

急性脊髄損傷における Interleukin-10の二次的損傷抑制効果に関する実験的研究

間部 毅

脊髄損傷の病態は、神経細胞および神経伝導路の直接外力による損傷とその後を引き続いて起こる二次的損傷に大別される。二次的損傷の進展メカニズムのなかで、マクロファージやマイクログリアなどが放出するサイトカインによる急性炎症反応は、その進展を助長する大きな因子の一つである。また多量の一酸化窒素 (NO) は神経毒性があり、活性化されたマクロファージやマイクログリアは誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) を発現し NO の産生源となり、二次的損傷の進展に影響を与える。

本研究では抗炎症性サイトカインである Interleukin-10 (IL-10) を急性脊髄損傷ラットへ全身投与し、これによるマイクログリア活性に及ぼす影響について検討し、また組織障害の進展とマクロファージの分布について時間的空間的に評価した。実験にはラットを用い、第7胸椎レベルで椎弓切除後、30gの重錘を1cmの高さから落下させる Weight drop (Allen) 法で急性脊髄不全損傷モデルを作成した。脊髄損傷30分後に IL-10を2 μ g/mlを1ml左大腿静脈から投与した IL-10群と生理食塩水を1ml投与したコントロール群の2群に分け、それぞれ損傷24, 72時間後に灌流固定を行い、抗 OX-42抗体、抗 ED1抗体、抗 iNOS 抗体を用いて免疫組織学的に検討を行い、さらに血清 NOx 値を測定し、また運動機能障害も検討を行った。

その結果 IL-10を全身投与することで壊死組織の進展が抑制され、マイクログリア活性は抗 OX-42抗体を用いた免疫染色により24時間後、72時間後共に細胞形態から活性化の抑制が示唆された。また抗 ED1 抗体陽性マクロファージ/マイクログリアは両群ともに72時間後に著明に増加していたが、頭側4mm、頭尾側6mmと損傷部から離れるにつれてコントロール群、IL-10群に有意差を認めた。また貪食形態を有するマクロファージ/マイクログリアは同時に抗 iNOS 抗体にも陽性であった。受傷前、30分後、24時間後、72時間後と血液を採取し、NOの代謝産物である NO₂⁻、NO₃⁻を測定したところ、コントロール群、IL-10群ともに受傷後30分には増加を認め、その後次第に低下し、受傷後24時間では両群間に有意差はなかったが、72時間後では有意差を認めた。さらに24時間後と72時間後に運動機能障害の評価を行い、コントロール群、IL-10群とも24時間と比較して72時間後には有意に改善していたが、両群間には差は認められなかった。

以上の結果から、IL-10を全身投与することで、超急性期ではあるがマクロファージ/マイクログリア活性化の抑制により炎症反応の悪循環を断ち、その結果二次的損傷進展の軽減効果が示唆された。

(平成15年10月14日受理)

Experimental Study on the Control Effect of Interleukin-10 for Secondary

Damage after Acute Spinal Cord Injury

Takeshi MANABE

Numerous factors are involved in the spread of secondary damage in the spinal cord after traumatic injury, including ischemia, edema, increased excitatory amino acids, inflammatory response, NO, and oxidative damage to the tissue from reactive oxygen species. Activated macrophages and microglia can produce neurotoxic cytokines, such as IL-1 β , TNF- α , and inducible NO synthase and thus may contribute to the spread of damage to levels of the rostral and caudal cord after spinal cord injury (SCI). We hypothesized that attenuation of an inflammatory response and reduction of NO from macrophages/microglia suppresses the spread of secondary damage in the spinal cord.

In this study, a laminectomy was performed in male Sprague-Dawley rats (380~420 g) at the T7 level under general anesthesia, and the spinal cord was injured using a weight drop technique (30 g weight, 10 mm height). We divided the rats into two groups. The IL-10 group was administered IL-10 (2 μ g/ml) and the control group was given saline (1 ml) from the femoral vein at 30 minutes after SCI. This study examined the morphology of microglia, the rostral-caudal distribution of macrophages/microglia, serum NO $_2^-$ and NO $_3^-$ (NOx), and behavior using a modified Tarlov's score at 24 and 72 h after SCI.

Macrophages/microglia were visualized with antibodies against OX-42 and ED1. OX-42 staining revealed activated microglia with blunt processes, called the amoeboid type. At 24 h after SCI, activated microglia were observed in all level in the control group. Though activated microglia were observed at 2 mm rostral and caudal to the lesion, OX-42 staining revealed microglia with the resting morphology, with numerous fine processes, called ramified type at 4 mm and 6 mm rostral and caudal to the lesion in the IL-10 group. At 72 h after SCI, the majority of OX-42 positive cells at 2 mm from the lesion showed the phagocytic morphology, and at 4 mm and 6 mm from the lesion showed the activated morphology in the control group. The activated microglia and the round phagocytic cells were observed at 2 mm from the lesion, and the resting microglia were observed at 4 mm and 6 mm from the lesion in the IL-10 group. From these results, activation of microglia was suppressed by administration of IL-10. Numerous cells with the phagocytic morphology were present at 72 h in both groups. These cells tended to locate within gray matter and dorsal white matter near the lesion and were limited to the necrotic area of dorsal white matter at levels distant to the lesion. The total number of ED1-positive cells gradually declined through 6 mm rostral and caudal to the lesion, particularly in the IL-10 group. Furthermore, ED1-positive cells with a phagocytic morphology stained antigen iNOS. Plasma NOx levels increased at 30 minutes after injury and gradually decreased. So there were no significant differences at 30 minutes and 24 h after injury. However significant difference in plasma NOx levels was observed between the control group and IL-10 group at 72 h after injury. The behavior score significantly improved at 72 h in both groups, as compared with the score at 24 h. However there were no significant differences at 72 h in either group.

Suppression of the activation of macrophages/microglia broke the vicious circle of an acute

inflammatory response, and it is thought that this may play some role in controlling the spread of secondary damage. (Accepted on October 14, 2003) *Kawasaki Igakkaishi* 29 (3): 203-219, 2003

Key Words ① Spinal cord injury ② Macrophage ③ Microglia
④ Inflammatory response ⑤ Nitric oxide

はじめに

脊髄損傷の病態は、神経細胞および神経伝導路の直接外力による損傷とその後に引き続いて起こる二次的損傷に大別される。二次的損傷の進展メカニズムは完全には解明されていないものの、炎症反応、虚血、浮腫、興奮性アミノ酸濃度の上昇、nitric oxide (以下 NO)、活性酸素-フリーラジカルの産生などの関与が注目されている¹⁾。なかでも急性炎症反応は、損傷部位に集積する細胞および損傷部位の残存細胞から放出される種々のサイトカインによる一連の反応である。中枢神経系における免疫システムを担う細胞であるマクログリアは、虚血や物理的傷害を受けると増殖し²⁾、O₂やNOなどのfree radicalや細胞傷害性の強いTNF- α やIL-1 β を放出し、二次的損傷の伸展に重要な役割を果たす^{3),4)}。また内皮細胞からは intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) や vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) などの接着分子が発現され、受傷後数時間以内に好中球が、またやや遅れてマクロファージが損傷脊髄実質内に浸潤し⁵⁾、新たなサイトカインやNOなどの酸化ストレスを産生する⁶⁾⁻⁹⁾。しかしながらマクロファージの活性は壊死組織の貪食など組織修復には必要不可欠で、Rapalinoら¹⁰⁾は末梢神経と共培養し活性化したマクロファージを損傷脊髄に移植し、軸索再生と運動機能の回復が得られたと報告した。一方Popovichら¹¹⁾は血中のマクロファージを減少させることにより下肢機能の改善と組織学的な修復を認めたことを報告し、さらにBetheaら¹²⁾はマクロファージに対して抑制的に作用するInterleukin-10 (以下IL-10)の全身投与により下肢機能が回復したことを報告した。また近年多量のNOがニュー

ロン死を引き起しさらにアポトーシスを誘導することも報告されている¹³⁾。このようにマクロファージが脊髄損傷後の二次的損傷に及ぼす影響について依然不明な点も多いが、急性期には組織傷害性に作用するものと考えられている。IL-10は単球/マクロファージの炎症性サイトカイン産生を始めとする免疫機能を抑制することが知られており、さらに中枢神経系ではアストロサイトやマクログリアの活性の抑制が報告されている。BetheaらはIL-10を全身投与することで組織内のTNF- α 量が減少することを報告したが、今回われわれはマクロファージ/マクログリアからのNO産生が低下し、二次的損傷の進展抑制が可能ではないかと仮説を立てた。

そこで本研究では、急性脊髄損傷ラットにIL-10を全身投与し、これによるマクログリア活性に及ぼす影響について検討し、また組織傷害の進展とマクロファージの分布を時間的空間的に評価し、さらには損傷後の血清NO値の時間的変化について検討を行った。

材料と方法

1. 急性脊髄損傷モデルの作成

雄性Sprague-Dawleyラット(13週齢, 380~420g)を用いた。麻酔はジエチルエーテルにて導入後、ハロセンにて維持した。第7胸椎椎弓切除を行い、硬膜を露出し、接触面積が直径2mmの円柱形で重さ30gの重錘を1cmの高さから落下させるWeight drop (Allen)法¹⁴⁾を用いて急性脊髄不全損傷モデルを作成した。これらをIL-10群とコントロール群の2群に分け検討を行った。IL-10群では、脊髄損傷30分後に生理食塩水を溶媒として2 μ g/mlのIL-10 (Genzyme Corporation)溶液を1ml左大腿静脈

から投与を行い、またコントロール群には生理食塩水 1 ml を同様に投与した。損傷24および72時間後に各々ハロセンにて深麻酔下に経心臓的に体重量のヘパリン加生理食塩水にて灌流後、4%パラフォルムアルデヒド400 ml で灌流固定を行い、脊髓を摘出した。摘出した脊髓は、その後同灌流固定液で14時間の後固定を行い、次いで20%シュウクローズ phosphate-buffered saline (以下 PBS と略す) 溶液に24時間浸漬した後 OCT compound 内に包埋後、ドライアイスアセトン溶液で凍結した。脊髓損傷部位から頭尾側にそれぞれ 2, 4, 6 mm の部位をクリオスタットを用いて 10 μ m の連続切片を作成し (Fig. 1), MAS コート付きスライドガラスに3切片を貼付した。対象は各群の24時間モデル、72時間モデルともに8匹ずつとした。

本実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (00-053, 01-004, 03-003), 川崎医科大学動物実験指針に基づき実施された。

2. 免疫組織学的検討

抗 OX-42 抗体, 抗 ED1 抗体, 抗 inducible NOS 抗体 (以下抗 iNOS 抗体)

組織切片を PBS 溶液で洗浄後, 3% H_2O_2 にて内因性ペルオキシダーゼ阻断を行い, PBS /0.1% Tween 20 (以下 PBT と略す) で洗浄し, 1.5% 正常馬血清 PBS 溶液でブロッキングを行った後, 1:500 の抗 OX-42 抗体 (Serotec Ltd) および抗 ED1 抗体 (Serotec Ltd) を 4 $^{\circ}$ C で14時

間反応させた。PBT にて 5 分 \times 3 回洗浄後, ビオチン化抗マウス IgG を 1:100 で30分間反応させた。PBT にて 5 分 \times 3 回洗浄後, ABC elite kit (Vector laboratories) のアビジン, ビオチン液を加えて30分反応させ, PBS にて 5 分 \times 3 回洗浄後, 0.05% DAB/0.01% H_2O_2 で発色させ, さらにヘマトキシリンにて後染色を行った。また抗 iNOS 抗体にはブロッキングにヒツジ血清を用い, 一次抗体には 1:100 の抗 iNOS 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を, また二次抗体には 1:100 のビオチン化抗ウサギ IgG を用いて免疫染色を行った。抗 OX-42 抗体陽性細胞については, 200 倍の倍率で前角部に観察される全抗 OX-42 抗体陽性細胞に対する明らかに静止型と判断されるマイクログリアの比率を検討した。また活性化マクロファージ/マイクログリアは 200 倍の倍率で 1 切片内に観察される貪食形態を有した抗 ED1 抗体陽性細胞数を後索, 灰白質に分けてカウントし, 3 切片の平均値を陽性細胞数とした。

3. NO 代謝産物の測定

脊髓損傷後の経時的な NO 量の推移について検討するため, 受傷前および受傷30分, 24, 72 時間後に採血し, NO の代謝産物である NO_2^- , NO_3^- を測定した。左大腿静脈から 1 ml の採血を行い, 0 $^{\circ}$ C, 15000 rpm で 5 分間遠沈した後に血清を採取し, 凍結後 SRL に依頼し, 高速液体クロマトグラフィー法 (High performance liquid chromatography; 以下 HPLC と略す) で NO_2^- , NO_3^- を測定し, その総量を NO_x とした^{15), 16)}。

4. 運動機能障害の評価

運動機能障害の評価は, ラットを約 20 $^{\circ}$ の斜面台を登らせ, 修正 Tarlov score^{17), 18)} に従って行った。評価は, 脊髓損傷24, 72時間後に処置条件を知らされていない2名の観察者によって行われた。

5. 統計学的検定

両群間の壊死組織の進展には Fisher's exact-test を用い, さらに

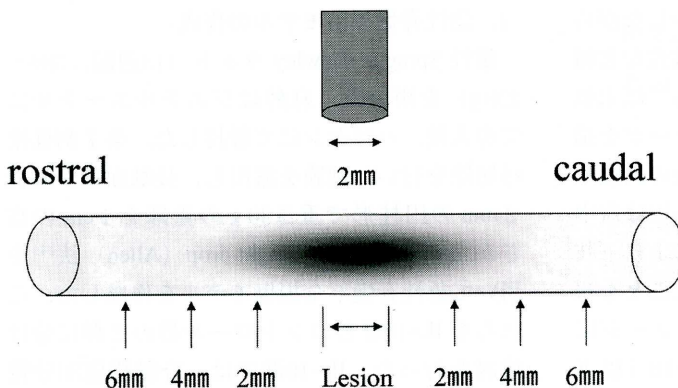


Fig. 1. Schema for the spread of secondary damage. The histological changes were evaluated in each region.

免疫組織学的検討には Mann-Whitney U-test を、NO 代謝産物の測定と運動機能障害の評価には Kruskal Wallis 検定後に Mann-Whitney U-test with Bonferroni 検定を用いた。

結 果

I. 損傷脊髄の組織学的変化 (H-E 染色)

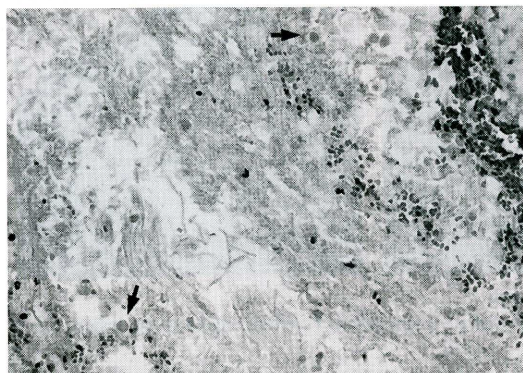


Fig. 2. Histopathological findings at 24h after SCI in the lesion.

The tissue was severely disrupted and observed multiple hemorrhages, edema, necrosis and spheroids (arrow) in the spinal cord.

(H-E staining $\times 200$)

1. 24時間後の損傷部位では、くも膜下や脊髄内に血腫を認め、灰白質は壊死に陥り、白質は浮腫状で、腫大した軸索であるスフェロイドが観察された (**Fig. 2**)。後索には、好中球を中心とした炎症細胞浸潤が認められた。損傷部位から頭尾側 2 mm 部で脊髄内に出血を認めた。後索の壊死している例では、その内部に少数の好中球が認められた。頭尾側 4 mm 部にも脊髄内の出血を認めた。また後索には境界明瞭な細長い管状の壊死巣である鉛筆状軟化が認められた。壊死領域はコントロール群では頭側 4 mm 部で 8 例中 4 例に、また尾側 4 mm 部では 8 例中 7 例に認められたが IL-10 群では尾側 4 mm 部で 8 例中 2 例にのみ認められた。壊死組織内部には少数の好中球を中心とした炎症細胞の浸潤を認めた。頭尾側 6 mm 部でも脊髄内に出血が認められた。壊死組織はコントロール群では頭側 6 mm 部では 8 例中 1 例、尾側 6 mm 部では 8 例中 3 例に認められたが、IL-10 群ではいずれの部位でも認められなかった (**Fig. 3, 4, Table 1**)。

2. 72時間後の損傷部位の後索には両群ともに壊死組織が広範囲に広がっており、その周囲の

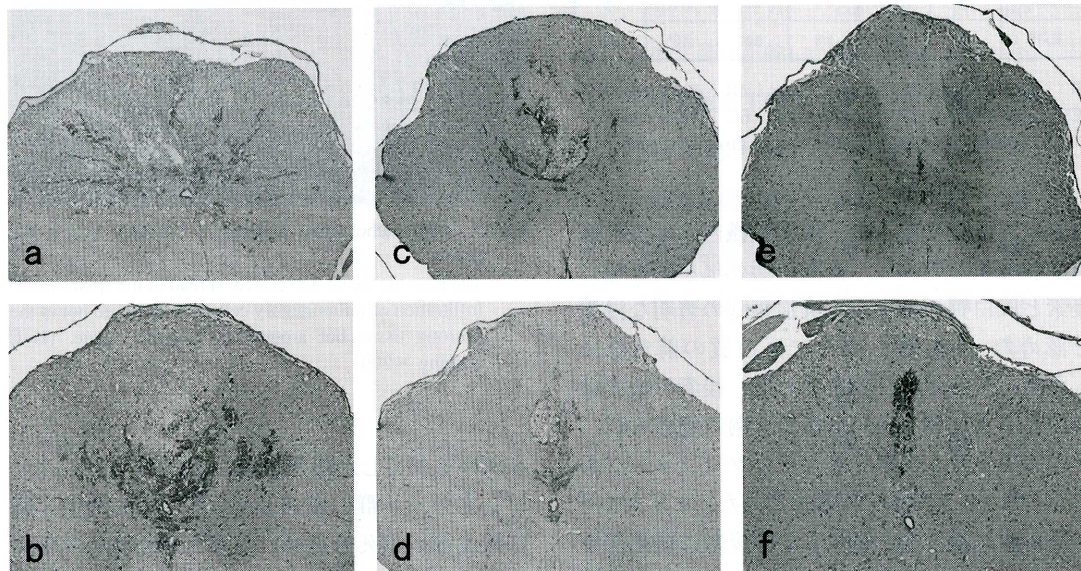


Fig. 3. Histopathological findings at 24h after SCI in the control group.

a ; 2 mm rostral b ; 2 mm caudal c ; 4 mm rostral d ; 4 mm caudal e ; 6 mm rostral f ; 6 mm caudal to the lesion. (H-E staining $\times 40$)

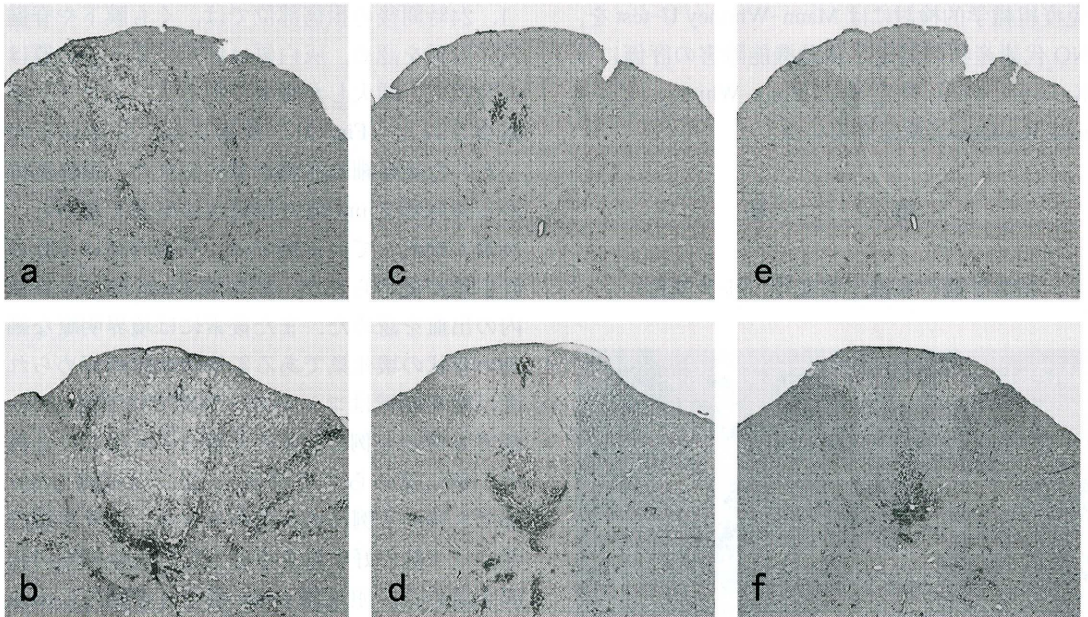


Fig. 4. Histopathological findings at 24h after SCI in the IL-10 group.

a ; 2 mm rostral b ; 2 mm caudal c ; 4 mm rostral d ; 4 mm caudal e ; 6 mm rostral f ; 6 mm caudal to the lesion. (H-E staining $\times 40$)

Table 1. Number of rats in which necrotic regions of the spinal cord were observed at 24h after SCI

Group	Rostral/Caudal Spinal Cord Level (mm)					
	6R	4R	2R	2C	4C	6C
Control	1/8	4/8	8/8	8/8	7/8	3/8
IL-10	0/8	0/8	8/8	8/8	2/8*	0/8

2R : 2 mm rostral ; 2C : 2 mm caudal ; 4R : 4 mm rostral ; 4C : 4 mm caudal ; 6R : 6 mm rostral ; 6C : 6 mm caudal

* Significantly different from the control group, $p < 0.05$

白質は浮腫状であった。壊死組織内には炎症細胞は散在するのみで、後索の壊死部を囲む様に後索と灰白質の境界部に炎症細胞の著明な浸潤を認めた (Fig. 5)。さらに灰白質の前角部にも血腫と炎症細胞浸潤を認めた。後索の壊死は両群とも頭尾側 2 mm 部まで全例に認められ、その周囲を貪食形態を有したマクロファージを中心とした炎症細胞の浸潤を認めた。コントロール群の頭尾側 4 mm 部では全例後索に壊死部を認めその内部と周辺部にマクロファージが浸潤していた。しかし IL-10 群では尾側 4 mm 部では全例に壊死組織を認めたが、頭側 4 mm 部では

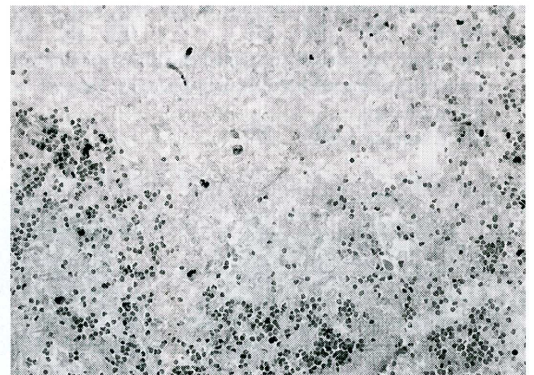


Fig. 5. Histopathological findings at 72h after SCI in the lesion.

The necrotic tissue was widely spread in the spinal cord. Infiltration of inflammatory cells was observed not in the necrotic tissue but around the necrotic tissue. (H-E staining $\times 200$)

8 例中 2 例にしか壊死組織は認められなかった。コントロール群の頭側 6 mm 部では 8 例中 5 例に後索部の壊死を認め、尾側 6 mm 部では全例後索部に壊死組織が存在していたが、IL-10 群では頭尾側 6 mm 部では全例ほぼ正常であった (Fig. 6, 7, Table 2)。以上により IL-10 の投与

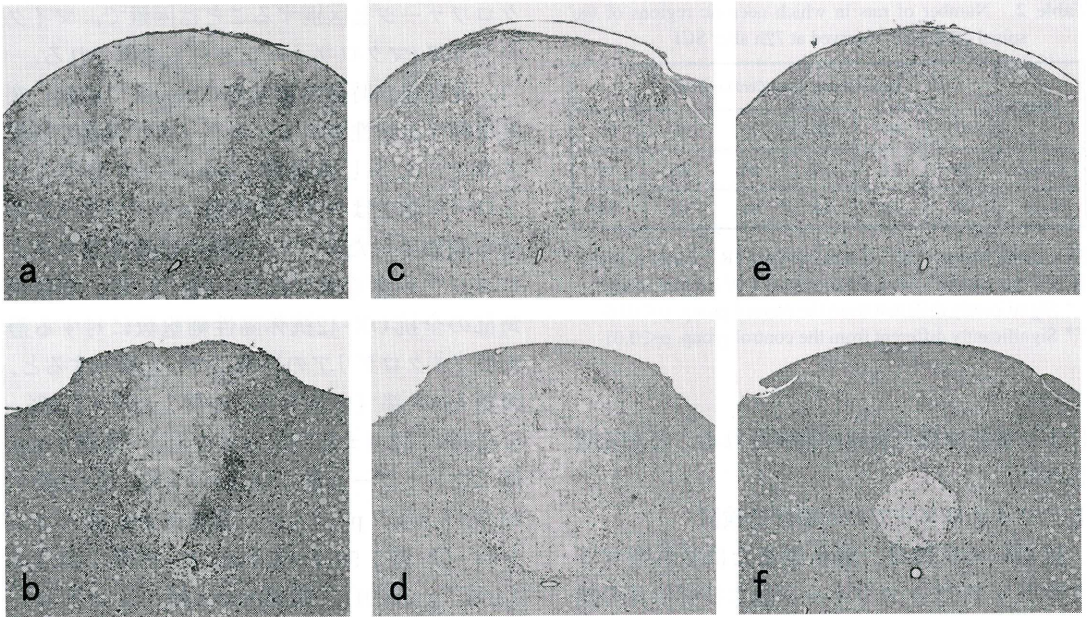


Fig. 6. Histopathological findings at 72h after SCI in the control group.
a ; 2 mm rostral **b** ; 2 mm caudal **c** ; 4 mm rostral **d** ; 4 mm caudal **e** ; 6 mm rostral **f** ; 6 mm caudal to the lesion. (H-E staining $\times 40$)

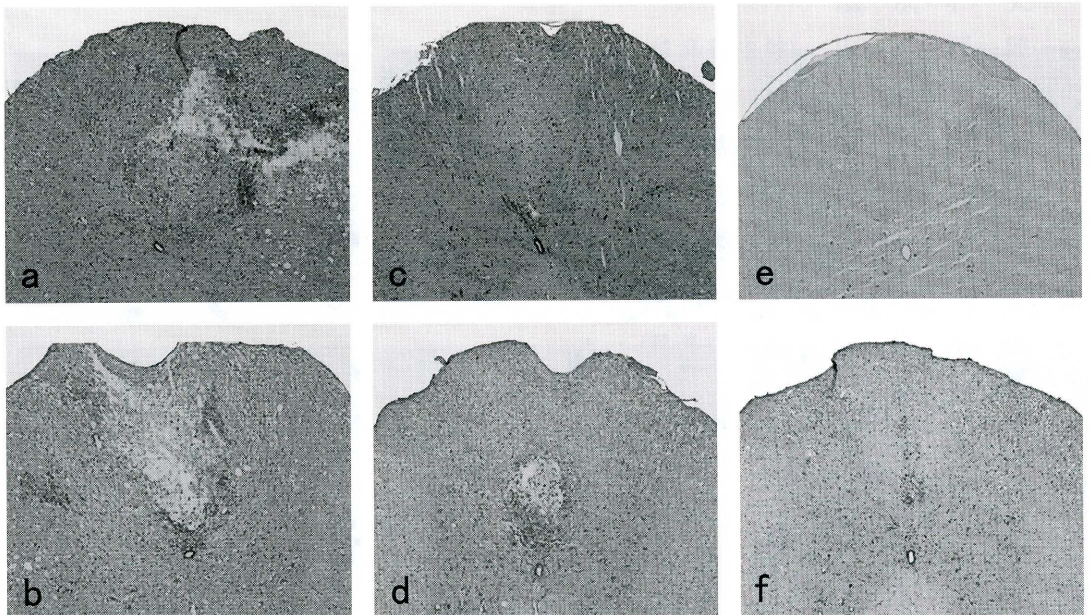


Fig. 7. Histopathological findings at 72h after SCI in the IL-10 group.
a ; 2 mm rostral **b** ; 2 mm caudal **c** ; 4 mm rostral **d** ; 4 mm caudal **e** ; 6 mm rostral **f** ; 6 mm caudal to the lesion. (H-E staining $\times 40$)

Table 2. Number of rats in which necrotic regions of the spinal cord were observed at 72h after SCI

Group	Rostral/Caudal Spinal Cord Level (mm)					
	6R	4R	2R	2C	4C	6C
Control	5/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
IL-10	0/8*	2/8**	8/8	8/8	8/8	0/8**

2R : 2 mm rostral ; 2C : 2 mm caudal ; 4R : 4 mm rostral ; 4C : 4 mm caudal ; 6R : 6 mm rostral ; 6C : 6 mm caudal

* Significantly different from the control group, $p < 0.05$

** Significantly different from the control group, $p < 0.01$

により壊死組織の進展が抑制されることが確認された。

II. マイクログリアの形態学的検討

抗OX-42抗体は、静止型または活性型マイクログリア/マクロファージおよび好中球の補体C3b受容体を認識する¹⁹⁾。マイクログリアは、正常では多数回分岐する細かい突起を有する静止型 (ramified type) であるが、病的状況下では突起の少ない活性型マイクログリア (ameboid type) に形態を変化させ、さらに貪食能を有する形態に変形したマイクログリアはマ

クロファージと区別することは困難で、マイクログリア/マクロファージとして認識される。

1. 受傷後24時間の頭尾側 2 mm 部では短い突起を有する活性型マイクログリアが両群で観察された。しかし頭尾側 4 mm, 6 mm 部のコントロール群ではやはり活性型マイクログリアが多く観察されたが、IL-10群では静止型マイクログリアが多く観られた (Fig. 8, 9)。脊髓前角部の全抗OX-42抗体陽性細胞数に対する静止型マイクログリアの比率について検討すると、頭側 4 mm 部 (コントロール群 ; $42.1 \pm 1.9\%$, IL-10群 ; $82.4 \pm 3.7\%$ $p < 0.01$)、尾側 4 mm 部 (コントロール群 ; $48.5 \pm 7.8\%$, IL-10群 ; $78.3 \pm 6.9\%$ $p < 0.01$)、頭側 6 mm 部 (コントロール群 ; $56.7 \pm 8.5\%$, IL-10群 ; $94.0 \pm 3.0\%$ $p < 0.01$)、尾側 6 mm 部 (コントロール群 ; $57.9 \pm 4.1\%$, IL-10群 ; $93.9 \pm 2.0\%$ $p < 0.01$) で有意差を認めた (Fig. 10)。

2. 受傷72時間後の頭尾側 2 mm 部では後索の壊死部の周囲や灰白質の前角部に円形状の貪食形態を有する抗OX-42抗体陽性細胞が多数観察されたが、IL-10群の前角部では短い突起を

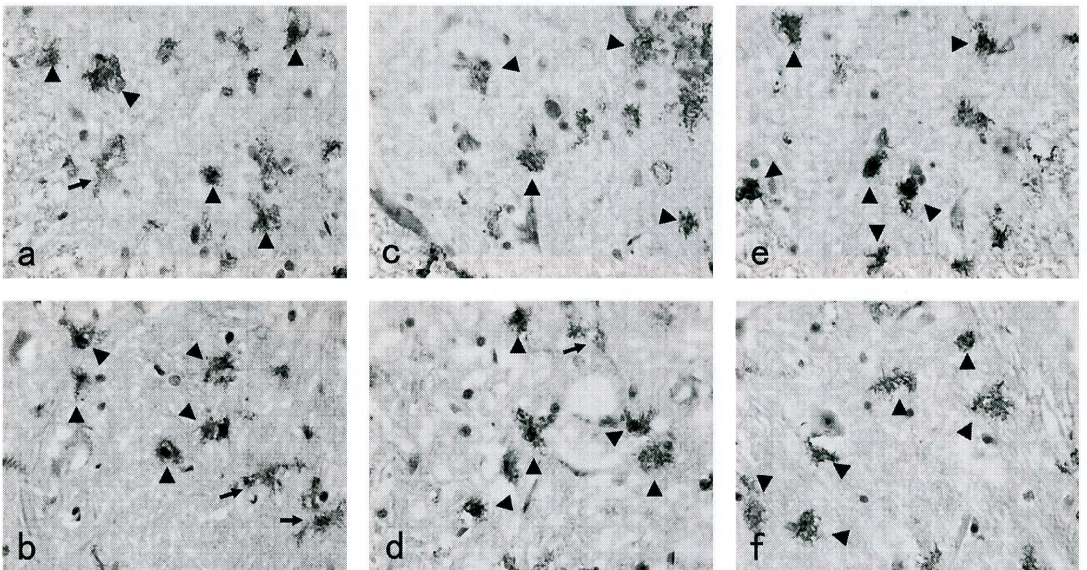


Fig. 8. OX-42 staining in the area of anterior horn at 24h after SCI in the control group.

a ; 2 mm rostral b ; 2 mm caudal c ; 4 mm rostral d ; 4 mm caudal e ; 6 mm rostral f ; 6 mm caudal to the lesion. The activated microglia (arrowhead) with blunt processes were observed in all level. (original magnification ; $\times 400$)

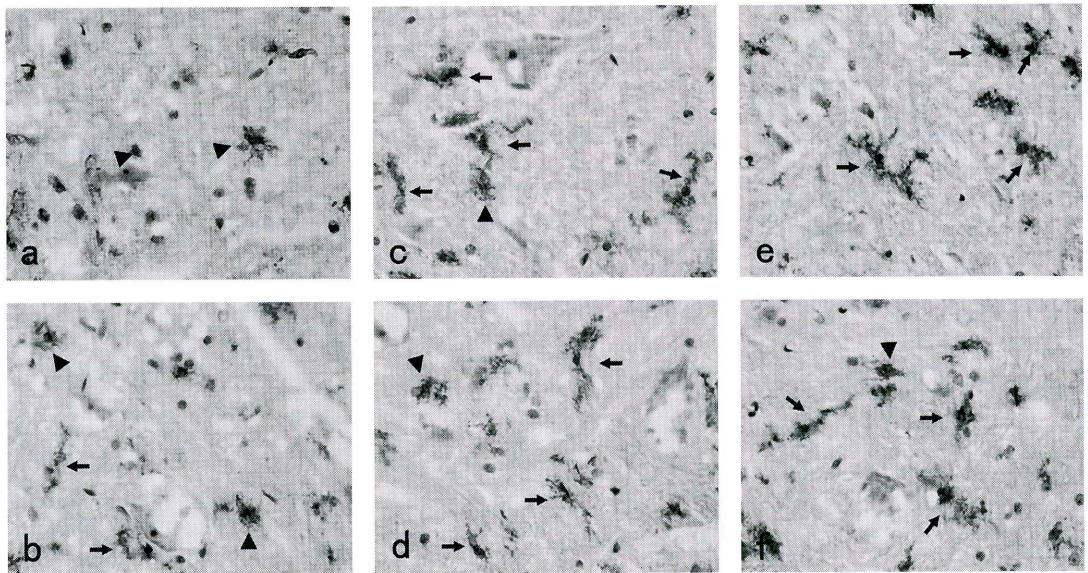


Fig. 9. OX-42 staining in the area of anterior horn at 24h after SCI in the IL-10 group. **a** ; 2 mm rostral **b** ; 2 mm caudal **c** ; 4 mm rostral **d** ; 4 mm caudal **e** ; 6 mm rostral **f** ; 6 mm caudal to the lesion. The activated microglia (arrowhead) were observed at 2 mm rostral/caudal to the lesion. However, OX-42 staining revealed microglia with the resting morphology (arrow) with numerous fine processes at 4 mm and 6 mm rostral/caudal to the lesion. (original magnification ; $\times 400$)

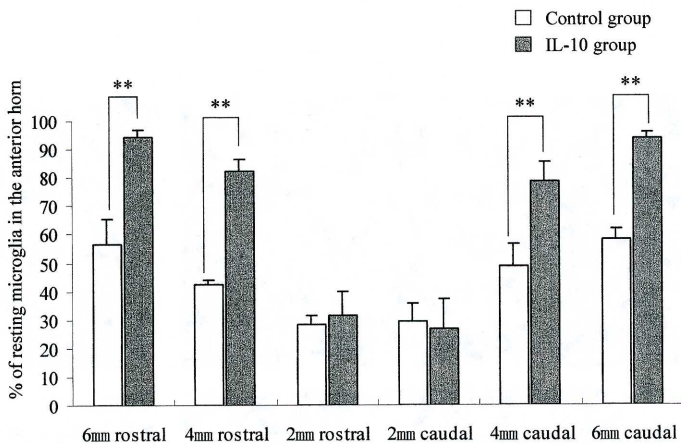


Fig. 10. The % of resting microglia in the anterior horn at 24h after injury in control and IL-10 group in each level. Values in figures are mean \pm SD of eight animals. ** $p < 0.01$

有する活性型マイクログリアが多数観察された。コントロール群の頭尾側 4 mm 部ではほとんどが活性型マイクログリアで特に尾側に著明であった。IL-10 群では尾側 4 mm 部に少数の活性型マイクログリアが観察されたが、頭側 4 mm 部はほとんどが静止型マイクログリアで両群間に

形態の違いが観られた。コントロール群の頭尾側 6 mm 部では活性型マイクログリアが多数存在していたが、IL-10 群ではほとんどが静止型であった (Fig. 11, 12)。脊髄前角部の静止型マイクログリア比率を検討すると頭側 4 mm 部 (コントロール群 ; $18.5 \pm 4.3\%$, IL-10 群 ;

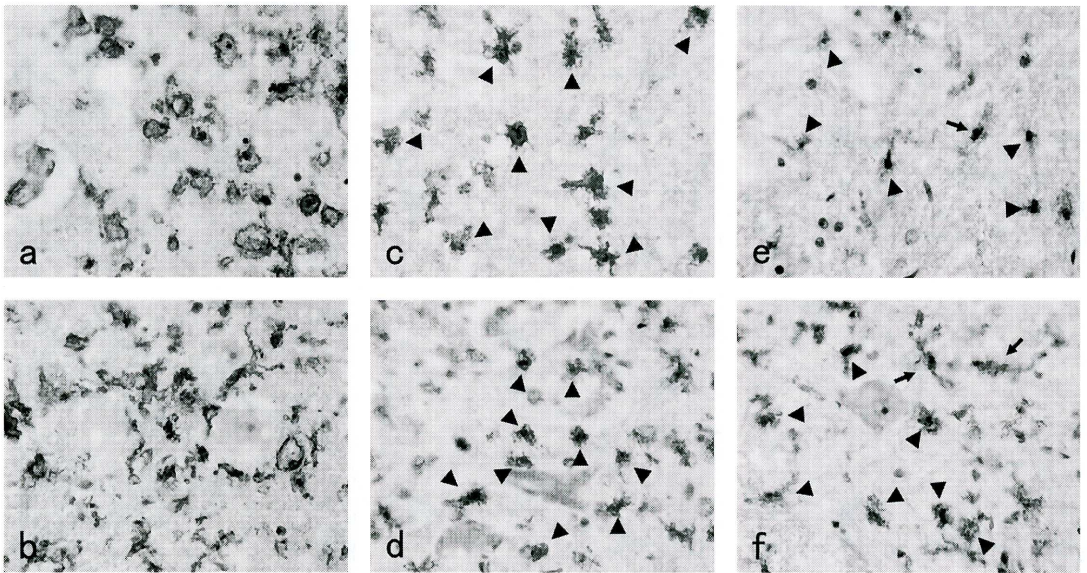


Fig. 11. OX-42 staining in the area of anterior horn at 72h after SCI in the control group. **a** ; 2 mm rostral **b** ; 2 mm caudal **c** ; 4 mm rostral **d** ; 4 mm caudal **e** ; 6 mm rostral **f** ; 6 mm caudal to the lesion. The majority of OX-42⁺ cells at 2 mm from the lesion showed the phagocytic morphology, and showed the activated morphology (arrowhead) at 4 mm and 6 mm rostral/caudal to the lesion. (original magnification ; × 400)

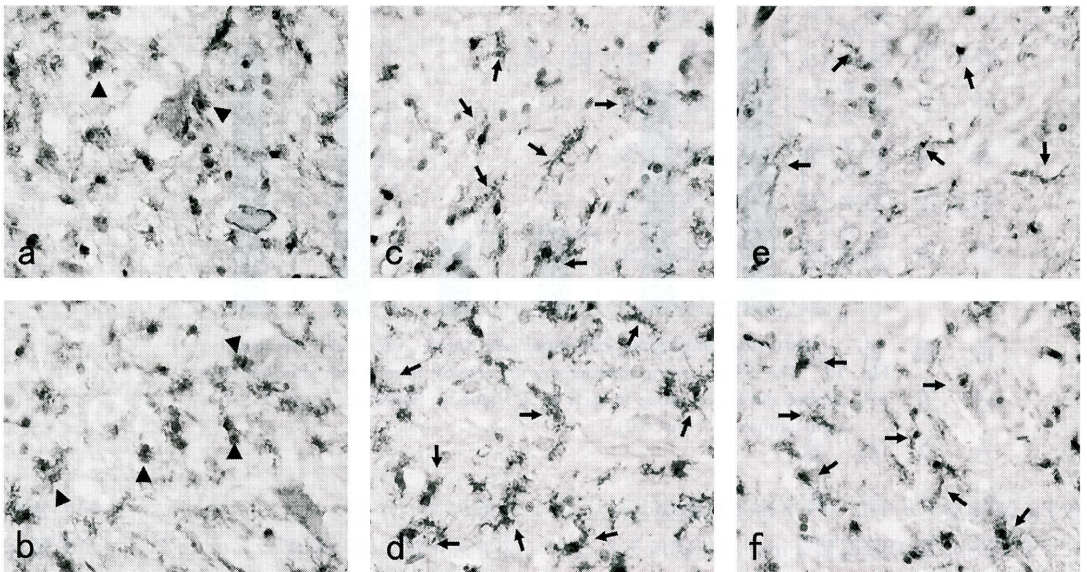


Fig. 12. OX-42 staining in the area of anterior horn at 72h after SCI in the IL-10 group. **a** ; 2 mm rostral **b** ; 2 mm caudal **c** ; 4 mm rostral **d** ; 4 mm caudal **e** ; 6 mm rostral **f** ; 6 mm caudal to the lesion. The activated microglia (arrowhead) and round phagocytic cells could be seen at 2 mm from the lesion. Furthermore, the majority of OX-42⁺ cells revealed the resting type (arrow) at 4 mm and 6 mm from the lesion. (original magnification ; × 400)

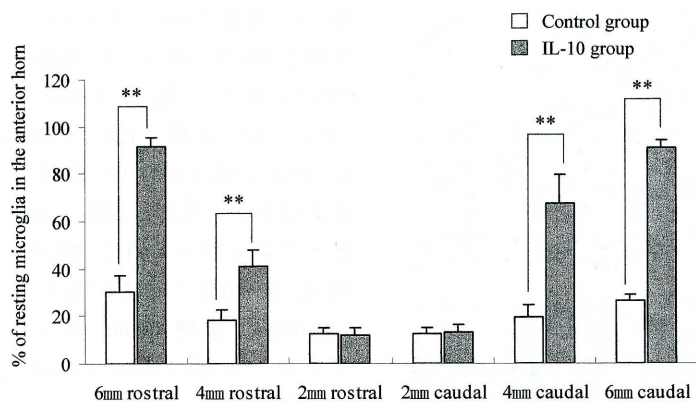


Fig. 13. The % of resting microglia in the anterior horn at 72h after injury in control and IL-10 group in each level. Values in figures are mean \pm SD of eight animals. **p<0.01

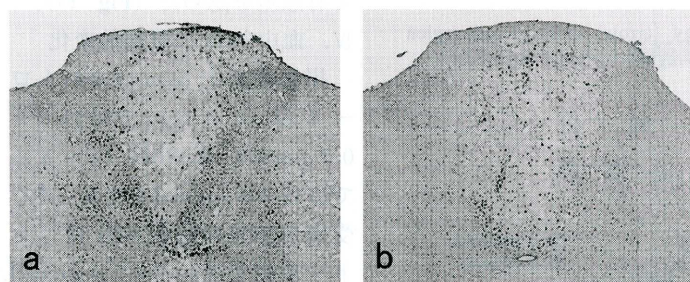


Fig. 14. Immunohistochemical staining for ED1 at 72h after injury. a; 2 mmcaudal to the lesion b; 4 mm caudal to the lesion (original magnification; \times 200)

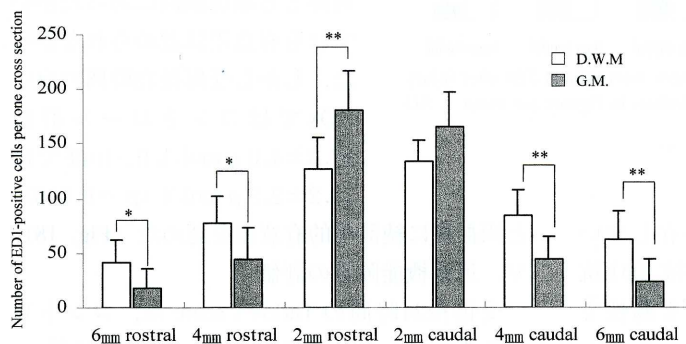


Fig. 15. Distribution of cell counts of ED1⁺ macrophages/microglia at 72h after injury in control group. ED1⁺ cells with a phagocytic morphologh were counted within 2, 4, and 6 mm rostral or 2, 4, and 6 mm caudal to the lesion. The date are expressed as FD1⁺ cells in dorsal white matter (D.W.M.) or in gray matter (G.M). Values in figures are mean \pm standard deviations (SD) of eight animals. *p<0.05 ** p<0.01

41.2 \pm 6.8% p<0.01), 尾側 4 mm 部 (コントロール群; 19.5 \pm 4.8%, IL-10群; 67.6 \pm 12.3% p<0.01), 頭側 6 mm 部 (コントロール群; 30.2 \pm 7.0%, IL-10群; 91.9 \pm 3.5% p<0.01), 尾側 6 mm 部 (コントロール群; 26.5 \pm 2.8%, IL-10群90.7 \pm 3.4% p<0.01) で有意差を認めた (Fig. 13). このことから特に前角部分では受傷後24時間ではマイクログリアの活性はIL-10の投与により頭尾側 4 mm 程度までしか及ばず, さらに72時間後でもその活性は著明に波及しないことが示唆された.

Ⅲ. 抗 ED1 抗体陽性細胞の分布

抗 ED1 抗体は活性化されたマクロファージ/マイクログリア中の細胞内抗原を認識する²⁰⁾.

1. 受傷24時間後の抗 ED1 抗体陽性細胞は両群ともに損傷部位と頭尾側 2 mm 部に散在する程度であった.

2. 受傷72時間後には, その数の著しい増加を認めた. 損傷部位では抗 ED1 抗体陽性細胞は脊髄組織内全体に高密度に分布していた. 頭尾側 2 mm 部では, 後索内の壊死組織を取り囲むように抗 ED1 抗体陽性細胞は存在し, 後索より灰白質に多く認められた (Fig. 14a). 頭尾側 4 mm 部では後索の壊死領域は縮小し, 抗 ED1 抗体陽性細胞はその壊死組織内およびその周囲に存在し, 灰白質では後索との移行部に認められた (Fig. 14b). 頭尾側 6 mm 部では,

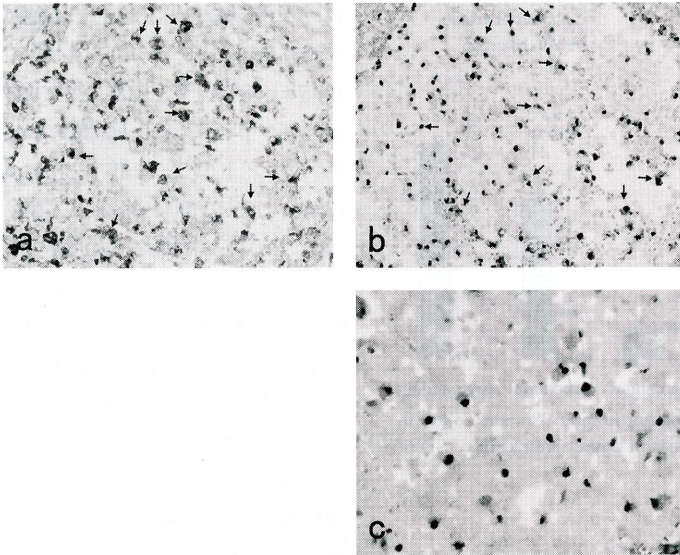


Fig. 16. Immunohistochemical staining for ED1 and iNOS in the necrotic region of the D.W.M. at 6 mm caudal to the lesion
a ; ED1⁺ cell with a phagocytic morphology (arrow) in the necrotic region
b & c ; iNOS⁺ cells (arrow) at the same region (original magnification ;
a & b × 200, **c** × 400)

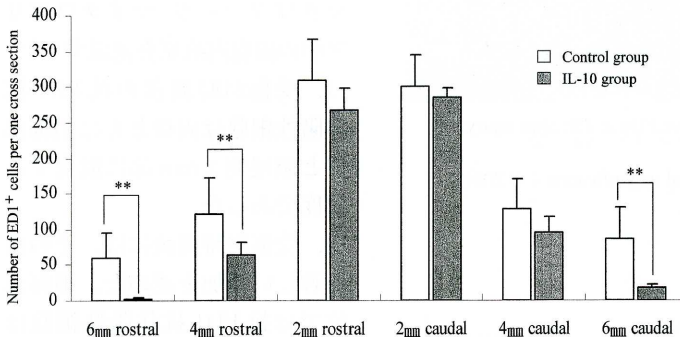


Fig. 17. The total number of ED1⁺ macrophages/microglia at 72h after injury in control and IL-10 group in each level. Values in figures are mean ± SD of eight animals. **p < 0.01

陽性細胞は後索内の壊死組織内に存在していた (Fig. 15)。また貪食形態を有する抗 ED1 抗体陽性細胞は同時に抗 iNOS 抗体にも陽性であった (Fig. 16)。

受傷72時間後の後索、灰白質内に観察される抗 ED1 抗体陽性細胞数をコントロール群と IL-10群で比較したところ頭側 2 mm 部 (コントロール群 ; 309.1 ± 58.7, IL-10群 ; 266.6 ±

30.9), 尾側 2 mm (コントロール群 ; 300.8 ± 43.9, IL-10群 ; 285.5 ± 12.5), 尾側 4 mm 部 (コントロール群 ; 128.1 ± 42.8, IL-10群 ; 95.3 ± 21.0) では有意差はなかったが, 頭側 4 mm 部 (コントロール群 ; 120.6 ± 52.0, IL-10群 ; 63.5 ± 18.5 p = 0.004), 頭側 6 mm 部 (コントロール群 ; 60.3 ± 34.0, IL-10群 ; 2.7 ± 2.3 p = 0.00046), 尾側 6 mm 部 (コントロール群 ; 86.0 ± 43.5, IL-10群 ; 17.2 ± 4.4 p = 0.00047) と損傷部から離れるにつれて有意差を認めた (Fig. 17)。

IV. 血中 NOx の経時の変化

損傷前血中 NOx はコントロール群 (n = 8) では 11.0 ± 0.7 μmol/l, IL-10群 (n = 8) では 12.0 ± 1 μmol/l であった。受傷後30分の血中 NOx はコントロール群では 19.7 ± 7.8 μmol/l, IL-10群では 21.8 ± 8.2 μmol/l で, 受傷24時間のコントロール群では 20.0 ± 5.7 μmol/l, IL-10群では 15.6 ± 3.6 μmol/l と両群とも増加傾向にあったがいずれも有意差は認められなかった。しかし受傷後72時間の血中 NOx ではコントロール群は 17.3 ± 4.0 μmol/l, IL-10群では 13.2 ± 2.5 μmol/l (p = 0.046)

と両群間に統計学的有意差を認めた (Fig. 18)。

V. 運動機能障害の評価

受傷後24時間の Tarlov's score は, コントロール群 (n = 8) では 0.78 ± 0.44, IL-10群 (n = 8) では 1.15 ± 0.16 と有意差は認められなかった。受傷後72時間の Tarlov score は, コントロール群では 1.5 ± 0.21 で, IL-10群では 1.73 ± 0.25 と両群ともに有意な改善を認めたが, 両群

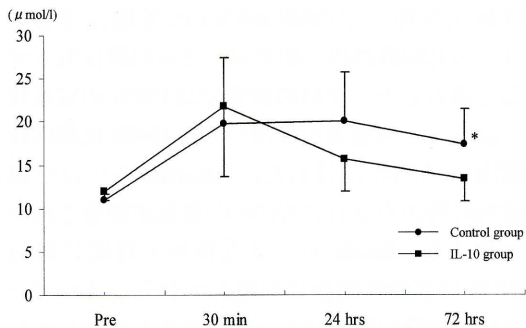


Fig. 18. Plasma NOx levels in both groups. Values in figures are mean ± SD of eight animals. * p<0.05

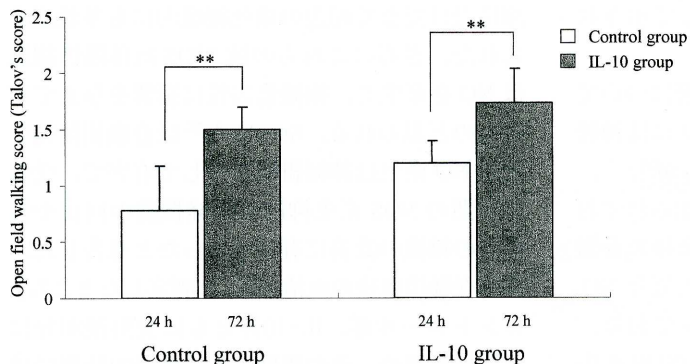


Fig. 19. Behavior score after SCI in both groups. Values in figures are mean ± SD of eight animals. **p<0.01

間に有意差は認められなかった (Fig. 19).

考 察

急性脊髄損傷における二次的損傷は受傷後数分以内から起こり、組織傷害の進展が麻痺の増悪につながる事が判明してきた^{21), 22)}。そのため二次的損傷の抑制は臨床上的大きな課題である。この二次的損傷の発現メカニズムは完全には解明されていないが、炎症反応もその進展を助長する大きな因子の一つである。炎症反応は損傷部位に集積する好中球やマクロファージなどの細胞および損傷部位のマイクログリアやアストロサイトなどの残存細胞から放出されるサイトカインによる一連の反応である。IL-10は主に2型ヘルパーT細胞から産生されるサイトカインで、単球/マクロファージ、アスト

ログリア、マイクログリアからも産生される²³⁾。そしてIL-10は単球/マクロファージに対して炎症性サイトカインの産生をはじめとする免疫機能を抑制する抗炎症性サイトカインとして作用し、炎症性疾患動物モデルでは容量依存性に生存率の改善が報告されている^{24), 25)}。さらにIL-10は、中枢神経系でもアストロサイトやマイクログリアの活性を抑制し、髄膜炎モデル²⁶⁾や実験的自己免疫性脳脊髄炎²⁷⁾に効果があることが報告されている。

今回の研究結果では急性期のIL-10全身投与により二次的損傷進展を有意に抑制することが可能であった。マイクログリアは、中枢神経系の免疫システムを担う重要な細胞であるが組織環境の変化に敏感で^{28)~30)}、病的環境下ではその形態を活性化型マイクログリアに変化させて、サイトカインを放出し二次的損傷の進展に関与することが知られている^{31)~34)}。抗OX-42抗体を用いた免疫染色による検討では、マイクログリアの活性化はコントロール群とIL-10群での細胞形態の違いとして表現された。またその活性の進展はIL-10群では72時間後にも著明には進んではおらず、超急性期にマイクログリアの活性を抑制することによりその後の炎症反応の進展を抑制しうることが示唆された。マクロファージは受傷から数時間遅れて損傷組織内に浸潤し、壊死組織を貪食し、組織修復には必要不可欠である。抗ED1抗体陽性細胞の浸潤は受傷後24時間では損傷部、尾側2mm部に散在する程度であったが、受傷72時間後にはその数は著明に増加し、かつその形態は貪食型で、抗iNOS抗体にも陽性であった。抗ED1抗体陽性細胞は、損傷部位から頭尾側2mm部にかけては壊死組織の周囲を取り囲むように存在し、損傷部位から離れるにつれて後索に存在する壊死組織内に観察された。これは損傷部位または頭尾側2mm部では後索の

コントロール群とIL-10群での細胞形態の違いとして表現された。またその活性の進展はIL-10群では72時間後にも著明には進んではおらず、超急性期にマイクログリアの活性を抑制することによりその後の炎症反応の進展を抑制しうることが示唆された。マクロファージは受傷から数時間遅れて損傷組織内に浸潤し、壊死組織を貪食し、組織修復には必要不可欠である。抗ED1抗体陽性細胞の浸潤は受傷後24時間では損傷部、尾側2mm部に散在する程度であったが、受傷72時間後にはその数は著明に増加し、かつその形態は貪食型で、抗iNOS抗体にも陽性であった。抗ED1抗体陽性細胞は、損傷部位から頭尾側2mm部にかけては壊死組織の周囲を取り囲むように存在し、損傷部位から離れるにつれて後索に存在する壊死組織内に観察された。これは損傷部位または頭尾側2mm部では後索の

傷害の程度が強くと、すでに壊死組織内のマイクログリア自身が脱落し、周囲から活性化マクロファージ/マイクログリアが浸潤し、より損傷部位から離れるにつれて後索の微小循環の変化などがマイクログリアを活性化し、壊死組織内に活性化マイクログリアが観察されたと推測される。Calsonら³⁵⁾は抗ED1抗体陽性マクロファージ/マイクログリア数と損傷組織量には有意な相関関係があったと報告した。今回われわれの研究では損傷部から離れるにつれて壊死組織内に抗ED1抗体陽性細胞は局限していたためCalsonらと同様に壊死組織の存在が両群間の総抗ED1抗体陽性細胞数の差として示されたと考えられる。

近年NOの中樞神経系に及ぼす影響についてさまざまな研究がなされている。NOには神経保護としての作用も報告されているが^{36), 37)}、多量のNOは神経毒性があることが知られており³⁸⁾、MatsuyamaらはNOの脊髄損傷後の脊髄空胞形成との関係を報告した³⁹⁾。また近年NOとアポトーシスとの関係も注目されており、Satakeら⁴⁰⁾はマクロファージ由来のiNOS産生のNOが脊髄損傷後早期のアポトーシスを誘導し、L-NAMEの投与により損傷部位のアポトーシスが減少することを報告した。生体内でのNO産生を担うNO合成酵素(nitric oxide synthase; 以下NOSと略す)には、神経型NOS(neural NOS; nNOS)、誘導型NOS(inducible NOS; iNOS)、血管内皮型NOS(endothelial NOS; eNOS)の3種のアイソザイムが知られている。iNOSは正常組織中には認められず、病的状況下でその遺伝子が活性化され、マクロファージ、マイクログリア、アストロサイト、神経細胞、血管内皮細胞において誘導されることが知られている^{41), 42)}。

iNOSはCa²⁺非依存性にNOを産生するため多量のNOを産生する。そのためiNOSの産生は神経毒性のあるNOの発生源として重要である。Xuら⁴³⁾はWestern blot法を用いてiNOS発現は受傷後1日目から始まり、その最大は受傷後1週間目であったと報告した。Satakeら⁴⁰⁾は

PCR法を用いてiNOS mRNAの発現は受傷後3から12時間以内に始まり、それ以降は低下すると報告した。今回の研究ではiNOSの定量化ではなく、免疫染色を用いて抗iNOS抗体陽性細胞の浸潤に注目した。Nakaharaら⁴⁴⁾は受傷後24時間から3日にiNOSの発現が観察されたと報告し、Satakeら⁴⁰⁾は受傷後6時間には抗iNOS抗体陽性細胞は出現しており、そのピークは受傷後24時間であったと報告した。しかし今回の研究では抗iNOS抗体陽性細胞は受傷後24時間には損傷部位、また頭尾側2mm部に散在する程度であったが、受傷後72時間には損傷部位だけでなく周辺の壊死組織内にも多数認められた。さらにこれらの抗iNOS抗体陽性細胞はNOを産生し、組織傷害性に影響を与えているものと思われる。Suzukiら⁴⁵⁾は脊髄損傷後早期のNO産生は神経組織に対して有害で、受傷後早期のNOS産生抑制は神経機能の回復や慢性期の組織の改善に有効であったと報告した。また脊髄損傷後の血清NOxを測定したところ、コントロール群、IL-10群ともに受傷後30分には増加を認め、その後低下し受傷後24時間では両群間に有意差はなかったが、72時間後では有意差を認めた。Nakaharaら⁴⁴⁾は脊髄損傷モデルのNO産生とNOS発現について観察し、NOの産生は受傷直後と受傷後24時間から72時間に二峰性の上昇を示し、後者はおもにiNOSによる産生であることを報告した。今回の研究では受傷72時間後のNO産生がIL-10群のほうに有意に低下しており、これはマクロファージ/マイクログリア活性を抑制した結果と考えられた。

近年脊髄損傷に対して二次的損傷の進展や脊髄再生、移植の面からもさまざまな研究がなされている。中村ら⁴⁶⁾は、神経幹細胞の至適移植時期を炎症性サイトカインと神経栄養因子のmRNA発現の変化から検討した。炎症性サイトカインは6~12時間をピークに4日後まで増加し、損傷後1週間は脊髄内の微小環境は炎症期と考えられることから、神経幹細胞の移植至適時期は損傷後7~14日と報告している。この

点から受傷後72時間以降もマクロファージ/マイクログリアを介した炎症反応は進行するものと考えられる。しかし今回の研究結果から、IL-10を全身投与することで、超急性期ではあるがマクロファージ/マイクログリア活性化の抑制により炎症反応の悪循環を断ち、その結果二次的損傷進展の軽減効果が示唆された。

ま と め

急性脊髄損傷ラットを用いて IL-10のマイクログリア活性に及ぼす影響および組織障害の進展、マクロファージの分布について検討を行い、以下の結論を得た。

1. IL-10全身投与により壊死の進展は有意に抑制された。受傷24時間後の前角部のマイクログリア活性は抑制され、72時間後にもその活性化は著明には進行しないことが示された。
2. 受傷24時間後の抗 ED1 抗体陽性細胞はコントロール群、IL-10群ともに損傷部位と頭尾側 2 mm 部に散在する程度であったが、72時間後にはその数の著しい増加を認めた。すなわち抗 ED1 抗体陽性細胞は、損傷部位の頭尾側 2 mm 部では後索内の壊死組織を取り囲むように存在し、頭尾側 4 mm 部では後索の壊死領域は縮小し、壊死組織内およびその周囲に存在し、灰白質では後索との移行部に認められた。また抗 ED1 抗体陽性細胞は頭尾側 6 mm 部では後索内の壊死組織内に限局しており、貪食形態を

有する抗 ED1 抗体陽性細胞は同時に抗 iNOS 抗体にも陽性であった。72時間後の後索、灰白質内に観察される抗 ED1 抗体陽性細胞数をコントロール群、IL-10群と比較したところ頭側 4 mm、頭尾側 6 mm と損傷部から離れるにつれて有意差を認めた。

3. 血清 NOx は受傷後からコントロール群、IL-10群ともに増加したが、72時間後にはIL-10群のほうが有意に減少していた。

4. 運動機能障害の評価ではコントロール群、IL-10群とも24時間と比較して72時間後には有意に改善していたが、両群間に差は認められなかった。

以上より、IL-10はマクロファージ/マイクログリアの活性化を抑制して急性炎症反応の悪循環を断ち、これにより脊髄損傷の二次的損傷進展の軽減効果が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御高閲を賜りました川崎医科大学整形外科教室 三河義弘教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究にご協力いただいた整形外科教室員各位、並びに免疫染色法の御指導をいただきました川崎医科大学神経病理学教室 伏見滋子先生、組織染色法の御指導をいただきました電子顕微鏡センターの各位、運動機能障害の評価をお願いいたしました医用実験センターの各位に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Janssen L, Hansbout RR : Pathogenesis of spinal cord injury and newer treatments. A review. *Spine* 14 : 23 - 32, 1989
- 2) Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ : The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 11 : 966 - 973, 1991
- 3) Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK : Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149 : 2736 - 2741, 1992
- 4) Boje KM, Arora PK : Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* 587 : 250 - 256, 1992
- 5) Mackay CR, Imhof BA : Cell adhesion in the immune system. *Immunol Today* 14 : 99 - 102, 1993
- 6) Blight AR : Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 9 (Suppl 1) : S83 - S91,

1992

- 7) Dusart I, Schwab ME : Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 6 : 712–724, 1994
- 8) Koshinaga M, Whittemore SR : The temporal and spatial activation of microglia in fiber tracts undergoing anterograde and retrograde degeneration following spinal cord lesion. *J Neurotrauma* 12 : 209–222, 1995
- 9) Popovich PG, Wei P, Stokes BT : Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 377 : 443–464, 1997
- 10) Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M : Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 4 : 814–821, 1998
- 11) Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, van Rooijen N, Stokes BT : Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 158 : 351–365, 1999
- 12) Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Lloor K, Green J, Dietrich WD : Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor- α production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 16 : 851–863, 1999
- 13) Takeuchi A, Isobe KI, Miyaishi O, Sawada M, Fan ZH, Nakashima I, Kiuchi K : Microglial NO induces delayed neuronal death following acute injury in the striatum. *Eur J Neurosci* 10 : 1613–1620, 1998
- 14) Allen AR : Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *JAMA* 57 : 878–890, 1911
- 15) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR : Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126 : 131–138, 1982
- 16) Yamada K, Nabeshima T : Simultaneous measurement of nitrite and nitrate levels as indices of nitric oxide release in the cerebellum of conscious rats. *J Neurochem* 68 : 1234–1243, 1997
- 17) Tarlov IM, Klinger H : Spinal cord compression studies II : Time limits for recovery after acute compression in dog. *Arch Neurol Psych* 71 : 271–290, 1954
- 18) 高木 啓, 高嶋瑞夫, 野村俊治, 橋本宗弘 : ラットの脊髄圧迫損傷に対する高用量 Methylprednisolone sodium succinate 繰り返し投与の効果. *応用薬理* 54 : 249–255, 1997
- 19) Robinson AP, White TM, Mason DW : Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology* 57 : 239–247, 1986
- 20) Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G : The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs : distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54 : 589–599, 1985
- 21) Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, Naruo M, Okabe H, Takatsuki K : Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 79 : 1177–1182, 1997
- 22) Tator CH, Fehlings MG : Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 75 : 15–26, 1991
- 23) Mizuno T, Sawada M, Marunouchi T, Suzumura A : Production of interleukin-10 by mouse glial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 205 : 1907–1915, 1994
- 24) 石田 博, 大田博之 : 重症炎症性疾患モデルマウスに対する IL-10 の治療効果の検討. *炎症* 15 : 101–106, 1995
- 25) Kato T, Murata A, Ishida H, Toda H, Tanaka N, Hayashida H, Monden M, Matsuura N : Interleukin 10 reduces mortality from severe peritonitis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 39 : 1336–1340, 1995
- 26) Koedel U, Bernatowicz A, Frei K, Fontana A, Pfister HW : Systemically (but not intrathecally) administered IL-10

- attenuates pathophysiologic alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol* 157 : 5185 – 5191, 1996
- 27) Rott O, Fleischer B, Cash E : Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol* 24 : 1434 – 1440, 1994
- 28) Banati RB, Graeber MB : Surveillance, intervention and cytotoxicity : is there a protective role of microglia? *Dev Neurosci* 16 : 114 – 127, 1994
- 29) Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW : Microglia : intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20 : 269 – 287, 1995
- 30) Kreutzberg GW : Microglia : a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19 : 312 – 318, 1996
- 31) Kato H, Kogure K, Araki T, Itoyama Y : Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. *Brain Res* 664 : 69 – 76, 1994
- 32) Giulian D : Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Res* 18 : 155 – 171, 1987
- 33) Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Ottovs L Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F : Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374 : 647 – 650, 1995
- 34) Tanaka M, Sotomatsu A, Yoshida T, Hirai S, Nishida A : Detection of superoxide production by activated microglia using a sensitive and specific chemiluminescence assay and microglia-mediated PC 12h cell death. *J Neurochem* 63 : 266 – 270, 1994
- 35) Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L : Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol* 151 : 77 – 88, 1998
- 36) Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA : Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 : 605 – 611, 1996
- 37) Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS : A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364 : 626 – 632, 1993
- 38) Peterson PK, Hu S, Anderson WR, Chao CC : Nitric oxide production and neurotoxicity mediated by activated microglia from human versus mouse brain. *J Infect Dis* 170 : 457 – 460, 1994
- 39) Matsuyama Y, Sato K, Kamiya M, Yano J, Iwata H, Isobe K : Nitric oxide : a possible etiologic factor in spinal cord cavitation. *J Spinal Disord* 11 : 248 – 252, 1998
- 40) Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M, Kawakami H, Iwata H, Adachi K, Kiuchi K : Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury. *Brain Res Mol Brain Res* 85 : 114 – 122, 2000
- 41) Nathan C, Xie QW : Nitric oxide synthases : roles, tolls, and controls. *Cell* 78 : 915 – 918, 1994
- 42) Minc-Golomb D, Tsarfaty I, Schwartz JP : Expression of inducible nitric oxide synthase by neurones following exposure to endotoxin and cytokine. *Br J Pharmacol* 112 : 720 – 722, 1994
- 43) Xu J, Kim GM, Chen S, Yan P, Ahmed SH, Ku G, Beckman JS, Xu XM, Hsu CY : iNOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 18 : 523 – 532, 2001
- 44) Nakahara S, Yone K, Setoguchi T, Yamaura I, Arishima Y, Yoshino S, Komiya S : Changes in nitric oxide and expression of nitric oxide synthase in spinal cord after acute traumatic injury in rats. *J Neurotrauma* 19 : 1467 – 1474, 2002
- 45) Suzuki T, Tatsuoka H, Chiba T, Sekikawa T, Nemoto T, Moriya H, Sakuraba S, Nakaya H : Beneficial effects of nitric oxide synthase inhibition on the recovery of neurological function after spinal cord injury in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363 : 94 – 100, 2001
- 46) 中村雅也, 岡野栄之, 千葉一裕, Bregman BS, 戸山芳昭 : 損傷脊髄内サイトカイン・神経栄養因子 mRNA の発現の変化. *日本パラプレジア医学会雑誌* 15 : 126 – 127, 2002