

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業)  
分担研究報告書

脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波治療に関する研究

研究分担者：小澤 浩司 東北大学整形外科准教授

研究協力者：八幡健一郎、菅野晴夫、山屋誠司

研究要旨

ラット脊髄損傷モデルに対する低出力体外衝撃波治療の安全性を確認し、運動機能やアロディニアを改善するか検討した。低出力体外衝撃波治療は、様々な神経系細胞から VEGF の発現を促し、血管新生を促進した。その神経保護効果によって細胞死や軸索損傷を抑制し、運動機能のみならず知覚機能を改善した。

A . 研究目的

体外衝撃波治療 (Extracorporeal shock wave therapy (ESWT)) は臨床で広く用いられている。近年、低出力の体外衝撃波照射が、in vitro において HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: ヒト臍帯静脈血管内皮細胞) で VEGF (vascular endothelial growth factor: 血管内皮細胞増殖因子) の発現を上昇させることが報告された。低出力体外衝撃波治療は虚血性心疾患や皮膚潰瘍モデルの in vivo においても、VEGF の発現を上昇させ血管新生を促進し組織修復および症状改善の効果をもつ。VEGF は血管内皮細胞を増殖させるだけでなく、神経系細胞に対して神経保護効果がある。そこで我々は、ラット脊髄損傷モデルに対する低出力体外衝撃波治療の安全性を確認し、運動機能やアロディニアを改善するか検討した。また、VEGF の発現および血管新生、細胞死などの治療効果のメカニズムを検討した。

B . 研究方法

60 匹のラットを以下の 4 群に分けた：

Sham 群 (椎弓切除のみ、脊髄損傷なし)、  
Sham-SW 群 (椎弓切除後に低出力衝撃波を照射)、  
SCI 群 (椎弓切除後に脊髄損傷を作製)、  
SCI-SW 群 (脊髄損傷後に低出力衝撃波を照射)。  
重錘落下式脊髄損傷作製装置 (New York University Impactor) で第 10 胸椎レベルに脊髄損傷モデルを作製した。低出力衝撃波 (0.1 mJ/mm<sup>2</sup>, 4 Hz, 200 shot/spot) を損傷部の皮膚上から週 3 回、3 週間照射した (図 1)。運動機能評価として、損傷後 42 日間の運動機能を BBB score (Basso, Beattie and Bresnahan score) を用いて評価した。知覚機能の評価として、損傷後 42 日間のアロディニアを von Frey test, Hargreaves test で評価した。損傷後 7 日目の脊髄組織で各神経系細胞マーカー - NeuN, GFAP, Olig2 と VEGF の二重染色を行い、VEGF 発現の局在を調べた。損傷後 42 日目の脊髄組織を用い CD31 染色、SMA 染色で新生血管数を、NeuN 染色で残存神経細胞数を、5-HT 染色で残存した神経軸索を評価した。損傷後 42 日目の Luxol fast blue 染色を行い、残存白質面積を比較した。さらに損傷後 7 日目の脊髄組織の TUNEL 染色

で細胞死を評価した。

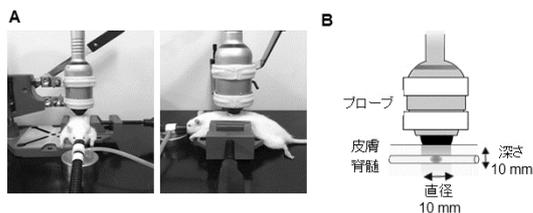


図1. 低出力体外衝撃波の照射

A 第8と第12 胸椎棘突起間の脊髄直上に経皮的に衝撃波用プローブを設置した。

B 衝撃波が有効な焦点距離は直径 10 mm, 深さ約 10 mm である。

### C. 研究結果

Sham 群、Sham-SW 群ともに BBB score は低下しなかった。HE 染色や NeuN 染色では Sham-SW 群に神経組織損傷はなかった。

SCI-SW 群では SCI 群に比べ、損傷後 14 日目、35 日目、42 日目の運動機能が有意に高かった(図2)。知覚機能は、von Frey test では損傷後 28 日目、35 日目で、Hargreaves' test では損傷後 35 日目、42 日目で、SCI 群に比べ SCI-SW 群が有意に改善していた(図3)。損傷後 7 日目の VEGF 染色では、SCI-SW 群で VEGF 陽性の細胞が有意に多かった。二重染色では NeuN、GFAP、Olig2 陽性の神経系細胞で VEGF が発現していた。損傷後 42 日目の CD31 陽性細胞、SMA 陽性細胞は SCI-SW 群で有意に多かった。残存白質面積は、SCI-SW 群で多い傾向にあったが、有意な差はなかった。TUNEL 陽性細胞数は、SCI-SW 群が有意に少なかった。

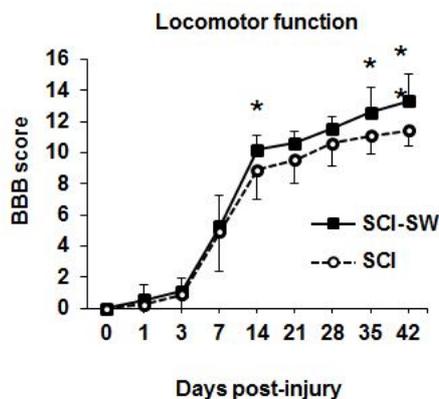


図2. 脊髄損傷後運動機能評価 BBB score

SCI 群と SCI-SW 群の BBB score は、損傷後 1 日から徐々に増加し、14 日目以降は緩やかになった。損傷後 14 日目、35 日目、42 日目では、SCI-SW 群は SCI 群よりも有意に運動機能が改善した。The values are mean ± SD (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

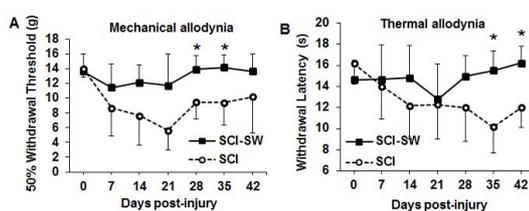


図3. 機械的、熱的アロディニアの評価

A: von Frey test では、損傷後 7 日目から SCI-SW 群の疼痛閾値が高い傾向にあり、損傷後 28 日目、35 日目では有意差がみられた。

B: Hargreaves' test では、損傷後 28 日目以降で SCI-SW 群の逃避潜時が高い傾向にあり、損傷後 35 日目、42 日目では、SCI-SW 群は SCI 群よりも有意に改善していた。The values are mean ± SD (\*p < 0.05).

### D. 考察

本研究から、正常脊髄に対する低出力体外衝撃波の安全性が確認された。さらに損傷脊髄への低出力体外衝撃波照射は、様々な神経系細胞において、VEGF の発現を増加

させ、CD31、SMA の発現を促進していた。これらの結果から、脊髄損傷後、衝撃波照射によってすべての神経系細胞において発現した VEGF が、血管新生を促進していると考えられた。加えて、脊髄損傷に対する低出力衝撃波治療が、運動機能のみならず、機械的アロディニアや、熱アロディニアを改善していた。低出力衝撃波治療は、TUNEL 陽性細胞を減少させていた。また、衝撃波治療によって、5HT 陽性軸索が増加していた。これらの結果から、低出力体外衝撃波は細胞死を抑制し、5HT 陽性軸索への損傷を抑制することによって、脊髄損傷後の運動、知覚機能を改善させたと考えられた(図4)。

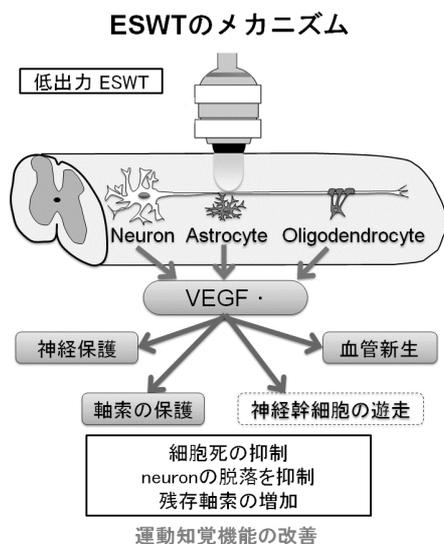


図4. 脊髄損傷に対する ESWT の治療メカニズム  
ラット脊髄損傷モデルに対する低出力体外衝撃波治療は、様々な神経系細胞から VEGF の発現を促し、血管新生を促進した。その神経保護効果によって細胞死や軸索損傷を抑制し、運動機能のみならず知覚機能を改善した。

## E . 結論

ラット脊髄損傷モデルに対する低出力体外衝撃波治療は、様々な神経系細胞から VEGF の発現を促し、血管新生を促進した。その神経保護効果によって細胞死や軸索損傷を抑制し、運動機能のみならず知覚機能を改善した。

## F . 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載

## G . 研究発表

### 1.論文発表

Yamaya, S., Ozawa, H., Kanno, H., Kishimoto, K. N., Sekiguchi, A., Tateda, S., et al. (2014). Low-energy extracorporeal shock wave therapy promotes vascular endothelial growth factor expression and improves locomotor recovery after spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, 121(6), 1514-1525

### 2.学会発表

1. 2013 年 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 千葉  
急性期脊髄損傷における低出力体外衝撃波治療の VEGF 発現促進・運動機能改善効果
2. 2014 年 ORS 2014 Annual Meeting New Orleans  
Low-energy Extracorporeal Shock Wave Therapy Promotes VEGF Expression in Various Neural Cells and Enhances Neuroprotective Effect after Spinal Cord Injury
3. 2014 年 EUROSPINE Annual General Meetings Lyon

Low-energy extracorporeal shock wave therapy promotes VEGF expression and demonstrates a neuroprotective effects after spinal cord injury

4. 2014 年 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 鹿児島  
脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波治療による VEGF 発現と神経保護作用の検討
5. 2015 年 ORS 2015 Annual Meeting Las Vegas  
Low-energy Extracorporeal Shock Wave Therapy Promotes VEGF Expression and Angiogenesis and Improve Locomotor and Sensory Functions after spinal cord injury
6. 2015 年 第 88 回日本整形外科学会学術集会 神戸  
脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波治療による VEGF 発現・血管新生の促進と運動・知覚機能の改善効果
7. 2015 年 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 富山  
脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波治療による血管新生の促進と軸索障害の抑制

#### H . 知的財産権の出願・登録状況

( 予定を含む )

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし