
Original Article

外傷性脊髄損傷後のレシチン修飾 SOD 投与の有用性

太田有紀¹⁾, 武永美津子¹⁾, 都倉享恵¹⁾, 濱口明美¹⁾, 山口葉子¹⁾, 中村雅也²⁾, 岡野栄之³⁾, 五十嵐理慧¹⁾

¹⁾聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 先端医薬開発部門

²⁾慶應義塾大学医学部整形外科

³⁾慶應義塾大学医学部生理学

連絡先: 太田有紀, 〒216-8512 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1

e-mail: yuki-o@marianna-u.ac.jp

Lecithinized superoxide dismutase promoted the recovery from spinal cord injury-induced motor dysfunction

PC-SOD (Lecithinized superoxide dismutase) is 4 molecules of a lecithin derivative-bound SOD, an enzyme of scavenging superoxide anion (O_2^-). Intravenous administration of PC-SOD (1 mg/kg) promoted the recovery from spinal cord injury (SCI)-induced motor dysfunction, when evaluated by BBB (Basso Beattie Bresnahan) score. The potency of PC-SOD was superior to that of methylprednisolone (MP) (30 mg/kg), which is now in clinical use. PC-SOD as well as MP inhibited SCI-induced neutrophil infiltration. The damaged area in PC-SOD treated spinal cord was less, as compared to that in MP-treated one. PC-SOD had only a little effect on gene expression of inflammatory cytokines and neurotrophic factors. However, MP suppressed not only gene expression but production. Different from MP, PC-SOD significantly promoted the production of GDNF. These data indicated that one reason why PC-SOD was superior might be ascribed partly to the increase of GDNF production.

Rec.5/27/2005, Acc.10/17/2005, pp113-120

Yuki Ohta¹⁾, Mitsuko Takenaga¹⁾, Yukie Tokura¹⁾, Akemi Hamaguchi¹⁾, Yoko Yamaguchi¹⁾,

Masaya Nakamura²⁾, Hideyuki Okano³⁾ and Rie Igarashi¹⁾

¹⁾Department of Frontier Medicine, Institute of Medical Science,
St.Marianna University School of Medicine

²⁾Department of Orthopedic Surgery, ³⁾Department of Physiology, Keio University School of Medicine

Key words spinal cord injury, lecithinized superoxide dismutase, methylprednisolone, Basso Beattie Bresnahan score, glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF)

はじめに

外傷性脊髄損傷時には多量の活性酸素が産生することが知られているが、過剰の活性酸素は、受傷時に生じる脊髄の断裂、挫滅、髄内出血などの1次的損傷から引き続き生

じる2次的損傷による障害や拡大に関与する¹⁾。すなわち、炎症を広げ細胞障害を惹起すると考えられている。したがって、損傷初期に産生される過剰量の活性酸素を効率的に消去することは、損傷の広がりを最小限に抑え、その結

表1 quantitative RT-PCRで用いたプライマー配列

Gene product	Sense	Antisense	Product size (bp)
TNF- α	5' cttatctactcccaggttctctcaa	5' gagactcctcccaggtacatgg	200
IL-6	5' caaagccagagtcattcagagc	5' ggctcttagccactcctctgt	151
BDNF	5' ggttcgagaggtctgacgac	5' caaaggcacttgactgctga	159
CNTF	5' atggctttcgagagcaaa	5' gctagccagatagaacggctaca	71
GDNF	5' caaaagactgaaaaggtcaccagat	5' gcttgccgggttctctctct	69
GAPDH	5' tcctcaagattgtcagcaa	5' agatccacaacggatacatt	309

果, 損傷後の機能修復・回復を促進すると考えられる. このような観点から, 活性酸素の1つであるスーパーオキシドアニオン(O_2^-)を消去する酵素, スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の投与が効果的であると期待される. しかしながら, SOD 自身は細胞親和性が低く血中半減期が短いために, 早くから期待されてきた生理活性タンパク質ではあるものの, これまで臨床応用には至っていない. その欠点を補ったものが, 細胞膜親和性を高め, 組織滞留性を獲得したレシチン誘導体結合 SOD (レシチン化 SOD ; PC-SOD) である^{2,3)}.

現在, 脊髄損傷に対して臨床で使われている薬剤は, ステロイド (メチルプレドニゾロン : methylprednisolone; MP) の大量投与である⁴⁾. MP の持つ強い抗酸化作用が薬理活性の発現に大きく寄与すると考えられており, SOD とは異なる活性酸素種の一つヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)生成の抑制が主たる作用とされる. $\cdot OH$ は活性酸素種の中で最も高い反応性を有し, 様々な生体物質を傷害する⁵⁾. 一方, O_2^- は $\cdot OH$ と比べ反応性は低いものの, $\cdot OH$ をはじめ他の活性酸素の前駆体となることから, この O_2^- の量を調節することは重要である. したがって, 脊髄損傷初期における PC-SOD の投与は, 過剰の O_2^- を速やかに消去し, 2 次的損傷による障害を最小限に抑えることが考えられる.

そこで本研究では, 外傷性脊髄損傷に対する PC-SOD の有用性を明らかにするために, モデル動物を作製し, 臨床で用いられている MP 投与との比較を行った. さらに損傷に伴う酸化ストレス, 炎症性サイトカインおよび神経栄養因子の発現に着目し, 作用機序の相違を検討した.

材料と方法

1) 外傷性脊髄損傷モデル動物の作製と後肢運動機能の評価

麻酔下, 雌性 9 週齢 Sprague-Dawley (SD) ラット (オリエンタル酵母工業株) 胸椎部 (T9-10) 位の脊髄に直接一定重

量の負荷 (25mm の高さから 10g の錘を落下) を与え, 後肢に運動機能障害を惹起した損傷モデルを作製した. 薬剤は, 損傷 30 分後に PC-SOD (1mg/kg, 3,186U/mg) あるいは MP (30mg/kg, ソル・メドロール®, ファイザー株) を単回静脈内投与した. 後肢運動機能は Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) スコアで経時的に評価した^{6,7)}.

2) 損傷脊髄摘出

損傷一定時間後, 損傷部位を中心とした 15mm 長の脊髄を摘出し, 以下の測定に用いた.

3) 脊髄細胞の定量

損傷脊髄から調製した lysate サンプルを用いて, 酵素免疫定量 (EIA) 法に準じて脊髄組織中のニューロン (neurofilament; NF), アストロサイト (glial fibrillary acidic protein; GFAP) およびオリゴデンドロサイト (myelin basic protein; MBP) の測定を行った. 一次抗体として anti-NF (1:500, mouse, Sigma), anti-GFAP (1:500, mouse, Sigma) および anti-MBP (1:500, goat, Santa Cruz Biotechnology) を用いた. また, 二次抗体として biotin 標識 anti-mouse IgG (1:1000, Sigma), biotin 標識 anti-goat IgG (1:1000, CHEMICON) および streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (1:500, ProZyme, Inc.) を用いた. 各々の発現量は lysate サンプル蛋白量あたりに補正し, 正常脊髄における発現量を 100% として表示した.

4) 脊髄 Myeloperoxidase (MPO) 活性

損傷脊髄を phosphate-buffered saline (PBS) を用いてホモジナイズし, 遠心分離後の上清を MPO 活性の測定に用いた. サンプル溶液に o-dianisidine dihydrochloride および 0.0006% H_2O_2 を含む反応液を加えて混合後, マイクロプレートリーダー (Model 3550, Bio Rad) を用いて 450nm の吸光度の時間推移を測定した. また, サンプル溶液の蛋白量を BCA Protein Assay Kit (PIERCE) を用いて測定し, MPO 活性値を算出した.

5) Quantitative RT-PCR

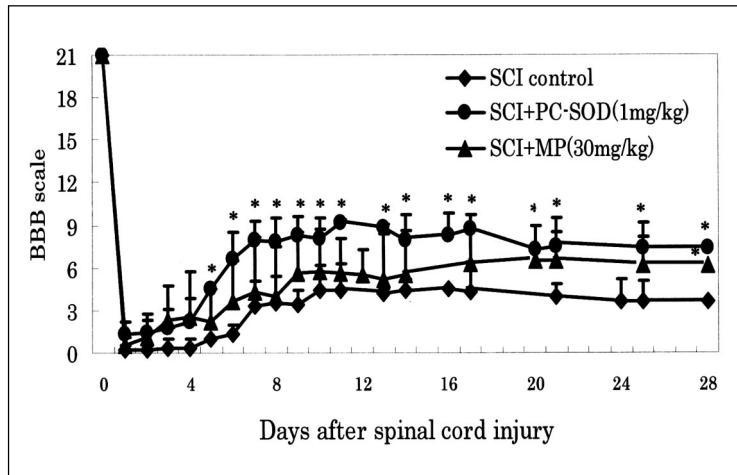


図1 ラット 脊髄損傷モデルの運動機能回復に及ぼすPC-SODおよびMPの効果

胸椎部(T9-10)位の脊髄に直接一定重量の負荷(10g, 25mm)を与え、後肢に運動機能障害を惹起した損傷モデルを作製した。損傷30分後にPC-SOD(1mg/kg, 3,186 U/mg)あるいはMP(30mg/kg)を単回静脈内投与し、経時的にBBBスコアに基づき運動機能を評価した(n=8, mean $\pm$ SD, * $p < 0.05$ vs. SCI control)。

単離した total RNA(1 μ g)から 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(AMV)⁺ (Roche Applied Science)を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA および LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I(Roche Applied Science)を用いて PCR を行った。反応およびデータ解析は LightCycler System(Roche Applied Science), LightCycler Software Version 4.0(Roche Applied Science)をそれぞれ用いて行った。また、内部標準として GAPDH mRNA の発現量を測定した。使用したプライマーの配列を表 1 に示す。

6) サイトカイン発現量の測定

損傷脊髄から調製した lysate サンプルを用いて、サイトカイン (tumor necrosis factor (TNF)- α および interleukin (IL)-6) 産生量を Endogen[®] Rat TNF α ELISA Kit (Pierce Biotechnology, Inc.) および Endogen[®] Rat IL-6 ELISA Kit (Pierce Biotechnology, Inc.)を用いてそれぞれ測定した。

7) 神経栄養因子発現量の測定

損傷脊髄から調製した lysate サンプルを用いて、EIA 法に準じて神経栄養因子の測定を行った。一次抗体として anti-brain-derived neurotrophic factor (BDNF)(1:500, rabbit, CHEMICON), anti-ciliary neurotrophic factor(CNTF)(1:500, mouse, R&D) および anti-gial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)(1:500, rabbit, Santa Cruz)を用いた。また、二次抗体として biotin 標識 anti-rabbit IgG(1:1000, Stressgen), biotin 標識 anti-mouse IgG(1:1000, Sigma) および streptavidin-horseradish peroxidase conjugate(1:500, ProZyme, Inc.)を用いた。各々の発現量は lysate サンプルの蛋白量あたりに補正し、正常脊髄における発現量を 100% として表示した。

8) 免疫組織染色

4%パラホルムアルデヒド/PBSに浸漬させた損傷脊髄をパラフィン包埋後、厚さ 4 μ m の切片を作製した。一次

抗体として anti-GDNF(1:100), 二次抗体としてローダミン標識 anti-rabbit IgG(1:100, American Qualex)を用いて免疫染色を行った。さらに、その切片について Haematoxylin-Eosin (HE)染色を行った。

結 果

1) 後肢運動機能の推移

損傷 30 分後に PC-SOD(1mg/kg)投与を行い、損傷に伴う障害を受けた後肢運動機能を BBBスコアで経時的に評価すると、損傷コントロール群に比べ明らかに有意な回復が認められた(図 1)。損傷 6 日目の BBBスコアが損傷コントロール群では平均 1.38 であるのに対し、PC-SOD 群では 6.63 と有意に機能改善を示した。この有意な改善効果は、損傷 28 日目まで継続的に認められた。また、MP (30mg/kg)投与においても、後肢運動機能の回復が認められたが、損傷 6 日目の BBBスコアは 3.63 と平均では損傷コントロール群に比べ高かったものの、有意な差異はみられなかった。有意に改善効果が認められたのは、損傷 28 日目のみであった。

2) 脊髄神経細胞の定量

損傷 10 日後における脊髄中のニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの含有量を検討したところ、損傷により脊髄中の各々は、それぞれ 51.4 ± 11.6 , 47.0 ± 11.0 , $68.8 \pm 8.0\%$ と著しく減少した ($p < 0.01$, 表 2)。これに比較して PC-SOD 投与は、それぞれ 77.5 ± 3.94 , 77.7 ± 6.81 , $87.0 \pm 4.64\%$ と損傷による減少を有意に抑制した ($p < 0.05$, 表 2)。一方、MP 投与においては、減少を抑制する傾向を示したが、有意な差は認められなかった。

3) 脊髄 MPO 活性

表2 神経細胞量に及ぼすPC-SODおよびMPの効果

	SCI	SCI+PC-SOD	SCI+MP
neuron (% of normal)	51.4 ± 11.6 [#]	77.5 ± 3.94 [*]	60.1 ± 5.3
astrocyte (% of normal)	47.0 ± 11.0 [#]	77.7 ± 6.81 [*]	55.8 ± 10.6
oligodendrocyte (% of normal)	68.8 ± 8.0 [#]	87.0 ± 4.64 [*]	71.2 ± 5.7

脊髄損傷10日後の脊髄サンプルを用いて、脊髄中のニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトをEIA法により測定した(n=4-6, mean ± SD, [#]p < 0.01 vs. normal, ^{*}p < 0.05 vs. SCI control)。

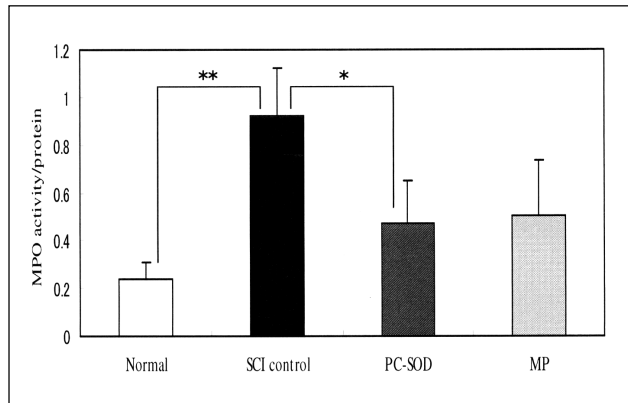


図2 MPO活性に及ぼすPC-SODおよびMPの効果

脊髄損傷5時間後の脊髄サンプルを用いて450nmの吸光度の時間推移を測定し、MPO活性値を算出した(n=6-8, mean ± SD, ^{*}p < 0.05, ^{**}p < 0.01)。

損傷5時間後の脊髄MPO活性は、 $0.92 \pm 0.20 \Delta\text{ABS}/\text{mg protein}/\text{min}$ であった。正常な脊髄では $0.24 \pm 0.066 \Delta\text{ABS}/\text{mg protein}/\text{min}$ であり、これは損傷によってその活性が約4倍に増加したことを示している。一方、PC-SOD投与群は $0.47 \pm 0.17 \Delta\text{ABS}/\text{mg protein}/\text{min}$ であり、損傷によって誘導されたMPO活性の増加を有意に抑制した($p < 0.05$, 図2)。また、MP投与群においても $0.51 \pm 0.23 \Delta\text{ABS}/\text{mg protein}/\text{min}$ と抑制傾向を示した。

4) 炎症性サイトカインの遺伝子発現および産生量

損傷5時間後、脊髄TNF- α ならびにIL-6のmRNA発現量はそれぞれ14倍、314倍と顕著に増加した。これに対しMP投与群は、それぞれ8.4倍、118倍の増加にとどまっており、有意にそれらの発現を抑えたことを示している($p < 0.01$, 図3A)。さらに、損傷によって増加したTNF- α 産生量($124 \pm 7.4 \text{ pg}/\text{mg protein}$)についても、 $95 \pm 12 \text{ pg}/\text{mg protein}$ と有意に抑制した($p < 0.05$, 図3B)。一方、PC-SOD投与群は、TNF- α ならびにIL-6のmRNA発現および産生量に大きな変化を及ぼさなかった(図3A, B)。

5) 神経栄養因子の遺伝子発現および産生量

脊髄損傷後、いずれの神経栄養因子のmRNA発現量は増加した。中でもGDNF mRNA発現量は、15.1倍と著明

な増加を示した。これに対しMP投与群では6.7倍の上昇にとどまり、遺伝子発現が抑えられた($p < 0.05$, 図3A)。また、MP投与群におけるGDNF産生は、いずれも損傷コントロール群と同程度であった(図3B)。一方、PC-SOD投与群は、神経栄養因子のmRNA発現量に対して大きな影響を及ぼさなかったが、それらの蛋白質レベルでの産生、特にGDNF産生量を有意に増加させた($p < 0.05$, 図3B)。

6) 組織切片免疫染色

損傷7日後における脊髄組織切片についてGDNFの発現を検討したところ、損傷コントロールあるいはMP投与群に比較して、PC-SOD投与群は陽性反応を強く示した(図4A)。また、PC-SOD投与が損傷の拡大を抑えていることも、HE染色から明らかに認められた(図4B)。

考 察

外傷性脊髄損傷に対して現在臨床で使用されている第1選択薬剤は、メチルプレドニゾロン(methylprednisolone, MP)である。これは主として抗酸化作用によって損傷の拡大を軽減することで薬理効果を発揮すると考えられている⁴⁾。外傷性脊髄損傷のうち、とりわけ2次損傷は複数の要因が組み合わさった現象であるが、脊髄組織から放出される過

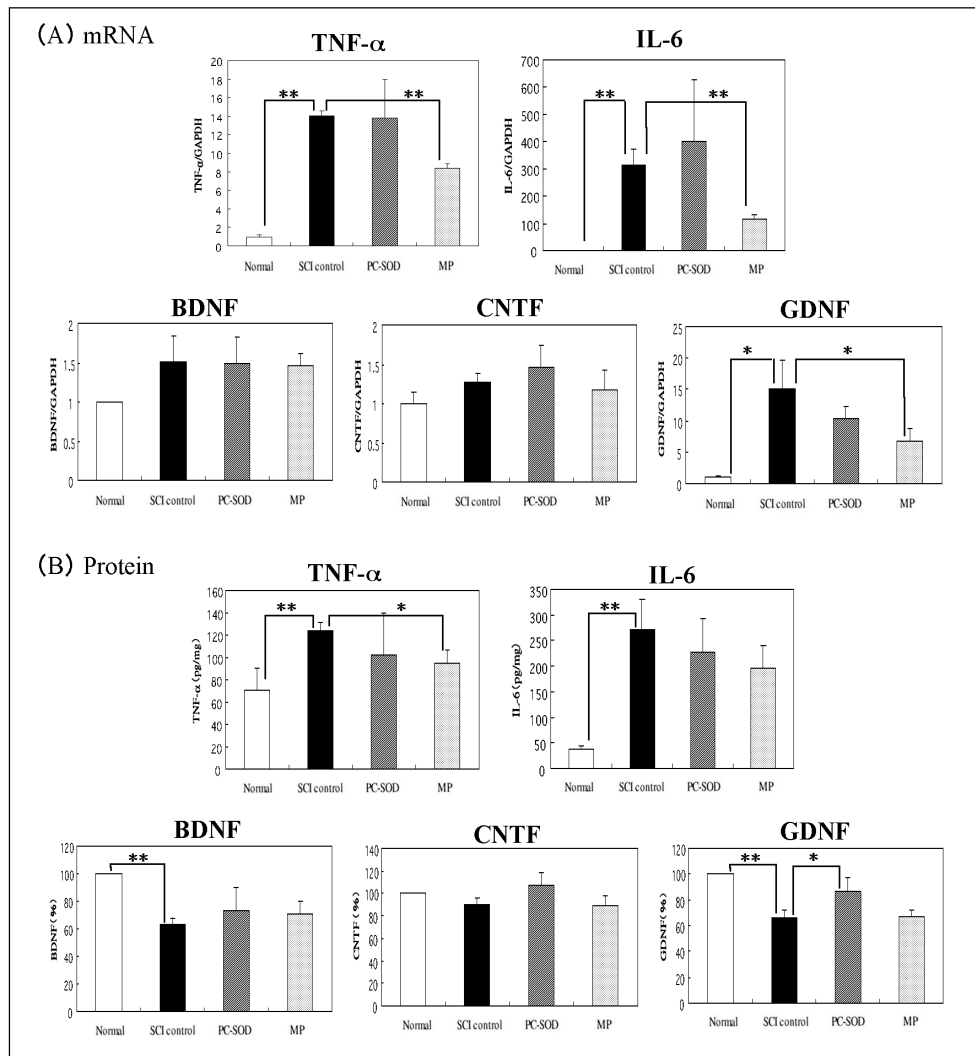


図3 炎症性サイトカインおよび神経栄養因子の遺伝子ならびに産生に及ぼすPC-SODおよびMPの効果

(A) 脊髄損傷5時間後の脊髄からRNAを抽出し、RT-PCR法により炎症性サイトカインおよび神経栄養因子のmRNA発現量を測定した($n=3-7$, mean $\pm$ SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

(B) 脊髄損傷5時間後の脊髄サンプルを用いて、EIA法により炎症性サイトカインおよび神経栄養因子の産生量を測定した($n=4-6$, mean $\pm$ SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

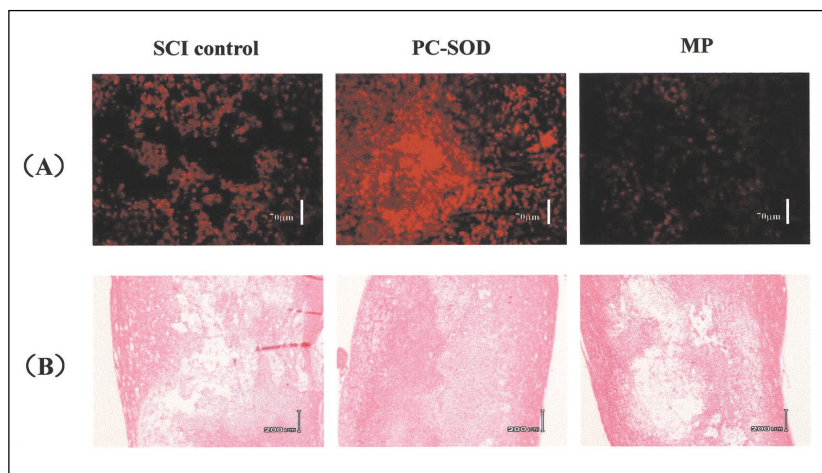


図4 損傷脊髄組織切片免疫染色
(A) 脊髄損傷7日後の脊髄組織切片を作製し、GDNFの発現を免疫染色法により検討した。

(B) 免疫染色で用いた組織切片についてHE染色を行った。

剰な活性酸素もその一つに挙げられる¹⁾。本研究で、レシチン誘導体結合SOD (レシチン化SOD; PC-SOD) 投与が、ラット外傷性脊髄損傷に伴う後肢運動機能障害を有意に改善することを明らかにした。すでに報告しているように^{8,9)}、同用量の非修飾SODの投与では有意な改善効果がみられなかったことから、PC-SODの持つ細胞膜親和性、臓器滞留性^{2,3)}が薬理効果の発現に大いに寄与したものと推察している。PC-SODはヒト型Cu/Zn SOD dimerあたり平均4分子のレシチン誘導体が共有結合した製剤であり、すでに第I相臨床試験を終了し安全性に問題のない製剤であること、またヒトへの臨床適用量として、1mg/kgの投与で十分な血中濃度および薬理効果が得られることが明らかとなっている。一方、ステロイドの外傷性脊髄損傷に対する適用量は30 mg/kgと大量投与である。動物モデルではあるものの、同条件でPC-SODがMPに比較して力価が高かったことは特筆すべき点である。実際、組織切片で見る限り、脊髄損傷の程度はPC-SOD投与群で抑えられており、また損傷部位を含む脊髄ニューロンを定量化すると、その減少も有意に抑えられることが今回の研究から明らかとなった。一方、MP投与群ではPC-SOD投与群に比べ損傷程度も大きく、これを反映し、脊髄ニューロン量も損傷コントロール群に比べ高かったものの、有意な増加はみられなかった。本研究では、PC-SODとMPの両群の作用の違いを明らかにすることに焦点を当て検討した。

脊髄損傷によって生じる急性炎症反応は、損傷部位への好中球やマクロファージの浸潤が関与する¹⁰⁾。その指標となるMPO活性は、損傷数時間をピークとして上昇したが、PC-SOD投与によってその活性は有意に抑制された。有意な差は認められなかったものの、MP投与においても抑制傾向を示し、いずれも好中球やマクロファージの浸潤を抑制することが明らかであった。

損傷脊髄内では炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β およびIL-6が損傷後6～12時間をピークに4日後まで上昇することが知られている¹¹⁾。グルココルチコイドであるMPは、TNF- α の発現あるいはNF- κ Bの活性化を抑制することが報告されており¹²⁾、本研究においても脊髄損傷後の炎症性サイトカインの発現を有意に抑制することを確認した。一方、PC-SOD投与群では、それらの発現に対して有意な抑制を示さなかった。炎症性サイトカインは神経毒性と神経栄養性の二面性の作用を持つことが知られており^{13,14)}、PC-SODの緩やかな抑制が神経栄養性に関連した可能性は否定できないが、さらに詳細な検討が必要と思われる。

損傷脊髄の神経細胞量の定量を検討したところ、PC-SOD投与群では損傷による細胞量の減少を有意に抑制し

た。すでに、活性酸素がアポトーシスを引き起こすことや、SODを過剰発現させた脊髄損傷モデルマウスではアポトーシスの抑制が報告されている^{15,16)}ことから、PC-SODが脊髄損傷により惹起されるアポトーシスを抑制した可能性が考えられた。ここではデータの詳細を示さなかったが、損傷2日後の脊髄組織切片を用いてTUNEL法により検討したところ、損傷コントロール群でのアポトーシス陽性細胞が平均40.8%であったのに対し、PC-SODあるいはMP投与群ではそれぞれ平均9.7%、9.6%と、いずれも同程度のアポトーシス抑制作用を示した。したがって、PC-SODの抗アポトーシス作用は確認できたものの、両投与群に明らかな差異は認められなかった。MPの抗酸化作用がアポトーシスの抑制にも寄与したものと考えられる。また、損傷7日以降の脊髄組織切片では、損傷コントロール群のアポトーシス陽性細胞はほとんど認められず、両群の差異もアポトーシス抑制に関しては比較することができなかった。

そこで、損傷を受けたニューロンの細胞死の抑制あるいは神経再生にも関与する神経栄養因子^{17,18)}BDNF、CNTFならびにGDNFの遺伝子発現および産生量に焦点を当てた。その結果、特に運動ニューロンに対して強い神経栄養効果を示すGDNF^{19,20)}の発現をMPが抑制することを見出した。GDNFの発現にはNF- κ Bが関与することから²¹⁾、MPによるGDNF発現の抑制にはNF- κ Bの不活性化を介した可能性が高い。一方、PC-SODはGDNF産生量を増加させた。この機序として、活性酸素が引き金となるプロテアーゼの活性化をPC-SODが抑えたことが一因と考えられる。損傷コントロール群では、GDNF遺伝子発現量が最も高いにも関わらず蛋白レベルでの産生量が低く、これも活性化プロテアーゼが産生を阻んだ一因である可能性が高い。末梢神経に比較して脊髄をはじめとする中枢神経系の軸索再生が困難である理由の1つとして、神経栄養因子の供給不足が挙げられている²²⁾。また、脊髄損傷モデル動物にGDNFを投与することにより、運動機能が改善すると報告されている²³⁾。したがって、脊髄損傷後のPC-SODあるいはMP投与による後肢運動機能の改善効果の違いは、GDNF遺伝子発現だけでなく、産生に及ぼす作用の差異が大きく寄与した可能性が高い。

本研究から、外傷性脊髄損傷からの機能回復にはPC-SOD投与がMPに比べ有効であることが明らかとなった。その機序として、過剰に産生した活性酸素を早期に消去することにより酸化ストレスを抑制したことに加え、神経栄養因子の産生を間接的にせよ促進したことが考えられた。その結果として、神経細胞死を抑制し、損傷の拡大を抑えて機能回復を亢進させたと推察された。一方、MPは酸化

ストレスの抑制を示したものの, 神経栄養因子産生を増大するに至らなかった. その差異が本モデル系での作用の違いとなって現われた一因と考えられる. MPは抗炎症作用だけでなく免疫系にも抑制作用を持つため, 予後を左右する薬剤との懸念は否めない.

非修飾 SOD に比べ低用量で薬理効果を発揮する PC-SOD は, 脊髄損傷に対して改善効果があり, 臨床で使われている MP に替わる, より有効な治療薬として大きな貢献をもたらすことが期待できる.

文 献

- 1) Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, Seligman ML: The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous disorders. *Acta Physiol Scand Suppl*, 492: 91-119, 1980.
- 2) Igarashi R, Hoshino J, Takenaga M, Kawai S, Morizawa Y, Yasuda A, Otani M, Mizushima Y: Lecithinization of superoxide dismutase potentiates its protective effect against Forssman antiserum-induced elevation in guinea pig airway resistance. *J Pharmacol Exp Ther*, 262: 1214-1219, 1992.
- 3) Igarashi R, Hoshino J, Ochiai A, Morizawa Y, Mizushima Y: Lecithinized superoxide dismutase enhances its pharmacologic potency by increasing its cell membrane affinity. *J Pharmacol Exp Ther*, 271: 1672-1677, 1994.
- 4) Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeyer J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W: Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hr or tirilazad mesylate for 48 hr in the treatment of acute spinal cord injury. *JAMA*, 277: 1597-1604, 1997.
- 5) Leski ML, Bao F, Wu L, Qian H, Sun D, Liu D: Protein and DNA oxidation in spinal injury: neurofilaments--an oxidation target. *Free Rad Biol Med*, 30: 613-624, 2001.
- 6) Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC: A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, 12: 1-21, 1995.
- 7) Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA, Holford TR, Hsu CY, Noble LJ, Nockels R, Perot PL, Salzman SK, Young W: MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter animal spinal cord injury study. *J Neurotrauma*, 13: 343-359, 1996.
- 8) Nakauchi K, Lkata T, Katoh S, Hamada Y, Tsuchiya K, Fukuzawa K: Effects of lecithinized superoxide dismutase on rat spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 13: 573-582, 1996.
- 9) Takenaga M, Ohta Y, Tokura Y, Hamaguchi A, Nakamura M, Okano H, Igarashi R: Lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) improved spinal cord injury-induced motor dysfunction through suppression of oxidative stress and enhancement of neurotrophic factor production. *J Control Release*, 110: 283-289, 2006.
- 10) Taoka Y, Okajima K, Uchida M, Murakami K, Kushimoto S, John M, Naruo M, Okabe H, Takatsuki K: Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, 79: 1177-1182, 1997.
- 11) Nakamura M, Richard AH, Linda M, Barbara MB, Barbara SB: Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Exp Neurol*, 184: 313-325, 2003.
- 12) Xu J, Fan G, Chen S, Wu Y, Xu XM, Hsu CY: Methylprednisolone inhibition of TNF-alpha expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 59: 135-142, 1998.
- 13) Mason J, Suzuki K, Chaplin D, Matsushima G: Interleukin-1 beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci*, 21: 7046-7052, 2001.
- 14) Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T: Accelerated Nerve Regeneration in Mice by Upregulated Expression of Interleukin(IL) 6 and IL-6 Receptor after Trauma. *J Exp Med*, 183: 2627-2634, 1996.
- 15) Sugawara T, Lewen A, Gasche Y, Yu F, Chan PH: Overexpression of SOD1 protects vulnerable motor neurons after spinal cord injury by attenuating mitochondrial cytochrome c release. *FASEB J*, 16: 1997-1999, 2002.
- 16) Xu W, Chi L, Xu R, Ke Y, Luo C, Cai J, Qiu M, Gozal D, Liu R: Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord*, 43: 204-213, 2005.
- 17) Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO: Survival effects of BDNF and NT-3 on axotomized rubrospinal neurons depend on the temporal pattern neurotrophin administration. *Eur J Neurosci*, 12: 776-780, 2000.
- 18) Coumans JV, Lin TT, Dai HN, MacArthur L, McAtee M, Nash C, Bregman BS: Axonal Regeneration and Functional Recovery after Complete Spinal Cord Transection in Rats by Delayed Treatment with Transplants and Neurotrophins. *J Neurosci*, 21: 9334-9344, 2001.
- 19) Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simmons L, Moffet B, Vanden

- RA, Simpson LC, [corrected to Simmons L, et al]: GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*, 266: 1062-1064, 1994.
- 20) Zurn AD, Baetge EE, Hammang JP, Tan SA, Aebischer P: Glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. *Neuroreport*, 6: 113-118, 1994.
- 21) Obara Y, Nakahata N: The signaling pathway of neurotrophic factor biosynthesis. *Drug News Perspect*, 15: 290-298, 2002.
- 22) Zhou L, Baumgartner BJ, Hill-Felberg SJ, McGowen LR, Shine HD: Neurotrophin-3 expressed in situ induces axonal plasticity in the adult injured spinal cord. *J Neurosci*, 23: 1424-1431, 2003.
- 23) 古川昭栄: 神経栄養因子—生理機能と治療への応用—. *脳神経*, 55: 829-839, 2003.