

患者さんへ

自主臨床試験：『圧迫性脊髄症急性増悪例に対する顆粒球コロニー刺激因子を用いた 神経保護療法』についてのご説明

1. はじめに、

臨床研究により新しい治療法を確立することは、大学病院の使命であり、患者さんのご協力により成し遂げることができるものです。今回参加をお願いする臨床研究は“自主臨床試験”と呼ばれるもので、実際の診療に携わる医師が医学的必要性・重要性に鑑みて、立案・計画して行うものです。製薬会社などが行う新薬の安全性・有用性をしらべ、厚生労働省の承認を得るための臨床試験、いわゆる治験ではありません。この試験については当院の治験審査委員会の審議にもとづく病院長の許可を得ています。試験に参加されるかどうかはあなたの自由意思で決めて下さい。参加されなくてもあなたが不利益を被ることはありません。

あなたは慢性圧迫性脊髄症と診断されています。これはヘルニア・骨のつぶれ・靭帯骨化症などにより脊髄が圧迫されているせいで手足の動きや感覚が悪くなってしまう状態です。さらに最近症状の悪化が急に進行しています。脊髄内部で神経細胞・神経膠細胞（しんけいこうさいぼう＝神経の補助細胞）が弱りつつあり、放置すればこれらの細胞が部分的に死んでしまうため回復しにくくなると考えられています。現在の医学ではこれらを完全に治す手段はなく、よい薬がないのが現状です。

最近私たち千葉大整形外科の脊髄損傷研究グループは、動物実験にて「顆粒球コロニー刺激因子；フィルグラスチム」という薬が脊髄損傷に有効であることを発見しました。この薬は白血球を増やす作用があり、白血球が減ってしまった患者さんなどに対して保険適応になっています。慢性圧迫性脊髄症でも急速に悪化する例では脊髄損傷と似たような病態が脊髄内でおこっていると考えられるため、同様にこの薬が効果を持つ可能性があります。

今回の試験では、顆粒球コロニー刺激因子（フィルグラスチム）を点滴し、急速に悪化した脊髄症状がどの程度改善されるかを観察していきます。将来的には顆粒球コロニー刺激因子（フィルグラスチム）を圧迫性脊髄症治療薬として今後広く用いることができるようになる可能性があります。しかし、なにぶんまだ顆粒球コロニー刺激因子（フィルグラスチム）を圧迫性脊髄症に用いたことは（報告例も含めて）全くないため、まず安全なのかどうかという点が疑問です。そこで今回の計画ではまず顆粒球コロニー刺激因子（フィルグラスチム）の圧迫性脊髄症急性増悪例に対する**安全性**を調べることにしました。

この臨床使用については当院の治験審査委員会の審議にもとづく病院長の許可を得ています。使用するかどうかはあなたの自由意思で決めて下さい。使用されなくてもあなたが不利益を被ることはありません。

2. この研究の目的

この研究の目的は、顆粒球コロニー刺激因子（フィルグラスチム）の圧迫性脊髄症急性増悪例に対する安全性を調べることです。

3. この研究の方法

(ア) 患者さん

今回研究に参加していただくのは圧迫性脊髄症と診断され、症状の急速な悪化が認められた20歳から75歳までの患者さんです。

ただし、以下にあげるような患者さんは安全性の面から除外とさせていただきます。

- ① この薬でアレルギーをおこしたことがある方
- ② 白血病など血液系悪性疾患にかかったことのある方
- ③ 過去5年以内になんらかのがんを治療したことがある方
- ④ 心筋梗塞・狭心症にかかったことのある方
- ⑤ 血栓・塞栓症（脳や肺、下肢などに血液が詰まる）にかかったことがある方
- ⑥ 脾臓がはれている方
- ⑦ 意識のないまたはもうろうとしている方
- ⑧ 妊娠中またはその可能性のある方
- ⑨ 脳梗塞などで手・足に麻痺のある方
- ⑩ その他、試験責任（分担）医師が被験者として不適当と判断した方

(イ) 研究に使用する薬剤

研究に参加していただく患者さんには顆粒球コロニー刺激因子（フィルグラスチム、商品名グラン[®]）という薬剤を点滴します。グラン[®]は液体の薬で有効成分として一本あたり顆粒球コロニー刺激因子が300 μ gまたは150 μ g含まれています。本研究に参加される人には、グラン[®]を1日1回、5日間点滴します。その他は手術・手や足のリハビリテーションを中心にした、一般に広くおこなわれている治療を適宜おこなうこととなります。

(ウ) 研究の進め方

今回の研究では顆粒球コロニー刺激因子（フィルグラスチム、商品名グラン[®]）の圧迫性脊髄症急性増悪例に対する安全性を調べるためにまずはじめの5例の方には少なめの量（一日体重kgあたり5 μ gを5日間）を投与し、副作用のないことが確認できたら続く5例の方には現在使われている最も多い量（一日体重kgあたり10 μ gを5日間）と、徐々に薬の量を増やしていきます。あなたに点滴するのは一日体重kgあたり μ gを5日間です。

(エ) 検査項目

治療の安全性を判定するために、「自覚症状」「他覚症状」を調べるとともに、血液や尿を調べる「臨床検査」、神経の周りを流れる液を採取する「脳脊髄液検査」、「MRI 検査」を行います。調べる内容とスケジュールは以下の通りです。臨床検査にあったって5ml程度の採血と採尿を行います。なお、異常値が見られた場合はさらに検査を行うことがあります。

観察・検査項目	試験開始前	試験薬投与中	試験薬投与終了時	試験薬終了後1週	試験薬終了後1ヶ月	試験開始後6ヶ月	試験開始後1年
文書での同意取得	○	—	—	—	—	—	—
患者背景調査・登録	○	—	—	—	—	—	—
試験薬（フィルグラスチム）		←————→		—	—	—	—
有害事象の調査 ^a		←————→				●	←————→
					安全性評価		
臨床症状観察		←————→					
臨床検査実施 ^b	○	←————→		○	○	○	○
MRI（脊髄）	○	—	○	—	○	○	○
脳脊髄液中タンパク・細胞	○	—	○	—	—	—	—
X線検査	○	—	—	○	○	○	○

現在、あなたが他の病院に通院されている場合は、その病院と病名、使用しているお薬をお知らせください。また、薬局等で購入して使用しているお薬がある場合もお知らせ下さい。また、薬局等で購入して使用しているお薬がある場合もお知らせ下さい。これらは、研究を安全に行うために大切なことです。また、あなたが他の病院に通院されている場合は、この研究に参加していることをその病院にお知らせすることがありますので、ご了解下さい。

4. この試験の予定参加期間

この研究は千葉大学医学部附属病院で平成20年承認日から平成22年3月31日にかけて行います。安全性の評価は点滴終了後1ヶ月の時点で行いますが、あなたに研究に参加していただく期間はトータルで1年間です。

5. 研究に参加する予定の被験者数

この研究には、大学病院・他の病院をあわせて、あなたと同じような圧迫性脊髄症患者さん10人に参加していただく予定です。そのうち大学病院では約3-4人の患者さんに参加していただく予定です。

6. 予想される効果と起こるかもしれない副作用

過去に顆粒球コロニー刺激因子（フィルグラスチム）の脳梗塞に対する臨床研究の成績が報告されており、脊髄損傷や圧迫性脊髄症の急性増悪例にも効果が期待されます。しかし今回の計画はあくまでも安全性の確認に主眼をおいていますので、ご理解ください。

また、顆粒球コロニー刺激因子（フィルグラスチム）の点滴により腰痛・骨痛のような副作用を生じることが考えられます（以下、添付文書からの抜粋です）。

フィルグラスチムの承認時安全性評価・使用成績調査対象6,391例中679例（10.6%）に1,139件の副作用が認められた。主な症状は筋・骨格系障害163件（骨痛96件（1.5%）、腰背部痛52件（0.8%）等）であった。なお、5%を超える頻度の副作用は認められていない。

重大な副作用：

- 1) ショック（頻度不明）
- 2) 間質性肺炎（頻度不明）：間質性肺炎が発現または増悪することがある。徴候または症状

として、発熱・咳嗽・呼吸困難および胸部レントゲン異常等がみられる。

3) 急性呼吸窮迫症候群（頻度不明）：急性呼吸窮迫症候群があらわれることがある。徴候または症状として、急速に進行する呼吸困難・低酸素血症および両側びまん性浸潤影などの胸部レントゲン異常等がみられる。

4) 芽球の増加（頻度不明）：急性骨髄性白血病・骨髄異形成症候群患者において芽球の増加を促進することがある。

5) 脾破裂（頻度不明）：本剤の過剰な作用に伴い脾破裂が発現する可能性がある。

7. この試験に参加しない場合の、他の治療方法

圧迫性脊髄症には一般的にカラー固定や牽引（入院・外来）、手術などがおこなわれており、どれも（個人差は大きいですが）ある程度の効果はあるとされています。圧迫性脊髄症の急性増悪例に関しては手術がおこなわれることが多いですが、有効な薬剤として臨床使用されているものは現在のところありません。

圧迫性脊髄症の急性増悪例に対して緊急で手術をおこなうことは極めて少なく、保存療法（4週間程度行います）にて、脊髄障害の進行を防ぎ、その後手術をおこなうことが一般的です。保存療法としては、持続牽引などが行われます。この研究に参加される場合は、その保存療法の期間に薬剤（フィルグラスチム）の点滴を行った後、手術をおこなうことになります。もしあなたがこの研究に参加されない場合には保存療法の期間の後に手術をおこなうことになるので、フィルグラスチムの点滴にかわる薬物治療はありません。手術による改善率には、個人差があります。術前の脊髄障害が重度の方は、改善率が低い傾向があります。

8. この試験中にあなたの健康に被害が生じた場合について

この臨床研究は、これまでの報告に基づいて科学的に計画され、慎重に行われます。もし、臨床研究の期間中あるいは終了後にあなたに副作用などの健康被害が生じた場合には、医師が適切な診察と治療を行います。本臨床研究は既に市販されているお薬を使用して行いますので、そのお薬による健康被害の治療も通常の診療と同様に患者様の健康保険を用いて行います。

9. この研究への参加は、患者さんの自由意思によるものです

この研究に参加するかあるいはしないかは、あなたの自由な意思で決めることができます。信頼している人に相談し、よくお考えの上、ご自分の意思で決めてください。たとえ、研究への参加をお断りになっても、その後の治療などに何ら不利益を受けることなく、治療にも差し支えることはありません。

いったんこの研究に参加することに同意した後でも、いつでも自由に研究への参加をとりやめることができます。その場合でも、あなたには何ら不利益を受けることなく、すぐに他の最も適した治療を受けることができます。ただし、その場合は担当医師にお知らせください。これはあなたの健康管理に万全を払うためです。

10. この薬に関する情報は、随時ご連絡します

この研究についてお聞きになりたいことがあれば、担当医師に遠慮なくおたずねください。研究が開始されると、新しいさまざまな情報が得られることになり、こうした情報によりあなたが研究への参加を取り止めるという判断をすることも考えられます。したがって、この研究に関する新しい重大な情報（研究の危険性・安全性など）が得られた場合には、速やかにその内容をあなたに伝え、このまま研究への参加を続けるのかどうか、もう一度あなたの自由な意思で決めていただきます。

11. この薬の使用を中止させていただく場合があります

あなたがこの研究への参加への取り止めを希望された場合だけでなく、以下に示した項目に該当した場合は、この研究の途中で参加を中止させていただく場合がありますのでご了承ください。その場合はすぐに中止の理由を説明致します。

- ・ 研究実施中にあなたに好ましくない症状などが発現し、研究を中止すべきと担当医師が判断した場合
- ・ 研究開始後、あなたがこの研究の対象となっている病気ではないことがわかった場合
- ・ 研究開始後、あなたが転院などにより来院できないことがわかった場合
- ・ あなたの病気が改善して、この研究による治療を続ける必要がないと担当医師が判断した場合

12. この研究に参加された場合、あなたのカルテなどが研究中あるいは研究終了後に調査されることがあります

患者さんの人権が守られながら、きちんとこの研究が行われているかを確認するために、この臨床研究の関係者（この病院の職員など）があなたのカルテなどの医療記録を見ることがあります。しかし、あなたから得られたデータが、報告書などであなたのデータであると特定されることはありません。

13. この研究結果が公表される場合でも、あなたの身元が明らかになることはありません

研究成果が学術目的のために公表されることがありますが、その場合もあなたの個人情報の秘密は厳重に守られ、第三者には匿名にして絶対にわからないように配慮されます。データの公表についてもあなたの同意が必要ですが、この同意書にあなたが自筆署名をすることによって、あなたの同意が得られたこととなります。

14. この研究への参加に同意された場合は、次の点を守ってください

この研究に参加していただいた場合には、治療の有効性や安全性を調べるためにさまざまな診察、検査を行います。正確なデータを得るために、研究が終了するまで担当医師の指示に従ってください。また、他科・他院を受診する際や、薬局等で薬を購入する際は、必ず研究に参加していることを当該医師または薬剤師に告げるとともに、可能な限り事前に研究担当医師にご相談下さい。また、事後でも必ず研究担当医師にご報告下さい。

15. あなたの費用負担について

- ・ 被験者への費用負担は通常の保険診療でまかなわれます。
この研究では顆粒球コロニー刺激因子（フィルグラスチム）を通常の保険適応外の目的で使用します。この薬代は厚生労働科学研究費補助金でまかないますのであなたの負担となることはありません。従って、この研究に関わる治療のうち、顆粒球コロニー刺激因子（フィルグラスチム）の薬代以外の部分は健康保険の適応となっており、治療にかかる医療費のうち健康保険からの給付を除く部分は患者様の自己負担になります。
- ・ 治療前後、治療中に行う検査についても、健康保険の使用が認められています。つまり、この研究に参加しない場合と同様に健康保険で検査が行われます。

16. この担当医師が、あなたを担当致します

<臨床研究代表医師>

整形外科教授 高橋和久

<臨床研究責任医師>この病院で行う研究の責任を持つ医師で、患者様を担当する場合があります。

整形外科准教授 山崎正志

<臨床研究分担医師>この研究を責任医師とともに行います。患者様を担当する場合があります。

整形外科講師 大河昭彦

リハビリテーション部准教授 村田淳

<臨床協力医師>この研究に協力します。患者様を直接担当します。

整形外科医師 門田 領

整形外科医師 萬納寺誓人

整形外科医師 宮下智大

整形外科医師 川辺純子

整形外科医師 古矢文雄

整形外科医師 藤由崇之

整形外科医師 遠藤友規

整形外科医師 林 浩一

整形外科医師 佐久間毅

整形外科医師 高橋宏

17. いつでも相談窓口にご相談下さい

あなたがこの研究について知りたいことや、心配なことがありましたら、どうぞ遠慮なくあなたの担当医師または上記の責任医師、あるいは臨床試験部にご相談下さい。

臨床試験部：月～金 8:30～17:00 043-222-7171 (内線 6460)

責任医師・分担医師・協力医師

月～金 8:30～17:00 整形外科外来 043-222-7171 (内線 6791)

夜間・休日 整形外科病棟 043-222-7171 (内線 6547)

同意書

自主臨床試験課題名：圧迫性脊髄症急性増悪例に対する顆粒球コロニー刺激因子を用いた神経保護療法

<説明事項>

1. はじめに：自主臨床試験について
2. この試験の目的
3. この試験の方法
4. この試験の予定参加期間
5. この試験への予定参加人数
6. この試験薬の予想される効果と起こるかもしれない副作用
7. この薬を使用しない場合の、他の治療方法
8. この試験中に、あなたの健康に被害が生じた場合について
9. この試験への参加は、患者さんの自由意思によるものです
10. この薬に関する情報は、随時ご連絡します
11. この薬の使用を中止させていただく場合があります
12. この試験に参加された場合、あなたのカルテなどが試験中あるいは試験終了後に調査されることがあります
13. この試験結果が公表される場合でも、あなたの身元が明らかになることはありません
14. この試験への参加に同意された場合に守っていただくこと
15. あなたの費用負担について
16. 担当医師について
17. 相談窓口について

【患者さんの署名欄】

私はこの試験に参加するにあたり、上記の事項について十分な説明を受け、同意説明文書を受け取り、内容等を十分理解いたしましたので、本試験に参加することに同意します。

同意日：平成 年 月 日

患者氏名： _____ (自署)

代理人氏名： _____ (続柄)

【医師の署名欄】

私は、上記患者さんに、この自主臨床試験について十分に説明いたしました。

説明日：平成 年 月 日

所属：千葉大学医学部付属病院整形外科

氏名： _____ (自署)

ラット脊髄損傷モデルにおける顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF)の血管系に対する効果

川辺純子 国府田正雄 橋本将行 門田領 藤由崇之 古矢丈雄 遠藤友規 林浩一 村田淳 大河昭彦 高橋和久 山崎正志
主任研究者：山崎正志 千葉大学大学院医学研究院整形外科学准教授
分担研究者：大河昭彦 千葉大学大学院医学研究院整形外科学講師
分担研究者：村田淳 千葉大学医学部附属病院リハビリテーション部准教授

研究要旨：ラット脊髄不全損傷モデルを作成し、顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF)投与群と対照群に分割した。G-CSFの血管系に対する効果を検討するため、以下の項目を評価し両群で比較した。①脊髄損傷後の血液脊髄関門(Blood spinal cord barrier: BSB)の機能、②血管新生サイトカインである VEGF および Angiopoietin-1, HGF, FGF-2 の mRNA 発現、③脊髄損傷部および損傷部周囲の新生血管数、④行動学的改善の推移。結果として①両群の急性期脊髄浮腫の程度および蛍光色素の血管外漏出量は有意な差はなかった。すなわち BSB 機能に有意差はないと言えた。②G-CSF 投与群では血管新生に関与するサイトカインの mRNA 発現が増強し、特に VEGF, HGF, FGF2 は有意に増強していた。③組織学的評価では G-CSF 投与は脊髄内の新生血管数を有意に増加させた。④行動学的に G-CSF 群は有意な改善を示した。これらより G-CSF は、急性期に脊髄内に血管新生を促進することで組織の虚血状態を緩和し、二次損傷の拡大を抑制、機能回復を促進したと考えられた。G-CSF は急性期脊髄損傷の治療薬となる可能性がある。

A. 研究目的

脊髄損傷の二次損傷軽減目的で現在臨床的にメチルプレドニゾロンが使用されているが、近年その効果に疑問がもたれ、副作用も無視しがたいため代替薬が必要とされている。

顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF)は造血系細胞の成長因子の1つで、骨髄系前駆細胞の分化、増殖、生存などの促進作用を有することが知られており、現在好中球減少症や、末梢血幹細胞移植ドナーに臨床使用されている。近年、中枢神経系における神経保護効果が報告されている(Schabiz WR, 2003)。また、我々は G-CSF が脊髄損傷モデルにおいても神経

保護効果を示すこと、すなわちニューロン・オリゴデンドロサイトのアポトーシス抑制効果、脱髄の減少、抗炎症作用を介して神経保護的に働く、という報告をした(第20、21回日本整形外科学会基礎学術集会)。

一方、血管系に対する効果としては、脳虚血モデルにおける G-CSF の血管新生効果の報告は散見されるものの(Lee ST, 2005)、脊髄損傷モデルでの検討はいまだなされていない。また、脊髄損傷後の血管新生は組織新生反応と関係する、との報告もあり(Loy DN 2002)、脊髄損傷モデルにおける G-CSF の作用機序には血管系に対する効果が関係している可能性も考えられる。今回我々は G-CSF の損傷後

脊髄血管系、すなわち Blood spinal cord barrier と血管新生に対する効果を評価・検討したので報告する。

B. 研究方法

成雌 SD ラットの 10～11 週齢を全身麻酔下に胸椎椎弓切除し、Infinite Horizon Impactor を用いて(200Kdyne)、脊髄圧挫損傷モデルを作成。①G-CSF 群(recombinant human G-CSF 15 μ g/kg)、②Control 群(同量の生理食塩水)の2群にランダムに分割し以下の比較検討を行った。なお、薬剤は受傷後 1 時間後より連続 5 日間投与した。G-CSF 投与量は、ヒトへの投与量および脳梗塞モデルへの投与量 (Schneider A, 2005)を参考にした。

(1)Blood spinal cord barrier (BSB)の機能評価:受傷後 3 日目のラットに、正常 BSB は通過しない分子量の蛍光色素を静脈注入。一定時間の還流後、生食で血管内の色素を washout し、血管外漏出した色素量を測定した。また、脊髄浮腫の程度を比較するため、脊髄内水分含有量の測定をおこなった。

(2)免疫組織学的評価:受傷 1 週間の時点で、損傷脊髄を取り出し、損傷中心から頭尾側に 2mm 間隔で 6mm 遠位まで脊髄横断切片を作成し、血管内皮細胞の抗体である von Willebrand Factor を用いて免疫染色を行った。脊髄横断面の 3 領域 (Lateral White Matter, Ventral Gray Matter, Cortical Spinal Tract) で一視野あたりの新生血管数を count した。

(3)Real time RT-PCR:術後 12 時間の実験動物の損傷脊髄を採取し、血管新生に関与するサイトカイン(vascular endothelial growth factor (VEGF) / angiopoietin 1 (Ang 1) / hepatocyte growth factor (HGF) / Fibroblast growth factor 2 (FGF 2)の PCR を行った。非

損傷群に対して、G-CSF 群および Control 群の mRNA 発現を相対的定量法により比較検討した。

(4)後肢運動機能評価:受傷後 1 週間から 6 週間までの後肢運動機能回復を BBB

locomotor scale (Basso DM, 1995)を用いて評価し、両群間で比較した。これに加え、別の動物で受傷後 10 週目での inclined plane test (Teng, 2002)を行い両群間で比較検討した。使用抗体は抗 Von Willebrand Fctor 抗体 (1: 400, DakoCytomation)。Real-time RT PCR には Model 7500 sequence detector (Applied Biosystems)を用いた。

組織学的検討には、Eclipse E600 (Nikon)、Scion-image (ver.4.0.3, Scion Corporation)を用いた。

統計学的解析には、2 群間の比較に student-t 検定、実験⑤の経時的行動学的評価に repeated-measures ANOVA 検定 (post-hoc として student-t 検定)、を用いた。

倫理面での配慮として、実験動物の管理は千葉大学医学部の実験動物扱い規約に準じて行われた

C. 研究結果

(1) 損傷後の脊髄水分含有量は、2 群間に差は見られなかった(図.1-A)。また損傷後に投与した蛍光色素の血管外漏出量は 2 群間に有意差は認めないものの G-CSF 群で漏出が抑えられる傾向があった(図.1-B)。

(2)新生血管数は脊髄横断切片の 3 箇所をカウントし、両群の新生血管数を比較した。Control 群(図.2-B,E,H)と比べて G-CSF 群(図.2-A,D,G)は径の大きな新生血管が多く見られた。LWM では頭側 4mm / 尾側 6mm の切片で有意に G-CSF 群の血管数が多く

(図.2-C)、VGM では頭側 / 尾側 ともに損傷中心より 4mm・6mm の切片で有意差を認めた(図.2-F)。CST では部位別の有意差は認めなかったものの(図.2-I)、測定した全血管数の平均値は G-CSF 群で有意に増加していた(図.2-J)。

(3)G-CSF 群では血管新生系サイトカインの mRNA 発現が増強しており、とくに、VEGF/HGF/FGF2 の mRNA 発現は非損傷群との比較において有意に増強した(図.3)。

(4)BBB scale は受傷後 4 週目以降で G-CSF 群が有意に改善し、6 週目の BBB 平均値は Control 群が 8.6 点であるのに対して G-CSF 群は 12.3 点であった。また、受傷後 10 週での inclined plane test では G-CSF 群で有意に maximum angle の上昇が見られた(図.4)。

D. 考察

過去の研究で我々は、G-CSF が脊髄損傷において、骨髄由来細胞の分化・損傷部への動員を促進し、損傷領域を縮小させる作用・またニューロン、オリゴデンドロサイトのアポトーシス抑制作用・抗炎症作用・脱髄抑制作用など神経保護効果を持つ薬剤であることを報告している(Koda M. 2007, Nishio Y. 2007)。今回の実験では、G-CSF 投与により BSB 機能が保たれる傾向にあり、血管新生促進サイトカインの mRNA 発現が増強し、血管新生が促進され、後肢運動機能の改善がみられた。先行予備実験で G-CSF 受容体が血管内皮細胞には発現していなかったことを考えると、血管新生促進効果はサイトカインを介した間接作用と考えられる。過去には、脊髄損傷モデルにおいて、VEGF 投与が血管透過性を亢進させ、損傷を悪化させる可能性についての報告もあるが(Benton RL, 2003)、今回の実験結果では、

G-CSF 投与により、VEGF 発現増強が確認されたが、損傷脊髄の血管透過性に有意差はなく、BSB の機能にも有意差がなかったことが証明された。すなわち G-CSF 投与により形成促進された新生血管は機能的血管であり、二次損傷拡大のトリガーである虚血状態を緩和し、二次損傷軽減の効果があることが考えられた。

G-CSF は脊髄損傷後、血管系に対する効果を介しても神経保護効果を発揮する可能性があり、過去に我々が報告した G-CSF の様々な神経保護効果とともに複合的に脊髄に働きかけ、結果として 2 次損傷の軽減をもたらし、後肢運動機能の改善につながると考えた。

E. 結論

G-CSF はラット脊髄圧挫損傷モデルで神経・神経膠細胞に対しての神経保護作用と抗炎症作用、および血管新生効果を持ち二次損傷軽減に働く。また、G-CSF は既に臨床認可されている薬剤であり、その点でも今後の臨床応用を検討する上で有利である。現在脊髄損傷に対する臨床試験を開始しており、現段階では、Phase I / II a を行っている。今後、有害事象発生の有無を確認後、最終設定投与量まで進める予定である。

[参考文献]

1. Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* 12, 1-21.
2. Benton, R.L., Whittemore, S.R., 2003. VEGF165 therapy exacerbates secondary damage following spinal cord injury. *Neurochem Res.* 28, 1693-703.

3. Koda, M., Nishio, Y., Kamada, T., Someya, Y., Okawa, A., Mori, C., Yoshinaga, K., Okada, S., Moriya, H., Yamazaki, M., 2007. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res.* 1149, 223-31.
 4. Lee, S.T., Chu, K., Jung, K.H., Ko, S.Y., Kim, E.H., Sinn, D.I., Lee, Y.S., Lo, E.H., Kim, M., Roh, J.K., 2005. Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1058, 120-128.
 5. Loy, D.N., Crawford, C.H., Darnall, J.B., Burke, D.A., Onifer, S.M., Whittemore, S.R., 2002. Temporal progression of angiogenesis and basal lamina deposition after contusive spinal cord injury in the adult rat. *J Comp Neurol.* 445, 308-24.
 6. Nishio, Y., Koda, M., Kamada, T., Someya, Y., Kadota, R., Mannoji, C., Miyashita, T., Okada, S., Okawa, A., Moriya, H., Yamazaki, M., 2007. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 66, 724-31.
 7. Schäbitz, W.R., Kollmar, R., Schwaninger, M., Juettler, E., Bardutzky, J., Schölzke, M.N., Sommer, C., Schwab, S., 2003. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 34, 745-51.
 8. Schneider, A., Kuhn, H.G., Schäbitz, W.R., 2005. A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle.* 4, 1753-7.
- F. 健康危険情報**
なし
- G. 研究発表**
1. 論文発表
 - 1). 川辺純子、国府田正雄、門田領、大河昭彦、山崎正志:ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける顆粒球コロニー刺激因子の血管系に対する効果. *日脊障医誌* 21(1): 112-113, 2008
 1. 学会発表
 - 1). 川辺純子、国府田正雄、門田領、橋本将行、萬納寺誓人、宮下智大、藤由崇之、古矢丈雄、遠藤友規、林浩一、大河昭彦、山崎正志、高橋和久:ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF)の血管系に対する効果. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会 浜松 平成19年10月25-26日
 - 2). 川辺純子、国府田正雄、門田領、西尾豊、山崎正志、大河昭彦:ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける顆粒球コロニー刺激因子の血管系に対する効果. 第42回日本脊髄障害医学会 大宮 平成19年11月9-10日
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
本研究について、本年度は特許取得や実用新案登録はない。

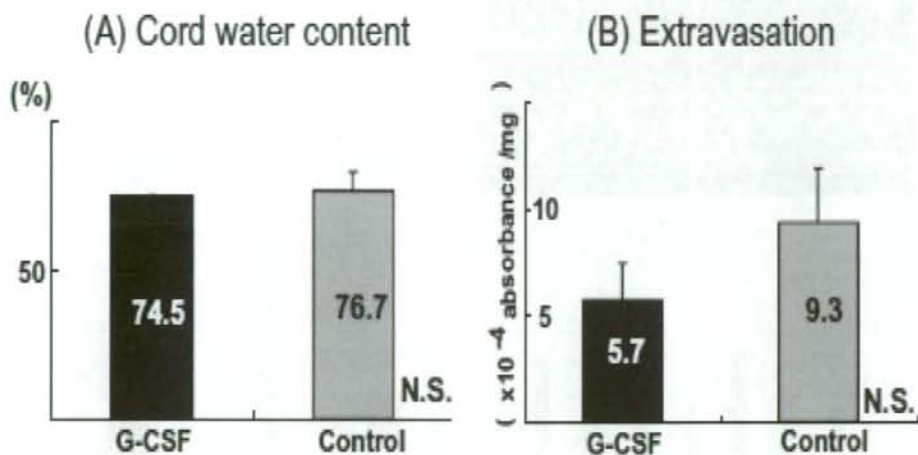
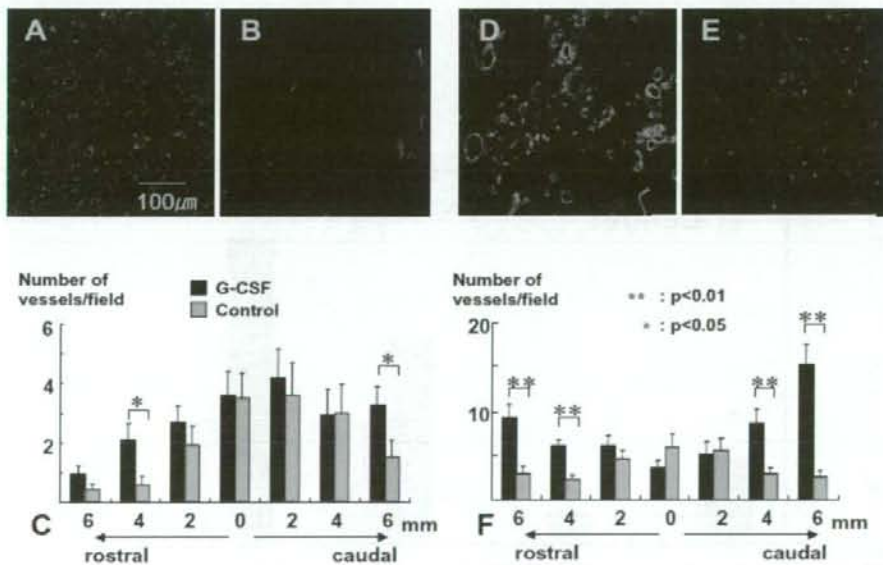


図1. Blood spinal cord barrier の機能評価

A: 損傷後脊髄内水分含有量. B: 蛍光色素血管外漏出量



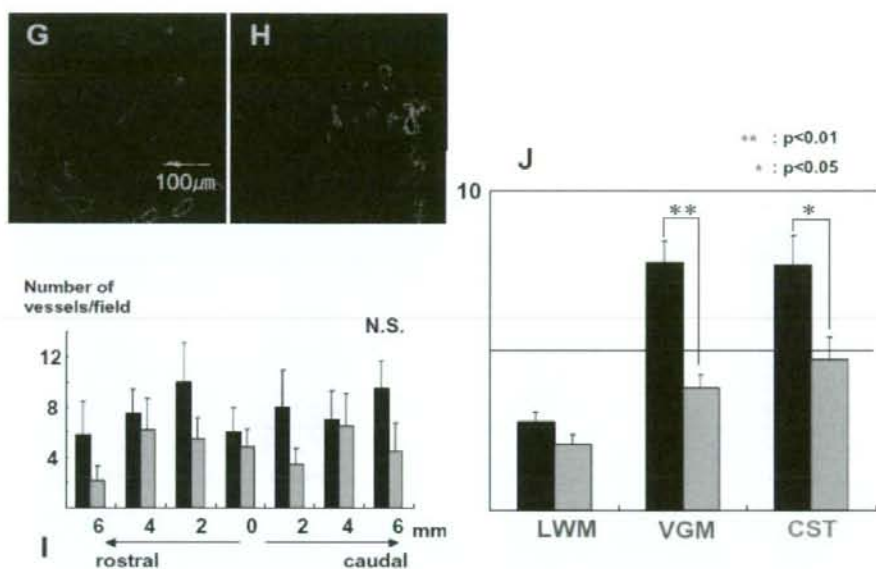


図2. 新生血管数評価

A-C: LWM 新生血管. D-F: VGM 新生血管. G-I: CST 新生血管
A,D,G: G-CSF 群. B,E,H: Control 群.

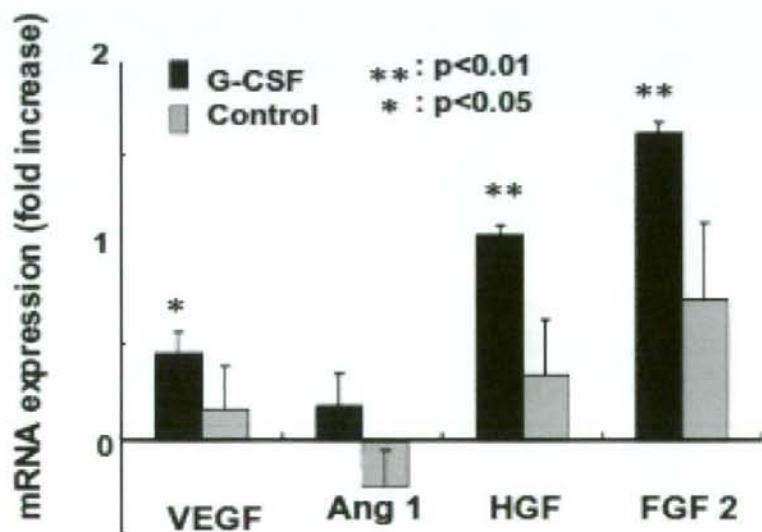


図3. 血管新生に関わるサイトカインmRNA 発現

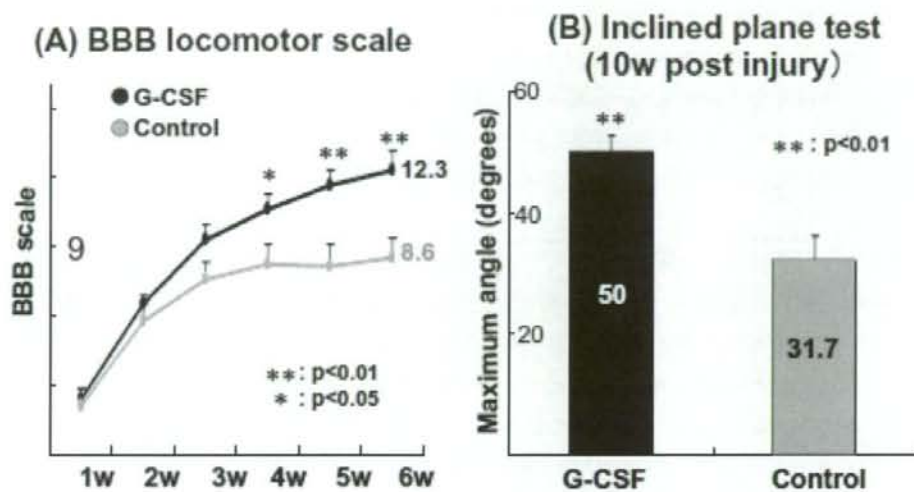


図4. 後肢運動機能

A: BBB locomotor scale. B: Inclined plane test (受傷後 10 週).

ラット脊髄損傷モデルに対する顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF)の治療効果とその機序

門田領 国府田正雄 橋本将行 西尾豊 染谷幸男 萬納寺誓人 宮下智大 村田淳 大河昭彦 高橋和久 山崎正志

主任研究者: 山崎正志 千葉大学大学院医学研究院整形外科学准教授

分担研究者: 大河昭彦 千葉大学大学院医学研究院整形外科学講師

分担研究者: 村田淳 千葉大学医学部附属病院リハビリテーション部准教授

研究要旨:ラット脊髄不全損傷モデルを作成し、(Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF) 投与群と対照群に分割した。毎週経時的に行動学的評価を術後 6 週まで行った。急性期実験として、①G-CSF 受容体の存在を確認、②炎症性サイトカインである TNF- α および IL-1 β の mRNA 発現を比較、および IL-1 β を発現している白血球系細胞を検出しその数を比較検討、③アポトーシスにおちいっているオリゴデンドロサイトを検出し、その数を比較検討した。慢性期実験として、④残存白質の割合とオリゴデンドロサイト数を比較検討、⑤行動学的改善の比較検討を行った。結果として、G-CSF 受容体はニューロンおよびアストロサイトに認められた。急性期においては G-CSF は脊髄術後の炎症性サイトカインの mRNA 発現を抑制し、IL-1 β を発現している白血球系細胞数を減少させた。また、アポトーシスにおちいっているオリゴデンドロサイト数を減少させた。慢性期においては G-CSF は損傷脊髄内の白質およびオリゴデンドロサイトの数を多く残存させていた。また、行動学的に G-CSF 群が有意な改善を示した。これらより G-CSF は、急性期に外来性に浸潤してくる白血球系細胞による炎症を抑制する作用を示すことでオリゴデンドロサイトのアポトーシスを軽減し、二次損傷を抑制・機能回復を促進したと考えられた。G-CSF は急性期脊髄損傷の治療薬となる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は白血球系細胞系細胞の栄養因子であるが、近年神経保護作用が報告され(Schabitz, 2003)、我々も脊髄損傷モデルにおける治療効果を報告した(第 20、21 回日本整形外科学会基礎学術集会)。脊髄損傷の二次損傷軽減目的で現在臨床的にメチルプレドニゾロンが使用されているが、近年その効果に疑問がもたれ、副作用も無視しがたいため代替薬が必要とされている。今回ラット脊髄損傷モデルにおける G-CSF の治療効果およびその作用機序について検討したので報告する。

B. 研究方法

成雌 SD ラットを全身麻酔下に T8/9 で椎弓切除し、IH injury device (200Kdyne)にて脊髄圧挫不全損傷モデルを作成、動物を 2 群に分割した;対照群(溶媒のみ)、G-CSF 群(recombinant human G-CSF 15 μ g/kg/day)。薬剤は経静脈的に術当日(術後 1 時間)から 5 日間連続投与した。G-CSF 投与量は、ヒトへの投与量および脳梗塞モデルへの投与量(Schneider, 2005)を参考にした。

毎週経時的に後肢運動機能評価を術後 6 週まで行い、屠殺した。これとは別に術後 10

週の動物で別項目の後肢運動機能評価を行った。組織学的評価は、実験ごとに損傷脊髄を採取し、組織標本を作製した。慢性期実験については行動学的評価に用いた動物より組織標本を作成した。標本作成方法として、損傷部を中心に2mm間隔で頭尾側に6mm遠位まで脊髄横断面での凍結切片を作成した（頭側より順にR6、R4、R2、C2、C4、C6）。観察切片は各実験に応じて決定した。

（急性期実験）

①術後72時間の対照群の損傷脊髄を採取、組織学的検討として免疫二重染色を行い、G-CSF受容体(G-CSFR)の存在を確認した。脊髄内在性細胞であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアに対して各々MAP-2、GFAP、AFP、Iba-1をマーカーとし、G-CSFRと二重陽性になるものを検討した。

②術後12・24・72時間にて脊髄を摘出し、RNAを抽出、Real-time RT PCRにて炎症性サイトカインのmRNAを検出(使用プライマー: Taqman^R Assay-on-demand; IL-1 β 、TNF- α)、両群間で比較した(n=4)。表記に際し、内因性コントロールにより標準化した後、術後12時間のG-CSF群のデータを基準として各データを対数値表示した。

③術後12時間・24時間にて炎症性サイトカインを発現している外来性炎症性細胞の割合を調べる目的で、損傷脊髄組織標本の免疫二重染色を行った(n=4、観察切片はR4、C4)。炎症性サイトカインマーカーとしてIL-1 β 、外来性炎症細胞のマーカーとして白血球系細胞を標識するmyeloperoxidase (MPO)を用い、二重陽性細胞数を計測し両群間で比較した。

④術後72時間・1週間にて脊髄を摘出。組織検討として免疫二重染色を行い、オリゴデ

ンドロサイトのアポトーシスにつき評価した(n=4、観察切片はR6、R4、C4、C6)。アポトーシスにいたった細胞のマーカーとして

caspase-3-active、オリゴデンドロサイトのマーカーとしてadenomatous polyposis coli (APC)を用いて二重陽性細胞数をカウントし、これをAPC陽性細胞数で除した値をオリゴデンドロサイトのアポトーシス率として両群間で比較した。

（慢性期実験）

⑤術後6週の組織にて髄鞘染色(Luxol Fast Blue (LFB)染色)による残存白質の評価を行った(n=10、観察切片はR6、R4、R2、C2、C4、C6)。白質全体の面積に占めるLFB陽性となる面積を正常髄鞘残存率として、両群間で比較した。またその組織中のオリゴデンドロサイト数を調べる目的で同じ動物の隣接切片を用いて免疫染色を行った。オリゴデンドロサイトのマーカーとしてAPCを用い、その数を計測・両群間で比較した。

⑥BBB locomotor scale (Basso, 1995)を用いて損傷直後より術後6週まで各群ラットの後肢運動機能回復を経時的に評価し、両群間で比較した(n=10)。これに加え、別の動物で術後10週のinclined-plane test (Teng, 2002)を行い両群間で比較検討した(n=5)。また、BBB locomotor scaleの点数と実験⑤の正常髄鞘残存率の相関関係を求めた。

（使用抗体）

G-CSFR (1:200, Abcam)
MAP-2 (1:400, Chemicon)
GFAP (1:400, Sigma)
APC (1:400, Calbiochem)
Iba-1 (1:400, Wako)
Caspase-3-a (1:400, R&D systems)
IL-1 β (1:200, Serotec)

MPO (prediluted, Abcam)

RNA 抽出には Rneasy RNA isolation kit (Qiagen)、Real-time RT PCR には Model 7500 sequence detector (Applied Biosystems) を用いた。

組織学的検討には、Eclipse E600 (Nikon)、Scion-image (ver.4.0.3, Scion Corporation) を用いた。

統計学的解析には、2 群間の比較に student-t 検定、実験⑤の経時的行動学的評価に repeated-measures ANOVA 検定 (post-hoc として student-t 検定)、BBB locomotor scale と正常髄鞘残存率との相関関係に Pearson の相関関係検定を用いた。

(倫理面での配慮)

実験動物の管理は千葉大学医学部の実験動物扱い規約に準じて行われた。

C. 研究結果

a. G-CSFR の存在

①術後 72 時間の脊髄切片上にて免疫二重染色で G-CSFR の存在を確認した (Fig. 1)。G-CSFR と二重陽性となったのはニューロン (Fig. 1 A-C, 矢頭) およびアストロサイト (Fig. 1 D-F, 矢頭) であった。一方、オリゴデンドロサイト (Fig. 1 G) およびミクログリア (Fig. 1 H) には G-CSFR は認められなかった。

b. 抗炎症作用

②術後 12、24、72 時間で Real-time RT PCR を行った (Fig. 2)。術後 12 時間で TNF- α (Fig. 2 A)、IL-1 β (Fig. 2 B) とも mRNA 発現レベルが G-CSF 群 (Fig. 2 A, B, closed column) で対照群 (Fig. 2 A, B, open column) に対し有意に低減していた ($p > 0.05$)。

③術後 12、24 時間の脊髄切片上で IL-1 β と MPO の免疫二重染色を行った (Fig. 3)。

IL-1 β と MPO の二重陽性となる細胞が炎症性の白血球系細胞であることを示している (Fig. 3 A-C, 矢頭)。IL-1 β 陽性細胞の $93.5 \pm 1.9\%$ が MPO を発現していた。術後 12、24 時間とも MPO 陽性細胞数に両群間の差は無かった (data not shown)。術後 12、24 時間の両方で、IL-1 β と MPO 二重陽性細胞数は G-CSF 群 (Fig. 3 D, closed column) で対照群 (Fig. 3 D, open column) に対し有意に減少していた ($p > 0.01$)。

c. オリゴデンドロサイトに対しての抗アポトーシス作用

④術後 72 時間、1 週間で Caspase-3-a と APC の免疫二重染色を行った (Fig. 4)。Caspase-3-a と APC の二重陽性となる細胞がアポトーシスにいたったオリゴデンドロサイトであることを示している (Fig. 4 A-C, 矢頭)。術後 72 時間でオリゴデンドロサイトのアポトーシス率は G-CSF 群 (Fig. 4 D, closed column) で対照群 (Fig. 4 D, open column) に対し有意に軽減した (Fig. 4 D, R6, R4: $p < 0.05$, C6: $p < 0.01$)。同様に術後 1 週間でもオリゴデンドロサイトのアポトーシス率は G-CSF 群 (Fig. 4 E, closed column) で対照群 (Fig. 4 E, open column) に対し有意に軽減した (Fig. 4 E, R6: $p < 0.05$, R4, C4, C6: $p < 0.01$)。

d. 脱髄軽減作用および行動改善

⑤術後 6 週間の切片上で髄鞘染色を行った (Fig. 5 A-E)。G-CSF 群 (Fig. 5 B, D) では対照群 (Fig. 5 A, C) に対して髄鞘が良好に残存していることが確認された。正常髄鞘残存率は G-CSF 群 (Fig. 5 E, closed column) で対照群 (Fig. 5 E, open column) に対し有意に高かった (Fig. 5 E, R6, C6: $p < 0.05$, R4-C4: $p < 0.01$)。また、同じ動物の隣接切片を用いて APC による免疫染色を行ったところ、G-CSF 群 (Fig. 5 F,

closed column)では対照群(Fig. 5 F, open column)に対してAPC陽性細胞数が有意に多く認められた(Fig. 5 F, R6, R4, C6: $p < 0.05$)。

⑥術後6週までの後肢運動機能の回復をBBB locomotor scaleにより経時的に観察した(Fig. 6 A)。G-CSF群(Fig. 6 A, closed circle)では対象群(Fig. 6 A, open circle)に比べて後肢運動機能が有意に回復した(Fig. 6 A, ANOVA $p < 0.05$)。各週の比較では、3週目以降で有意にG-CSF群の点数が良好となり、最終平均点数は対象群が 9.7 ± 0.3 点であったのに対し、G-CSF群 12.8 ± 0.9 点であった(Fig. 6 B, $p < 0.01$)。術後10週のInclined plane testでは、対象群が 31.7 ± 4.4 度であったのに対し、G-CSF群 50.0 ± 2.7 度であった(Fig. 6 B, $p < 0.01$)。また、BBB locomotor scaleと正常髄鞘残存率には、正の相関関係が認められた($r = 0.676, p < 0.01$)。

D. 考察

G-CSFの神経保護効果に関しては脳梗塞モデルでの報告がなされており、メカニズムとしては神経細胞のアポトーシス抑制効果(Schneider, 2005)、炎症性サイトカインの発現低下(Gibson, 2005, Komine, 2005)などが考察されている。また、オリゴデンドロサイトのアポトーシスにより脱髄が生じる事が報告されている(Crowe, 1996)。

今回の実験により、脊髄損傷急性期において、G-CSFが炎症性サイトカインのmRNA産生を抑制し、損傷脊髄に外来性に浸潤してくる白血球系細胞のIL-1 β 産生を抑制するなど、抗炎症作用をもつことが示された。また、G-CSFは脊髄損傷急性期のオリゴデンドロサイトのアポトーシスを抑制することが示された。G-CSFRがオリゴデンドロサイト上に発現して

いないことより、G-CSFのオリゴデンドロサイトに対しての抗アポトーシス作用は、抗炎症作用による2次的なものか、アストロサイトなどG-CSFRを発現している細胞を介した間接的作用であることが考えられる。また、脊髄損傷慢性期においてはG-CSFにより、脱髄の軽減と後肢運動機能の改善がもたらされた。過去の研究で我々は、G-CSF受容体が神経細胞上に発現、G-CSF投与により急性期の神経細胞死が抑制される事を示した。すなわち、G-CSFの脊髄損傷に対する効果は、急性期におけるニューロンに対しての直接的な抗アポトーシス作用、オリゴデンドロサイトに対しての間接的な抗アポトーシス作用、抗炎症作用などにより、二次損傷軽減に働き、後肢運動機能の改善に繋がったと考えられる(Fig. 7)。

E. 結論

G-CSFはラット脊髄圧挫損傷モデルで神経・神経膠細胞に対しての神経保護作用と抗炎症作用を持ち二次損傷軽減に働く。

また、G-CSFは既に臨床認可されている薬剤であり、その点でも今後の臨床応用を検討する上で有利である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 門田領, 国府田正雄, 西尾豊, 大河昭彦, 山崎正志: 脊髄損傷における顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF)の神経保護作用. 日脊障医誌 20: 180-181, 2007.

2. 学会発表

1. 門田領, 国府田正雄, 染谷幸男, 大河昭彦, 山崎正志, 守屋秀繁: ラット脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte Colony-Stimulating Factor: G-CSF) の治療効果. 第21回日本整形外科学会基礎学術集会 長崎 平成18年10月19-20日
2. 門田領, 国府田正雄, 橋本将行, 西尾豊, 染谷幸男, 萬納寺誓人, 宮下智大, 大河昭彦, 山崎正志, 守屋秀繁: 脊髄損傷における顆粒球コロニー刺激因子

(Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF) の神経保護作用. 第41回日本脊髄障害医学会 千葉 平成18年11月9-10日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

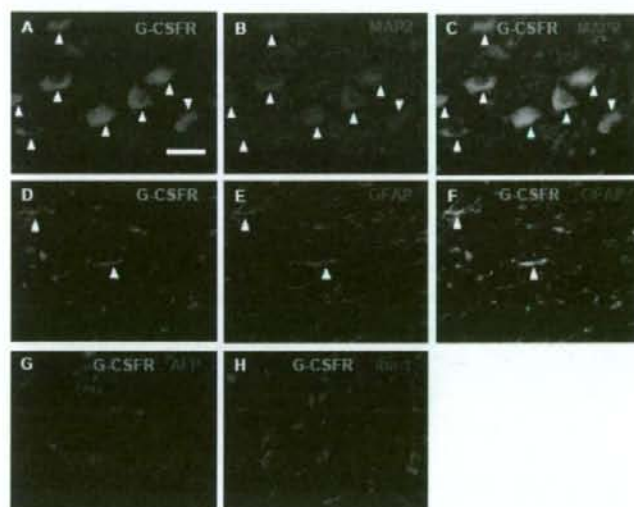


Fig. 1 G-CSFRと細胞特異抗体との免疫二重染色(術後72時間)

A-C: G-CSFR / MAP2 二重染色, D-F: G-CSFR / GFAP 二重染色; ニューロンおよびアストロサイトに G-CSFR 発現が認められた。G: G-CSFR / AFP 二重染色, H: G-CSFR / Iba-1 二重染色; オリゴデンドロサイトおよびミクログリアには G-CSFR 発現が認められなかった。A-F 矢頭は各発現細胞を示す(bar=50 μ m)。

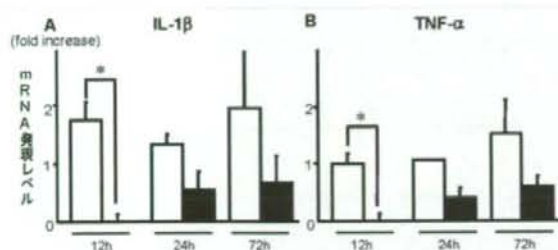


Fig. 2 G-CSF による各炎症性サイトカイン mRNA 発現の変化
 A:IL-1 β ;術後 12 時間で G-CSF 群で有意に発現が低下した。B:TNF-a;術後 12 時間で G-CSF 群で有意に発現が低下した (open column: 対象群, closed column: G-CSF 群, *: p<0.05, bars: \pm S.E.)。

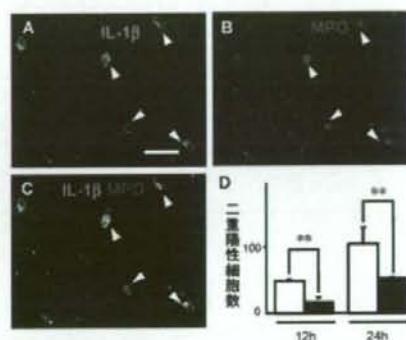


Fig. 3 炎症性好中球数の変化
 A-C:IL-1 β / MPO 二重染色;術後 24 時間での像。矢頭は各発現細胞を示す (bar=50 μ m)。D:術後 12、24 時間で G-CSF 群で有意に IL-1 β / MPO 二重陽性細胞数が低下した (open column: 対象群, closed column: G-CSF 群, **: p<0.01, bars: \pm S.E.)。

