

厚生科学研究費補助金 脳科学研究事業

脊髄髄膜瘤の脊髄・末梢神経機能回復法の開発に関する研究

平成13年度総括・分担研究報告書

平成 14 年 3 月

主任研究者 山 崎 麻 美

脊髄膜流の脊髄・末梢神経機能回復法の開発に関する研究班 構成員名簿

区 分	氏 名	所 属 施 設	職 名
主 任 研 究 者	山 崎 麻 美	国立大阪病院 脳神経外科	医 長
分 担 研 究 者	岡 野 栄 之	慶應義塾大学 生理学	教 授
	戸 山 芳 昭	慶應義塾大学 整形外科	教 授
	三 宅 淳	ティッシュエンジニアリング研究センター	副センター長
	有 田 憲 生	兵庫医科大学 脳神経外科	教 授
	坂 本 博 昭	大阪市立総合医療センター 脳神経外科	部 長
	稲 垣 隆 介	関西医科大学 脳神経外科	講 師
(事 務 局) 経理事務連絡担当責任者	奥 田 小百合	国立大阪病院 臨床研究部 〒540-0006 大阪市中央区法円坂2-1-14 TEL(06)6942-1331(3321) FAX(06)6943-6467	

目 次

I. 総括研究報告

平成13年度総括研究報告	1
国立大阪病院 脳神経外科 主任研究者 山崎 麻美	

II. 分担研究報告

1. 脊髄髄膜瘤の外科治療：神経幹細胞移植に向けて	5
大阪市立総合医療センター小児脳神経外科 ¹ 、大阪市立大学大学院医学研究科脳神経外科 ² 坂本 博昭 ¹ 、北野 昌平 ¹ 、西川 節 ² 、高見 俊宏 ² 、原 充弘 ²	
2. 脊髄髄膜瘤の脊髄・末梢神経機能の回復法の開発	13
慶應義塾大学医学部 岡野 栄之	
3. 脊髄損傷に対する神経幹細胞移植	15
慶應義塾大学整形外科 中村 雅也、戸山 芳昭	
4. 脊髄髄膜瘤の治療の可能性に関する研究	17
関西医科大学 脳神経外科 稲垣 隆介、桜井 靖夫	
5. 脊髄髄膜瘤の神経機能回復に関する基礎研究 新生ラット脊髄経路障害モデルにおける神経幹細胞移植による皮質脊髄路構築の試み	19
大阪市立総合医療センター小児脳神経外科 ¹ 、大阪市立大学大学院医学研究科脳神経外科学 ² 、 産業技術総合研究所 ティッシュエンジニアリング研究センター(TERC) ³ 、 国立大阪病院脳神経外科 ⁴ 坂本 博昭 ¹ 、高見 俊宏 ² 、森川 俊枝 ¹ 、北野 昌平 ¹ 、西川 節 ² 、 原 充弘 ² 、金村 米博 ³ 、山崎 麻美 ⁴	
6. ヒト神経幹細胞の安定・大量培養法の開発 ー細胞増殖測定法の改良ー	23
産業技術総合研究所 ティッシュエンジニアリング研究センター(TERC) ¹ 、 国立大阪病院脳神経外科・臨床研究部 ² 、兵庫医科大学脳神経外科 ³ 、 慶應義塾大学医学部生理学 ⁴ 原 正之 ¹ 、金村 米博 ¹ 、山崎 麻美 ² 、有田 憲生 ³ 、 岡野 栄之 ⁴ 、三宅 淳 ¹	
研究成果の刊行に関する一覧表	27

脊髄髄膜瘤の脊髄・末梢神経機能回復法の開発に関する研究

国立大阪病院脳神経外科部長・臨床研究部政策医療基盤研究室室長

主任研究者 山崎麻美

要旨

脊髄髄膜瘤の脊髄・末梢神経機能回復法の開発として幹細胞移植を用いた脊髄髄膜瘤修復術の開発について検討した。戦略として、①脊髄髄膜瘤における神経機能障害の発生メカニズムの解明、②幹細胞移植術の開発、③移植用ヒト幹細胞の分離・培養法の開発、の3つの課題をたてた。神経幹細胞移植が、脊髄損傷を含む神経疾患の治療法として有効であり、これらの技術を脊髄髄膜瘤等の先天異常疾患にさらに発展させることで、脊髄髄膜瘤の治療に画期的な治療法が開発されることが期待される。

A. 研究目的

脊髄髄膜瘤は10000出生あたり3人（1998年）と先天性中枢神経疾患のなかでは発症頻度が高く、小児脳神経外科領域では水頭症と並んで重要な治療対象疾患である。現在、早期診断と出生直後の閉鎖術および水頭症治療により、生命予後と知能予後は著しく改善した。しかし、このような治療法をもってしても、残存する神経機能を温存することはできるが、既に障害された脊髄・末梢神経機能（下肢の麻痺や変形、知覚障害、膀胱直腸障害など）を改善する効果はなく、依然として予後不良の疾患である。1990年代から再びアメリカの一部の施設で行われるようになった胎内手術をもってしても、水頭症やキアリ奇形の発症を軽減する事はできたが、やはり脊髄・末梢神経機能を改善するにはいたらなかった。近年神経幹細胞（以下、NSC）を用いた神経機能の再生、修復をめざした研究が開始され、中枢神経機能、とりわけ損傷脊髄の機能回復には期待を抱かせる報告が続いている。脊髄髄膜瘤は主な機能障害の部位が脊髄及び末梢神

経であり、神経発生異常疾患の中ではその効果が期待できる疾患であると考えられる。脊髄髄膜瘤患者の神経機能を改善させる画期的な治療法を開発することがこの研究の目的である。

B. 研究方法

幹細胞移植を用いた脊髄髄膜瘤修復術の開発戦略として、①脊髄髄膜瘤における神経機能障害の発生メカニズムの解明②幹細胞移植術の開発③移植用ヒト幹細胞の分離・培養法の開発の3つの課題をたてた。

①脊髄髄膜瘤における神経機能障害の発生メカニズムの解明としては、脊髄髄膜瘤を形態発生異常・羊水による機械的損傷・遺伝子異常の観点からその病態を分析する必要がある。すなわち脊髄髄膜瘤モデルの解析と脊髄損傷を用いた解析と分子遺伝子学的解析をすすめる。②幹細胞移植術の開発としては、脊損モデルに対して脊髄髄膜瘤モデルに対して移植実験を行う。③移植用ヒト幹細胞の分離・培養法の開発としては、同種神経幹細胞と自己体性幹細胞（臍帯血・羊膜上皮細胞）の研究を行う。

C. 研究結果及び考察

①脊髄髄膜瘤における神経機能障害の発生メカニズムの解明；ノックアウトマウスからの検討としては*Pax3*遺伝子異常が考えられている*splotch mouse*や最近の報告の*Lpp1*の遺伝子異常による*loop-tail mouse*の検討を進める必要がある。脊髄髄膜瘤の神経機能障害は部分的神経回路形成不全であると考えている。その根拠はMcLoneが*delayed splotch (Spd) mice*で神経管癒合不全が存在しても、形態学的検査で脊髄前角細胞や脊髄後根神経節などを確認していることや、ヒトの手術所見で、障害部位以下の脊髄や神経根は肉眼的に正常に近い解剖学的構造を示していることなどからである。詳しくは、坂本らの分担研究報告に述べられている。

②幹細胞移植術の開発としては、脊損モデルに対して行った。脊髄髄膜瘤に伴う神経障害は、閉鎖不全をおこした脊髄が羊水によって受ける慢性的機械的刺激の結果、もたらされたという報告がある。正常発育した脊髄が生後の外傷によって損傷を受ける脊髄損傷と同一に議論することは難しいが、二次的損傷が脊髄髄膜瘤の神経症状発現に与える影響は大きい。その観点から脊髄損傷に対する神経幹細胞移植治療の経験から学ぶところは大きいと思われる。成体ラット頸髄挫傷損傷モデルを用いた移植実験は、岡野分担研究報告に詳しい。さらに脊髄髄膜瘤は、新生児であり、かつその障害部位のほとんどが下肢であるという宿主環境であるので、その環境下での神経幹細胞移植術の有効性を検討した。新生ラット中位胸髄半切断モデル（中村・戸山らの分担研究報告参照）、および新生ラット下位胸髄完全切断モデル（坂本・高見らの分担研究報告参照）を作成した。これら各種脊髄損傷モデルを用いて、神経幹細胞を移植した後の、損傷部位の組織学的修復状態の1)免疫組織化学的検索、2)トレーサーを用いた再生（一部新生）軸索の検索、3)電顕的検索ならびに4)運動機能評価による神経機能回復の評価を行った。さらに脊髄髄膜瘤モデルに対して移植実験のために疾患モデル動物を作製した。疾患モデル動物としては自然発症の*delayed splotch (Spd) mice*・*Vitamine A*誘発の実験モデル・*surgical treatment*による実験モデルの作成があるが、いずれも大きな問題点としては自然淘汰のためのとも喰い現象のため、出生後はほとんど生存できないということである。C57-BLを用いて*surgical treatment*による実験モデルを作成した。（福

原らの分担研究報告書参照）

③移植用細胞の確立とその供給を目指す研究：ヒト胎児脳・脊髄由来NSCの安全・安定・大量培養法の確立のための研究を行なった。ヒト神経幹細胞は分裂増殖が遅く大量培養が難しいことが、経験的に知られている。ヒト神経幹細胞の多分化能を保持したままの増殖に最適な培養条件を検討した。ヒト胎児脳・脊髄由来NSCは、細胞供給源としてその有効性は確立されているが、基本的に同種移植となり、またその利用には多くの倫理的問題をはらみ実際の臨床応用の点で困難な点も存在する。そこで、さらに拒絶反応の問題が無くかつ社会的容認が得られやすい移植用細胞ソースを探索する試みとして、様々な細胞に分化する体性幹細胞（間葉系幹細胞、神経幹細胞など）が存在することが報告されてきた臍帯血と胎盤組織から、体性幹細胞を効率的に分離・増幅する技術の開発に着手した。（田原・三宅分担研究報告書）
（倫理面への配慮）

ヒト胎児由来の細胞を研究に用いることは社会倫理的に重要な問題を含む。ヒト胎児組織由来の神経幹細胞を用いた研究については、平成11年8月に、岡野栄之が当時所属していた大阪大学医学部の倫理委員会において承認を受け、平成11年11月に山崎麻美が所属する国立大阪病院において、『神経幹細胞による脳・脊髄の再生・修復法の開発；ヒト胎児の脳に由来する神経幹細胞を用いた基礎的研究』医学倫理委員会の承認を得た。また平成13年8月にティッシュエンジニアリング研究センター・医の倫理委員会において、『ヒト胎児由来神経幹細胞の選択的分離法および安定・大量培養法の開発、およびそれを用いた脳・脊髄の再生・修復法の開発のための基礎的研究』と題する研究申請を行い、承認を受けた。

また国立大阪病院医学倫理委員会において『ヒト臍帯血、ならびに胎盤組織からの体性幹細胞の分離とその特性の解明の基礎的研究』についても、平成13年10月に承認を受けた。

D. 評価

達成度について 1年間の準備段階としては、研究班体制が構築され、基礎的知見の整理が行われ、問題点が明らかになったという点で準備はほぼ整ったといえる。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

近年の細胞移植による基礎研究の進展は目覚ましく、再生医療は、パーキンソン病などにおいて多くの成果を取

めてきた。脊髄の再生あるいは修復に関しては永らく不可能とされてきたが、特に脊髄損傷における細胞移植による再生、修復という新たな治療法の確立へ向けた研究へは、大きな期待がよせられている。このような再生医学の可能性が先天性発生異常による神経難病の一つである脊髄髄膜瘤にも、向けられていくことの学術的意義は大きい。国際的にも全く行われていない極めて独創的な研究テーマである。脊髄髄膜瘤の患児は、生まれてから成人期に至るまで、下肢機能障害や膀胱直腸障害のために、頻回の手術や入院・リハビリテーションを受けなければならないのが現状である。中枢神経発達異常疾患に対してこのようなNSC移植による治療の可能性の道が開かれれば、患者・家族はもとより神経難病医療に甚大な医学的貢献をもたらすことが期待される。

今後の展望について

脊髄髄膜瘤の発生病態の解析と、髄膜瘤モデル動物への移植実験を押し進めていけば、今後の展望が切り開けてくる。

E. 結論

以上の結果は、神経幹細胞移植が、脊髄損傷を含む神経疾患の治療法として有効である可能性を示唆しているものと考えられる。これらの技術を脊髄髄膜瘤等の先天異常疾患にさらに発展させることで、脊髄髄膜瘤の治療に画期的な治療法が開発されることが期待される。

脊髄髄膜瘤の外科治療：神経幹細胞移植に向けて

大阪市立総合医療センター小児脳神経外科¹ 大阪市立大学大学院医学研究科脳神経外科²

坂本 博昭¹ 北野 昌平¹ 西川 節² 高見 俊宏² 原 充弘²

研究要旨

脊髄髄膜瘤に対する現在の治療法には、既に障害された脊髄・末梢神経機能（下肢の麻痺や変形、下肢や仙尾部の知覚障害、排尿・排便障害など）を改善する効果はない。最近、実験動物を用いて脊髄損傷を作製し、自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞を損傷脊髄に移植すると、有意な神経機能の回復が認められたとする報告がある。脊髄損傷は脊髄髄膜瘤と共に、長年にわたり機能回復に対する有効な治療法がなかった疾患である。そこで、脊髄・末梢神経機能の回復に向けて、神経幹細胞移植という画期的な治療法をこの疾患に対しても試みる価値がある。神経幹細胞移植をこの疾患に応用する際の利点としては、従来行われてきた手術操作に加え神経幹細胞移植は比較的容易に行えると思われ、そのため従来治療が必要とされる症例全例にこの治療が可能である。また、この疾患を持つ症例は重篤な脳の機能障害を合併することが比較的少なく成人期に達し、神経機能評価では下肢の麻痺の程度など客観的に評価しやすい。さらに、多くの先天性神経形成不全の疾患の中でこの疾患は頻度が高い。移植時期、移植細胞の由来や採取方法、移植細胞の数、移植部位、移植方法などの具体的な方法は、今後実験的研究を行ってその安全性と有効性を十分に検討する必要があるが、先天性神経形成不全による疾患の中で、脊髄髄膜瘤（脂肪脊髄髄膜瘤）はこの新しい治療法を最初に試みるのに最も適した疾患と思われる。

A. 研究目的

胎生早期に尾側神経管の癒合不全が発生すれば、臨床的には二分脊椎spina bifidaが発生する。この疾患は脊髄神経機能の障害を来す中枢神経系の発生異常のなかで最も頻度が高い。二分脊椎は脊髄組織が皮膚組織に覆われているかどうかで、開放性二分脊椎spina bifida apertaと潜在性二分脊椎spina bifida occultaの2つに大きく分類できる。脊髄髄膜瘤myelomeningoceleは前者に分類される。神経管癒合不全によって脊髄の形態が形成されない神経組織neural placodeは、表皮には覆われず外表に露出した状態である（図1）。病変脊髄のレベルより尾側の脊髄機能は臨床的にはほぼ全廃する。脊髄髄膜瘤は腰仙椎部に多いため、生下時より下肢の麻痺や変形、下肢から仙尾部にかけての知覚脱失、神経因性膀胱による排尿障害、

排便障害などを呈し、これらの症状は自然経過で改善することはない。逆に、出生後は二次的な神経損傷と中枢神経系の感染の危険性があるため、脊髄髄膜瘤の出生後の初期治療として、neural placodeを外科的に脊椎管内の硬膜嚢の中に戻す修復術が必要である。しかし、現在の修復術による治療法には、感染予防や更なる神経障害の予防効果はあるが、脊髄、末梢神経の機能回復は全く期待できない^{3,12)}。

潜在性二分脊椎で最も頻度が高い疾患は脂肪脊髄髄膜瘤lipomyelomeningocele（脊髄脂肪腫spinal lipoma）である。神経管の癒合に際し皮下の脂肪組織が神経管内に迷入するため、神経管の癒合の一部が妨げられ、皮下の脂肪腫と脊髄内の脂肪腫とが連続することになる。外表上の特徴は皮下の脂肪腫などの皮膚所見で、脊髄髄膜瘤のように脊髄組織は外表には露出しないため、感染を起こ



図1 脊髄髄膜瘤の外表所見（上方が頭側）

神経管癒合不全によって脊髄の形態が形成されない神経組織はneural placode（矢頭）と呼ばれる。このplacodeと周囲の髄膜や皮膚組織とは癒合している。脊髄中心管の開口部（→）から髄液が流出している。右の例ではneural placodeは非常に薄くなって、内部が見える。

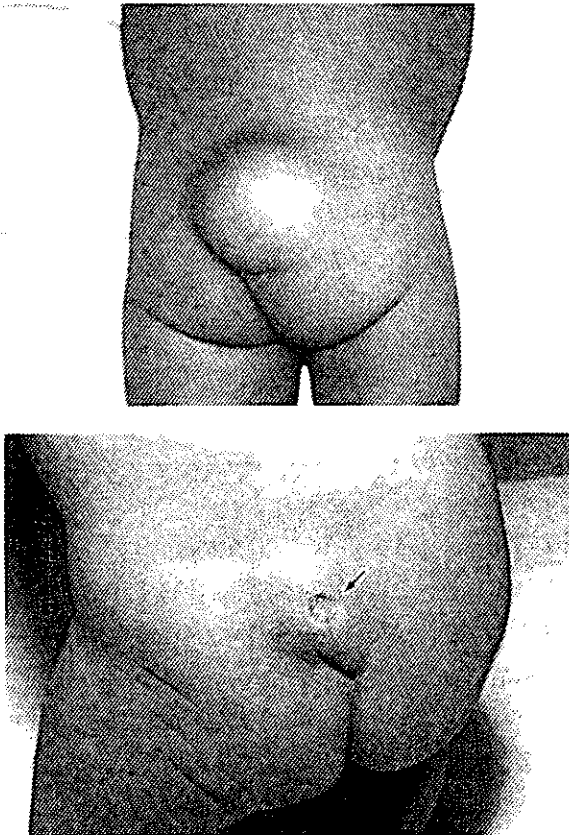


図2 脂肪脊髄髄膜瘤の外表所見

腰仙部の正中部に皮下脂肪腫やそれに伴う瘢痕形成（→）を認めるが、神経組織は直接外表には露出していない。

す危険性はない（図2）。しかし、癒合不全によって脊髄、末梢神経の形成が障害されたり、皮下から脊髄内まで連続する脂肪腫により脊髄係留症候群tethered cord syndromeを生じて、年齢が高じるほど二次的な神経損傷をきたす症例の割合が増加する²⁶⁾。神経障害は脊髄

髄膜瘤に較べれば軽度であるが、下肢の麻痺や変形、下肢や仙尾部の知覚障害、排尿排便障害をきたし、発症年齢は生下時から成人期まで幅広い²⁰⁾。係留を解除する外科治療によって神経機能の更なる悪化は防止できるが、脊髄髄膜瘤の場合と同様に、一旦発生した神経機能の回復はほとんど期待できないのが現状である²⁶⁾。

最近、自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞が出生後でもヒトの中樞神経に存在することが明らかとなり、その生物学的な特性についての報告が見られる^{10,16,17)}。この神経幹細胞の臨床応用の可能性として、脊髄損傷に対する神経幹細胞移植はその有効性が期待されて

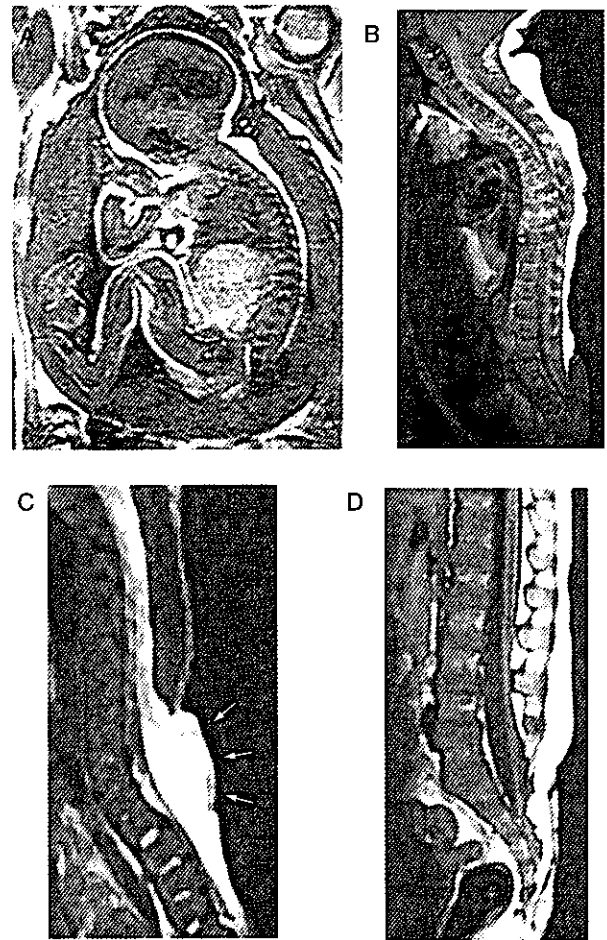


図3 脊髄髄膜瘤のMRI

- 母体MRIによる胎児脊髄髄膜瘤（fast spine echo像）。腰仙部の瘤の所見とその内部に脊椎管から脱出した脊髄組織（→）の所見が認められる。
- Aと同じ症例で、出生直後に行ったMRI（T1強調画像）。胎児MRIとほぼ一致した所見である。
- Aとは異なる例の出生直後のMRI（T2強調画像）。脊椎管内の脊髄が二分脊椎の部分より脊椎管外に脱出し、脊髄髄膜瘤の表面のneural placode（→）に移行している。
- Aの症例で修復2年後のMRI（T1強調画像）脊髄は脊椎管内の硬膜囊の中に収まっている。しかし、脊髄下端部は萎縮している。

いる^{7,18)}。脊髄損傷は脊髄髄膜瘤と共に、長年にわたり機能回復に対する有効な治療法がなかった疾患である。脊髄髄膜瘤は神経組織の形成不全による疾患であるため、脊髄損傷とはその治療効果は同様に論じられないが、現在のところ全く有効な治療法がない現状を打開するには、神経幹細胞移植という画期的な治療をこの疾患に対しても試みる価値があると思われる。ここでは、現在行われている脊髄髄膜瘤、脂肪脊髄髄膜瘤の治療の概要を述べ、臨床的応用に向けて問題となる点を検討した。

B. 研究方法

1. 対象

我々が経験した脊髄髄膜瘤は102例で、脂肪脊髄髄膜瘤は72例である。脊髄髄膜瘤では、出生前に胎児超音波エコー検査やMRIなどで診断されたのは14例で(図3A)、残り88例は出生後に診断された。染色体異常、重症心疾患など致命的な合併症を持っていない限り症例を選択することなく、全例生後72時間以内に瘤の修復を行った。出生後早期にMRIを行った症例は35例で、脊髄と周囲組織との形態を観察した(図3B,C)²¹⁾。脂肪脊髄髄膜瘤は術前に全例でMRIを行い、脂肪腫と脊髄との解剖学的関係を検討した(図4A)²¹⁾。手術適応は、脂肪脊髄髄膜瘤によると思われる下肢の神経症状や排尿排便障害を認めれば、症候性と考え全例で手術適応とした。無症候性の例では、神経症状の出現を予防する目的であるので、手術による神経症状の出現の可能性を十分に説明し、患者

や保護者の同意が得られれば手術を行った²⁶⁾。手術時の年齢は生後1か月から29歳で、2歳までがほぼ80%を占めた。

2. 外科治療法

著者らが行っている脊髄髄膜瘤と脂肪脊髄髄膜瘤の手術法を概説する^{22,25)}。

脊髄髄膜瘤の修復術の要点は、neural placodeを周囲組織から遊離して脊髄の係留を解除し、硬膜囊の中に脊髄組織を納めることにある(図5)。1) neural placodeを皮膚やその移行部から切離し、neural placodeを周囲の非神経組織から遊離した。neural placodeから出る神経根はできるだけ温存したが、明らかなaberrant nerveは切離してneural placodeを遊離した。このような操作で脊髄組織の係留を解除した。癒合不全のため脊髄下部は正常より尾側に位置しているため頭側に逆走する神経根や、神経根に沿って認められる血管もできるだけ温存した。2) neural placodeの腹側を覆う軟膜を確認し、placodeの左右の軟膜縁を細いナイロン糸で縫合した。この際、脊髄中心管の開口部を閉塞しないようにした。この操作は、脊髄円錐部の再建reconstruction of conus medullarisと呼ばれる。3) 硬膜を周囲の組織から剥離して硬膜囊を形成し、この中にneural placodeを納めた。硬膜は密に閉鎖し、髄液の漏れを防いだ。周囲の筋肉を剥離し、形成した硬膜囊を覆い、皮下組織、皮膚組織を縫合した。

脂肪脊髄髄膜瘤の手術の要点は、1) 皮下組織に連続する脂肪組織からの脊髄係留の解除、2) 脊椎管内の脂肪腫の摘出による神経組織の圧迫解除、3) 術後の脊髄と周囲硬膜との癒着の防止、である(図6)。脂肪組織は皮下組織から筋膜、筋肉の欠損部、脊椎の欠損部(二分脊椎)や硬膜の欠損部を通して脊髄髄内に及んだ。必要な部分の椎弓を切開し硬膜内に入り、硬膜を切開した。脊髄軟膜下に存在する脂肪組織が大きければ、脊髄軟膜下に存在する脂肪組織を伴った脊髄円錐が硬膜囊に収まるまで軟膜下の脂肪組織を摘出した。この際、頭側と尾側の脊髄の観察が可能であった。くも膜下腔に存在する脊髄と硬膜とを繋ぐ脂肪組織や終糸などを切除し、脊髄の係留を解除した。脊髄表面の軟膜を縫合して脊髄表面が軟膜で覆われるようにしたり、癒着が発生しにくいGore-Tex sheetを用いて硬膜形成を行った^{23,24)}。切開した椎弓を元に戻し、筋肉、筋膜、皮下組織、皮膚を縫合した。

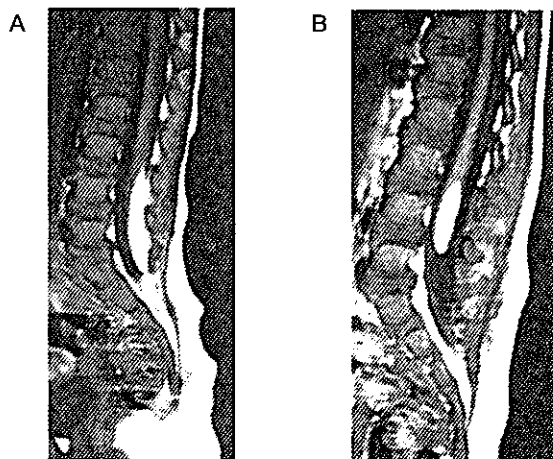


図4 脂肪脊髄髄膜瘤

- A. 術前のMRI。脊髄下端部にT1強調画像では白く描出される脂肪腫が存在し、この脂肪腫と皮下の脂肪腫とは連続している。
- B. 術後のMRI (T1強調画像)。脊髄は脂肪腫を含むが、脊髄は皮下の脂肪腫との連続性はない。

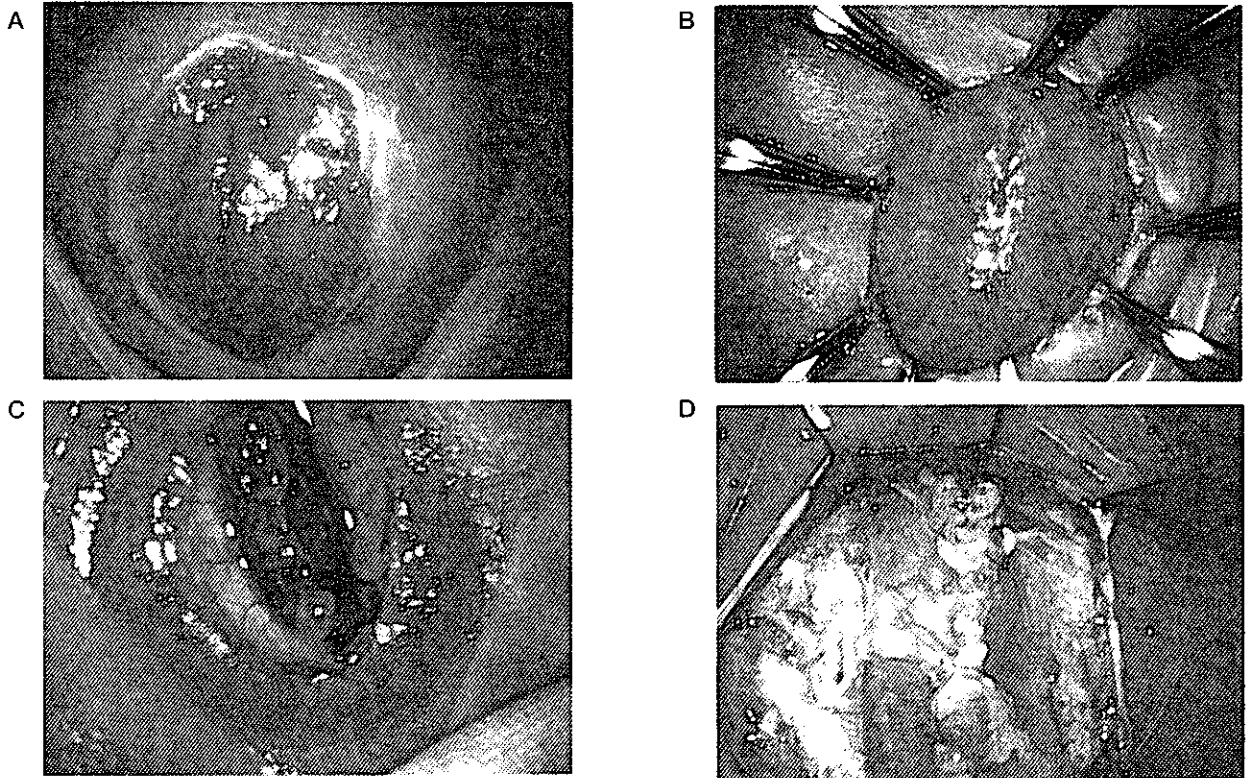


図5 脊髄髄膜瘤の修復術

1. 術中写真

1-A. 修復前（上方が頭側）

1-B. neural placodeを周囲の皮膚や髄膜より剥離する。

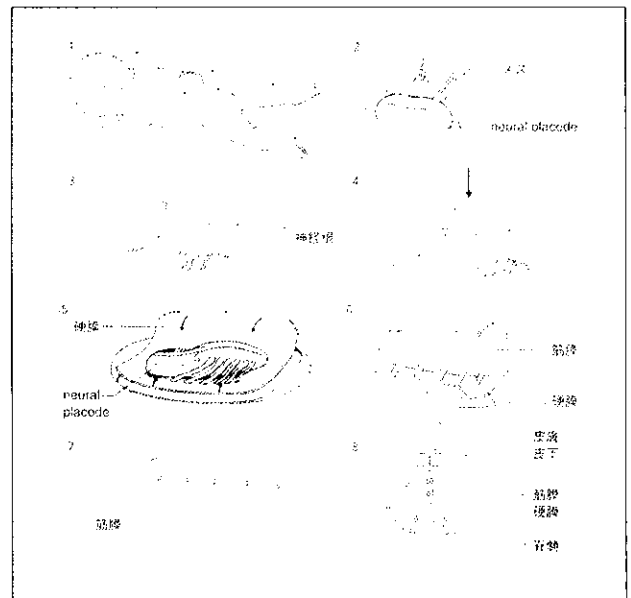
1-C. 周囲組織より分離したneural placodeの腹側の左右の軟膜を正中で縫合する。

1-D. 周囲の硬膜を剥離し、neural placodeを包むようにして硬膜嚢を形成する。

C. 研究結果

脊髄髄膜瘤では全例で瘤の修復時にneural placodeやその頭側に続く脊髄を確認できた。この術中の所見から、極合不全を来した脊髄組織の頭側、尾側に手術操作を加えることは、十分可能と思われた。術後のMRIでは、neural placodeと脊髄組織は硬膜嚢内に存在し、その上を筋肉、皮膚組織が被っている（図3D）。脊髄髄膜瘤では、水頭症に対して行った髄液シャントによる髄膜炎を除けば、瘤の修復に伴って重篤な感染を合併した例はなかった。経膈分娩の例でも中枢神経の感染はなかった。しかし、脊髄髄膜瘤では出生時に認められた神経症状が著明に改善した例は1例もなかった。

脂肪脊髄髄膜瘤では、脊髄脂肪腫の摘出や脊髄係留の解除に際して、脊髄組織を直視下に確認でき、脊髄軟膜内の脂肪腫の摘出も安全に行うことができた。術後のMRIでは、脂肪腫の容積は縮小してその一部は脊髄内に存在するが皮下脂肪腫との連続性はなく、脊髄係留は解



2. 模式図

- ① 術前
- ② neural placodeを周囲の皮膚や髄膜より剥離する。
- ③ neural placodeを周囲組織から完全に剥離して、脊髄係留を解除する。
- ④ neural placodeの頭側に存在する脊髄中心管の開口部（→）を閉塞しないように、脊髄門錐の再建を行う。
- ⑤ 硬膜嚢内に形成した脊髄門錐部を納める。
- ⑥ 周囲の筋嚢を剥離する。
- ⑦ 筋嚢で硬膜嚢を被う。
- ⑧ 皮膚と皮下組織を縫合する。

（文献25より引用、一部改変）

除されていた(図4B)。術前に神経症状を認めた例では、神経症状がわずかに改善した例はあったが、神経症状が著明な改善をみたり消失した例はなかった。

D. 考察

神経幹細胞移植に向けて現在行われている脊髄髄膜瘤の外科治療を見直し、次の項目について考察した。

1. 現在行われている治療の限界

脊髄髄膜瘤では、合併する水頭症の治療が髄液シャントという有効な治療法が確立された1970年代以降も、残存する脊髄神経機能の障害は治療が不可能で困難な問題とされてきた^{3,12)}。また、神経症状を認めた脂肪脊髄髄膜瘤例では、係留解除が充分に行われても症状の消失や著明な軽快は期待できないとされている²⁶⁾。我々は様々な手術操作を考案したが^{21,24)}、今回の治療結果でも従来の結果とほぼ同様であったことから、現在行われている脊髄髄膜瘤や脂肪脊髄髄膜瘤に対する外科的治療法では、脊髄・末梢神経機能の回復は期待できないと結論できる。

1990年代に脊髄髄膜瘤の機能回復に向けて、出生前の子宮内で脊髄髄膜瘤の修復を行い、子宮内での脊髄神経の機械的障害や羊水内での神経障害を予防しようとする試みがあった⁸⁾。しかし、この早期の瘤の修復によっ

て水頭症やキアリ奇形の発生を軽減させる効果は認められたが、脊髄神経機能の回復は認めないとする結果であった⁹⁾。このように、現在行われている修復術をより早期に行っても、神経管癒合不全に基づく脊髄・末梢神経障害の機能回復に対して有効ではなかった。そのため、現在の修復術とは全く異なった新しい観点からの治療法の開発が必要と思われる。

2. 病態解析

神経管癒合不全により発生する脊髄髄膜瘤や脂肪脊髄髄膜瘤において、神経機能回復に向けた新しい治療法の開発が困難な理由としては、神経管の癒合は胎生早期に見られるため、臨床的にも実験的にも病態解析が困難なことである。生理的な神経管の癒合や細胞分化の機序については、floor plate側からはsonic hedge hog遺伝子、roof plate側からはBMP蛋白質を形成する遺伝子などが関与することが明らかとなったが、細胞の分裂、分化の制御など調節機構については現在も解析中である^{4,29)}。

神経管癒合不全症は遺伝要因と環境要因からなると言われている⁵⁾。母親への葉酸の予防的投与によって、地域や人種に関わらず、その発生が約70%減少することが明かとなり、葉酸代謝異常について検討されている²⁾。遺伝要因としては、葉酸代謝酵素であるMTHFRの遺伝子の塩基置換は酵素活性を低下させるため、遺伝的危険

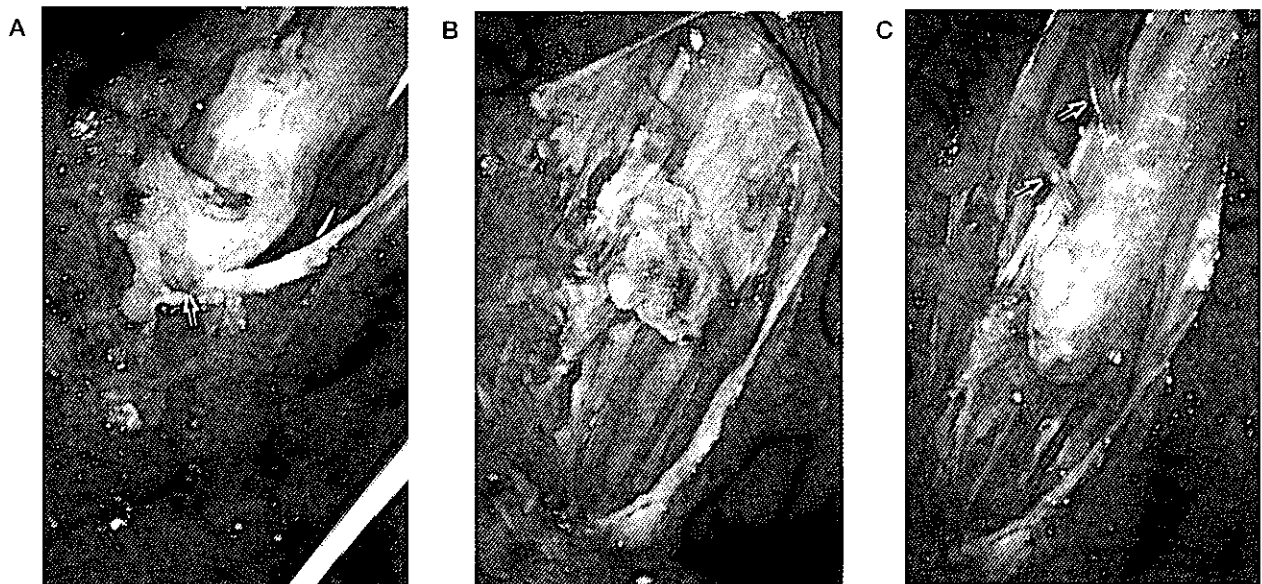


図6 脂肪脊髄髄膜瘤の修復術

A. 硬膜を切開すると、皮下から連続する脂肪腫(→)は脊髄内に続いて脂肪脊髄髄膜瘤の形態をとる。

B. 脊髄内に連続する脂肪腫を切除し、脊髄係留を解除する。

C. 脊髄軟膜下に存在する脂肪腫の部分摘出を行い、脂肪腫の容積を小さくさせる。脊髄下端部は異常に低位であるので、神経根の一部は頭側に逆行している(→)。この後、硬膜を縫合し、筋層、皮膚組織を縫合する。

(文献22より引用、一部改変)

因子の一つではないか考えられている。本邦では難治性水頭症調査研究班（主任研究者 山崎麻美）で水頭症遺伝子バンクを設立し、脊髄髄膜瘤の患者とその家系でMTHFR遺伝子の解析が進んでいる^{27,30)}。実験モデルでは、自然発症のdelayed splotch (Spd) miceなどがヒトの神経管癒合不全に極めて類似した表現型を呈し、このような哺乳類での神経管癒合不全症の動物実験モデルを用いた分析が進んでいる³¹⁾。環境要因として、Vitamin Eなどの奇形誘発物質で比較的容易に神経管癒合不全の実験モデルの作成は可能であるので形態的な解析は進んでいるが、出生後はほとんど生存できないため神経機能障害の解析が困難なことが挙げられる。我々の実験結果でも出生後に1日以上生存したものはなかった¹⁴⁾。そのため、今後は実験動物のwhole embryo cultureなどの方法を用いるなど、移植後の形態解析を考慮する必要がある¹⁵⁾。また、比較的長期に生存するモデルも考案され、このような実験モデルを用いた機能障害の解析が必要となる¹⁹⁾。

新生児期もしくは乳児期などの神経機能の回復は成人期に較べて極めて良いことは知られている。このことから幼若期の神経機能の回復は成人期には見られない神経再生や神経回路の再形成の機構があると思われる。しかし、今回の検討では、脊髄髄膜瘤は出生直後に治療を行い、脂肪脊髄髄膜瘤でも乳児例が極めて多くを占めたにもかかわらず、神経障害の回復には治療効果が見られなかった。新生児期の脊髄障害の回復機構についての検討は十分ではないため、今回の研究事業では幼若実験動物を用いた神経回路の再生についても基礎的研究を行う計画を立てた²⁸⁾。

3. 神経幹細胞移植による脊髄神経機能回復の可能性

脊髄損傷による脊髄機能障害は有効な治療方法が開発されていなかった¹¹⁾。一方、脊髄の再生あるいは修復に関しては永らく不可能とされてきたが、近年の細胞移植による基礎研究の進展は目覚ましく、脊髄の再生、修復の新たな治療法の確立が期待されている¹⁾。実験的には、神経幹細胞移植による脊髄損傷の治療はラットを用いて行われ、神経機能の改善を見ている¹⁸⁾。神経幹細胞移植によって、機能的なシナプス架橋を試みたり、微小グリア環境を整えるなどの効果が期待でき、このような効果は従来の治療法では期待できなかったものである。

脊髄損傷は一旦完成した神経組織が後天的に損傷を受ける結果生じる障害である。脊髄髄膜瘤や脂肪脊髄髄膜瘤は神経管癒合不全という先天的な脊髄形成不全を来す

疾患であるため、脊髄損傷とは神経幹細胞移植による治療効果と同等には議論できない。しかし、ヒト神経管癒合不全の病態と同じと考えられているdelayed splotch (Spd) miceの神経管癒合不全モデルでは、神経管癒合不全は存在するものの、形態学的検査で脊髄前角細胞や脊髄後根神経節などが認められたとしている¹³⁾。この所見からは脊髄・末梢神経機能障害は二次的なものである可能性も示唆されるため、神経幹細胞移植による神経回路の再生に期待が持てるのではないと思われる。

4. 神経幹細胞移植の安全性

移植細胞の由来や採取部位、移植細胞の数、移植部位、移植手技、移植時期などの具体的な移植方法は、今後実験的研究を行って安全性と有効性とを十分に検討する必要がある。移植される神経幹細胞の安全性の確立と供給は、独立行政法人産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センターによる¹⁰⁾。一方、移植の外科的処置については、従来の治療に際して脊髄を直視下に観察し病変部を操作でき、今回の検討からはこの手術の際に神経幹細胞を移植することは比較的安全に行える手技と思われる。

5. 神経幹細胞移植を行う際の利点

現在行われている実験的な脊髄機能回復に向けた種々の細胞を脊髄に移植する方法から推測すれば、脊髄神経機能の回復のために神経幹細胞移植を行うには、病変部を直視下に観察し、適切な部位に移植する必要がある¹⁸⁾。ヒトの場合、脊髄髄膜瘤では二次的脊髄神経機能の障害および感染の予防のため、全例で瘤の修復が行われる。また、神経症状を呈する脂肪脊髄髄膜瘤は脊髄係留解除の外科的治療の適応とされている。移植部位やその方法は、今後実験的にその安全性や有効性を確認していくことになるが、方法に述べたように、従来の治療に際して脊髄を直視下に観察し病変部を操作できる。そのため、脊髄髄膜瘤や脂肪脊髄髄膜瘤では現在手術適応がある例には、全例この治療を追加して行うことは可能と思われる。

脊髄髄膜瘤では水頭症、キアリ奇形など脳の病変を伴う。水頭症に対しては、髄液シャントなど適切な治療を行える。キアリ奇形は画像上では極めて頻度が高いが、臨床的に脳幹、小脳症状を呈するため治療を必要とする例は5%から10%と少ない^{3,12,23)}。このような合併症を適切に治療すれば、ほとんどの症例が成人まで生存し、知能レベルもほぼ維持される^{3,12)}。脂肪脊髄髄膜瘤では

合併する脳病変は極めてまれで、知能面での障害は合併しない。神経幹細胞移植後に神経経路の構築には、リハビリテーションによる効果も期待できる。リハビリテーションを有効に行うには、ある程度以上の言語理解能力や表現能力が必要である。また、神経機能を評価する場合、神経機能評価は下肢の麻痺の程度や部位、知覚障害の範囲などで客観的に評価しやすい²⁵⁾。意思の疎通が可能であればさらに、評価は正確となる。このように、脊髄髄膜瘤や脂肪脊髄髄膜瘤では知能障害の合併が比較的少ないことから、脊髄神経機能の回復を試みる疾患としては適したcandidateと思われる。

6. 神経幹細胞移植による治療法の問題点

脊髄髄膜瘤の修復を行う時期は、通常は出生後48時間以内、遅くとも72時間以内に行えば、感染率は増加しないとされている³⁾。生後から修復までの間に移植する神経幹細胞を用意することになる。最近では胎児超音波エコーで出生前診断され、母体MRIで脊髄髄膜瘤の診断が可能である。このように出生前に診断がなされておれば、移植細胞の準備に時間的な余裕があると思われる。脂肪脊髄髄膜瘤では感染の危険性はなく、手術の計画から実施までに時間の余裕があるため、移植用の神経幹細胞の準備にはあまり問題が生じないと思われる。どのような移植細胞を用意するか、また移植細胞の数を確保できるかは、今後実験的研究によって解決していく必要がある。最近、臍帯血など神経組織以外からの神経幹細胞の分離の可能性が示唆されている⁶⁾。脊髄髄膜瘤の場合は、出生直後に手術を行うため、この臍帯血など患児自身の組織由来の神経幹細胞を用いれば、自己移植となるため免疫抑制剤などの投与が不要となり、臍帯血は理想的な神経幹細胞の源となる。

現在のところ、出生時に脊髄髄膜瘤の診断がなされた場合、感染予防のため通常は出生後は48時間から72時間までに瘤の修復術を行うため、保護者と治療に関してのインフォームドコンセントを十分に得るには時間的制限がある。一方、出生前に診断されている場合は、計画的に出生させて瘤の修復を行えるので数週間から数日の時間の余裕が生まれる。また、脂肪脊髄髄膜瘤では、感染の危険性はないためこのような時間的な余裕がある。このように、患児の保護者と治療についての話し合いを持つ時間の余裕ができ、倫理面や心理面での患者家族の配慮が十分に行えると思われる。

7. 先天性の神経組織形成不全に対する神経幹細胞移植

による治療の意義

脊髄損傷に対する神経幹細胞移植は、一旦形成され完成された神経回路が障害を受け、これを神経幹細胞移植という新しい方法で再生しようとする試みである。今回の脊髄髄膜瘤は先天性な神経組織の形成不全の病態である。この神経幹細胞移植による治療が効果的であれば、他の神経組織の形成不全による疾患にも応用できる可能性を示唆できることになり、極めて有意義なことと思われる。

E. 結 論

現在の治療法では、脊髄髄膜瘤、脂肪脊髄髄膜瘤に伴う脊髄・末梢神経の機能障害を明らかに改善することはできなかった。この疾患に神経幹細胞移植を応用する際の利点としては、現在行われている修復術など手術操作に加えて、病変部位やその周囲の脊髄に神経幹細胞移植を直接行うことが可能なことである。また、この疾患は重篤な脳の機能障害を合併することが比較的少なく、ほとんどの例は成人期に達し、神経機能評価は下肢の麻痺の程度や知覚障害の範囲などで客観的に評価しやすい。さらに、多くの先天性神経形成不全の疾患の中でこの疾患の頻度は高い。移植細胞の由来や採取部位、移植細胞の数、移植部位、移植手技、移植時期などの具体的な移植方法は、今後実験的研究を行って安全性と有効性を十分に検討する必要があるが、従来の治療法が無効な先天性の神経形成不全による疾患の中で、脊髄髄膜瘤、脂肪脊髄髄膜瘤はこの新しい治療法をまず最初に試みるのに最も適した疾患と思われる。

文 献

- 1) Bartolomei JC, Greer CA. Cell transplantation for spinal cord injury repair. *Neurobiology of Spinal Cord Injury*. Edited by Kalb RG, Strittmatter SM. Human Press Inc., Totowa, NJ, 195-213, 2000.
- 2) Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong L-YC, Gindler J, Hong S-X, Correa A: Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. *New Engl J Med* 341; 1485-1490, 1999.
- 3) Cohen AR, Robinson S: Early management of myelomeningocele. *Pediatric Neurosurgery, surgery of the developing nervous system*. McLone DG edited, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 241-259, 2001.
- 4) Colas J-F, Schoenwolf GC: Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental*

- dynamics 221,117-145, 2001.
- 5) Copp AJ: Genetic models of mammalian neural tube defects. *Ciba Found Symp* 181: 118-143, 1994.
 - 6) Ha Y, Choi JU, Yoon DH, Yeon DS, Lee JJ, Kim HO, Cho YE. Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells in vitro. *Neuroreport* 12:3523-7, 2001.
 - 7) Han SS, Fischer I. Neural stem cells and gene therapy: prospects for repairing the injured spinal cord. *JAMA* 283:2300-2301, 2000.
 - 8) Heffez DS, Aryanpur J, Cuello Rotellini NA, Hutchins GM, Freeman JM: Intrauterine repair of experimental surgically created dysraphism. *Neurosurgery* 32: 1005-1010, 1993.
 - 9) Hirose S, Farmer DL, Albanese CT: Fetal surgery for myelomeningocele. *Curr Opin Obstet Gynecol* 13, 215-222, 2001.
 - 10) 金村米博、岡野栄之：神経幹細胞の同定法とその応用. *Clinical Neuroscience* 20, 14-19, 2002.
 - 11) McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW: Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5, 1410-1412, 1999.
 - 12) McLone DG, Naidich: Myelomeningocele. Disorder of the developing nervous system. diagnosis and treatment, Hoffman HJ, Epstein F, edited. Blackwell Science Publications, Boston, 87-108, 1986.
 - 13) McLone DG, Dias MS, Goossens W, Knepper PA: Pathological changes in exposed neural tissue of fetal delayed splotch (Spd) mice. *Child's Nerv Syst* 13, 1-7, 1997.
 - 14) Nakanishi N, Sakamoto H, Nishikawa M, Hakuba A: Pathogenesis of cnephaloschisis in retinoic-acid-treated hamster embryos I: a morphometric study of the craniofacial structures. *J Craniofac Genet Dev Biol* 19: 174-182, 1999.
 - 15) New DA: Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 53: 81-122, 1978.
 - 16) 小川祐人、岡野栄之：神経幹細胞を用いた治療戦略. *神経研究の進歩*, 5: 45-53, 2001.
 - 17) 岡野栄之. 神経幹細胞. *再生医学と生命科学*, 浅島誠、岩田博夫、上田一実、中辻憲夫編. 蛋白質核酸酵素, 45:2063-83, 2000.
 - 18) Okano H, Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Toyama T, Nakamura M, Bregman BS, Uchiyama Y.: Transplantation of in vitro expanded neural stem cells results in neurogenesis and recovery of motor function after spinal cord contusion injury in rats. *Soc for Neurosci* 325.11, 2001.
 - 19) 小野村敏信: 総括研究報告書、厚生省精神・神経疾患研究委託費「脊椎・脊髄の発生異常に基づく神経機能の治療及び予防に関する研究」平成元年度研究報告書, 1-4, 1990.
 - 20) Pang D, Wilberger JE Jr: Tethered cord syndrome in adults. *J Neurosurg* 57:32-47, 1982.
 - 21) Sakamoto H, Hakuba A, Fujitani K, Nishimura S: Surgical treatment of the retethered spinal cord after repair of lipomyelomeningocele, *J Neurosurg* 74, 709-714, 1991.
 - 22) 坂本博昭、白馬一明：先天性疾患, 2) 腰仙椎部およびその他. *臨床脊椎脊髄医学*, 伊藤達雄、服部孝道、山浦昌編, 三輪書店, 東京, 335-343, 1996.
 - 23) 坂本博昭、北野昌平、西川一節、安井敏裕、藤谷健、白馬一明、中西愛彦: Chiari奇形に伴った小児脊髄空洞症. *小児の脳神経*, 22, 9-18, 1997.
 - 24) Sakamoto H, Kitano S, Fujitani K: Surgical treatment of lipomyelomeningocele for prevention of postoperative retethering. *Spina Bifida*, Matsumoto S, Sato H edited. Springer-Verlag, Tokyo, 79-87, 1999.
 - 25) 坂本博昭、北野昌平: V. 小児(新生児、乳児)脊髄・脊椎疾患. *脳神経外科 周術期管理のすべて*, 松谷雅生、田村一晃 編集, メジカルビュー社, 374-384, 2000.
 - 26) 坂本博昭、北野昌平: Tethered spinal cord. *Annual review 神経* 2001. 柳沢信夫, 篠原幸人, 岩田一誠, 清水輝夫, 寺本一明, 編集. 中外医学社, 東京, 304-310, 2001.
 - 27) 坂本博昭、山崎麻美、金村米博、岡本伸彦、森鑑二、北野昌平、西川一節: 脊髄髄膜瘤症例とその家系における葉酸代謝酵素 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子の1塩基置換C677T, A1298Cの解析. 厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 難治性水頭症調査研究班 平成13年度研究報告書, 2002 (印刷中).
 - 28) 坂本博昭、高見俊宏、北野昌平、西川一節、原一充弘、金村米博、山崎麻美: 脊髄髄膜瘤の神経機能回復に関する基礎研究. 新生ラット脊髄経路障害モデルにおける神経幹細胞移植による皮質脊髄路構築の試み. 厚生労働省厚生科学研究費補助金 (脳科学研究事業) 脊髄髄膜瘤の脊髄・末梢神経機能回復法の開発, 平成13年度報告書, 2002 (印刷中).
 - 29) Tanabe Y, Jessell TM: Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274: 1115-1122, 1996.
 - 30) 山崎麻美、金村米博、岡本伸彦、有田憲生: 水頭症遺伝子バンク設立の経過と遺伝解析. 厚生省科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 難治性水頭症調査研究班 平成11年度研究報告書, 43-56, 2000.
 - 31) 山崎麻美: 二分脊椎・脊髄係留症候群. *脊椎脊髄ジャーナル*, 14: 529-534, 2001.

脊髄髄膜瘤の脊髄・末梢神経機能の回復法の開発

慶應義塾大学医学部

岡野 栄之

研究要旨

本研究は、ヒト脊髄損傷の治療法を開発するための基礎的なモデル研究である。ラット頸髄損傷モデルに対し、ラット胎仔脊髄由来の神経幹細胞の移植を行った。損傷後、9日目に移植することにより、組織学的にも、機能的にも回復傾向をみることができた。

A. 研究目的

ヒト脊髄損傷の治療法確立のための、基礎的な研究である。ラットの脊髄損傷モデルへ神経幹細胞を導入し、機能回復を試みた。

B. 研究方法

脊髄C4, C5レベルで背側の椎弓を外し、contusionモデルによる脊髄損傷モデルRatを作製した。同動物においては、脊髄は空洞変性を起こすとともに行動学的(pellet retrieval test)に後索症状に起因すると考えられる異常を示した。損傷後、9日目にラット胎仔由来の神経幹細胞を移植し、移植後4～5週目に組織学的、行動学的な検討を行った。

C. 研究結果

移植した外来性の神経幹細胞からは、ホストの神経組織内において、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが新生していることが確認できた。ドナー神経前駆細胞由来のニューロンが、ホスト神経回路網に組み込まれているかどうかの確認を行った。ニューロンで特異的にenhanced yellow fluorescent protein (EYFP)を発現するトランスジェニックラット由来の移植細胞を調製し、参考例と同様の方法で移植を行い、移植後5週

間目に移植部脊髄を取り出した。移植細胞由来のニューロンがホスト脊髄内で分化・生存していることの確認は、ニューロンで特異的にenhanced yellow fluorescent protein (EYFP)を発現するトランスジェニックラット由来の移植細胞を調製し、参考例と同様の方法で移植を行い、移植部脊髄を抗EYFP抗体で染色することにより行った。移植を受けた動物の脊髄組織を抗EYFP抗体で染色した後に、電子顕微鏡で検索した。その結果、EYFP陽性の細胞すなわち移植細胞由来のニューロンの軸索にミエリン形成が認められ、移植細胞由来のニューロンとEYFP陰性のニューロンすなわちホストのニューロンとの間にシナプスが形成されていることが確認された。移植後5週間目で、前肢で小さな餌を取りこれを口にもっていくという動作について機能評価を行ったところ(pellet retrieval test)、移植を行わなかった対照群に比べ移植群で有意な機能改善が認められた。すなわち、前肢の巧緻運動について移植により機能改善が認められることが確認された。

D. 考察

哺乳類成体脊髄においてはニューロン新生がおこらない(non-neurogenic site)と言われている。すなわち、成体脊髄には、内在性の神経幹細胞(in vitroでneurosphereを形成し、分化誘導するとニューロンとグリアの両方を

産み出す)が存在するものの、*in vivo*では損傷時にも、非損傷時にもニューロン新生は起こらない。これは、特に損傷時の脊髄の微小環境が、ニューロン新生に対して抑制的であることを示唆している。この原因としては、損傷直後に (IL-1a, IL-1b, IL-6, TNF-a) などの炎症性サイトカインの発現が、一過性に誘導される (Nakamura et al., *Exp. Neurol.*, 2001) ことが関与しているものと考えられる。特にIL-6はgp130シグナルを活性化し、内在性の神経幹細胞をグリアへ誘導するものであると考えやすい。この急性の炎症期に神経幹細胞の移植を試みたが、ほとんど生着しなかった。また、例え生着しても、もっぱらアストログリアへと分化し、ニューロンを新たに産み出すことはなかった。しかし、受傷後9日後では、炎症性サイトカインの発現もベースレベルまで低下しており、逆に神経栄養因子の発現が亢進している (Nakamura et al., *Exp. Neurol.*, 2001)。以上より、損傷脊髄への神経幹細胞移植の成功のためには、*time window*があり、この受傷後9日後はそこに含まれるものと考えられる。

E. 結論

以上の結果は、神経幹細胞移植が、脊髄損傷を含む神経疾患の治療法として有効である可能性を示唆しているものと考えられる。これらの技術をさらに発展させることで、脊髄損傷に対する脊髄再生を目的とした新規の治療法が開発されることが期待される。

脊髄損傷に対する神経幹細胞移植

慶應義塾大学整形外科

中村 雅也 戸山 芳昭

研究要旨

新生ラット損傷脊髄に胎児脊髄由来神経幹細胞移植を行った。移植細胞は移植部位から最大12mm移動し、ニューロン、オリゴデンドロサイトへ分化した。また、非移植群と比較して有意に良好な軸索の再生と下肢運動機能の改善がみられた。

A. 研究目的

本研究の目的は、近年移植材料として注目を浴びている神経幹細胞を新生ラット脊髄損傷に移植し、解剖学的検索と運動機能評価を行いその有用性を検討することである。

B. 研究方法

1) 神経幹細胞培養：胎齢14日Sprague-Dawleyラット脊髄を用いて、Weissらの方法に準じて培養を行った。増殖因子はEGFとFGF2を用いた。1週間ごとに継代を行い、3回の継代後にBrdUを用いて細胞の標識を行った。
2) 脊髄損傷モデル作成：生後3日齢Sprague-Dawleyラットを用いた。4% chloral hydrate腹腔内麻酔下に第6・7胸椎椎弓切除を行い、Bregmanらの方法に準じて第6胸椎レベルにover-hemisection injuryモデルを作成した(Kunkel-Bagden et al., Exp Neurol, 1992)。
3) 神経幹細胞移植：損傷作成後直ちに、損傷部のギャップに 2×10^6 個の細胞をゼルフォームとともに移植した(移植群)。なお、対照として損傷部に培養液とゼルフォームを移植したものを非移植群、椎弓切除のみを行い、損傷を加えなかったものを椎弓切除群とした。移植後6-8週に、a) 免疫組織化学的検索、b) トレーサーを用いた再生(一部新生)軸索の検索、c) 電顕的検

索(再髄鞘化、シナプス形成)、d) 運動機能評価(footprints解析、contact placing reflex)を行った。

C. 研究結果

移植細胞は移植部位で良好に生着し、最大8mm頭尾側方向への移動もみられた。順行性に標識された皮質脊髄路線維は移植群で多数みられ、さらに逆行性標識でも大脳皮質・脳幹部の標識細胞数は移植群で非移植群より有意に多かった。移植部に未熟ではあるが髄鞘化された再生(一部新生)軸索が多数見られ、移植細胞より分化したニューロン、オリゴデンドロサイトもみられた。また、移植部にシナプス形成も認め、さらに神経幹細胞移植により下肢運動機能とcontact placing reflexの回復を認めた。

D. 考察

移植細胞がニューロンとオリゴデンドロサイトに分化し、未熟ではあるが髄鞘化された再生(一部新生)軸索が移植部にみられたことから、移植細胞が軸索の再生、髄鞘化に重要な働きをしている可能性が示唆された。

E. 結論

新生ラット損傷脊髄に対する神経幹細胞移植により運動機能の有意な回復が得られた。

脊髄髄膜瘤の治療の可能性に関する研究

関西医科大学 脳神経外科

稲垣 隆介 桜井 靖夫

研究要旨

近年の細胞培養技術の急速な進歩に伴い、胎生幹細胞や神経幹細胞が樹立され、また、これらを特定の種類の細胞に分化させることも可能となってきた。脊髄損傷などでは、幹細胞をある特定の時期に移植することで、脊髄の損傷が改善し、臨床症状も良くなることが報告されている。脊髄髄膜瘤などの二分脊椎症では生下時に認められる神経症状は改善しないと考えられているが、早期に神経幹細胞を移植することで脊髄髄膜瘤に伴う神経症状が改善し得るかどうかにつき検討を加える。

A. 研究目的

胎生幹細胞や神経幹細胞が樹立され、その将来性が期待されている。また、幹細胞を移植することで脊髄の外傷による損傷はある程度回復する可能性が示唆されている。これに対し脊髄髄膜瘤に代表される二分脊椎症では、生下時に認められる脊髄髄膜瘤に起因する神経障害は治らないと考えられている。本研究では脊髄髄膜瘤に代表される開放性二分脊椎症による脊髄症状が幹細胞移植で改善するか否かを見極めることが目的である。しかし、前段階として脊髄髄膜瘤の発生解剖学的な研究は比較的少なく、幹細胞移植により症状が改善しうる程度にまで発達した神経組織が存在しているか否かも明らかでない。まず第一段階として、移植をした幹細胞が生着し症状の改善を来す可能性があるか否かを検討する。自然発生の開放性二分脊椎動物モデルに加え、薬剤誘発モデルも外科的に作成した二分脊椎症モデルも報告されているが、本実験にはある程度数が必要であると考えられるため、外科的作成モデルが、病理・解剖学的に自然発生モデルに類似するかどうかで外科的作成二分脊椎症が幹細胞移植実験モデルに適しているかどうかの検討を行

う。まず、安定的に得られるかどうか、また、どの程度の胎生期に手術をすればどの程度の時期まで腹腔内子宮外培養が可能か検討を行った。

B. 研究方法

動物実験（マウス）を行い脊髄髄膜瘤を作成した。方法はC57系マウスを使用した。生後8週前後の雌雄マウスを交配させる。膈栓の確認された目を妊娠0日とし、妊娠10日から14日に一妊娠雌あたり2～3胎児を外科的に手術し髄膜瘤を作成した。手術を施行した胎児は腹腔内・子宮外腔で培養した。数日経過した時点で頸椎の脱臼により妊娠マウスを処理後、胎児を取り出し、その生死ならびに脊髄の外表奇形の有無につき調べた。

C. 研究結果

マウス胎児を妊娠12日に手術をし、妊娠14日まで腹腔内培養をしたものでは、比較的高率（約7割）に脊髄髄膜瘤様の異常を認めた。その一方で、妊娠10日、妊娠16日に手術を施行した例では長時間生存しなかった。

D. 考察

脊髄髄膜瘤は0.5-1/1000出生の頻度で見られる疾患であり、障害部より以下にみられる脊髄症状は程度の差はあれ治療が困難であると考えられている。近年、妊婦が薬酸を服用することでその発生を抑えることが出来る可能性も示唆されているが、動物実験からも全ての脊髄髄膜瘤を予防できるものではないと考えられる。一方、同様に治療方法がないと考えられていた脊髄外傷が幹細胞移植で治療可能であることが報告されるようになった。われわれは、脊髄髄膜瘤も幹細胞の使用で障害脊髄以下の脊髄障害を軽減する可能性もあると考えている。特に手術所見では障害部以下の脊髄や神経根は肉眼的に正常に近い解剖学的構造を示しているのに、神経機能が廃絶している症例ではその可能性は高いと考えられる。実験的にニワトリやマウスに脊髄髄膜瘤を作成することは可能であることがわかっているが、幹細胞移植実験を続ける上でその実験動物における脊髄髄膜瘤が、どのような神経の発達を示すのか、またヒトの病態と類似しているのかどうかなどの確認が必要と考えられる。実験動物では、自然発生・薬剤誘発モデルに加え外科的に作成した二分脊椎モデルが報告されているが、幹細胞移植実験にはある程度以上の個体が一定量・定期的に得られる必要があると考えられるために外科的作成モデルが理想的であると考えている。その理由は、①マウスなどの小型動物では妊娠期間が短く比較的短時間に実験を繰り返すことが出来る。②すでに、幾種類かの実験モデルが存在している。③ヒト以外では今までのところ、出生後に長期間生存させることが難しいために（異常のある個体を親が食べてしまう）、移植実験を行うのであれば胎内で行う必要がある、などである。Yasudaらの報告によれば薬剤誘発開放性二分脊椎を持つマウスでは正常マウスに比べて二分脊椎部でGFAP陽性細胞が多くなる。その一方で胎児脊髄レベルでの神経の発達に関する報告は少ない。Oiらはexencephalyの胎児脳を調べることでneuron-specific enolaseやsomatostatinが陽性の細胞が増加していることを示している。Yasudaらが示したように、脊髄髄膜瘤部にはGFAP陽性のastrocytoのみが増加しているのであれば、幹細胞移植はあまり有用はないかもしれないが、Oiらが示しているように神経細胞が造成しておりかつ、脊髄髄膜瘤の中心部だけに欠落しているのであれば、その部位に神経幹細胞を移植することで脊髄髄膜瘤部以下の脊髄機能を回復させうる可能性もあると考えられる。今年度は外科的に脊髄髄膜瘤が安定的に得られるか

どうかを検討した。マウスの場合胎生の12日には比較的容易に手術が可能であり、胎生14日までは生存させることが可能であった。今後は①更に長期に生存させることが可能かどうか、②脊髄髄膜瘤部の発生・解剖が正常個体とどのように違い、幹細胞移植が可能と考えられるような異常であるのかどうかにつき検討を加える。

E. 結論

今回の検討からは、外科的に脊髄髄膜瘤を作成できることが再確認できた。問題は、親マウスの腹腔内・子宮外で2日間の培養が可能であったが、さらに培養期間の延長が必要である。

脊髄髄膜瘤の神経機能回復に関する基礎研究 新生ラット脊髄経路障害モデルにおける神経幹細胞移植による皮質脊髄路構築の試み

大阪市立総合医療センター小児脳神経外科¹ 大阪市立大学大学院医学研究科脳神経外科学²
産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センター³ 国立大阪病院脳神経外科⁴

坂本 博昭¹ 高見 俊宏² 森川 俊枝¹ 北野 昌平¹ 西川 節²
原 充弘² 金村 米博³ 山崎 麻美⁴

研究要旨

近年、神経幹細胞移植による脊髄の再生あるいは修復が試みられており、神経再生治療に向けた研究が精力的に進められている。先天性中枢神経疾患である脊髄髄膜瘤に伴う神経機能障害に対しては、有効な機能改善の方法がない状況が続いており、本研究では神経幹細胞移植による脊髄髄膜瘤の神経機能回復の可能性について、特に神経回路構築の観点から検討した。新生ラット脊髄経路障害モデルを用い、経路障害部位に神経幹細胞移植を行い、運動性伝導路の主回路である皮質脊髄路（錐体路）構築について解析する計画を立てた。

A. 研究目的

神経管癒合不全によって発生する脊髄髄膜瘤においては、出生前診断の進歩による早期診断とそれに基づく早期閉鎖術および新生児管理の進歩により、著しい生命予後や知能面からみた機能予後の改善を得たが、脊髄機能回復に関しては脊髄損傷による機能障害と同様に、有効な治療方法が開発されていないのが現状である (McLone, 1996)。治療が困難な原因として、神経管癒合不全の病態解明の難しさおよび脊髄自身の再生あるいは修復能の限界が挙げられる。脊髄の再生あるいは修復に関しては永らく不可能とされてきたが、近年の細胞移植による基礎研究の進展は目覚ましく、脊髄の再生・修復の新たな治療法の確立が期待されている (Baltolomei and Greer, 2000)。とりわけ、自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞は、その細胞生物学的特性から大いに注目を集めており、神経幹細胞移植によって脊髄損傷の機能障害を改善する実験結果が集積されつつある (Okano et al., 2001)。本研究では、中枢神経の形成異常によって発

生する脊髄髄膜瘤に対する神経機能回復の可能性について考察するため、新生ラット脊髄経路障害モデルを作製し、神経幹細胞移植による神経回路構築の可能性について検討する予定である。脊髄髄膜瘤は発生初期段階における神経管癒合不全に起因するため、発生後期から分化・形成が始まる運動性伝導路の主回路である皮質脊髄路（錐体路）は正常に形成されず、それが脊髄機能障害の一因と考えられる。そこで、新生皮質脊髄路が、移植神経幹細胞あるいはそこから分化した新生ニューロン及びグリア細胞といかに関わり神経回路を構築するかを形態学的に明らかにする。

B. 研究方法

胎児ラット由来神経幹細胞培養

Fisher 344系ラット胎児あるいはグリーンラット胎児 (E14.5) の脳室あるいは脊髄中心管周囲組織を分離・培養 (Reynolds et al., 1992)。培養液にはホルモン混合液と fibroblast growth factor-2 (FGF-2; 20 ng/ml, Pepro Tech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) を混ぜたDMEM/F12を使用し