

62.5)歳、疾患の内訳は後縦靭帯骨化症(OPLL)8例、黄色靭帯骨化症(OYL)2例、その他3例であった(表1)。責任高位は頸椎6例、胸椎6例、脊髄円錐部1例であった。有痛期間は4か月～28年(平均9.8年)で、7例が At-level pain、6例が Below-level pain であった。圧迫性脊髄症の急性増悪例のため、6例では投与から1か月以降に手術治療が行われた。

13症例中11例で10mm以上のVASの低下が認められた(表2)。完全に疼痛が消失した例も2例認められた。無効例が2例あったが、疼痛が増悪した例はなかった。有効例では全例、投与後数日から1週間以内に除痛効果が得られていた。VASは投与前平均65.4mmから投与後1週間で平均35.4mmに減少した( $p<0.01$ )。一方、除痛効果は8例で投与から2か月以降(平均4.1か月)に減弱が見られ、経過観察期間中に4例で効果消失を認めた。投与後6か月の時点でのVASは46.9mmと再度上昇していた( $p=0.02$ )(表2)。

JOA scoreは13症例中9例で投与後に改善が見られた(表3)。ASIA scoreの運動と痛覚は投与後1か月および6か月でも、投与直前と比べ有意に改善を認めた(表4)。疼痛

に対して効果のなかった2例ではJOA scoreもASIA scoreも改善が得られていなかった。

末梢血中の白血球数は投与開始後1日目から有意に増加した(表5)が、投与終了後速やかに減少し、1週間の時点では投与前の値に戻っていた。白血球の分画中、顆粒球が著明に増加していたが、単球も有意に増加していた。CRPも有意に増加していたが、軽度の増加であり臨床的に問題となる値ではなかった。リンパ球数は投与前後で変化を認めなかった。投与期間中、および投与後に重篤な有害事象の発生は認めなかった。

VASが10mm以上改善したG-CSF有効群11例と改善しなかった無効群2例に分けて検討したところ、神経症状の改善が見られた症例では全例で除痛効果が得られ、有意な疼痛の軽減が得られていた( $p=0.02$ )。障害高位と疼痛の位置関係としては、At-level painは全例に有効であり、Below-level painは無効例が多く、その関連が示唆されたが、症例数が少ないこともあり有意差を認めるには至らなかった( $p=0.10$ )。一方で、有痛期間、MRIでのT2 High Signal Change(全例に存在)、投与時の脊髄圧迫については有意な関連を認めなかった。

表1. 脊髄障害性疼痛を有する圧迫性脊髄症急性増悪例13例のリスト

症例 No.	年齢 (歳) /性別	診断	責任 高位	有痛期 間 (年)	疼痛部位	G-CSF投与 後 経過期間
1	68/男	後縦靭帯骨化症	胸椎(T4/5)	0.7	below-level	12
2	46/男	後縦靭帯骨化症	胸椎(T6/7)	0.8	at-level	12
3	75/男	後縦靭帯骨化症	頸椎(C4/5)	3	below-level	12
4	64/男	後縦靭帯骨化症	頸椎(C4/5)	0.3	at-level	12
5	32/男	後縦靭帯骨化症	胸椎(T8/9)	4	at-level	12
6	58/男	後縦靭帯骨化症	頸椎(C5/6)	4	at-level	6
7	72/男	脊髄円錐症候群	円錐部(T12/L1)	4	below-level	12
8	67/男	黄色靭帯骨化症	胸椎(T11/12)	16	at-level	12
9	73/男	頸椎症性脊髄症	頸椎(C4/5)	13	below-level	12
10	71/男	後縦靭帯骨化症	頸椎(C5/6)	4	at-level	12
11	78/男	黄色靭帯骨化症	胸椎(T10/11)	19	below-level	12
12	70/女	後縦靭帯骨化症	頸椎(C4/5)	30	at-level	12
13	38/女	胸髄腫瘍	胸椎(T11/12)	28	below-level	12

表2. G-CSF投与後のVASの変化

症例 No.	投与直前	投与 1週間後	投与 1ヵ月後	投与 3ヵ月後	投与 6ヵ月後
1	50	25	25	25	25
2	60	30	30	30	20
3	50	30	30	50	50
4	50	25	25	45	45
5	80	0	0	0	0
6	50	40	40	40	50
7	90	90	90	90	90
8	90	40	40	60	60
9	70	70	70	70	70
10	80	50	50	50	50
11	60	0	0	60	60
12	60	20	20	20	30
13	60	40	40	40	60
平均	65.4	35.4*	35.4*	44.6*	46.9/**
±SD	±15.1	±25.0	±25.0	±23.2	±23.5

VAS:0~100mm

\*: 投与直前に比し有意に改善 (p<0.05)

\*\* : 投与1週間後と比し有意に増悪(p<0.05)

表3. JOAスコアの変化

症例 No.	JOAスコア(点)				改善率(%)	
	投与 1カ月前	投与 直前	投与 1カ月後	投与 6カ月後	投与 1カ月後	投与 6カ月後
1	8.5/11	1.5/11	6/11	8/11	47.4	68.4
2	7.5/11	5.5/11	6.5/11	10/11	18.2	81.8
3	16/17	8.5/17	14.5/17	14.5/17	70.6	70.6
4	14/17	9.5/17	14.5/17	14.5/17	66.7	66.7
5	6/11	4/11	6/11	6/11	28.6	28.6
6	7/11	5/11	6/11	6/11	16.7	16.7
7	7.5/11	5.5/11	5.5/11	5.5/11	0	0
8	6/11	4/11	6.5/11	6.5/11	35.7	35.7
9	15/17	13/17	13/17	13/17	0	0
10	7/17	4.5/17	8/17	8/17	28.0	28.0
11	6/11	4/11	6/11	6/11	28.6	28.6
12	13/17	11/17	11/17	11/17	0	0
13	5/11	3/11	3/11	3/11	0	0

JOAスコア：日本整形外科学会頸髄症治療判定基準  
(頸髄症：0～17点，胸髄症：0～11点)

表4. ASIA運動・痛覚スコアの変化

症例 No.	運動スコア		運動スコア 増加点数		痛覚スコア			痛覚スコア 増加点数		
	投与 直前	1カ月 後	6カ月 後	1カ月 後	6カ月 後	投与 直前	1カ月 後	6カ月 後	1カ月 後	6カ月 後
1	82	100	100	18	18	63	98	102	35	39
2	92	94	97	2	5	84	85	98	1	14
3	96	100	100	4	4	69	112	112	43	43
4	89	100	100	11	11	106	110	110	4	4
5	100	100	100	0	0	82	84	99	2	17
6	95	95	95	0	0	28	32	32	4	4
7	100	100	100	0	0	84	84	84	0	0
8	96	100	100	4	4	90	101	94	11	4
9	100	100	100	0	0	106	106	106	0	0
10	88	100	100	12	12	62	94	99	32	37
11	94	94	97	0	3	88	94	96	6	8
12	100	100	100	0	0	62	62	62	0	0
13	94	94	94	0	0	90	90	90	0	0

平均 94.3 98.2\* 98.7\* 3.9 4.4 78.5 88.3\*\* 91.5\*\* 10.6 13.1  
±SD ±5.5 ±2.8 ±2.2 ±6.0 ±5.8 ± ±22.8 ±22.2 ±15.3 ±16.1

運動スコア：0～100点，痛覚スコア：0～112点

\*: 投与直前に比し有意に改善 (p<0.05)

\*\*：投与直前と比し有意に改善 (p<0.01)

表5. G-CSF投与後の血液データの変化

	正常値	投与直前	投与開始後の最高値	<i>p</i>
白血球 ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	4.0~9.0	6.3 ± 1.7 (3.3~9.8)	27.7 ± 4.5 (18.1~36.1)	<0.01
顆粒球 ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	1.8~5.0	3.7 ± 1.3 (2.0~6.6)	23.6 ± 3.9 (15.6~31.9)	<0.01
リンパ球 ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	1.0~4.1	2.1 ± 1.1 (0.9~5.4)	1.8 ± 0.9 (1.0~4.4)	0.09
単球 ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	0.1~0.6	0.4 ± 0.1 (0.2~0.6)	0.9 ± 0.4 (0.3~1.4)	<0.01
CRP (mg/dl)	0.5以下	0.1 ± 0.1 (0.0~0.4)	0.5 ± 0.6 (0.0~2.5)	<0.01

投与開始後の最高値：投与開始後7日目までの最高値

#### D. 考察

脊髄障害性疼痛は前述のように本邦で提唱された新しい概念であり、いまだ未解明な点が多い。本概念についての報告も、限られたものである[16,17]。現時点では明確な治療指針をたてるには到底到らず、さらなる大規模研究が必要な状況である。欧米では類似疾患として脊髄損傷後の神経障害性疼痛がこれに該当する。これについては報告がいくつか存在する。Baastrupらは脊髄損傷後の神経障害性疼痛に対する薬物治療のReviewを著している[18]が、治療のメカニズムとしては神経細胞の異常発火を抑制することを主としている。その中でも無作為化二重盲検試験の結果[1-3]から、抗けいれん薬でカルシウムチャンネルを拮抗するガバペンチン、プレガバリン、および三環系抗うつ薬である Amitriptyline などを第一選択薬として推奨している。これだけでは効果が不十分であったり、副作用等で使用できない場合には、第二選択薬として

セロトニン・ノルアドレナリン再取り込阻害薬(SNRI)、さらには第三選択薬として Lamotrigine や Tramadol、Opioid なども加え、多角的なフォーカスから治療していくことを重視している。しかし、これまでに行われた研究が十分な規模ではなく、未解明なことも多いためさらなる大規模な研究が必要と述べている。すなわち、脊髄障害性疼痛に関しては、いまだ適切な治療法が確立されていないのが現状のようである。

G-CSFの脊髄障害性疼痛に対する作用は解明されていない。渉猟しえた限りでは動物実験も含め、G-CSFを脊髄障害性疼痛に投与した研究は行われていない。しかし我々の動物実験による研究で、G-CSFが骨髄由来細胞を動員し、損傷した脊髄に直接的に作用する[9]ことや、炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )の発現を抑制する[8]ことが考えられている。また炎症性疼痛に関しての報告ではあるが、BrackらはG-CSFがOpioidを含有する多核白血球の遊走を促進

し、局所鎮痛効果を発揮すると述べている [19]。これらの関与が示唆されるが、解明にはさらなる研究が必要である。今後、基礎研究も含めて原因の解明に努めたいと考えている。脊髄障害性疼痛に対する G-CSF の有効性が証明されれば、痛みに苦しむ多くの患者の福音となるため、その有用性について検討する価値は高いと考えている。

今後は本研究結果を踏まえ、対照群を設定した上で前向きに G-CSF の脊髄障害性疼痛に対する効果を解析していく予定である。検討項目としては VAS だけではなく、睡眠や活動性などの QOL に関わる項目についても調査を進めることが重要と考える。

[参考文献]

1. Siddall PJ, Middleton JW. A proposed algorithm for the management of pain following spinal cord injury. *Spinal Cord* 2006; 44: 67-77.
2. Levendoglu F, Ogun CO, Ozerbil O, Ogün TC, Ugurlu H. Gabapentin is a first line drug for the treatment of neuropathic pain in spinal cord injury. *Spine* 2004; 29: 743-51.
3. Rintala DH, Holmes SA, Courtade D, Fiess RN, Tastard LV, Loubser PG. Comparison of the effectiveness of amitriptyline and gabapentin on chronic neuropathic pain in persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2007; 88: 1547-60.
4. 北川誠一, 湯尾明. G-CSFの基礎, 作用機序. *Biotherapy* 1992; 6: 20-8.
5. Kawada H, Takizawa S, Takanashi T, Morita Y, Fujita J, Fukuda K, Takagi S, Okano H, Ando K, Hotta T. Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation* 2006; 113: 701-10.
6. Schäbitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Schölzke MN, Sommer C, Schwab S. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2003; 34: 745-51.
7. Schneider A, Kuhn HG, Schäbitz WR. A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle* 2005; 4: 1753-7.
8. Koda M, Nishio Y, Kamada T, Someya Y, Okawa A, Mori C, Yoshinaga K, Okada S, Moriya H, Yamazaki M. 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* 2007; 1149: 223-31.
9. 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の神経保護作用. *日脊障医誌* 2007; 20: 180-1.
10. 川辺純子, 国府田正雄, 門田領, 大河昭彦, 山崎正志. ラット脊髄圧挫モデルに

- における顆粒球コロニー刺激因子の血管系に対する作用. 日脊障医誌 2008; 21: 112-3.
11. 国府田正雄, 西尾豊, 門田領, 川辺純子, 山崎正志. 脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の治療効果およびその作用メカニズムの解析. 整形外科 2007; 58: 1464.
12. Nishio Y, Koda M, Kamada T, Someya Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okada S, Okawa A, Moriya H, Yamazaki M. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. J Neuropathol Exp Neurol. 2007; 66: 724-31.
13. 佐久間毅, 山崎正志, 国府田正雄, 橋本将行, 高橋宏, 林浩一, 川辺純子, 藤由崇之, 古矢丈雄, 山内友規, 門田領, 宮下智大, 萬納寺誓人, 染谷幸男, 西尾豊, 鎌田尊人, 腰塚周平, 池田修, 喜多恒次, 安宅洋美, 吉永勝訓, 村田淳, 橋本光宏, 大河昭彦, 高橋和久. 圧迫性脊髄症の急性増悪期に顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)投与による神経保護療法を施行した5症例. 千葉医学 2010; 86: 11-8.
14. 佐久間毅, 山崎正志, 国府田正雄, 高橋宏, 加藤啓, 林浩一, 川辺純子, 藤由崇之, 古矢丈雄, 山内友規, 門田領, 宮下智大, 萬納寺誓人, 染谷幸男, 西尾豊, 鎌田尊人, 腰塚周平, 池田修, 安宅洋美, 蓮江文男, 吉永勝訓, 村田淳, 花岡英紀, 橋本将行, 橋本光宏, 大河昭彦, 高橋和久. 圧迫性脊髄症急性増悪期例に対する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を用いた神経保護療法 Phase I/IIa 臨床試験. 千葉医学 2010;86:233-9
15. 佐久間毅, 山崎正志, 国府田正雄, 高橋宏, 加藤啓, 林浩一, 橋本将行, 橋本光宏, 大河昭彦, 高橋和久. 脊柱靱帯骨化症に伴う脊髄障害性疼痛に対し顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)が著効した2例. 千葉医学 2010; 86: 185-9.
16. 植松弘進, 柴田政彦, 松村陽子, 松田陽一, 阪上学, 井上隆弥, 真下節. 当院における脊髄障害性疼痛の検討. PAIN RESEARCH 2010; 25: 19-25.
17. 金景成, 井須豊彦, 森本大二郎, 菅原淳, 小林士朗. 脊髄障害性疼痛に対するケタミン使用の小経験. 日脊障医誌 2009; 22: 170-1.
18. Baastrup C and Finnerup N B. Pharmacological management of neuropathic pain following spinal cord injury. CNS Drugs 2008; 22: 455-75.
19. Brack A, Rittner H.L, Machelska H, Beschmann K, Sitte N, Schafer M, Stein C. Mobilization of opioid-containing polymorphonuclear cells by hematopoietic growth factors and influence on inflammatory pain. Anesthesiology 2004; 100: 149-57.

## E. 結論

G-CSF 神経保護療法の臨床試験を行った圧迫性脊髄症急性増悪患者 57 例のうち、投

与前から脊髄障害性疼痛を認めた13例を対象として、G-CSFの疼痛軽減効果を解析した。11例で投与後に疼痛が軽減し、2例では完全に消失した。G-CSFは脊髄障害性疼痛に対する新たな治療薬となり得る。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. 佐久間毅, 山崎正志, 国府田正雄, 橋本将行, 高橋宏, 林浩一, 川辺純子, 藤由崇之, 古矢丈雄, 山内友規, 門田領, 宮下智大, 萬納寺誓人, 染谷幸男, 西尾豊, 鎌田尊人, 腰塚周平, 池田修, 喜多恒次, 安宅洋美, 吉永勝訓, 村田淳, 橋本光宏, 大河昭彦, 高橋和久: 圧迫性脊髄症の急性増悪期に顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)投与による神経保護療法を施行した5症例. 千葉医学 86: 11-18, 2010.
2. 高橋宏, 山崎正志, 大河昭彦, 国府田正雄, 橋本将行, 橋本光宏, 林浩一, 佐久間毅, 川辺純子, 藤由崇之, 古矢丈雄, 山内友規, 門田領, 宮下智大, 萬納寺誓人, 染谷幸男, 西尾豊, 鎌田尊人, 腰塚周平, 池田修, 喜多恒次, 青木保親, 吉永勝訓, 村田淳, 高橋和久: 急性脊髄損傷に対して顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF)投与による神経保護療法を施行した6症例. 千葉医学 86: 175-183, 2010.
3. 佐久間毅, 山崎正志, 国府田正雄, 高橋宏, 加藤啓, 林浩一, 橋本将行, 橋本光宏, 大河昭彦, 高橋和久: 脊柱靱帯骨化症に伴う脊髄障害性疼痛に対し顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)が著効した2例. 千葉医学 86: 185-189, 2010.
4. 佐久間毅, 山崎正志, 国府田正雄, 高橋宏, 加藤啓, 林浩一, 川辺純子, 藤由崇之, 古矢丈雄, 山内友規, 門田領, 宮下智大, 萬納寺誓人, 染谷幸男, 西尾豊, 鎌田尊人, 腰塚周平, 池田修, 安宅洋美, 蓮江文男, 吉永勝訓, 村田淳, 花岡英紀, 橋本将行, 橋本光宏, 大河昭彦, 高橋和久: 圧迫性脊髄症急性増悪期例に対する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を用いた神経保護療法: Phase I/IIa 臨床試験. 千葉医学 86: 233-239, 2010.
5. 高橋宏, 佐久間毅, 林浩一, 大河昭彦, 国府田正雄, 山崎正志: 急性脊髄損傷に対して顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)投与を施行した臨床試験例の検討. 日脊障医誌 23: 34-35, 2010.
6. 佐久間毅, 高橋宏, 林浩一, 大河昭彦, 国府田正雄, 山崎正志: 圧迫性脊髄症急性増悪期に対する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)投与による神経保護法. 日脊障医誌 23: 36-37, 2010.

### 学会発表

1. Kato K, Yamazaki M, Sakuma T, Takahashi H, Hashimoto M, Furuya T, Hashimoto M, Koda M, Okawa A, Takahashi K. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) reduced neuropathic pain in patients with rapidly aggravating compression myelopathy: analyses of clinical trial cases. 2nd Annual Meeting, Cervical Spine Research Society-Asia Pacific Section. April 28-30, 2011, Paradise Hotel Busan,

Korea. (Abstract p67)

2. 加藤啓, 山崎正志, 佐久間毅, 高橋宏,  
橋本光宏, 林浩一, 古矢丈雄, 橋本将行,  
国府田正雄, 大河昭彦, 高橋和久. 脊髄  
障害性疼痛に対する顆粒球コロニー刺激  
因子(G-CSF)の効果:臨床試験例での  
解析. 第40回日本脊椎脊髄病学会.  
2010年4月21-23日 京王プラザホテル  
東京都. J Spine Res 2(3):636, 2011
3. 佐久間毅, 加藤啓, 高橋宏, 大河昭彦,  
国府田正雄, 山崎正志. 脊柱靱帯骨化  
症に伴う脊髄障害性疼痛に対し顆粒球コ  
ロニー刺激因子(G-CSF)が著効した2例.  
第45回日本脊髄障害医学会. 2010年  
11月21-2日 松本文化会館 松本市. 抄  
録集 p169

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。



## マウス脊髄損傷モデルに対する G-CSF 動員末梢血幹細胞移植の治療効果

高橋宏，国府田正雄，橋本将行，橋本光宏，古矢丈雄，林浩一，佐久間毅，加藤啓，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

分担研究者： 国府田正雄 千葉市立青葉病院整形外科副部長

分担研究者： 花岡英紀 千葉大学医学部附属病院臨床試験部部長

研究要旨：マウス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)動員末梢血幹細胞移植の治療効果を検討した。対照群、G-CSF 動員単核球を移植する群、G-CSF 動員 CD34 陽性細胞を移植する群の 3 群に分け、①行動学的改善の推移、②移植後 8 週における移植細胞の残存の有無を検討した。結果として、①単核球および CD34 陽性細胞移植群においては対照群に比し、移植後 6 週から 8 週にかけて有意な行動の改善を認めた。さらに CD34 陽性細胞移植群では対照群に比し有意な運動量の回復を認めた。②移植細胞は一部で損傷部より約 2mm 頭尾側にわたり残存し、血管系の細胞へと分化していた。今回の結果から、急性脊髄損傷において単核球移植でも治療効果がみられたが CD34 陽性細胞移植においてより良好な治療効果が得られることが示唆された。臨床応用の面からは G-CSF 投与により脊髄損傷急性期の二次損傷を軽減し、さらにその後動員される幹細胞を回収して損傷部へ移植することで、更なる脊髄損傷の機能回復が期待される。

### A. 研究目的

近年、急性脊髄損傷に対する細胞移植療法については、基礎実験の結果が多数報告されている。その中でも特に注目されているのは ES 細胞、iPS 細胞であり、これらの細胞移植においてはその有効性が報告されており、臨床応用への期待が高まっている。しかし、ES 細胞においては倫理的問題、拒絶反応の問題があり、また、iPS 細胞においては移植細胞の高率な腫瘍化が報告され、臨床応用はいまだ困難な状態である[1]。この面から、急性脊髄損傷に対する移植細胞としては、骨髄間質細胞や、造血幹細胞な

どの自己由来の細胞の方が臨床応用へ向けての検討が進めやすい。

我々は顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)投与が急性脊髄損傷における急性期の二次損傷を軽減させることを基礎実験において明らかにしてきた。既に臨床試験を開始している[2]が、G-CSF を投与すると末梢血中に造血幹細胞が多数動員される。この動員された造血幹細胞の中に表面に CD34 抗原を持つ骨髄単核球細胞の分画がある[3]。この G-CSF により動員された CD34 陽性末梢血幹細胞は、他の虚血性疾患に治療において有用であるという報告が散見される。下

肢虚血性疾患においては、基礎実験において CD34 陽性末梢血幹細胞を下肢虚血モデルに投与することで、移植細胞が虚血部位に取り込まれ血行を改善すると報告され[4]、臨床応用も既に始まりその効果も報告されている[5]。さらに、急性心筋梗塞においても、基礎実験において CD34 陽性末梢血幹細胞を投与することにより心筋が保護され、投与した細胞の一部が心筋となり機能回復に有用であると報告され[6]、臨床応用が始まっている[7]。これらの虚血性疾患における CD34 陽性末梢血幹細胞の作用機序としては、虚血部位における血管新生の促進によるものであると考えられている。

しかし、下肢虚血疾患、心筋梗塞等の疾患と異なり、脊髄においては血液脊髄関門 (Blood Spinal Cord Barrier) が存在するため、G-CSF を投与して末梢血中に動員される造血幹細胞のうち脊髄内に生着しうる数はごく一部となる。急性脊髄損傷においてはこの Blood Spinal Cord Barrier の破綻に伴い、G-CSF を投与することにより急性期には脊髄内に末梢血幹細胞が生着しうるが、Blood Spinal Cord Barrier の修復に伴い脊髄内への末梢血幹細胞の移動・生着は期待できなくなる。ただし、G-CSF の損傷脊髄内への作用としては、我々は他に直接的なアポトーシス抑制[8]、オリゴデンドロサイトの細胞死の抑制と髄鞘保護、炎症性サイトカイン発生の抑制[9]などの効果を有することを明らかにしており、我々は G-CSF の静脈内投与の効果は、これらの直接的に二次損傷を軽減するというものが主であると考えている。そこで今回我々は、急性脊髄損傷において G-CSF にて末梢血中に動員された造血幹細胞を回収、濃縮して損傷脊髄内に直接

移植することで、更なる治療効果が得られるのではないかとという着想に至った。本研究の目的は、マウス脊髄損傷モデルにおける G-CSF 動員末梢血幹細胞移植の治療効果を検討することである。

## B. 研究方法

8~10 週齢の成雌 NOD/Scid マウス(体重 25-30g)に対し、第 9 胸椎椎弓切除を行い Infinite Horizon Impactor を用いて(60Kdyne) 脊髄圧挫損傷モデルを作成。これらをランダムに C 群、M 群、CD34 群の 3 群に分割し、1 週間後に、①C 群には溶媒のみ(3.0 $\mu$ l)を、②M 群にはヒト由来 G-CSF 動員末梢血単核球細胞 (mPB MNC)  $1.0 \times 10^5$  個(3.0 $\mu$ l)を、③CD34 群にはヒト由来 G-CSF 動員末梢血 CD34 陽性細胞 (mPB CD34+)  $1.0 \times 10^5$  個 (3.0 $\mu$ l)を、それぞれ損傷脊髄内に直接注入した。これら 3 群に対し、以下の比較検討を行った。

- 1) 後肢運動機能評価: 受傷後 1 週間から 8 週間までの後肢運動機能回復を Basso Mouse Scale (BMS) を用いて評価し[10]、各群間で比較検討した。これに加え、移植後 8 週において Scanet 40 (Merquest 社製) を用いて 30 分間歩行テストを行い、各群の運動量について比較検討した。
- 2) 免疫組織学的検討: 移植後 8 週の時点で損傷脊髄を摘出し、2.5mm 間隔で脊髄矢状断切片を作成した。抗ヒトミトコンドリア抗体を用いて免疫染色を行い、移植したヒト由来細胞が生着・残存しているか、また、残存している場合、損傷部から頭尾側にどの程度まで存在しているかを確認した。さらに血

管内皮細胞の抗体である von Willebrand Factor を用いて二重染色を行った。

統計学的検定には、3群間のBMSの経時的回復については Repeated-measures ANOVA, Turkey-Kramer 法を、また各週における3群の比較及び Scanet 40での運動量解析には Two-factor ANOVA, Turkey-Kramer 法を用いた。

### C. 研究結果

- 1) BMSにおいてはC群に比しM群、CD34群の双方で損傷6週目から8週目において有意な行動の改善を認めた ( $p<0.01$ )。損傷8週目におけるBMSは

C群で  $5.29 \pm 0.49$  であったのに対しM群では  $6.38 \pm 0.62$ 、CD34群では  $6.50 \pm 0.53$  であり、移植群双方で対照群に比し有意な改善を認めていた ( $p<0.01$ )。また、Scanet 40を用いた損傷後8週目での運動量の解析では、C群、M群、CD34群の順に運動量は増加しており、C群とCD34群の間には有意な運動量の差を認めた ( $p<0.01$ ) (図1、図2)。

- 2) 移植細胞は移植後8週の時点で一部残存しており、損傷中心より約2mm頭尾側までにわたり存在した(図3-1)。さらに、移植細胞はVWFで二重染色される血管系の細胞へと分化していた(図3-2)。

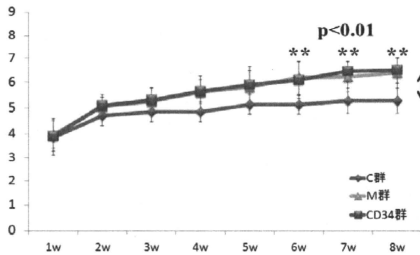


図1: BMS Score

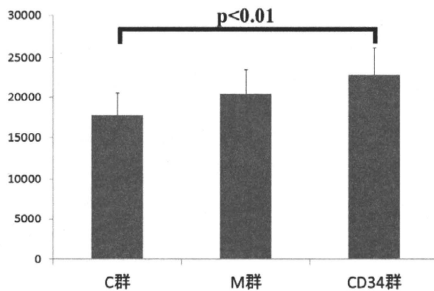


図2: Scanet 40

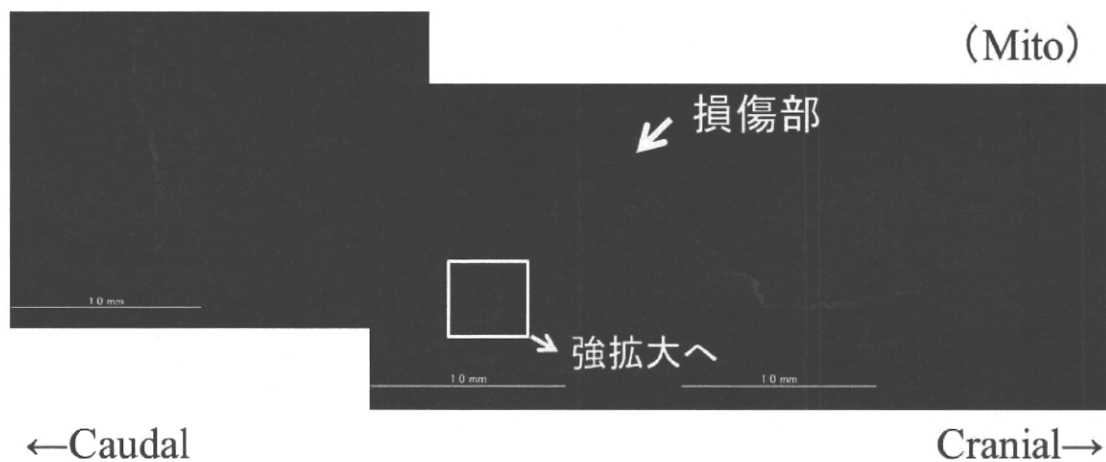


図3-1 免疫組織学的検討

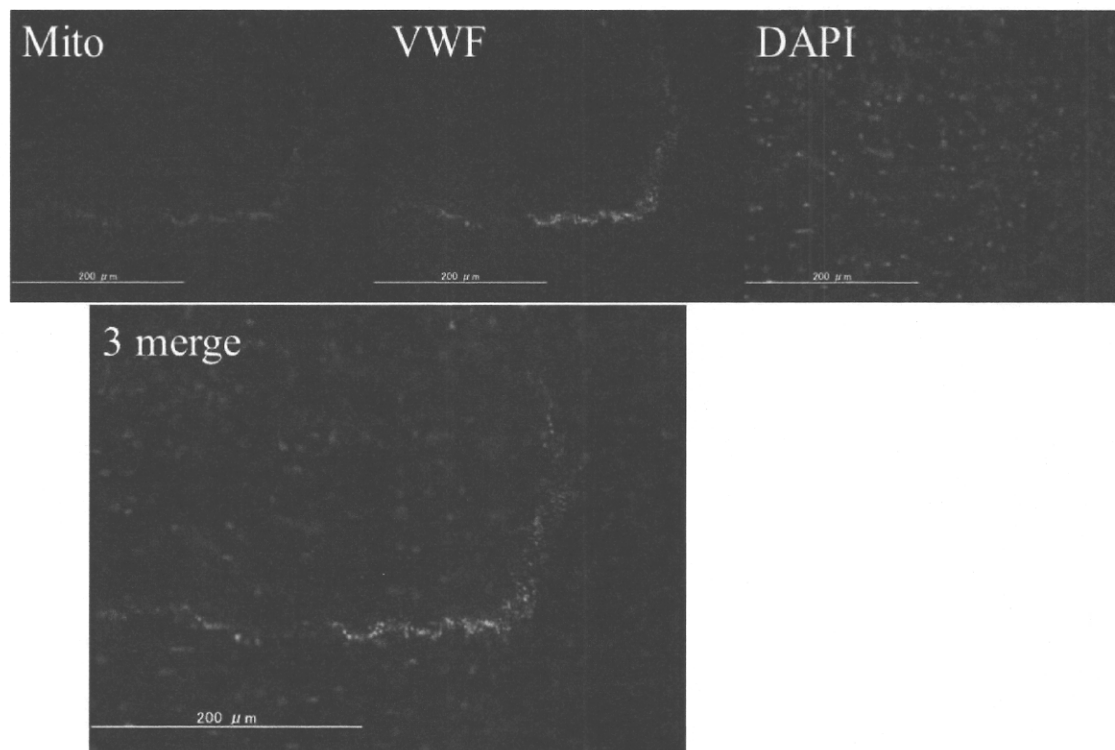


図3-2 免疫組織学的検討

#### D. 考察

中枢神経系においてはマウス脳梗塞モデルにおいて CD34 陽性末梢血幹細胞の投与により梗塞周囲における血管再生が促進され、さらに CD34 陽性末梢血幹細胞は内因性の神経再生に必須であると報告されている[11]。本研究においても移植細胞は損傷脊髄内に生着し、血管系の細胞に分化していたことから、これらの知見に合致する結果となった。

また、CD34 陽性末梢血幹細胞に比べ比較的臨床使用が容易な骨髄単核球細胞を脳梗塞亜急性期に投与することで、有意な神経組織の再生効果を得たとの報告もある[12]。本研究においても CD34 陽性末梢血幹細胞移植のみならず骨髄単核球細胞移植においても行動回復を認めており、CD34 陽性細胞のみを純化せずに骨髄単核球細胞の分画を抽出して直接移植することによっても治療効果があると示唆された。しかし、運動量解析の結果からその効果は CD34 陽性細胞のみを純化して移植の方が勝ると考えられた。

また、今回の結果から、行動学的改善は損傷後 6 週から 8 週の慢性期にみられており、さらに一部移植細胞は生着していたがその数は少なかった。これらより、移植後早期に血管新生が促進されている可能性が示唆される。今後は損傷後亜急性期における移植細胞の生着率、そして移植後早期における神経栄養因子、血管新生に関連するサイトカインに関して Real time PCR を行い検討する計画である。

骨髄単核球細胞、CD34 陽性末梢血幹細胞は比較的臨床使用が容易であり、さらに自己由来の細胞であるため拒絶反応もなく、

多疾患においては臨床応用が始まっている細胞治療法のソースである。このため、急性脊髄損傷に対する細胞移植治療の早期臨床応用が期待できると考えている。

#### [参考文献]

1. Kan EM, Ling EA, Lu J. Stem cell therapy for spinal cord injury. *Curr Med Chem* 2010; 17: 4492-4510.
2. 高橋宏, 山崎正志, 大河昭彦, 国府田正雄, 橋本将行, 橋本光宏, 林浩一, 佐久間毅, 川辺純子, 藤由崇之, 古矢丈雄, 山内友規, 門田領, 宮下智大, 萬納寺誓人, 染谷幸男, 西尾豊, 鎌田尊人, 越塚周平, 池田修, 喜多恒次, 青木保親, 吉永勝訓, 村田淳, 高橋和久. 急性脊髄損傷に対して顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF) 投与による神経保護療法を施行した 6 症例. *千葉医学* 86: 175-183, 2010
3. Henschler R, Brugger W, Luft T, Frey T, Mertelsmann R, Kanz L. Maintenance of transplantation potential in ex vivo expanded CD34(+)-selected human peripheral blood progenitor cells. *Blood* 1994; 84: 2698-2703.
4. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Keamey M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3422-3427.
5. Kawamoto A, Katayama, Handa N, Kinoshita M, Takano H, Horii M,

- Sadamoto K, Yokoyama A, Yamanaka T, Onodera R, Kuroda A, Baba R, Kaneko Y, Tsukie T, Kurimoto Y, Okada Y, Kihara Y, Morioka S, Fukushima M, Asahara T. Intramuscular Transplantation of Granulocyte Colony Stimulating Factor-Mobilized CD34-Positive Cells in Patients with Critical Limb Ischemia: A phase I/IIa, Multi-Center, Single-Blind and Dose-Escalation Clinical Trial. *Stem Cells* 2009; 27: 2857-2864.
6. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, Sadamoto K, Horii M, Matsumoto T, Murasawa S, Shibata T, Suehiro S, Asahara T. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation* 2006; 113: 1311-1325.
7. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Keamey M, Chaudhry M, Burq A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007; 115: 3165-72.
8. Nishio Y, Koda M, Kamada T, Someya Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okada S, Okawa A, Moriya H, Yamazaki M. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 724-31.
9. 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
10. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma* 2006; 23: 635-659.
11. Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, Tsukamoto Y, Iso H, Fujimori Y, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clinical Invest* 2004; 114: 330-338.
12. 田口明彦. 脳血管障害に対する新しい細胞治療の開発. *循環器病研究の進歩* 2007; 28: 53-58.

#### E. 結論

マウス脊髄圧挫損傷モデルにおいて、G-CSF 動員末梢血幹細胞移植により行動学的に有意な改善を認め、単核球細胞移植より CD34 陽性幹細胞を移植する方でより良好な改善を認めた。さらに移植細胞は一部

で損傷部を中心に生着し、血管系細胞へと分化していた。臨床応用の面からは G-CSF 投与により脊髄損傷急性期の二次損傷を軽減し、さらにその後動員される幹細胞を回収し損傷部へ移植することで更なる脊髄損傷の機能回復が期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. 佐久間毅, 山崎正志, 国府田正雄, 橋本将行, 高橋宏, 林浩一, 川辺純子, 藤由崇之, 古矢丈雄, 山内友規, 門田領, 宮下智大, 萬納寺誓人, 染谷幸男, 西尾豊, 鎌田尊人, 腰塚周平, 池田修, 喜多恒次, 安宅洋美, 吉永勝訓, 村田淳, 橋本光宏, 大河昭彦, 高橋和久: 圧迫性脊髄症の急性増悪期に顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 投与による神経保護療法を施行した 5 症例. 千葉医学 86: 11-18, 2010.
2. 高橋宏, 山崎正志, 大河昭彦, 国府田正雄, 橋本将行, 橋本光宏, 林浩一, 佐久間毅, 川辺純子, 藤由崇之, 古矢丈雄, 山内友規, 門田領, 宮下智大, 萬納寺誓人, 染谷幸男, 西尾豊, 鎌田尊人, 腰塚周平, 池田修, 喜多恒次, 青木保親, 吉永勝訓, 村田淳, 高橋和久: 急性脊髄損傷に対して顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF) 投与による神経保護療法を施行した 6 症例. 千葉医学 86: 175-183, 2010.
3. 佐久間毅, 山崎正志, 国府田正雄, 高

橋宏, 加藤啓, 林浩一, 橋本将行, 橋本光宏, 大河昭彦, 高橋和久: 脊柱靭帯骨化症に伴う脊髄障害性疼痛に対し顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)が著効した 2 例. 千葉医学 86: 185-189, 2010.

4. 佐久間毅, 山崎正志, 国府田正雄, 高橋宏, 加藤啓, 林浩一, 川辺純子, 藤由崇之, 古矢丈雄, 山内友規, 門田領, 宮下智大, 萬納寺誓人, 染谷幸男, 西尾豊, 鎌田尊人, 腰塚周平, 池田修, 安宅洋美, 蓮江文男, 吉永勝訓, 村田淳, 花岡英紀, 橋本将行, 橋本光宏, 大河昭彦, 高橋和久: 圧迫性脊髄症急性増悪期例に対する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を用いた神経保護療法: Phase I/IIa 臨床試験. 千葉医学 86: 233-239, 2010.
5. 高橋宏, 佐久間毅, 林浩一, 大河昭彦, 国府田正雄, 山崎正志: 急性脊髄損傷に対して顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)投与を施行した臨床試験例の検討. 日脊障医誌 23: 34-35, 2010.
6. 佐久間毅, 高橋宏, 林浩一, 大河昭彦, 国府田正雄, 山崎正志: 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(G-CSF)投与による神経保護法. 日脊障医誌 23: 36-37, 2010.

### 学会発表

1. Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Koda M, Hashimoto M, Hashimoto M, Fujiyoshi T, Furuya T, Sakuma T, Kato K, Takahashi K. A phase I and IIa clinical trial using granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) as a neuroprotective therapy for acute spinal cord injury: 2nd Annual Meeting, Cervical Spine Research

- Society-Asia Pacific Section. April 28-30, 2011, Paradise Hotel Busan, Korea. (Abstract p70)
2. Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Koda M, Hashimoto M, Hashimoto M, Sakuma T, Kato K, Takahashi K. Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for acute spinal cord injury: a phase I and IIa clinical trial. 38th Annual Meeting, Cervical Spine Research Society. December 2-4, 2010, The Westin Charlotte, Charlotte, North Carolina. (Abstract p191)
  3. Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Koda M, Hashimoto M, Hashimoto M, Hayashi K, Kato K, Takahashi K. Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for acute spinal cord injury: phase I, IIa clinical trial. EuroSpine 2010, Annual Meeting of the Spine Society of Europe. September 15-17, Reed Messe Wien Exhibition & Congress Center, Vienna. Eur Spine J 19 (Supple 3): S235-S236, 2010
  4. 高橋宏, 山崎正志, 大河昭彦, 橋本光宏, 佐久間毅, 加藤啓, 国府田正雄, 橋本将行, 高橋和久. 急性脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) を用いた神経保護療法: Phase I・IIa 臨床試験 第二報. 第40回日本脊椎脊髄病学会. 2010年4月21-23日 京王プラザホテル 東京都. J Spine Res 2(3):631, 2011
  5. 高橋宏, 山崎正志, 大河昭彦, 橋本光宏, 佐久間毅, 加藤啓, 国府田正雄, 橋本将行, 高橋和久. 急性脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) を用いた神経保護療法 第二報. 第10回日本再生医療学会総会. 2011年3月1-2日 京王プラザホテル 東京. 再生医療 10 suppl: 238, 2011
  6. 高橋宏, 国府田正雄, 橋本将行, 佐久間毅, 大河昭彦, 山崎正志. 急性脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) を用いた神経保護療法の検討: 第3報. 第45回日本脊髄障害医学会. 2010年11月21-2日 松本文化会館 松本市. 抄録集 p115
  7. 高橋宏, 山崎正志, 大河昭彦, 国府田正雄, 橋本将行, 林浩一, 佐久間毅, 高橋和久. 急性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) を用いた神経保護療法の検討. 第39回日本脊椎脊髄病学会. 2010年4月22-24日 高知県立県民文化ホール 高知市. J Spine Res 1(3):590, 2010
  8. 高橋宏, 国府田正雄, 橋本将行, 大河昭彦, 橋本光宏, 林浩一, 佐久間毅, 山崎正志, 高橋和久. マウス脊髄損傷モデルに対する G-CSF 動員末梢血幹細胞移植の治療効果. 第25回日本整形外科基礎学術集会. 2010年10月14-15日 国立京都国際会館 京都市.
  9. 高橋宏, 山崎正志, 大河昭彦, 橋本光宏, 佐久間毅, 加藤啓, 国府田正雄, 橋本将行, 高橋和久. 急性脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) を用いた神経保護療法 第二報. 第10回日本再生医療学会総会 2011年3月1-2日 京王プラザホテル 東京. 再生医療 10 suppl: 238, 2011



10. 高橋宏，国府田正雄，橋本将行，橋本光宏，佐久間毅，加藤啓，大河昭彦，山崎正志，高橋和久. マウス脊髄損傷モデルに対する G-CSF 動員末梢血幹細胞移植の治療効果. 第 10 回日本再生医療学会総会 2011 年 3 月 1-2 日 京王プラザホテル 東京. 再生医療 10 suppl: 238, 2011

#### 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。

研究成果の刊行に関する一覧表

【H22. 4. 1～H23. 3. 31】

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山崎正志	頸部・脊柱の変形	菅野伸彦, 高井信朗, 高橋和久, 土屋弘行	整形外科領域 ハンドブック Orthopaedic Access	メジカル ビュー社	東京	2010	pp30-37
山崎正志	後縦靭帯骨化症/黄色靭帯骨化症	菅野伸彦, 高井信朗, 高橋和久, 土屋弘行	整形外科領域 ハンドブック Orthopaedic Access	メジカル ビュー社	東京	2010	pp254- 255
山崎正志	胸椎手術における 三次元実体模型の 有用性：術前手術 シミュレーション および術中ナビゲ ーション	馬場久敏	OS NOW Instruction No. 14, 内視 鏡・ナビゲー ションを併用 した脊椎手術 ：最新の手術 手技の見逃せ ないポイント	メジカル ビュー社	東京	2010	pp102- 117
宮下智 大, 山崎 正志, 高 橋和久	頸部脊椎症に伴う 頸部. 運動器の痛 み	菊地臣一編	プライマリケ ア：頸部・肩 の痛み	南江堂	東京	2010	pp175- 181
山崎正志	強直性脊椎骨増殖 症	戸山芳昭編	アトラス骨関 節画像診断	中外医学 社	東京	2011	印刷中
山崎正志	上位頸椎手術	富士武史編	整形外科治療 と手術の合併 症	金原出版	東京	2011	印刷中

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayashi K, Hashimoto M, Koda M, Naito A, Murata A, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M	Transplantation of murine induced pluripotent stem (iPS) cell-derived astrocytes increases sensitivity to mechanical stimulus in a rat spinal cord injury model	J Neurosurg Spine	(in press)		

Kawabe J, Koda M, Hashimoto M, Fujiyoshi T, Furuya T, Endo T, Okawa A, Yamazaki M	Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) exerts neuroprotective effects via promoting angiogenesis after spinal cord injury in rats	J Neurosurg Spine	(in press)		
Seichi A, Hoshino Y, Kimura A, Nakahara S, Watanabe M, Kato T, Atsushi O, Kotani Y, Mitsukawa M, Ijiri K, Kawahara N, Inami S, Chikuda H, Takeshita K, Nakagawa Y, Taguchi T, Yamazaki M, Endo K, Sakaura H, Uchida K, Kawaguchi Y, Neo M, Takahashi M, Harimaya K, Hosoe H, Imagama S, Taniguchi S, Ito T, Kaito T, Chiba K, Matsumoto M, Toyama Y	Neurological complications of cervical laminoplasty for patients with ossification of the posterior longitudinal ligament-A multi-institutional retrospective study-	Spine			2011 Feb 1. [Epub ahead of print]
Yamazaki M, Okawa A, Mannoji C, Fujiyoshi T, Furuya T, Koda M	Postoperative paralysis after posterior decompression with instrumented fusion for thoracic myelopathy due to ossification of the posterior longitudinal ligament	J Clin Neurosci	18	294-296	2011

Fujiyoshi T, Kubo T, Chan CC, Koda M, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M	Interferon gamma decreases chondroitin sulfate proteoglycan expression and enhances hindlimb function following spinal cord injury in mice	J Neurotrauma	27	2283-2294	2010
Kamada T, Koda M, Dezawa M, Anahara R, Toyama Y, Yoshinaga K, Hashimoto M, Koshizuka S, Nishio Y, Yamazaki M	Transplantation of human bone marrow stromal cell-derived Schwann cells reduces cystic cavity and promotes functional recovery after contusion injury of adult rat spinal cord	Neuropathology	31	48-58	2011
Fujiyoshi T, Yamazaki M, Okawa A, Kawabe J, Hayashi K, Endo T, Furuya T, Koda M, Takahashi K	Analysis of static versus dynamic factors for the development of myelopathy in patients with cervical ossification of the posterior longitudinal ligament	J Clin Neurosci	17	320-324	2010
Yamazaki M, Okawa A, Fujiyoshi T, Furuya T, Koda M	Posterior decompression with instrumented fusion for thoracic myelopathy caused by ossification of the posterior longitudinal ligament	Eur Spine J	19	691-698	2010
Yamazaki M, Okawa A, Fujiyoshi T, Kawabe J, Furuya T, Kon T, Koda M	Intraoperative spinal subarachnoid hematoma in a patient with cervical ossification of the posterior longitudinal ligament	Spine	35	E359-E362	2010