

平成30年 5月 1日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10505

研究課題名(和文) エダラボンによる脊髄損傷の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Free radical scavenger edaravone produces robust neuroprotection in a rat model of spinal cord injury

研究代表者

石井 秀明 (ISHII, Hideaki)

新潟大学・医歯学総合病院・特任准教授

研究者番号：60529775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：フリーラジカル消去薬であるエダラボンの脊髄損傷に対する効果について研究した。エダラボンを加重30分前、同時、10分後に投与開始する群を作成し3 mg/kg/hで静注した。中等量エダラボン加重30分前投与群は、生食群と比較して有意に脊髄運動誘発電位の振幅が回復した。脊髄損傷後の脂質過酸化におけるエダラボンの効果を調べた結果、脊髄におけるmalonyldialdehydeは中等量エダラボン群が生食群と比較して有意に低値を示した。さらに、生食群と比較して有意に中等量および高用量エダラボン群で、脊髄損傷後の運動機能回復が認められた。本研究によって、エダラボンは神経保護作用を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We used multimodal approach to evaluate the effects of edaravone in a rat model of spinal cord injury (SCI). SCI was induced by extradural compression of the spinal cord at the thoracic level. Moderate-dose (3 mg/kg/h) edaravone was administered 30 min prior to compression, at the start of compression, or 10 min after decompression. Preemptive administration regimens resulted in significantly improved spinal motor-evoked potentials (MEPs). A moderate-dose of edaravone resulted in significant attenuation of lipid peroxidation, as evidenced by lower concentrations of free radical malonyldialdehyde (MDA) in the spinal cord at 3 h post-SCI. Both moderate- and high-dose edaravone resulted in significant functional improvements evidenced by better Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scores and better performance on the inclined plane during 8-wk period post-SCI.

研究分野：麻酔科学

キーワード：脊髄損傷 エダラボン

1. 研究開始当初の背景

外傷などによる脊髄損傷は運動および感覚神経障害を伴い、四肢麻痺は受傷後の生活の質を著しく低下させる。現在の標準的治療法はステロイド大量療法であるが、その効果には議論の余地がある()。

脊髄損傷の急性期は直接外力による一次損傷に続き、虚血等によって局所の微小循環が破綻し、二次損傷へと進展していく。サイトカインの産生は炎症細胞を誘導し、ヒドロキシラジカルやペルオキシラジカルなどのフリーラジカルを介し周囲の細胞傷害に加担し二次損傷を増悪させる。さらに、ミトコンドリアの機能不全を経て神経細胞はアポトーシスに至り、神経学的予後が悪化する。特に、フリーラジカルによる細胞膜の連鎖的な脂質過酸化 (lipid peroxidation) は神経細胞傷害を増悪させる。したがって、フリーラジカルを制御すれば脊髄損傷の増悪が抑制される可能性がある。

2. 研究の目的

脳梗塞治療薬として臨床使用されているフリーラジカル消去薬のエダラボンを脊髄損傷の治療に応用し、その治療効果を検討する。エダラボンはどのような脊髄保護効果を有するか電気生理学的手法を用いて解明する。本研究の最終目標は、新規の治療法を開発し脊髄損傷患者の社会復帰を促進することである。そのために、エダラボンの至適投与法を明らかにし、さらに行動実験によって中長期的な運動機能の回復の程度を検討する。

3. 研究の方法

本研究で行う実験は、新潟大学動物実験倫理委員会 (No.233-2) の承認を受けて実施した。新潟大学動物実験規則および研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針を遵守し、実験動物を愛護的に扱い、疼痛を伴う場合は全身麻

酔下で施行した。

(1) 実験1: 脊髄損傷後の脊髄運動誘発電位 (motor-evoked potentials, MEPs) 回復によるエダラボンの効果。

エダラボンの至適投与開始時期を明らかにするために、Wistar 系雄性ラット (370-420 g) を使用し、ウレタン 1.5 g/kg による全身麻酔下に人工呼吸管理をした。左大腿静脈および大腿動脈にカテーテルを留置したのち、T10 の椎弓を穿孔し、錘 10 g を脊髄に 10 分間加重した。エダラボンを加重 30 分前、加重と同時に、加重後 10 分後に投与開始する群を作成し 3 mg/kg/h で 2 時間持続静注した。電気刺激装置 (SEN-3301, 日本光電) によって経頭蓋的電気刺激 (100-150 V) をして L1/2 より脊髄運動誘発電位 (motor-evoked potentials, MEPs) を導出し、その振幅を測定した。

(2) 実験2: 脊髄虚血後の体性感覚誘発電位の測定。

Wistar 系ラットを全身麻酔下で気管切開し、人工呼吸器管理した。側胸部から開胸し上行大動脈を絹糸で遮断し 10 分間循環停止させた。前肢および後肢刺激による体性感覚誘発電位を測定した。

(3) 実験3: 脊髄損傷後の lipid peroxidation におけるエダラボンの効果。

エダラボン低用量 (1 mg/kg/h)、中等量 (3 mg/kg/h)、高用量 (10 mg/kg/h)、生食群およびシャム群の 5 群にわけ、加重 3 時間後に脊髄および血液を採取した。lipid peroxidation の indicator である malonyldialdehyde (MDA) 濃度を測定した。

(4) 実験4: 脊髄損傷後の運動機能回復におけるエダラボンの効果。

自発呼吸を温存したままセボフルランに

よる全身麻酔下で、実験 1 と同様に加重した。エダラボン中等量 (3 mg/kg/h)、高用量 (10mg/kg/h) を 2 時間持続静注した。脊髄損傷後 8 週間の運動機能回復を Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) score による open-field locomotion test と inclined plane test で評価した。

(5) 統計的解析

データは平均値 ± 標準偏差で表し、各群のラットは n=5-7 であった。MEP および MDA の変化は一元配置分散分析 Dunnett 法を用い、運動機能回復は二元配置分散分析 Bonferroni 法を用いて比較した。体性感覚誘発電位の比較には Wilcoxon 符号付順位和検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 電気生理学的分析

中等量エダラボンの至適投与開始時期の検討をおこなった。図 1 A は加重30分前投与、加重と同時投与、加重10分後投与の代表的な spinal motor-evoked potentials (MEPs) を表す。図 1 B は2時間後の MEP 相対振幅の比較で、中等量エダラボンを加重30分前に投与した群 (0.59 ± 0.43) は、生食群 (0.02 ± 0.04) と比較して有意に振幅が回復した ($P < 0.0001$)。

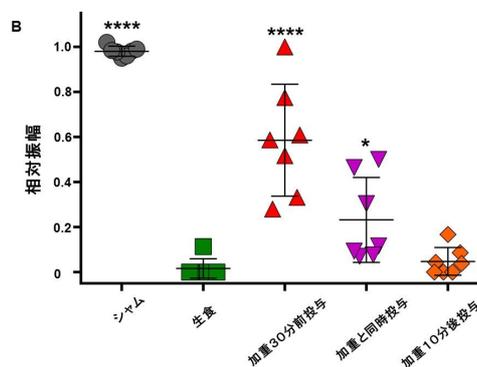
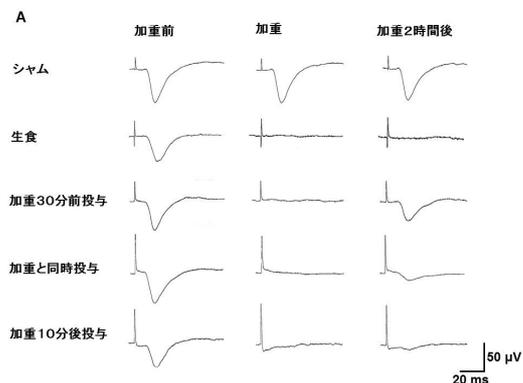


図 1 中等量エダラボンの各投与開始時期による脊髄運動誘発電位の変化。* $P < 0.05$; **** $P < 0.0001$ 生食群と比較。

脊髄虚血時の体性感覚誘発電位を測定した。図 2 A に代表的な体性感覚誘発電位を示した。前肢刺激による体性感覚誘発電位は、循環停止前と比較して振幅 $63.9 \pm 6.1\%$ 低下、潜時 $127.7 \pm 17.2\%$ 延長した(図 2 B)。後肢刺激では、振幅 $61.3 \pm 8.0\%$ 低下、潜時 $131.9 \pm 9.4\%$ 延長した(図 2 C)。

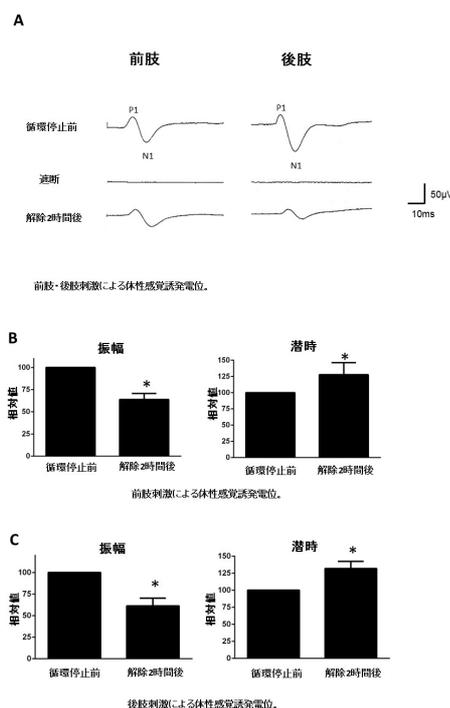


図 2 循環停止後の体性感覚誘発電位の変化。* $P < 0.05$ 循環停止前と比較。

(2) 生化学的分析

血漿中のMDAは高用量エダラボン群 ($1.15 \pm 0.68 \text{ mmol/l}$) が生食群 ($0.52 \pm 0.38 \text{ mmol/l}$) と比較して有意に高値 ($P < 0.05$) を示した (図3 A)。脊髄におけるMDAは中等量エダラボン群 ($0.43 \pm 0.16 \text{ nmol/mg protein}$) が生食群 ($1.04 \pm 0.18 \text{ nmol/mg protein}$) と比較して有意に低値を示した ($P < 0.0001$)。一方で低用量および高用量エダラボンはシャム群と比較して有意に高値を示した (図3 B)。

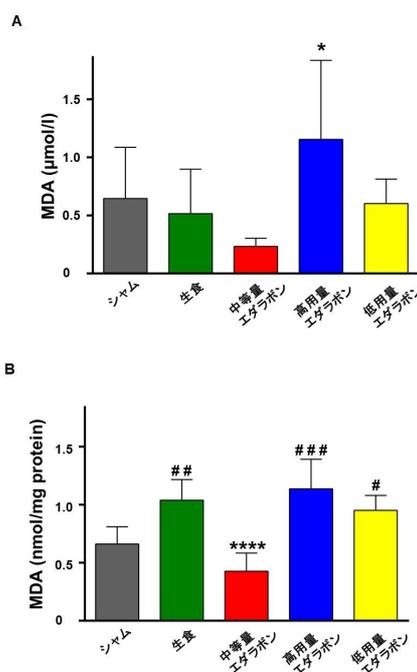


図3 加重3時間後の血漿(A)と脊髄(B)の malonyldialdehyde (MDA) 濃度。* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 生食群と比較、# $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ シャム群と比較。

(3) 行動分析

Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) score による open-field locomotion test (図4 A) において、生食群 (6.3 ± 2.9) と比較して有意に中等量エダラボン群 (16.0 ± 2.2) および高用量エダラボン群 (15.3 ± 1.1) で運動機能の回復を認めた。inclined plane test も同様な結果であった (図4 B)。

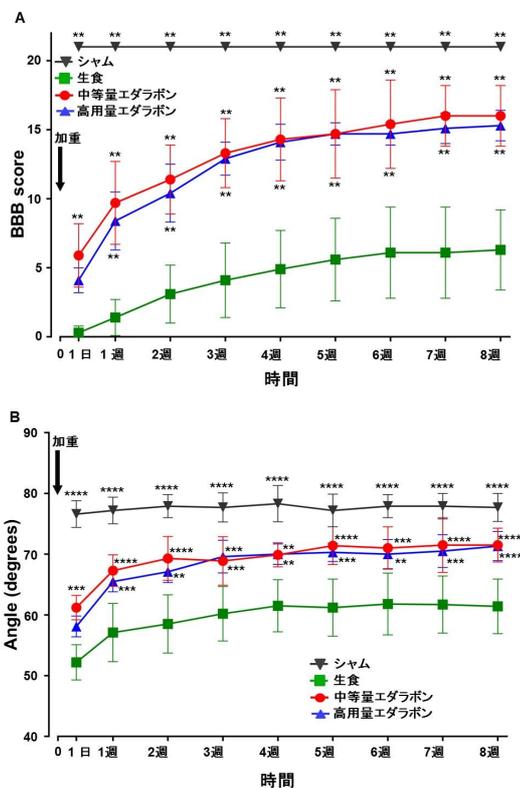


図4 脊髄損傷後の運動機能の回復。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 生食群と比較。

(4) 考察

電気生理学的実験によって、全身麻酔下の損傷直後の機能的変化を捉えることが可能になる。本研究の電気生理学的分析の結果から、中等量エダラボンの早期投与は効果が高いことが明らかになった。一方で、高用量エダラボンにおける脊髄のMDAが高値を示したことおよび運動機能回復が損傷早期で遅延したことから、臨床的に高用量の必要性は低いと考えられる。

錘 10 g を 10 分間加重するモデルにおける体性感覚誘発電位は振幅の完全消失に至ったものの、回復の評価が困難であった。錘加重法は侵襲の調節性が乏しいことが一因の可能性があるので、 10 分間循環停止し脊髄虚血後の体性感覚誘発電位の経時的振幅回復の評価を試みた。その結果、この手法は侵襲の調節に有用であり、振幅の経時的評価

を詳細に解析できることが明らかとなった。
エダラボンの脊髄保護効果が体性感覚誘発
電位にどのような影響を与えるか不明のま
まである。今後さらなる研究が必要である。

(5) 結語

フリーラジカル消去薬であるエダラボンの
早期中等量投与は脊髄損傷に対する神経保
護作用を有し、運動機能の回復を促進する可
能性が示唆された。

<引用文献>

Coleman WP *et al.* J Spinal Disord.
13(3)、2000、185-99.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hideaki Ishii、Andrey B. Petrenko、Mika
Sasaki、Yukio Satoh、Yoshinori Kamiya、
Toshiyuki Tobita、Kenta Furutani、Mari
Matsuhashi、Tatsuro Kohno、Hiroshi Baba、
Free radical scavenger edaravone produces
robust neuroprotection in a rat model of
spinal cord injury、Brain Research、査読
有、
1682、2018、24-35
DOI: 10.1016/j.brainres.2017.12.035

〔学会発表〕(計2件)

石井 秀明、完全循環停止モデルラット
における脊髄誘発電位の検討、
第 62 回新潟ショックと蘇生・集中治療研究
会、2016 年

石井 秀明、循環停止モデルラットにお
ける体性感覚誘発電位の検討、
日本蘇生学会第 35 回大会、2016 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石井 秀明 (ISHII, Hideaki)
新潟大学・医歯学総合病院・特任准教授

研究者番号：60529775

(2)研究分担者

河野 達郎 (KOHNO, Tatsuro)
東北医科薬科大学・医学部・教授
研究者番号：00313536