

は明記されていない。

5年間に労災病院関連の28施設において登録された脊髄損傷1,366名中、中心性頸髄損傷と診断されたのは261例（19.1%）であった[7]。

MRIで脊髄内がT2で高信号になっている高位を損傷レベルとすると、損傷高位はC3-4高位が最多となっている[8,9]。高頻度に見られる手指筋の委縮や拘縮は、C3-4高位での索路障害に基づく廃用症候群と考えられている[8]。

### 病 態

中心性頸髄損傷の病態は、頸髄横断面の解剖から説明されることが多い。すなわち、頸髄横断面では白質の錐体側索路、脊髄視床路、後索などでは、外側より仙髄・腰髄・胸髄・頸髄の順で中心に向かい配列されているとするForesterのラミネーション仮説に基づいている（図1）[10]。Schneiderもそれを支持し、脊髄中心部の灰白質と周辺白質の障害（圧挫・出血・血腫）のため、中心性頸髄損傷では上肢の障害が強いとし、これが古典的理解となっている。

しかしながら、ヒトの脊髄での錐体路に層状構造が存在することに関しては、解剖組織学での実証が得られていない[11]。むしろ、上下肢への下行線維はまばらに局在しているという報告もある[12]。また、Bungeは病理学的所見から、中心性頸髄損傷は側索・後索の障害が主で、灰白質の障害は認めないと報告している[13]。

受傷のメカニズムは、脊柱管の狭小化（椎体後方骨棘、OPLL、膨隆した椎間板）がもともと存在していたところに外力が加わり生じるとされている。すなわち、上位椎体下縁と下位椎弓上縁との間での脊髄狭撃によるpincer's mechanismにて発生する[14]、あるいは頸椎過伸展で黄色靭帯のたくれ込みがおこり、硬膜管を最大30%まで狭窄するために発生すると説明されている[15]。

市原はコンピューターシミュレーションで、まず後方からの圧迫で側索・後索が障害されてBunge型の損傷が起こり、次に灰白質の障害が起こりSchneider型の損傷が生じるとしている[16]。

近年の分子生物学的研究手法の進歩に伴い、脊

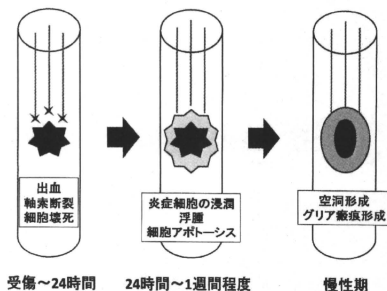


図2 脊髄損傷後の組織反応の推移

受傷直後、損傷部に出血が生じ、神経細胞の軸索が断裂し、神経細胞・アストロサイト・オリゴデンドロサイトなどの脊髄細胞が直接外力により壊死する（受傷～24時間）。

続いて、白血球・マクロファージ・ミクログリアなどの炎症細胞・貪食細胞が浸潤し、サイトカインを放出し、浮腫がおこり炎症が周囲に波及する。その結果、損傷部周囲の細胞までもがアポトーシスに陥る（24時間～1週間程度）。

その後、損傷中心部は空洞化し、その周囲にはグリア瘢痕が形成される。神経細胞の軸索はグリア瘢痕に阻まれて伸張しない（慢性期）。

損傷後の局所での組織反応の推移が明らかにされつつある。すなわち、受傷部位の細胞壊死などの1次損傷、引き続いて起こる炎症細胞の浸潤・細胞のアポトーシスなどの2次損傷、受傷部位の空洞化・周囲のグリア瘢痕形成について、解析が進んでいる（図2）[17]。

### 自然経過・予後予測

中心性頸髄損傷例の多くで、時間の経過とともに神経症状が改善していくのは周知の事実である。中心性頸髄損傷の予後良好因子として、40歳以下・広い脊柱管・上肢型損傷などがあげられている[18,19]。画像診断では、早期MRIにてのT1等信号/T2等信号が挙げられている[4,20]。

中心性頸髄損傷の成績不良因子としては、高齢（70歳以上）および脊柱管の狭小化が挙げられている[21]。OPLL例は改善の悪い例が多く、Frankel分類のEまで改善した例はなかったとの報告がある[22]。早期（急性期から亜急性期）MRIでのT1低信号/T2高信号は予後不良因子とされている（図3）[4,23,24]。

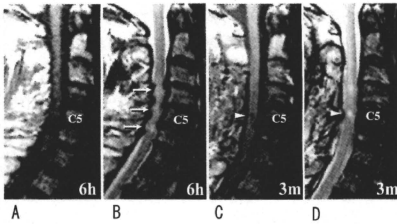


図3 MRI診断でT1低信号/T2高信号の改善不良例  
60歳の男性。自転車走行中に転倒し受傷。過伸展損傷。初診時Frankel C。頸椎X線側面像では多椎間に頸椎症性変化を認める。

受傷後6時間のMRIでは、C3/4、C4/5、C5/6高位で脊髄は前方後方から圧排をうけている。T1強調像では髄内の信号変化は明らかでない(A)。T2強調像では、C3/4、C4/5、C5/6高位に髄内高信号の領域が存在するが、脊髄が圧迫のため変形しており、輝度変化およびその境界は明瞭でない(B矢印)。受傷後3週後にC3-7椎弓形成術施行。

受傷後3ヵ月のMRI画像では、脊髄の前方後方からの圧排は解除され、脊髄の形態は復元している。T1強調矢状断像でC5/6高位で髄内に低信号領域が観察される(C矢頭)。T2強調矢状断像ではC5/6高位での髄内高信号がより明瞭になっている(D矢頭)。

受傷後1年2ヵ月の最終調査時、移動には車椅子が必要である。

手術例を含まない純粋な自然経過に関しては、非骨傷性頸髄損傷例を対象とした研究ではあるが、入院時Frankel分類BまたはCで脊髄圧迫が20%以下の例20例のうち、1年後にFrankel分類で1段階以上改善した例が75%、D以上へ改善した例が65%であった。同様に、脊髄圧迫が20%以上の例17例のうち、1年後にFrankel分類で1段階以上改善した例が94.1%、D以上へ改善した例が64.7%であった[25]。

### 保存治療

保存治療としては、通常、安静臥床や頸椎カラー固定が行われるが、安静期間や固定期間はさまざまである。骨傷例には牽引(Glisson・Crutchfield)やHalo装置固定が行われることもある。最近の傾向としては、合併症予防のために早期離床が推奨されている。

積極的保存療法として、受傷当日からの座位・リハビリテーションを行う施設もある[25]。しか

し、損傷靭帯の回復には12週間の安静を要するとの報告もあり[26]、ある程度の固定は必要と考えられる。

薬物療法としてはメチルプレドニゾロン(MPSS)大量療法があり、本邦においては1997年、厚生省の認可のもとに臨床使用が開始された。現在のところ、脊髄損傷に対して治療目的に使用できる唯一の薬剤である。Pollardらは412名の頸髄不全損傷患者にMPSS大量療法を行い、若年者や中心性損傷例において良好であったと報告している[27]。本邦でも、Frankel分類C以上の中心性頸髄損傷患者22名に1,000mg以下のMPSS投与が有効であったとの報告がある[28]。

しかしながら、近年、MPSS大量療法の有効性を疑問視する報告が相次ぎ、副作用の報告も多い。Pointillartらは、手術を施行していない106例のランダム化臨床試験(RCT)にて神経学的に改善がみられなかったと報告している[29]。本邦においても、手術を試行していない46例のRCTにて、MPSS群にて呼吸器合併症が有意に増加し、消化器合併症も増加したと報告されている[30]。また、銃などによる穿通性外傷では治癒が遅延したとの報告もある[31]。

新たな薬物療法の開発を目的として、筆者らは顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を用いた神経保護療法の臨床試験を開始した[32-34]。急性期脊髄損傷例および圧迫性頸髄症急性増悪例を対象に、安全性確認を主目的とするPhase I/IIa臨床試験が行われ、G-CSF投与に伴う有害事象の発生はなかった。また、G-CSF投与が行われた全例で、運動および感覚の改善を認めた。引き続き、G-CSF療法の有効性を評価することを主目的とするPhase IIb臨床試験を施行する予定である。

動物実験の段階ではあるが、脊髄損傷への有効性が示されたものとして、抗IL-6レセプター抗体[35]、肝細胞増殖因子(HGF)[36]がある。

### 手術療法

中心性頸髄損傷に対する保存療法と手術療法を比較した質の高い研究は少なく、手術適応については議論の余地が多い。かつて除圧術は禁忌とされていたが[2]、手術が有効な症例が存在するこ

とは確かである。

麻痺が軽度の例、脊髄圧迫がない例は、一般に保存治療が選択されるが、OPLLをはじめとする高度脊髄圧迫例で麻痺が重度、あるいは麻痺の増悪が認められれば除圧術が考慮される。

斉鹿らは、頸椎症例の第5頸椎における脊柱管前後径を保存治療群32例と手術治療群18例と比較し、前者で平均14.1mm、後者で12.1mmであったと報告している。またOPLL例で脊柱管占拠率を比較すると、保存治療群3例で平均25%、手術治療群20例で43%であったとしている[37]。

Chenらは、保存治療を行った多椎間脊柱管狭窄症例は機能予後不良のことが多く、後に脊髄症を発症する可能性が高いとしている[38]。

手術を選択すべき症例として、「受傷早期に症状が悪化する例」「症状の改善が早期に認められない例」を挙げている報告もある[39]。麻痺増悪は、受傷後も脊髄にとって劣悪な環境が残存している証拠であり、脊髄浮腫、炎症性物質の発現、脊髄血流循環動態の悪化から、障害部位より上行性に神経症状の悪化を呈するためと説明されている[39]。

急性期手術の目的として、①神経経圧迫因子の除去、②脊髄2次損傷の予防、③脊柱安定性の獲得が挙げられている[40]。急性期に手術を行うことで、脊髄圧迫病変の残存による脊髄循環障害・静脈環流障害などで惹起される2次損傷を防止し、リハビリテーションを早期に開始することで、早期離床・早期社会復帰が可能となる。

保存療法と手術療法の多施設前向き無作為共同研究が本邦で開始されており、注目されている[25]。非骨傷性頸髄損傷を対象とした研究では、入院時Frankel分類BあるいはC、MRIにて損傷部の脊髄圧迫率20%以上の症例を対象に行った多施設前向き無作為共同研究（手術治療17例：受傷後平均9.5日で手術、保存治療17例）の結果で、1年後にFrankel分類で1段階以上改善したものが手術群で70.6%、保存群で94.1%、D以上へ改善したものが手術群で58.8%、保存群で64.7%であり、両群に統計学的有意差はなく、急性期除圧術は麻痺回復に有効ではなかったと報告されている[25]。今後のさらなる検討が期待される。

脱臼・骨折例が含まれ非骨傷性頸髄損傷例の

みを対象とした解析ではないが、4,982例の脊髄損傷例のメタ解析において、「72時間以内の手術が安全である」、「麻痺悪化傾向のある症例では緊急手術を要する」については賛同が得られている（evidence level: class 2）[41]。ただし早期の手術では、自然経過の中での改善が治療成績に含まれている可能性があるため評価が難しい。

画像での判断としては、不安定性のある破裂骨折・脱臼骨折は手術が必要である。しかしAllen分類のDistractive-Flexion: stage 1（自然整復されるとレントゲンで評価できない）、Compressive Flexion: stage 1-2、Vertical-Compression: stage 1は神経症状がなければ手術不要であると報告されている[40]。

最も頻度の高い過伸展型損傷例のうち、脊髄圧迫も脊柱不安定性もない安定型に対しては、手術適応はないとされている。不安定性を示すものはAllen分類のDistractive Extension (DE)に相当し、椎間板や前縦帯断裂を伴えばDE-1（軽度不安定型）、これに椎間関節包の破裂が加わると極端に不安定性が増し、高度不安定型のDE-2となる。DE-1では保存治療にて麻痺悪化の場合は手術適応、高度脊髄圧迫があれば手術適応、DE-2では脊髄圧迫の有無にかかわらず固定術を要し、また、外傷性椎間板ヘルニアはDE-1と同様の適応で前方除圧固定術を行うべきとされている[40]。

手術時期に関する報告としては、症状改善がプラトーに達し、脊髄圧迫があるものは手術すべきとの報告がある[42]。また、中心性頸髄損傷手術例62例の検討から、受傷から手術まで30日以内の症例では、手術時期にかかわらず改善度に差がなかったとの報告がある[43]。また受傷後3～9ヵ月（10例：平均3.5ヵ月）の時期に手術療法を行い、良好な改善を得たとの報告もある[44]。

Fehlingsらによる重症度を問わない全ての脊髄損傷例を対象とする文献的考察によると、受傷後4週以降に行われた除圧術例では、いずれの報告でも改善が認められていた。特に、受傷後3ヵ月以降に除圧術を受けた例の46.5%で感覚または運動機能の改善があった。同様に、12ヵ月以降の除圧術例の79%、24ヵ月以降の除圧術例の81%で改善があったとしている[45]。

手術治療に関するこれまでの報告を総括すると、中心性頸髄損傷の急性期治療に際しては、麻痺の進行がなく脊柱不安定がない場合には、高度な脊髄圧迫が存在している場合においても、除圧術を急ぐ必要はなく、保存治療を原則としてよいと考えられる。

## 謝 辞

本研究にご協力頂いた千葉大学整形外科教室頸椎脊髄診療班の諸先生に深謝する。

## SUMMARY

Acute cervical central spinal cord injury is characterized by greater motor impairment of upper extremities compared with the lower extremities. The lesion exists at the central portion of the spinal cord; in the gray matter and the inner region of the white matter. Recent advances in molecular biology have enabled us to clarify the tissue reactions following injury from the acute phase through the chronic phase. Prognosis of paralysis can considerably be predicted by MR image diagnosis immediately after injury. High-dose methylprednisolone has been used for pharmacotherapy. However, recent reports have doubt on its therapeutic effect and side-effects related to the therapy have been emphasized. A clinical trial of granulocyte colony-stimulating factor has initiated the development of a new medication therapy. In patients who have no compression of the spinal cord, conservative therapy is principally selected. When patients have spinal cord compression accompanied by canal stenosis and their paralysis is severe or progressing, decompression surgery is indicated. However, there have been few high-quality studies that compare operative treatment with conservative therapy, and indications for surgery remain controversial. A multicenter prospective randomized clinical trial has begun to analyze further the effect of decompression surgery.

## 文 献

- 1) 山崎正志. 頸椎胸椎疾患. 糸満盛憲, 早乙女絢一, 守屋秀繁編, TEXT 整形外科 (第3版), 東京: 南山堂, 2005: 76-89.
- 2) Schneider RC, Cherry G, Pantek H. Syndrome of acute central cervical cord injury; with special reference to mechanisms involved in hyperextension injuries of cervical spine. *J Neurosurg* 1954; 11: 546-77.
- 3) 白井 宏, 平林 冽. 急性中心性頸髄損傷について. *整形外科* 1981; 32: 1803-12.
- 4) 山崎正志, 高橋和久. 中心性頸髄損傷のMRI診断. 伊藤博元編, 図解よくわかる整形外科MRI診断実践マニュアル, 東京: 全日本病院出版会, 2007: 29-38.
- 5) 新宮彦介. 日本における脊髄損傷疫学調査第3報 (1990-1992). *日バラ医誌* 1995; 8: 26-7.
- 6) 新宮彦介. 疫学調査よりみた高齢者脊髄損傷. *日バラ医誌* 1995; 8: 28-9.
- 7) 古澤一成, 徳弘昭博, 杉山宏行, 池田篤志, 住田幹男, 富永俊克. 全国脊髄損傷データベースからみた中心性頸髄損傷の現状. *日脊障医誌* 2007; 20: 84-5.
- 8) 植田尊善. 中心性頸髄損傷の臨床と疫学-非骨傷性頸髄損傷を中心に. *脊椎脊髄* 2008; 21: 562-5.
- 9) 貴船雅夫, 白石 元, 小笠博義. 中心性頸髄損傷のMRI. *中部整災誌* 2003; 46: 325-6.
- 10) Forester O. *Symptomatologie der Erkrankungen Des Rückenmarks unf seiner wurzeln*. In: Bumkeo, Forester O ed, *Handbook of Neurology* Vol 5, Berlin: Springer 1936: 83.
- 11) Nathan PW, Smith M, Deacon P. The corticospinal tracts in man: course and location of fibers at different segmental levels. *Brain* 1990; 113: 303-24.
- 12) Levi AD, Tator CH, Bunge RP. Clinical syndromes associated with disproportionate weakness of the upper versus the lower extremities after cervical spinal cord injury. *Neurosurgery* 1996; 38: 179-83.
- 13) Bunge RP, Puckett WR, Becerra JL, Marcillo A, Quencer RM. Observation on the pathology of human spinal cord injury: a review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv Neurol* 1993; 59: 75-89.
- 14) Penning L. Some aspects of plain radiography of cervical spine in chronic myelography. *Neurology* 1962; 12: 513-9.
- 15) Taylor AR. The mechanism of injury to the spinal cord in the neck without damage to the vertebral column. *J Bone Joint Surg* 1951; 33B: 543-7.
- 16) 市原和彦, 金子和生, 加藤圭彦, 河野俊一, 桜本逸男, 田口敏彦. 脊髄力学的特性を考慮した中心性頸髄損傷の病態解明. *中部整災誌* 2006; 49: 27-8.
- 17) 国府田正雄, 鎌田尊人, 西尾 豊, 染谷幸男, 出澤真理, 山崎正志. 脊髄損傷再生医学の最前線: われわれの脊髄再生研究とその展望. *脊椎脊髄* 2007; 20: 1247-52.
- 18) 貴船雅夫, 三村 寛, 酒井和裕, 小笠博義. 非骨傷性頸髄損傷の治療成績に影響を与える因子について. *中部整災誌* 2001; 44: 379-80.
- 19) 貴船雅夫, 三村 寛, 酒井和裕, 小笠博義. 中心性頸髄損傷の治療成績に影響を与える因子について. *日バラ医誌* 2001; 14: 92-3.
- 20) 服部和幸, 小川 潤, 聡美和彦. 中心性頸髄損傷の画像診断-予後予測を中心に. *MB Orthop* 2002; 15: 23-38.
- 21) 二村彰人, 藤吉文規, 坪口純和, 杉本勝正, 奥田敏治. 中心性頸髄損傷のX線学的検討と麻痺の改善. *中部整災誌* 1996; 39: 1039-40.
- 22) 服部和幸, 市村正一, 里見和彦. 後縦帯骨化を伴った骨傷のない中心性頸髄損傷の予後. 別冊整

- 形外科 2004; 45: 186-91.
- 23) Yamashita Y, Takahashi M, Matsuno Y, Kojima R, Sakamoto Y, Oguni T, Sakae T, Kim EE. Acute spinal cord injury: magnetic resonance imaging correlated with myelopathy. *Br J Radiol* 1991; 64: 201-9.
  - 24) 植田尊善, 芝 啓一郎, 白澤建蔵, 大田秀樹, 森英治, 竹光義治. 非骨傷性頸髄損傷の病態と急性期治療. *脊椎脊髓* 1997; 10: 581-90.
  - 25) 植田尊善, 河野 修. 非骨傷頸損に対する急性期除圧術の効果 - 多施設前向き無作為共同研究の結果. *臨整外* 2006; 41: 467-72.
  - 26) Pang D, Pollack IF. Spinal cord injury without radiographic abnormality in children: the SCIWORA syndrome. *J Trauma* 1989; 29: 654-64.
  - 27) Pollard ME, Apple DF. Factors associated with improved neurologic outcomes in patients with incomplete tetraplegia. *Spine* 2003; 28: 33-9.
  - 28) 伊藤全哉, 大澤良充, 寺本 隆, 吉田光一郎, 鳥居行雄. 骨傷のない中心性頸髄損傷の治療経験. *中部整災誌* 2001; 44: 1337-8.
  - 29) Pointillart V, Petitjean ME, Wiart L, Vital JM, Lassié P, Thicoipe M, Badadie P. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. *Spinal Cord* 2000; 38: 71-6.
  - 30) Matsumoto T, Tamaki T, Kawakami M, Yoshida M, Ando M, Yamada H. Early complications of high-dose methylprednisolone sodium succinate treatment in the follow-up of acute cervical spinal cord injury. *Spine* 2001; 26: 426-30.
  - 31) Prendergast MR, Saxe JM, Ledgerwood AM, Lucas CE, Lucas WF. Massive steroid do not reduce the zone of injury after penetrating spinal cord injury. *J Trauma* 1994; 37: 576-80.
  - 32) 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.
  - 33) 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.
  - 34) 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, 萬納寺督人, 染谷幸男, 西尾 豊, 鎌田専人, 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. 圧迫性頸髄症の急性期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法を施行した5症例. *千葉医学* 2010; 86: 11-8.
  - 35) Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, Iwamoto Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Toyama Y, Okano H. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J Neurosci Res* 2004; 76: 265-76.
  - 36) Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J, Watanabe K, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi T, Miyatake S, Coffin RS, Nakamura T, Toyama Y, Okano H. Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res* 2007; 85: 2332-42.
  - 37) 齊藤 稔, 河合伸也, 小田裕胤, 田口敏彦, 富永俊克. 中心性頸髄損傷の治療方針に関する検討. *日バラ医誌* 1991; 4: 232-3.
  - 38) Chen TY, Dickman CA, Eleraky M, Sonntag VK. The role of decompression for acute incomplete cervical spinal cord injury in cervical spondylosis. *Spine* 1998; 23: 2398-40.
  - 39) 川本俊樹, 金 彪, 黒川 龍. 中心性頸髄損傷の自然経過. *脊椎脊髓* 2008; 21: 567-73.
  - 40) 須田浩太. 中心性頸髄損傷の手術療法. *脊椎脊髓* 2008; 21: 611-5.
  - 41) Fehlings MG, Perrin RG. The timing of surgical intervention in the treatment of spinal cord injury: a systematic review of recent clinical evidence. *Spine* 2006; 31: S28-36.
  - 42) Saruhashi Y, Hukuda S, Katsuura A, Asajima S, Omura K. Clinical outcomes of cervical spinal cord injuries without radiographic evidence of trauma. *Spinal Cord* 1998; 36: 567-73.
  - 43) 植田尊善, 佐々木邦雄, 芝 啓一郎, 権藤英資, 香月正昭, 山野耕一郎, 浅川康司, 角田信昭. 急性中心性頸髄損傷に対する手術成績. *整災外* 1985; 33: 986-90.
  - 44) 豊田 実, 大塚 稔, 穴水依人, 星川慎弥, 荒木千恵美. 中心性頸髄損傷に対する手術療法について. *関東整災誌* 1999; 30: 216-9.
  - 45) Fehlings MG, Sekhon LH, Tator C. The role and timing of decompression in acute spinal cord injury: what do we know? What should we do? *Spine* 2001; 26: S101-10.

# ラット脊髄損傷に対する人工多能性幹 (iPS) 細胞由来 アストロサイト移植効果の検討

林 浩一, 橋本 将行, 国府田 正雄, 大河 昭彦, 佐久間 毅, 高橋 宏, 山崎 正志  
千葉大学大学院医学研究院整形外科

【背景】(1)iPS細胞は体細胞から作成することが可能であることと、受精卵の破壊など倫理的問題が絡まないことから、自家移植の際の有力な選択肢となり得る可能性がある。(2)Neural Stem Sphere (NSS) 法はES細胞コロニーから周囲に神経幹細胞を分化、遊走させる方法である。(3)脊髄損傷においてアストロサイトはグリア瘢痕を形成し軸索再生を阻害するといわれてきた。近年アストロサイトが炎症の波及を防いでいる、再生軸索のガイドランスとなっている、といった脊髄損傷に対し保護的な役割に関する報告も増えてきている。

【目的】1: マウスiPS細胞よりNSS法を用いて、神経幹細胞を分化させ、さらにアストロサイトを分化誘導すること。2: 誘導したアストロサイトをラット脊髄損傷モデルに移植し、その効果を検討すること。

【方法】(分化誘導実験) マウスiPS細胞は、理研Cell Bankより譲渡を受け、未分化な状態ではGFP緑色蛍光を発する。マウスiPS細胞をFeeder細胞上で培養、直径300-500 $\mu$ mのコロニーをpick upし、Astrocyte Conditioned Medium (ACM)+bFGF存在下に4日間浮遊培養しNSSを作成した。NSSを接着培養へ移し周囲に遊走してくる神経幹細胞を回収し、継代・増殖させた。P3-P5の神経幹細胞をDMEM+10%FBS培地にてアストロサイトへ分化させた。RT-PCRにて分化過程における遺伝子発現の推移をみた

(移植実験) 8週齢の雌性SDラット(N=30)の第9-10胸椎レベルに、IH Impactorを用いて脊髄損傷を作成した。脊髄損傷3日後に、10万個/5 $\mu$ lのiPS細胞由来アストロサイトをHamilton syringeを用いて髄注したものをアストロサイト移植群(N=20)、DMEMを髄注したものをDMEM群(N=10)とした。免疫抑制剤として両群にサイクロスポリンを移植後2週間は注射、その後は飲料水に混入した。アストロサイトを移植する寸前にPKH26Red処理を行い移植細胞のマーカーとした。下肢運動機能評価として、毎週BBB scoreを、損傷8週時にInclined plane test、運動量解析をSCANET-MV40にて行った。脊髄損傷に伴うallodyniaの評価として、損傷8週時にThermal hyperalgesia test (熱刺激)と、Mechanical allodynia test (圧刺激)を行った。この際、脊髄損傷を起こしていないラット(N=5: ノーマル群)も加えて検討した。組織学的検討として残存髄鞘量(Luxol fast blue染色)、アストロサイト量(GFAP

Transplantation of astrocytes derived from induced pluripotent stem cell on an experimental spinal cord injury in rats

K. Hayashi, et al.

Key words: spinal cord injury (脊髄損傷), astrocyte (アストロサイト), transplantation (移植)

陽性面積)、疼痛ペプチド量(CGRP陽性面積)を計測した。

【結果】(分化誘導実験) 図1が作成したNSSである。右図のように表面にネスチン陽性の神経幹細胞が存在し、中心部はGFP緑色蛍光の残存する未分化な状態である。右下の図は位相差顕微鏡写真であり、NSS周囲に大量の神経幹細胞が遊走している。

## Neural Stem Sphere (NSS)と神経幹細胞

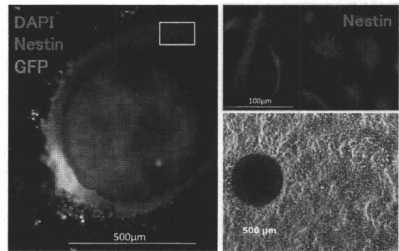


図1

作成した神経幹細胞を、DMEMと10%FBSの培地に移すとほとんどすべての細胞がGFAP陽性アストロサイトに分化した。分化細胞はGFAP, S100陽性であった。細胞の分化段階におけるRT-PCRを示す。iPS細胞はNanog, Oct3/4のみ強く発現し、神経幹細胞はNestinを最も強く発現した。アストロサイトはGFAPを強く発現していた(図2)。

## RT-PCR

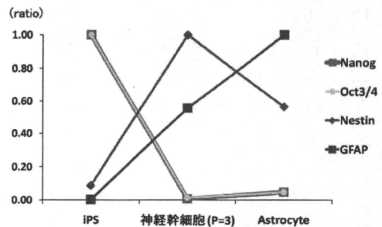


図2

(移植実験) BBB score他、全ての下肢運動機能評価に有意差はなかった。

Thermal hyperalgesia test (熱刺激) ではアストロサイト移植群は、ノーマル群に比し有意に熱刺激に過敏であった(図3)。

Mechanical allodynia test (圧刺激) では、アストロサイト移植群は、ノーマル群、DMEM群に比して有意にallodyniaが強かった(図4)。

### 熱刺激テスト

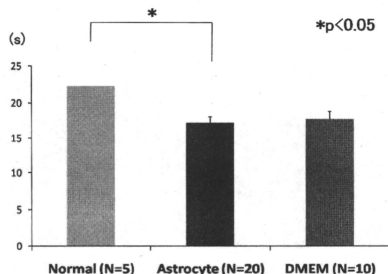


図3

### 圧刺激テスト

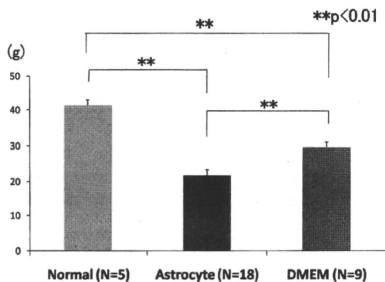


図4

移植細胞から出た突起は内在性アストロサイトの突起と並走していた。移植後8週時に移植細胞は残存していたが、GFAPの染色性は陰性となっていた。

残存白質量・アストロサイト量・疼痛ペプチド量において、両群間に有意差はなかった。

【考察】NSS法は手順が簡便であり、今回iPS細胞からアストロサイトの分化誘導に成功した。また神経幹細胞の継代・凍結保存が可能であった。今後iPS細胞からの神経系細胞分化法として臨床応用が期待される。

移植実験においては下肢運動機能の改善はなく、アストロサイト単独移植では効果が不十分であることが考えられた。

allodyniaの発生機序は、現在のところ不明な点が多いがHofstetter<sup>3)</sup>は神経幹細胞移植でallodyniaが生じたが、アストロサイトへの分化を抑制すると、allodyniaも減少したと報告し、Davis<sup>4)</sup>はアストロサイト移植にて、行動は改善せず、allodyniaが生じたと報告した。本研究においてもアストロサイト移植群で有意にallodyniaが増強しており、allodyniaの原因としてアストロサイトの関与が示唆された。脊髄損傷への細胞移植治療においてallodyniaの発生は大きな問題である。

【結論】NSS法を用いてマウスiPS細胞よりアストロサイトを分化した。得られたアストロサイトをラット脊髄損傷モデルに移植した。移植後8週時点で移植細胞は残存していたが、GFAPの染色性は低下していた。アストロサイト移植によりallodyniaの悪化がみられた。

#### 【文献】

- 1) Nakayama T, Motoki-Soga T, Yamaguchi K, et al : Efficient production of neural stem cell and neurons from embryonic stem cells. *NeuroReport* 15: 487-491, 2004
- 2) Nakayama T, Inoue N : Neural stem sphere method : induction of neural stem cells and neurons by astocyte-derived factors in embryonic stem cells in vitro. *Method Mol Biol* 330: 1-13, 2006
- 3) Hofstetter CP, Holmstrom NA, Lijia JA, et al : Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell graft; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci* 8: 346-353, 2005
- 4) Davies JE, Proschel C, Zhang N, et al : Transplanted astrocytes derived from BMP-or CTNF-treated glial precursors have opposite effects on recovery and allodynia after spinal cord injury. *J Biol* 7: Article7, 2008

# ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける bFGF徐放ゼラチンハイドロゲル移植の検討

古矢 文雄, 橋本 将行, 国府田 正雄, 松瀬 大\*, 大河 昭彦, 山崎 正志  
千葉大学大学院医学研究院整形外科,

\*東北大学大学院医学系研究科細胞生物学講座細胞組織学分野

【背景】脊髄損傷における細胞移植療法において、生着率を上げることは行動回復につながる可能性があり重要である。そのためScaffoldおよび細胞栄養因子との併用療法が近年注目されている。ゼラチンハイドロゲルは粒子状の水溶性生体吸収性高分子であり、細胞移植の際のScaffoldとしての役割を担うとともに、ゲル内に溶解した栄養因子を徐放する作用を併せ持っている<sup>1)2)3)</sup>。線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, 以下bFGF)は強力な血管新生作用、細胞増殖作用を持つ栄養因子である。諸家より神経細胞のapoptosisを抑制する働き<sup>4)5)6)7)</sup>や、脊髄再生の過程における神経前駆細胞の産生および細胞の分化を促す効果<sup>8)</sup>、脊髄損傷動物モデルにおける神経保護効果<sup>9)10)</sup>などが報告されている。今回の実験の目的はラット脊髄圧挫損傷モデルにおけるbFGF徐放ゼラチンハイドロゲル移植の治療効果を検討することである。

【対象および方法】図1に本実験のスケジュールを示す。8-10週齢雌性SDラットを使用し、ハロセン深麻酔下に第9-10胸椎を椎弓切離後、Infinite Horizon Impactorを用いて第9/10胸髄レベルに200Kdynで脊髄圧挫損傷モデルを作成した。損傷から1週後、脊髄損傷中心部にbFGF20 $\mu$ gを含有したゼラチンハイドロゲル0.4mg/8 $\mu$ lを注入した。今回はゼラチンの分解とともにbFGFが約2週間かけて徐放されるゲルを使用した。下肢運動評価として損傷後3日、1週、以後1週おきに9週までBBB scaleによる評価を行った。また損傷4、6、8週時点て斜面台に5秒間姿勢を保持できる最大角度を計測した (Inclined plane test)。下肢痛覚評価としてHargreaves device およびDynamic Plantar Aesthesiometerを用いたThermal hyperalgesia、Mechanical allodyniaの評価を損傷5、7、9週時点てそれぞれ行った。損傷後9週に大脳皮質運動野にBiotinylated dextran amine (BDA)を注入、皮質脊髄路の順行性トレーシングを施行した。損傷後11週時点て4%パラフォルムアルデヒドを用いて灌流固定を施行し、皮質脊髄路トレーシングの評価及び損傷空洞面積の計測を行った。ゼラチンハイドロゲルにbFGFを添加したものを注入したGel+bFGF群に対し、同量のゼラチンハイドロゲルのみを注入したGel単独群、同量の生理食塩水を注入した生食群を作成し比較検討を行った。統計学的検討については、BBB scaleではRepeated-measures ANOVAを用い各群の経時的

的变化を比較、Post-hoc testにはTurkey-Kramer法を用いた。その他の多群間の比較はOne-way ANOVAとTurkey-Kramer法を用いて検討、危険率95%以上を棄却した。

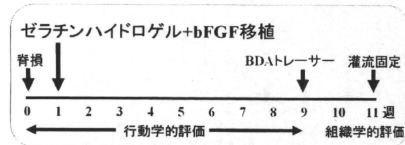


図1 実験スケジュール

【結果】皮質脊髄路の順行性トレーシングでは、Gel+bFGF群において多くの線維が損傷空洞の頭側端近傍まで到達しているのに対し、生食群は損傷部より離れた頭側ですでにdie backしている線維を多く認めた。矢状断切片にて損傷部頭側端におけるBDA陽性線維数をカウントした。Gel+bFGF群およびGel単独群では生食群に比べて多くのBDA陽性線維が認められる傾向を示したが有意差は得られなかった (図2)。損傷空洞面積は3群間に有意差を認めなかった (図3)。損傷9週時における各グループのBBB scaleはそれぞれGel+bFGF群9.9点、Gel単独群9.4点、生食群7.5点と、生食群に比べてGel+bFGF群およびGel単独群で改善傾向を認めたが有意差は得られなかった (図4)。また、Inclined Plane testにおいても生食群に比べGel+bFGF群およびGel単独群で行動学的改善傾向を認めたが有意差は得られなかった (図5)。Thermal hyperalgesiaの評価では3群間に有意差は認めなかった (図6)が、Mechanical allodyniaの評価では損傷7週後においてGel+bFGF群は生食群と比しallodynia状態の改善を認めた (図7)。

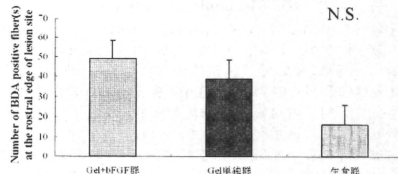


図2 CSTトレーシング

Effects of bFGF incorporated gelatin hydrogel transplantation in a rat spinal cord contusion model  
T. Furuya, et al.

Key words : Spinal cord injury (脊髄損傷), Scaffold (足場), bFGF (線維芽細胞増殖因子)



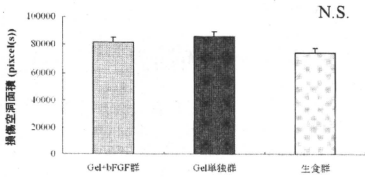


図3 損傷空洞面積 (クレシルバイオレット染色)

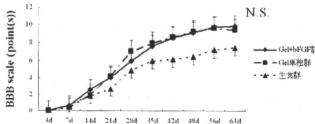


図4 BBB scale

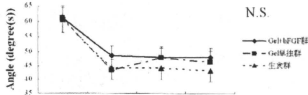


図5 Inclined plane test

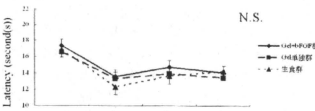


図6 Thermal hyperalgesia

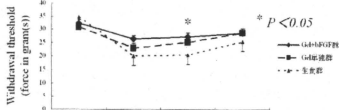


図7 Mechanical allodynia

【考察】 BBB scale, Inclined plane testにおいて有意差は得られなかったが、生食群と比しGel+bFGF群およびGel単独群において運動機能の改善傾向を認めた。これらはGel+bFGF群およびGel単独群は生食群に比べ損傷部頭側でBDA陽性線維数が多く認められる傾向があった組織像と相関していた。一方で行動学的、組織学的検討においてGel+bFGF群はGel単独群と比べbFGF併用投与の効果が認められなかった。原因として投与時期が損傷から1週時点と若干遅い可能性が考えられたが、Gel単独群においても生食群に比べ運動機能の改善傾向を示したのは興味深い結果であった。Gel+bFGF群におけるAllodyniaの改善に関しては引き続き組織学的評価を行い検討する予定である。以上より、ゼラチンハイドロゲルは脊髄損傷組織におい

て、行動回復を助長するような神経保護作用を持つ可能性が示唆された。

【謝辞】ゼラチンハイドロゲルをご提供いただいた京都大学再生医科学研究所生体組織工学研究部門生体材料分野田畑泰彦教授に深謝する。併せて本研究にあたりご指導、ご助言を賜った東北大学大学院医学系研究科細胞生物学講座細胞組織学分野出澤真理教授に深謝する。

【文献】

- 1) Tabata Y, Ikada Y. Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 31: 287-301.
- 2) Tabata Y. Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Eng* 2003; 9 (Suppl 1): S5-15.
- 3) Simon Y, Mark W, Tabata Y, et al. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Controlled Release* 2005; 109: 256-74.
- 4) Anderson KJ, Dam LS, Cotman CW. Basic fibroblast growth factor prevents death of lesioned cholinergic neurons in vivo. *Nature* 1988; 332: 360-1.
- 5) Otto D, Frotscher M, Unsicker K. Basic fibroblast growth factor and nerve growth factor administered in gel foam rescue medical septal neurons after fimbria fornix transection. *J Neurosci Res* 1989; 22: 83-91.
- 6) Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, et al. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1995; 65: 1740-51.
- 7) Kirschner PB, Henshaw R, Weise J, et al. Basic fibroblast growth factor protects against excitotoxicity and chemical hypoxia in both neonatal and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 619-23.
- 8) Zhang F, Clarke JD, Ferretti P. FGF-2 Up-regulation and proliferation of neural progenitors in the regenerating amphibian spinal cord in vivo. *Dev Biol* 2000; 225: 381-91.
- 9) Yang Dong Teng, Italo Mocchetti, Wrathall JR. Basic and acidic fibroblast growth factors protect spinal motor neurons in vivo after experimental spinal cord injury. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 798-802.
- 10) Yang Dong Teng, Italo Mocchetti, Wrathall JR, et al. Basic fibroblast growth factor increases long-term survival of spinal motor neurons and improves respiratory function after experimental spinal cord injury. *J Neurosci* 1999; 19(16): 7037-47.

# ラット脊髄圧挫損傷慢性期における細胞外マトリックス分解促進によるグリア瘢痕抑制効果

川辺 純子, 国府田 正雄\*, 橋本 将行\*\*, 大河 昭彦, 山崎 正志  
千葉大学整形外科, \*千葉市立青葉病院 整形外科, \*\*千葉市立海浜病院 整形外科

【目的】脊髄損傷後、脊髄内部では急性期から慢性期にかけて様々な化学的・物理的変化が起こる。損傷の直接的刺激で出血や、Blood Spinal cord Barrier (BSB)の破綻、神経組織の機械的圧縮などの一次損傷に引き続き、さまざまな分子のcascade reactionが起こり、最終的には内部に空洞を伴ったグリア瘢痕を形成し、慢性化する。

現在脊髄損傷に対する治療研究においては、慢性化する前の二次損傷を軽減させ、さらに脊髄再生を促進させるため、急性期および亜急性期に投与する薬物療法と細胞移植による治療が有望視されている。慢性期脊髄損傷の治療研究としてはこれまでに瘢痕を外科的に切除する方法や、酵素投与により瘢痕を切除する方法などの治療効果が報告されているが、急性期治療研究と比べて報告は少ない。慢性期のグリア瘢痕は、反応性アストロサイトを主な構成細胞としており、軸索進展を物理的にブロックする他、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)を発現し、化学的にも軸索進展阻害作用を示し神経再生に不利な状況を作り出している。

今回我々は脊髄損傷慢性期治療の為、CSPGを分解し得る酵素の一つとしてMMP-2に注目した。MMP-2はMatrix Metalloprotease Familyのgelatinase群のひとつで、脊髄損傷後の病態との関連がいくつか報告されている。脊髄損傷後の発現時期および活性持続期間より、瘢痕形成に何らかの関係があると示唆されており、またその活性化とCSPG溶解の関連についても報告がある。今回の研究の目的は脊髄損傷慢性期のグリア瘢痕を内在性MMP-2の発現増強・活性化によって制御可能かどうかを検討することである。

【対象と方法】(in vitro)生後3日のSDラット大脳皮質よりアストロサイトを中心としたグリア細胞培養を行い、アストロサイトの活性化サイトカインであるTGF- $\beta$ 1、およびマクロファージの強力な活性物質であるリポポリサッカライド(LPS)刺激の有無により、4群に分ける。各群において、免疫組織学的評価・real time PCR・MMP活性評価のためのゼラチンゼイモグラフィ、さらに培養グリア細胞の細胞外マトリックスを用いたneurite assayを行った。

Neurite assayは各群に、0.2%トライトン処理を加え、細胞を溶解除去。残った細胞外マトリックス上に小脳顆粒球細胞を散布し、24時間後計測を行った。

(in vivo)SDラットのメス10~11週齢に、脊髄圧挫損傷モデルを作成(IH impactor 200kdyne, Th9/10)。LPS群とControl群にランダムに分けた。LPS群は、受傷後4週日よりLPS 10 $\mu$ g/dayを連続5日間腹腔内投与、control群は同量の生理食塩水を投与した。検討項目はCSPGの発現を組織学的検討にて評価。RT-PCRにてCSPG, MMP-2のmRNAレベルの発現状況を検討し、後肢運動機能評価はBBB scaleを用いて行った。

【結果】(in vivo)アストロサイトのマーカーであるGFAPとCSPGの一種であるNeurocanの二重染色像。4群すべてにおいて細胞間にneurocanが認められ、controlと比較してTGF刺激後の細胞ではNeurocanの発現密度が増強していた。また、位相差顕微鏡像ではアストロサイトの細胞形態の変化を認めた。Controlと比べてTGF刺激後は細胞が密集して放射状に突起伸長がみられた(図1)。

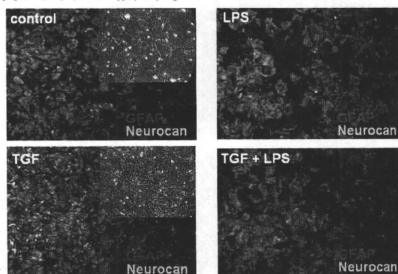


図1. GFAP/Neurocan 二重免疫染色像

Real time PCRは、Control群に対して各群のCSPGおよびMMP-2のmRNA発現を相対的定量法により比較検討した。TGF刺激によりCSPGのmRNAの発現が増強する傾向が見られたが、有意差は認めなかった。MMP-2活性をゼラチンゼイモグラフィにて評価した。Positive controlの活性型MMP-2のバンドを右端に示す。TGFおよびLPSの刺激によりゼラチンの溶解がみられ、MMP-2の活性が他群と比較して高いことがわかる(図2)。

Suppression of glial scar inhibition by promoting degradation of extracellular matrix after chronic spinal cord injury in rats  
J. Kawabe, et al.

Key words : chronic spinal cord injury, chondroitin sulfate proteoglycans (CSPG), matrix metalloproteinase

図2 Gelatine Zymography

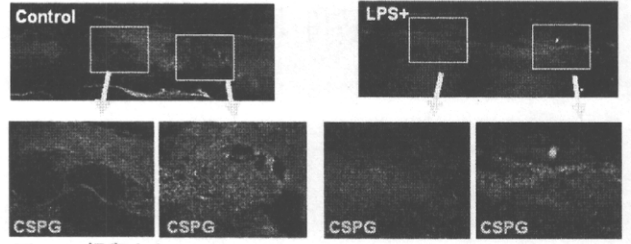
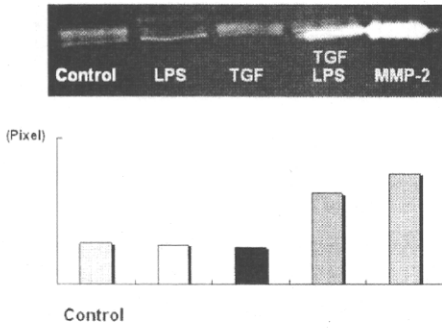


図4 a: 損傷中心のCSPG

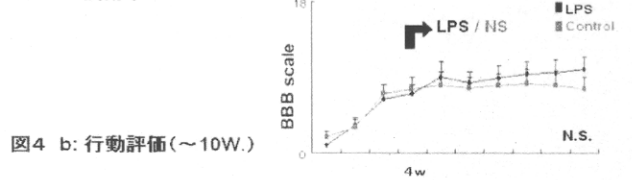


図4 b: 行動評価(～10W.)

Neurite assayでは各群ともに神経突起伸長は見られたが、TGF+LPS群は突起伸長が良好であり、定量化したグラフではTGF単独投与群との間には有意差を認めた。さらにTGF+LPS群にMMP-2阻害剤を添加すると、軸索進展が現れる傾向にあり(図3)、

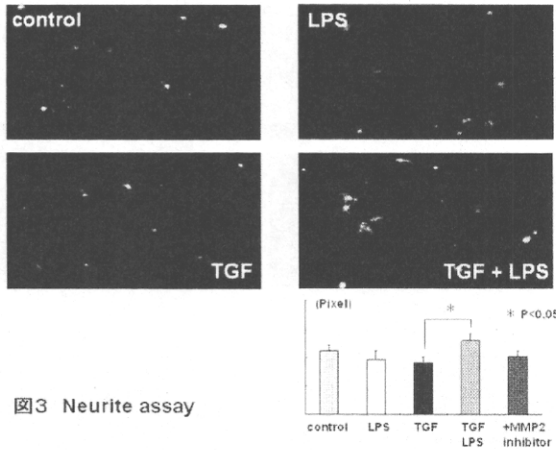


図3 Neurite assay

この結果はTGF刺激でCSPGが増加し、軸索伸長阻害作用を示し、これにLPSを加えると、MMP-2活性化が高まりCSPG分解促進し、軸索伸長阻害作用がキャンセルされるという仮説を裏付けるものと考えられる。(in vivo) 受傷後5週目、薬剤投与開始から1週目の脊髄を用いてsagittal切片を作製し、CSPGの抗体であるCS56を用いて免疫染色を行った。Control群では損傷部周囲にCSPGの発現が散見されるのに対して、LPS投与群では発現が減弱していた(図4-a)。Real Time PCRは両群間に有意差は見られなかった。後肢運動機能評価はBBB scaleをもちいて行った。受傷後10週までのBBB Scaleの推移に両群間で有意差はなかった(図4-b)。

【考察】脊髄損傷後、脊髄内では出血、blood spinal cord barrierの破綻、炎症など様々な病的イベントを経て、結果的にグリア瘢痕を形成し、慢性化する。グリア瘢痕からはCSPGの発現が増強し、軸索伸長阻害作用を示すため、脊髄損傷慢性期の治療としては、グリア瘢痕、CSPGの軸索進展阻害作用の制御が必要不可欠である。今回、内在性MMP-2の発現増強あるいは活性化が誘導されるとCSPGが分解され、軸索伸長阻害作用もキャンセルされるという仮説の元の実験を行った。

TGF刺激にてastrocyteの形態変化が生じ、細胞外マトリクス内のCSPG発現が増強した。TGFおよびLPS刺激したsampleではCSPGのmRNAレベルでの発現変化はないものの、MMP-2の活性が増強することがわかった。

TGFおよびLPS刺激したsampleではTGF単独刺激のsampleと比較して軸索伸長が有意に促進されたこと、さらにはここにMMP-2阻害剤を加えることにより、その促進効果が打ち消された結果を見ると、MMP-2活性化が誘導されると、CSPGの軸索進展阻害作用が抑制され、神経再生に有利な環境が構築されることが示唆された。一方vivoでは受傷後5週目脊髄内にもCSPGは発現しており、LPS投与群では発現が減弱していたが、受傷後10週目までは後肢運動機能に有意差はなかった。この結果はLPS投与により、内在性MMP-2活性化増強以外の作用が行動に影響している可能性を示している。今後はMMP-2活性化を促進する他の薬剤での検討も行っていく予定である。

# ラット脊髄損傷に対するシロスタゾール投与の有用性の検討

林 浩一, 橋本 将行, 国府田 正雄, 大河 昭彦, 山崎 正志  
千葉大学大学院医学研究院整形外科

## 【背景】

phosphodiesterase3 (以下PDE3) 阻害薬であるシロスタゾール (商品名プレタル) は、末梢血管拡張・血小板凝集抑制作用を有し、塞性動脈硬化症の治療薬、脳梗塞の再発予防薬として臨床に用いられている。脳梗塞モデルにシロスタゾールを投与したところ、白質のアポトーシスが減少した、との報告が複数なされている<sup>1)2)3)</sup>。これはシロスタゾールがcAMPの分解を阻害することによって、cAMP-responsive element binding protein (以下CREB) のリン酸化を介した神経保護作用によるものであるといわれている<sup>4)5)</sup>。また脊髄損傷研究においても、シロスタゾール同様、細胞内cAMPの分解を阻害するPDE4阻害薬であるロリプラムを、ラット脊髄損傷モデルに使用したところ、有意に行動が回復した、との報告もあり<sup>6)</sup>、cAMPの分解を防ぐことにより軸索再生がもたらされる可能性が考えられている。

## 【目的】

ラット脊髄損傷に対してシロスタゾールを投与し、その有用性を検討すること。

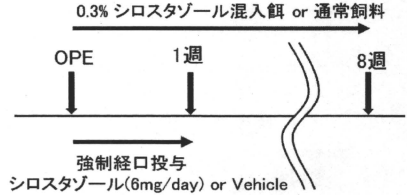
## 【対象】

生後8週のSDラットに、IH impactorを用いて脊髄圧挫損傷モデルを作成し、シロスタゾール投与群とコントロール群にわけた。その2群に対して、シロスタゾールの投与時期にて、I.術後投与 (急性期投与)、II.術前投与 (予防的投与)、III.慢性期投与、の3つの実験を行った。

## 【方法I】

術後投与実験 (急性期投与) では、シロスタゾール群に対して脊髄圧挫損傷手術直後より、1週間シロスタゾール6mgを連日強制経口投与し、また同時に8週間0.3%シロスタゾール混入餌を投与した。コントロール群に対しては、ビークルと通常飼料を投与した。検討項目として、BBB scoreの他、3種類の下肢運動機能評価 (Rota-rod test, Inclinedplane test, Footprint analysis) を行い、組織学的検討として、残存白質量の計測、p-CREB、オリゴデンドロサイトのカウントを行った。

## I 術後投与実験 (急性期投与)



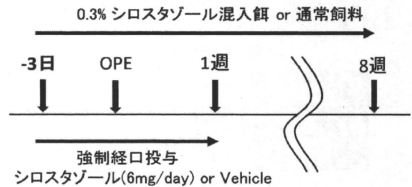
## 【結果I】

BBB scoreに有意差はなく、また、他の下肢運動機能評価にも有意差はなかった。残存白質量を、損傷部頭側3mmの部位と、損傷中心部にて検討したが有意差はなかった。p-CREB陽性細胞数を、損傷中心部より頭側2mmの部位と、尾側2mmの部位で、灰白質・白質にわけてカウントしたが有意差はなかった。また、オリゴデンドロサイト陽性細胞数を、損傷中心部と、尾側4mmでカウントしたが有意差はなかった。

## 【方法II】

術前投与実験 (予防的投与) では、脊髄圧挫損傷手術の3日前から、手術後1週間目まで、先の実験同様にシロスタゾールまたはビークルを投与し、かつシロスタゾール混入餌または通常飼料を8週間まで投与した。BBB スコア、体重、残尿量、inclinedplane test、空洞面積を検討した。

## II 術前投与実験 (予防的投与)



## 【結果II】

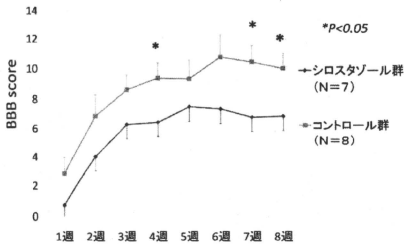
BBB scoreにて、シロスタゾール投与群は損傷直後より終始行動回復が不良であり、4週目、7週目、8週目まで有意に不良であった。体重・残尿量・inclinedplane testでは有意差はなかった。空洞面積は、Scion Image softwareを用いて計測したが、有意差はなかった。

Effects of cilostazol on an experimental spinal cord injury in rats

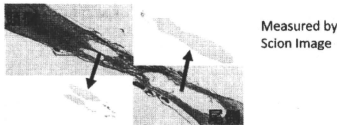
K. Hayashi, et al.

Key words : cilostazol (シロスタゾール), spinal cord injury (脊髄損傷), platelet aggregate inhibitor (血小板凝集阻害薬)

結果 II BBB score



結果 II 空洞面積



	空洞面積 (pixel)	
シロスタゾール群 (N=7)	110412.6 ± 6234.4	] N.S.
コントロール群 (N=8)	135210.9 ± 11635.1	

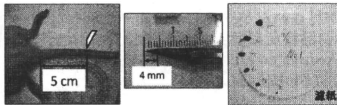
【方法III】

慢性期投与実験では、脊椎圧挫損傷手術より5週間通常飼料を投与し、5週目よりシロスタゾール混入餌もしくは通常飼料を10週目まで投与した。BBB score、inclinedplane testを行い、また、手術後6から7週の時点で、出血時間を検討した。

【結果III】

BBB score、inclinedplane testに有意差はなかった。出血時間は、デューク法に準じて、尾部をメスで穿刺し、出血が止まる時点を出血時間とした。両群間に有意差はなかった。

結果 III 出血時間



	出血時間 (秒)	
シロスタゾール群 (N=10)	94.5 ± 4.5	] N.S.
コントロール群 (N=9)	96.7 ± 6.2	

【結果のまとめ】

術前投与実験（急性期投与）では、行動評価・組織学的評価において、全て有意差はなかった。術前投与実験（予防的投与）では、シロスタゾール群は損傷直後より有意に行動回復が不良であったが、空洞面積には有意差はなかった。慢性期投与実験では、行動評価・出血時間において有意差はなかった。

【考察】

術前投与実験において、シロスタゾール投与群は損傷直後より終始行動回復が不良であった。Wilhiteら<sup>7)</sup>は、ヒトにおいて 各種血小板凝集抑制剤を比較検討したところ、シロスタゾール単独では、有意な出血時間の延長はないと報告しており、本研究においても、空洞面積・肉眼的出血時間に有意差はなかった。このことから、「微小出血が、脊髄損傷の程度を増強した可能性がある」と考えた。

【文献】

- 1) Lee JH, Park SO, Shin YW, et al. Neuroprotection by cilostazol, a phosphodiesterase type 3 inhibitor, against apoptotic white matter change in rat after chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res* 2006; 1082: 182-191
- 2) Watanabe T, Zhang N, Liu M, et al. Cilostazol protects against brain white matter damage and cognitive impairment in Rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 2006; 37: 1539-1545
- 3) Lee JH, Park SO, Shin YW, et al. Concurrent administration of cilostazol with donepezil effectively improves cognitive dysfunction with increased neuroprotection after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Brain Res* 2007; 1185: 246-255
- 4) Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993; 262: 1274-1277
- 5) Walton M, Sirimanne E, Williams C, et al. The role of cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) in hypoxic-ischemic brain damage and repair. *Mol Brain Res* 1996; 43: 21-29
- 6) Pearce D, Pereira FC, Marcillo AE, et al. cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Neuroscience* 2004; 10: 610-616
- 7) Wilhite DB, Comerota AJ, Schmieder FA, et al. Managing PAD with multiple platelet inhibitors: The effect of combination therapy on bleeding time. *J Vasc Surg* 2003; 38: 710-713

# 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

川辺 純子, 國府田 正雄\*, 門田 領, 大河 昭彦, 山崎 正志  
千葉大学大学院医学研究院整形外科, \*千葉県立東金病院整形外科

【目的】顆粒球コロニー刺激因子 (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、末梢血管細胞移植ドナーに臨床使用されている。また近年、中枢神経系における神経保護効果が報告されており、我々はこれまでに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。

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、脊髄損傷モデルでの検討はまだまだなされていない。また、背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<sup>3)</sup>、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。今回私たちは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。

【方法】成雌SDラットの10~11週齢を全身麻酔下に laminectomy し、Infinite Horizon Impactor を用いて (200Kdyne)、脊髄圧挫損傷モデルを作成。G-CSF群 (recombinant human G-CSF 15  $\mu$ g/kg)、Control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。

(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、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。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：血管新生に関与するサイトカイン (vascular endothelial growth factor / angiopoietin 1 / hepatocyte growth factor / Fibroblast growth factor 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BBB scale、および10週目でのinclined plane testにて検討した。

【結果】(1) 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。また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。

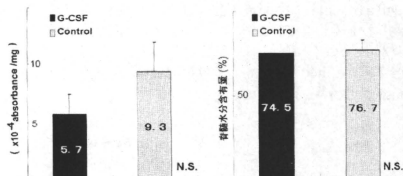


図1. 蛍光色素血管外漏出量と脊髄水分含有量

(2) 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、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。CSTでは部位別の有意差は認めなかったものの、測定した全血管数の平均値はG-CSF群で有意に新生血管が増加していた。

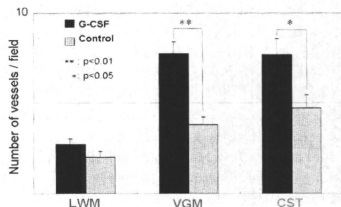


図2. 各領域の新生血管数

The effects of Granulocyte Colony-stimulating factor on vasculature after spinal cord injury in rats.

J. Kawabe, et al.

Key words : spinal cord injury (脊髄損傷), G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子), Angiogenesis (血管新生)

(3)G-CSF群ではVEGF/ HGF/ FGF2 のサイトカインの mRNA発現が非損傷群との比較において有意に増強した。

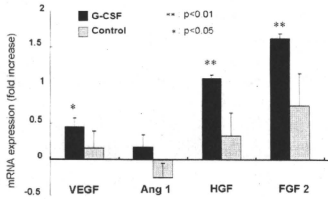


図3. 血管新生に関わるサイトカイン mRNA発現

(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。

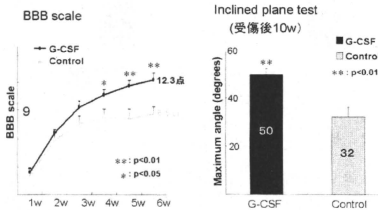


図4. 後肢運動機能評価

【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<sup>4)5)</sup>。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。すなわち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、これらの作用が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。

文献

- 1) Shabitz WR, et al : Neuroprotective effect of Granulocyte Colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. Stroke 34: 745-751, 2003.
- 2) Lee ST, et al : Granulocyte Colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. Brain Res 1058: 120-128, 2005.
- 3) Loy DN, et al : Temporal progression of angiogenesis and basal lamina deposition after contusive spinal cord injury in the adult rat. J Comp Neurol. 445: 308-324, 2002.
- 4) Koda M, et al : 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: 223-231, 2007.
- 5) Nishio Y, et al : Granulocyte Colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. J Neuropathol Exp Neurol 66(8): 724-731, 2007.

# ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける骨髄間質細胞(BMSC)移植と Rhoキナーゼ阻害薬の併用による治療効果

古矢 丈雄, 橋本 将行\*, 国府田 正雄\*, 大河 昭彦, 山崎 正志  
千葉大学大学院医学研究院整形外科, \*千葉県立東金病院

【背景】近年の幹細胞生物学の進歩により、従来は再生不能とされてきた脊髄損傷に対し数多くの細胞移植治療の報告がなされている。一方、細胞移植単独では機能回復が限定的であり、臨床的に意義のある改善が得られないという報告も多い。そのために細胞移植と薬剤との併用療法の必要性がクローズアップされてきている。現在までに我々は損傷脊髄に対する細胞移植ソースとして、骨髄より得られる造血幹細胞<sup>1)2)</sup>、骨髄由来分化細胞<sup>3)</sup>を用いた実験を行い比較的良好な成績を得ている。骨髄間質細胞 (Bone marrow stromal cell、以下BMSC) は、自家骨より容易に採取可能であること、培養が比較的容易であること、Stem cell likeな多能性をもつことから自家細胞移植にたびたび用いられる細胞ソースである。BMSCの一部の間葉系幹細胞はneuronやgliaに分化するといわれ<sup>4)</sup>、またBMSCは軸索伸張のためのtrophic factorを分泌すると報告されており<sup>5)</sup>、移植により軸索伸張作用、神経保護効果が期待される。Rhoキナーゼ阻害薬 (Fasudil) はくも膜下出血後の脳血管攣縮改善薬として臨床使用されている薬であり、細胞内においてはRho-kinaseを阻害することにより、神経軸索の退縮や細胞死を減少させることが知られている。当教室の西尾らは急性期ラット脊髄損傷に対するくも膜下腔注射による行動回復を報告している<sup>6)</sup>。今回の実験の目的はBMSC移植にRho-kinase阻害薬 (Fasudil) を併用し更なる回復が得られるかどうかを検討することである。

【対象および方法】図1に当実験のスケジュールを示す。(BMSCの採取と培養) GFP transgenic SDラットの両大腿骨・下腿骨より髓腔内容を取り出し、附着性の細胞を継代培養し、得られた細胞をBMSCとした。得られた細胞をBMSCのマーカーであるnestin、fibronectin、vimentin、CD90にて染色した。移植には4-8回継代したものを使用した。(手術) 雌性SDラット9週齢を使用、ハロセン深麻酔下第9-10胸椎椎弓切除、Infinite Horizon Impactorを用いて第9/10胸椎レベルに圧挫損傷モデルを作成した(200Kdyn)。直後に第1腰椎を椎弓切除し、オスモチックポンプに接続したシリコンチューブを同部位よりも膜下腔に刺しFasudilの持続注入(180  $\mu$ g/日)を4週間施行した。損傷から2週後再手術によって損傷部を露出、BMSCを損傷部より2mm遠位と近位にそれぞれ2.5  $\mu$ lずつ計2.5  $\times$  10<sup>6</sup>個注入した。損傷後9週に大脳皮質運動野に

Biotinylated dextran amine (BDA) を注入、皮質脊髄路の順行性トレーシングを施行した。(各グループ) BMSC単独群 (生食くも膜下腔注射+BMSC移植)、Fasudil単独群 (Fasudilくも膜下腔注射+生食移植) およびコントロール群 (生食くも膜下腔注射+生食移植) を作成し、併用群との比較検討を行った。(下肢運動評価) 損傷後3日、1週、以後1週おきに9週までBBBスコアによる行動評価を行った。9週時点でFootprints analysisを行い、歩幅、ストライド、回旋につき評価した。(下肢温痛覚評価) Dynamic Plantar Aesthesiometer、Hargreaves deviceを用いて知覚の評価を行った。(組織学的評価) 損傷後11週時点で4%パラフォルムアルデヒドを用いて灌流固定を施行し、組織学的評価を行った。損傷空洞面積の測定、抗GFP抗体、glia、neuronのマーカーを用いた移植細胞の評価、皮質脊髄路トレーシング、neurofilamentおよびserotonin線維数のカウントを行った。(統計学的検討) BBBスコアではRepeated-measures ANOVAを用い各群の経時の変化を比較、Post-hoc testにはTurkey-Kramer法を用いた。その他の多群間の比較はOne-way ANOVAとTurkey-Kramer法を用いて検討、危険率95%以上を棄却した。

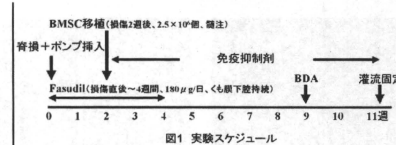


図1 実験スケジュール

【結果】移植細胞の蛍光免疫染色ではnestin、fibronectin、vimentin、CD90各マーカー陽性であり、諸家のBMSCの報告と一致した。BBBスコアは、Repeated-measures ANOVAにおいては有意差を認めなかったが、BMSC+Fasudil併用群で損傷8週・9週においてコントロール群と比べ有意に改善を認めた。9週時点での各群の平均スコアは併用群12.9点、BMSC単独群11.5点、Fasudil単独群11.7点、コントロール群10.8点であった(図2)。Footprintsに有意差を認めなかった。下肢温痛覚評価では治療によるアロデニア・知覚過敏症状の悪化を認めなかった。損傷空洞面積は併用群ではコントロール群と比較し縮小を認めた(図3)。移植細胞の残存数と脱分化の評価を行うため、抗GFP抗体とglia、neuronのマーカーとの蛍光二重染色を行った。併用群、BMSC移植単独群双方にて抗GFP抗体陽性細胞の残存を認めるも数は非常に少なかった。多くの細胞は注入部位にとどまっていたが一部の移植細胞はhost実質内へmigrationしていた。併用群とBMSC移植単独群では残存数に差は認めなかつ

The effects of combined therapy using bone marrow stromal cell and Rho-kinase inhibitor in a rat spinal cord contusion model

T. Furuya, et al.

Key words : Spinal cord injury (脊髄損傷), BMSC (骨髄間質細胞), Rho-kinase inhibitor (Rhoキナーゼ阻害薬)



た。移植BMSCとアストロサイト(図4)、オリゴデンドロサイト、ニューロンのマーカーとのマージは認めなかった。皮質脊髄路トレーシングでは併用群およびFasudil単独群において損傷部より尾側の灰白質内にBDA陽性線維が認められた(図5)。BMSC単独群・コントロール群では損傷部を越えた線維は認められなかった。Sagittal切片にて損傷部、および2.5、5.0mm 頭尾側地点での横断するneurofilament陽性線維数をカウントしたが各群間で線維数の差を認めなかった。また、serotonin陽性線維数のカウントでは損傷部より2.5mm頭側で併用群はBMSC単独群と比べ陽性線維が多く認められた(図6)。

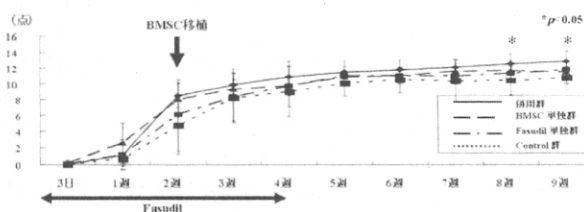


図2 BBBスコア

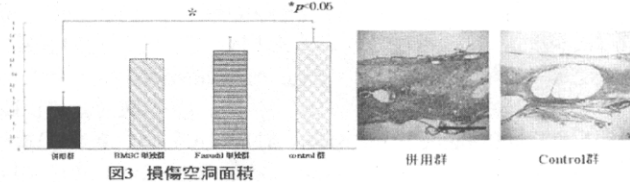


図3 損傷空洞面積

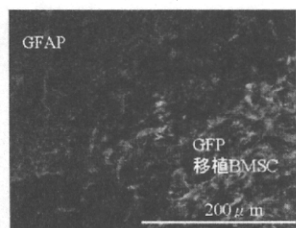


図4 GFP/GFAP蛍光二重染色 併用群

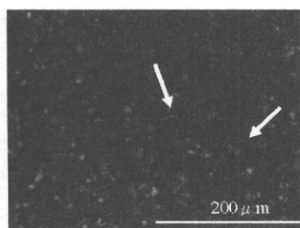


図5 皮質脊髄路トレーシング 損傷部尾側 灰白質

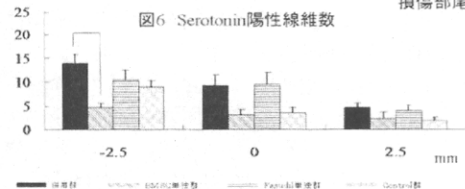


図6 Serotonin陽性線維数

【考察】Fasudilのくも膜下持続投与およびBMSC移植の併用治療により損傷空洞面積の縮小が認められ、BBBスコアにおいてコントロールに比較し有意な改善を示した。Fasudilの軸索退縮抑制作用、神経保護作用、BMSC移植による栄養因子の分泌による軸索や神経細胞に対するtrophic supportにより、残存組織の壊死を減少させ、軸索の再生に有利な環境を創出できたことが考えられる。特に併用群において損傷部頭側でserotonin陽性線維数の増加を認め、皮質脊髄路のトレーシングで損傷部より遠位にBDA陽性線維がみられた

ことより、再生線維、あるいは残存線維の生存環境を併用療法が改善させたと考える。西尾らはFasudilの2週間連続投与によって、コントロールに比べ有意な下肢運動機能の回復を報告している。今回Fasudil単独群においてコントロールに比べ有意な改善が得られなかった。本実験ではFasudilの効果は容量依存性と考え、投与を4週間に伸ばしたため、有意な改善が得られなかった可能性がある。最近ではRho阻害薬による軸索伸展阻害因子CSPGの増加の報告もあり<sup>7)</sup>、いたずらに投与期間を長くするのしかえって逆効果であった可能性が考えられる。単独治療と比べ併用治療による劇的な効果が得られなかった原因として、上記のようにFasudilの投与期間等の問題以外、BMSCの残存細胞数が少ないことが考えられる。本実験では移植BMSCのmigrationを観察すべく移植部位を損傷部頭尾側とした。結果的に残存移植細胞は少なく、migrationも一部にしかみられなかった。BMSCを生存させ、trophic supportによる移植効果を引き出すには(空洞に補充するように)損傷部位に直接移植を行う方法のほうがよいのかもしれない。また今回移植時期を損傷2週としたが、glial scarの完成される時期であり神経保護の観点からすると移植時期としては若干遅く、今後の検討課題と思われた。

【Acknowledgement】Fasudilは旭化成株式会社、千葉大学大学院医学研究院神経生物学山下俊英教授より譲渡を受けた。

- 【文献】1)Koda M, Okada S, Nakayama T, et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. Neuroreport 2005 Nov 7;16(16):1763-7.  
 2)Koshizuka S, Okada S, Okawa A, et al. Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. J Neuropathol Exp Neurol 2004 Jan;63(1):64-72.  
 3)Kamada T, Koda M, Dezawa M, et al. Transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells promotes axonal regeneration and functional recovery after complete transection of adult rat spinal cord. J Neuropathol Exp Neurol 2005 Jan;64(1):37-45.  
 4)Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. J Clin Invest 2004;113(12):1701-10.  
 5)Qu R, Li Y, Gao Q, Shen L, et al. Neurotrophic and growth factor gene expression profiling of mouse bone marrow stromal cells induced by ischemic brain extracts. Neuropathology 2007 Aug;27(4):355-63.  
 6)Nishio Y, Koda M, Kitajo K, et al. Delayed treatment with Rho-kinase inhibitor does not enhance axonal regeneration or functional recovery after spinal cord injury in rats. Exp Neurol 2006 Aug; 200(2): 392-397.  
 7)Chan CC, Wong AK, Liu J et al ROCK inhibition with Y27632 activates astrocytes and increases their expression of neurite growth-inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. Glia 2007 Mar;55(4):369-84

# 日本脊椎脊髓病学会雑誌

第19巻 第1号

2008年3月20日発行

**The Journal of  
the Japanese Society for Spine Surgery  
and Related Research**

Vol. 19 No. 1

March 20, 2008

**第37回日本脊椎脊髓病学会号**

The 37th Annual Meeting of  
the Japanese Society for Spine Surgery and Related Research

会 長： 里 見 和 彦

会 期： 平成20年4月24日(木)・25日(金)・26日(土)

開催地： 東京都

1-4-D2-3

## 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

川辺 純子, 國府田 正雄\*, 門田 領, 橋本 将行\*, 萬納寺 賢人, 宮下 智大, 藤由 崇之, 古矢 文雄,

遠藤 友規, 林 浩一, 大河 昭彦, 山崎 正志, 高橋 和久  
千葉大学大学院医学研究院整形外科, \*千葉県立東金病院整形外科

【目的】顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte-Colony Stimulating Factor; G-CSF)は好中球系細胞の成長因子であり、現在好中球減少症などに臨床使用されている。近年、中枢神経保護効果も報告されており(Shabitz 2002)、我々も脊髄圧挫損傷モデルでの神経保護効果を過去に報告した(西尾2005、門田2006)。

脊髄損傷において血管新生はその組織修復反応と行動の回復に関係するとされている(Loy 2002)。またG-CSFには損傷後の脳浮腫を軽減させる(Gibson 2005)、血管新生を促進する働きもある(Ohki 2005)。これらより、G-CSFが脈管系への作用を介した神経保護効果を持つ可能性がある。

今回、ラット脊髄圧挫損傷モデルを用いて、Blood-Spinal cord-Barrier (BSB)損傷および血管新生に対するG-CSFの効果およびその機序を検討した。

【方法】(実験1)成雌ラット脊髄圧挫損傷モデル(IH spinal cord impactor, 200Kdyne, T8/9 level)を作成、2群に分けた。G-CSF群はhuman recombinant G-CSF 15  $\mu$ g/kg/dayを、受傷後1時間より経静脈的に5日間連続投与、対照群は同量の生理食塩水を投与した。受傷後3日目に、脊髄損傷部のBSB損傷の評価を以下の2方法で行った。i) 損傷脊髄を抽出。以下の測定値により脊髄内水分含有量の割合を算出した;(湿重量-乾重量)/湿重量 $\times$ 100。ii) 蛍光色素塩溶液を静脈注射、1.5時間還流させた後、生理食塩水を還流させ血管内の色素を除去。損傷部を取り出し、血管内漏出した色素を蛍光測定器にて計測した。

(実験2)実験1同様に脊髄損傷モデルを作成、薬剤を投与。損傷1週、2週で脊髄損傷部を取り出し、横断切片標本を製作。Von Willebrand factorを用いて血管内皮細胞を免疫染色。その径が20  $\mu$ m以上のものを新生血管と定義し、脊髄横断面の3箇所(ventral gray matter, lateral white matter, cortical spinal tract)にてカウントした。

(実験3)実験1同様に脊髄損傷モデルを作成、薬剤を投与。受傷後12時間後に脊髄抽出。real time PCRにより、血管新生に関わる各種サイトカインの発現の計測を行った。

(実験4)実験1同様に脊髄損傷モデルを作成、薬剤を投与。各群の後肢運動機能をBBB locomotor scale

とinclined plane testを用いて受傷後1週目から受傷後6週まで経時的に評価した。

【結果および考察】(1)BSBに対する評価は、脊髄水分含有量および蛍光色素の血管外漏出検査ともに、有意な差は認めなかった。(2)新生血管数は、G-CSF群で有意に多かった。(3)Real time RT-PCRではG-CSF群は非損傷群・生食投与群との比較において、測定した各種サイトカイン発現の増加を認め、特に非損傷群との比較では有意差を認めた。(4)G-CSF群では対照群に比較して後肢運動機能は有意に回復した。

Michaelらはラットの脳損傷モデルでG-CSF投与によりBlood Brain Barrier透過性が上昇したと報告している(2000)。一方Gibsonらはマウス脳虚血モデルにおいてG-CSFは脳浮腫を軽減させたとの報告をしている。今回の実験では脊髄浮腫およびBSB透過性ともに両群に差はなかった。その理由として損傷モデルやG-CSF投与量の違いが考えられる。血管新生に対しては過去にLee (2005)・Lu (2006)が脳虚血モデルでG-CSFの血管新生効果を報告しており、今回の結果とも矛盾しない。またその血管新生の作用機序にはVEGFの関与が示されている(Minamino 2005)。今回の研究では、G-CSF投与により、新生血管の増加が確認された。また、治療により血管新生を促進させるサイトカインの発現が増強していた。これより血管新生に対してのG-CSFの働きは、サイトカインを介した作用であると考えられる。

以上に述べた働きと過去に我々が報告したG-CSFの脊髄損傷における神経保護効果、およびニューロン・オリゴデンドロサイトの抗アポトーシス作用、抗炎症作用等が相乗的に働き、2次損傷を軽減し良好な行動回復をもたらした可能性がある。

【結論】以上より、G-CSFは血管系にも働きかけて神経保護効果を示す脊髄損傷治療薬としての可能性が示唆された。

The effects of G-CSF on vasculature in rat spinal cord injury  
J. Kawabe, et al.

Key words : G-CSF, spinal cord injury, angiogenesis

---

第 23 回  
日本整形外科学会基礎学術集会  
抄 録 集

The 23rd Annual Research Meeting of  
the Japanese Orthopaedic Association  
ABSTRACTS

会 長 高 倉 義 典 (奈良県立医科大学整形外科学教室)  
会 期 平成 20 年 10 月 23 日(木)・24 日(金)  
会 場 国立京都国際会館(京都市)

---