細胞保護作用の薬理機序は細胞内 glutathione 濃度上昇であった。
- BS は BSCB 保護効果を介した新規脊髄損傷治療薬としての可能性を有する。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野博士課程の在学中に行った研究をまとめたものです。稿を終えるにあたり、研究の機会をくださった北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・岩崎倫政教授に深い謝意を表します。また、本研究全般にわたり、直接のご指導ご鞭撻を賜りました同運動器先端医学分野・角家健特任准教授に心より感謝いたします。

本研究は、一般社団法人・日本損害保険協会（2022年）、科学研究費助成事業（17K10915）、AMED革新的先端研究開発支援事業、第7回小林財団研究助成、住友電工研究助成（2018年）を受けたものです。関係各所の皆様にお礼申し上げます。

最後に本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご支援頂きました、北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室の教官各位、教室員の皆様、北海道大学薬学研究院・前仲勝実教授、乙黒聡子技術職員、福岡大学薬学部・中川慎介准教授、研究にあたり多くのサポートをして下さった遠藤美樹様、全ての皆様に心より感謝を申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37, 13-25.
- Abdullahi, W., Tripathi, D. and Ronaldson, P.T. (2018). Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 315, C343–C356.
- Bartanusz, V., Jezova, D., Alajajian, B., and Digicaylioglu, M. (2011). The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications. *Ann Neurol* 70, 194-206.
- Blume, C., Geiger, M.F., Brandenburg, L.O., Müller, M., Mainz, V., Kalder, J., Albanna, W., Clusmann, H., Mueller, C.A. (2020). Patients with degenerative cervical myelopathy have signs of blood spinal cord barrier disruption, and its magnitude correlates with myelopathy severity: a prospective comparative cohort study. *Eur Spine J* 29, 986–993
- Chandar K, Freeman BK. (2014). Spinal Cord Anatomy. In: *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. Elsevier, pp. 254-263.
- Chen, Z.L., Indyk, J.A., Bugge, T.H., Kombrinck, K.W., Degen, J.L., and Strickland, S. (1999). Neuronal death and blood-brain barrier breakdown after excitotoxic injury are independent processes. *J Neurosci* 19, 9813-9820.
- Cohen, D.M., Patel, C.B., Ahobila-Vajjula, P., Sundberg, L.M., Chacko, T., Liu, S.J., and Narayana, P.A. (2009). Blood-spinal cord barrier permeability in experimental spinal cord injury: dynamic contrast-enhanced MRI. *NMR Biomed* 22, 332-341.
- Cowan, K.M., and Easton, A.S. (2010). Neutrophils block permeability increases induced by oxygen glucose deprivation in a culture model of the human blood-brain barrier. *Brain Res* 1332, 20-31.
- Daneman, R., and Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020412.
- Deli, M.A., Abraham, C.S., Kataoka, Y., and Niwa, M. (2005). Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol* 25, 59-127.
- Flynn, J.R. and Bolton, P.S. (2007). Measurement of the vertebral canal dimensions of the neck of the rat with a comparison to the human. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 290, 893-899.

- Horner, P.J., Power, A.E., Kempermann, G., Kuhn, H.G., Palmer, T.D., Winkler, J., Thal, L.J., et al. (2000). Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 20, 6, 2218–2228.
- Ijima, Y., Furuya, T., Koda, M., Matsuura, Y., Saito, J., Kitamura, M., Miyamoto, T., Orita, S., Inage, K., Suzuki, T., Yamazaki, M., Ohtori, S. (2017). Experimental rat model for cervical compressive myelopathy. *Neuroreport*, 28, 1239–1245.
- Iyer, A., Azad, T.D., Tharin, S. (2016). Cervical Spondylotic Myelopathy. *Clinical Spine Surgery*, 29, 408–414.
- Janelidze, S., Hertze, J., Nägga, K., Nilsson, K., Nilsson, C., Wennström, M., van Westen, D., Blennow, K., Zetterberg, H. and Hansson, O. (2017). Increased blood-brain barrier permeability is associated with dementia and diabetes but not amyloid pathology or APOE genotype. *Neurobiology of Aging*, 51, 104–112.
- Jaumard, N.V., Leung, J., Gokhale, A.J., Guarino, B.B., Welch, W.C. and Winkelstein, B.A. (2015). Relevant anatomic and morphological measurements of the rat spine: considerations for rodent models of human spine trauma. *Spine*, 40, E1084–E1092.
- Jia, Z., Zhu, H., Li, J., Wang, X., Misra, H. and Li, Y. (2012). Oxidative stress in spinal cord injury and antioxidant-based intervention. *Spinal Cord*, 50, 4, 264–274.
- Jones, L.L., Yamaguchi, Y., Stallcup, W.B., and Tuszynski, M.H. (2002). NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* 22, 2792–2803.
- Kadota, K., Lu, P., Nguyen, K., Lee-Kubli, C., Kumamaru, H., Yao, L., Knackert, J., Poplawski, G., Dulin, J.N., Strobl, H., *et al.* (2016). Spinal cord reconstitution with homologous neural grafts enables robust corticospinal regeneration. *Nat Med* 22, 479–487.
- Kakaroubas, N., Brennan, S., Keon, M. and Saksena, N.K. (2019). Pathomechanisms of Blood-Brain Barrier Disruption in ALS. *Neuroscience Journal*, 2019, 1–16.
- Kamencic, H., Griebel, R.W., Lyon, A.W., Paterson, P.G. and Juurlink, B.H.J. (2001). Promoting glutathione synthesis after spinal cord trauma decreases secondary damage and promotes retention of function. *The FASEB Journal*, 15, 1, 243–250.
- Karadimas, S. K., Moon, E. S., Yu, W.-R., Satkunendrarajah, K., Kallitsis, J. K., Gatzounis, G., Fehlings, M. G. (2013). A novel experimental model of cervical spondylotic myelopathy (CSM) to facilitate translational research. *Neurobiol Dis*, 54, 43–58.
- Kim, P., Haisa, T., Kawamoto, T., Kirino, T., Wakai, S. (2004). Delayed myelopathy induced by chronic compression in the rat spinal cord. *Ann Neurol*, 55, 503–511.

- Klironomos, G., Karadimas, S., Mavrakis, A., Mirilas, P., Savvas, I., Papadaki, E., Papachristou, D. J., Gatzounis, G. (2011). New experimental rabbit animal model for cervical spondylotic myelopathy. *Spinal Cord*, 49, 1097–1102.
- Kurokawa, R., Murata, H., Ogino, M., Ueki, K., Kim, P. (2011). Altered blood flow distribution in the rat spinal cord under chronic compression. *Spine*, 36, 1006–1009.
- Long, H., Li, G., Lin, E., Xie, W., Chen, W., Luk, K. D., Hu, Y. (2013). Is the speed of chronic compression an important factor for chronic spinal cord injury rat model? *Neurosci Lett*, 545, 75–80.
- Lucas, J.H., Wheeler, D.G., Emery, D.G. and Mallery, S.R. (1998). The endogenous antioxidant glutathione as a factor in the survival of physically injured mammalian spinal cord neurons. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57, 937–954.
- Markuske, H. (1977). Sagittal diameter measurements of the bony cervical spinal canal in children. *Pediatric Radiology*, 6, 129–131.
- Matsui, R.H., Castilho, J.C. de M., Moraes, L.C. de, Gomes, M.F., Faltin Júnior, K. and Matsui, M.Y. (2013). Anatomical evaluation of the cervical vertebrae of Wistar rats by means of digital radiographs and its correlation with the maturation stages of human cervical vertebrae. *Dental Press Journal of Orthodontics*, 18, 82–88.
- Morofuji, Y., Nakagawa, S., So, G., Hiu, T., Horai, S., Hayashi, K., Tanaka, K., Suyama, K., Deli, M.A., Nagata, I., *et al.* (2010). Pitavastatin strengthens the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 30, 727-735.
- Najjar, S., Pahlajani, S., De Sanctis, V., Stern, J.N.H., Najjar, A. and Chong, D. (2017). Neurovascular unit dysfunction and blood–brain barrier hyperpermeability contribute to schizophrenia neurobiology: a theoretical integration of clinical and experimental evidence. *Frontiers in Psychiatry*, 8, 83.
- Nakagawa, S., Deli, M.A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimonio, T., Kittel, A., Tanaka, K., and Niwa, M. (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 54, 253-263.
- Nakagawa, S., Deli, M.A., Nakao, S., Honda, M., Hayashi, K., Nakaoka, R., Kataoka, Y., and Niwa, M. (2007). Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 27, 687-694.
- Natarajan, R., Northrop, N., and Yamamoto, B. (2017). Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Dextran extravasation as a measure of blood-brain barrier permeability. *Curr Protoc Neurosci* 79, 958.1-958.15.

- Ortiz, G.G., Pacheco-Moisés, F.P., Macías-Islas, M.Á., Flores-Alvarado, L.J., Mireles-Ramírez, M.A., González-Renovato, E.D., Hernández-Navarro, V.E., Sánchez-López, A.L. and Alatorre-Jiménez, M.A. (2014). Role of the blood–brain barrier in multiple sclerosis. *Archives of Medical Research*, 45, 687–697.
- Park, J.Y., Kim, S.D., Park, J., Lim, D.J., Lee, H.K., and Chung, H.S. (2006). A new and simple transection knife for study of neurodegeneration and neuroregeneration in animal model. *Acta Neurochir Suppl* 99, 145-150.
- Portiansky, E.L., Nishida, F., Barbeito, C.G., Gimeno, E.J. and Goya, R.G. (2011). Increased number of neurons in the cervical spinal cord of aged female rats. *PLoS ONE*, 6, e22537.
- Radu, M., and Chernoff, J. (2013). An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp*, e50062.
- Rosenberg, G.A. (2012). Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1139-1151.
- Santiago, H.A.R. de, Pierro, L.R.D., Reis, R.M., Caluz, A.G.R.E., Ribeiro, V.B. and Volpon, J.B. (2015). Allometric relationships among body mass, MUZZLE-tail length, and tibia length during the growth of Wistar rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 30, 743–748.
- Sashindranath, M., Daglas, M., and Medcalf, R.L. (2015). Evaluation of gait impairment in mice subjected to craniotomy and traumatic brain injury. *Behav Brain Res* 286, 33-38.
- Saunders, N.R., Dreifuss, J.J., Dziegielewska, K.M., Johansson, P.A., Habgood, M.D., Mollgard, K., and Bauer, H.C. (2014). The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front Neurosci* 8, 404.
- Saunders, N.R., Dziegielewska, K.M., Mollgard, K., and Habgood, M.D. (2015). Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Front Neurosci* 9, 385.
- Sengupta P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*, 4, 624-630.
- Shlosberg, D., Benifla, M., Kaufer, D., and Friedman, A. (2010). Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 6, 393-403.
- Sifat, A.E., Vaidya, B., and Abbruscato, T.J. (2017). Blood-brain barrier protection as a therapeutic strategy for acute ischemic stroke. *AAPS J* 19, 957-972.
- Sommer, C.J. (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133, 245-261.
- Sorby-Adams, A.J., Marcoionni, A.M., Dempsey, E.R., Woenig, J.A., and Turner, R.J. (2017). The role of neurogenic inflammation in blood-brain barrier disruption and development of

cerebral oedema following acute central nervous system (CNS) injury. *Int J Mol Sci* 18.

Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., and Hickman, J.J. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom* 20, 107-126.

Stewart, A.N., Glaser, E.P., Mott, C.A., Bailey, W.M., Sullivan, P.G., Patel, S.P. and Gensel, J.C. (2022). Advanced age and neurotrauma diminish glutathione and impair antioxidant defense after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 39, 1075–1089.

Sun, G., Chen, Y., Zhou, Z., Yang, S., Zhong, C., Li, Z. (2017). A progressive compression model of thoracic spinal cord injury in mice: function assessment and pathological changes in spinal cord. *Neural Regen Res*, 12, 1365-1374.

Suzuki, Y., Nakagawa, S., Endo, T., Sotome, A., Yuan, R., Asano, T., Otsuguro, S., Maenaka, K., Iwasaki, N., Kadoya, K. (2022). High-Throughput Screening Assay Identifies Berberine and Mubritinib as Neuroprotection Drugs for Spinal Cord Injury via Blood-Spinal Cord Barrier Protection. *Neurotherapeutics*, 19, 1976–1991.

Sweeney, M.D., Ayyadurai, S., and Zlokovic, B.V. (2016). Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci* 19, 771-783.

Takeshita, T., Nakagawa, S., Tatsumi, R., So, G., Hayashi, K., Tanaka, K., Deli, M.A., Nagata, I., and Niwa, M. (2014). Cilostazol attenuates ischemia-reperfusion-induced blood-brain barrier dysfunction enhanced by advanced glycation endproducts via transforming growth factor-beta1 signaling. *Mol Cell Neurosci* 60, 1-9.

Toossi, A., Bergin, B., Marefatallah, M., Parhizi, B., Tyreman, N., Everaert, D.G., Rezaei, S., Seres, P., Gatenby, J.C., Perlmutter, S.I. and Mushahwar, V.K. (2021). Comparative neuroanatomy of the lumbosacral spinal cord of the rat, cat, pig, monkey, and human. *Scientific Reports*, 11, 1955.

Vilaça, C.D.O., Orsini, M., Araujo, L.M.A., De Freitas, M.R.G., Davidovich, E., Fiorelli, R., Fiorelli, S., Fiorelli, C., Oliveira, A.B. (2016). Cervical spondylotic myelopathy: what the neurologist should know. *Neurology International*, 2016, 8.

Wong, A.D., Ye, M., Levy, A.F., Rothstein, J.D., Bergles, D.E., and Searson, P.C. (2013). The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* 6.

Youdim, K.A., Avdeef, A., and Abbott, N.J. (2003). In vitro trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. *Drug Discov Today* 8, 997–1003.

Zeman, R.J., Peng, H., Feng, Y., Song, H., Liu, X. and Etlinger, J.D. (2006). β 2 -adrenoreceptor agonist-enhanced recovery of locomotor function after spinal cord injury is glutathione dependent. *Journal of Neurotrauma*, 23, 170–180.