

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780287

研究課題名（和文） 犬脊髄損傷症例に対する嗅神経鞘細胞自家移植による脊髄再生療法の臨床治験

研究課題名（英文） Clinical Trial of Spinal Cord Regeneration Therapy by Injection of Olfactory Ensheathing Cells (OECs) in Dogs with Spinal Cord Injury

研究代表者

伊藤 大介 (ITO DAISUKE)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：40508694

研究成果の概要（和文）：本研究目的は、自然発症した犬の脊髄損傷症例に対して軸索再生ならびに髄鞘形成能を有する嗅神経鞘細胞を自家移植することによって、その有用性ならびに副作用を評価するものであった。しかし研究期間内に症例選択基準をクリアし、飼い主の同意を得て実際に臨床応用にまで至る症例はいなかった。その他の研究成果として脊髄疾患症例の脳脊髄液中に存在するタンパク質濃度の測定が、脊髄損傷の程度や予後判定に有用であることが判明した。また、犬の脊髄損傷症例において、硬膜外カテーテル電極を用いて術中体性感覚誘発電位（somatosensory evoked potential: SEP）を測定できることが判明し、術中モニタリングのみならず、予後判定法に用いることができる可能性が示唆された。さらに犬において経皮電極によって簡便に運動誘発電位（motor evoked potential: MEP）を測定できることが判明した。

研究成果の概要（英文）：The main purpose of this study was a clinical trial of spinal cord regeneration therapy by transplanting autologous olfactory ensheathing cells (OECs) derived from nasal mucosa in dogs with severe spinal cord injury (SCI). Although few cases cleared the case selection for OECs transplantation therapy, the owners of dogs did not consent the therapy. However it has been revealed that measurement of concentration of specific protein within cerebrospinal fluid obtained from SCI dogs is useful to assess severity of SCI and predict the outcome. Furthermore, intraoperative somatosensory evoked potential (SEP) could be measured using an extradural catheter electrode in canine SCI cases. The assessment of intraoperative SEP might be used as not only intraoperative monitoring but also predict factor of outcome. In addition, it has been revealed that motor evoked potential (MEP) could be easily measured via skin in dog.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：獣医学

科研費の分科・細目：畜産・獣医学臨床獣医学

キーワード：再生医療、Olfactory Ensheathing Glia (OEG), 鼻粘膜

1. 研究開始当初の背景

多くの脊髄損傷患者が世界中で新しい治療法を待ち望んでいる。人において脊髄損傷は交通事故、運動や転倒などによって起こり、症状は不全麻痺から完全麻痺と様々である。現時点ではこうした脊髄損傷患者に対する有効な治療法はなく、脊髄損傷患者は不自由な生活を余儀なくされている。

犬においても人と同様に交通事故や椎間板ヘルニアなどによる脊髄損傷症例は多く、重症例では生涯にわたって不自由な生活を余儀なくされるか、諸外国では安楽死が選択される。近年、脊髄軸索に再生能力自体は備わっているが、中枢神経の環境が脊髄再生を妨げていることが解明され、細胞移植による脊髄再生医療が注目されている。その中で嗅（鼻）粘膜から嗅球に存在している嗅神経鞘細胞（Olfactory Ensheathing Cells: OECs）は軸索伸展因子を放出し、髄鞘形成能を有していることから、幹細胞等、他の細胞を用いた移植療法に比べ遙かに人や犬への臨床応用に近い位置にあり、実際に人での臨床治験が開始され始めている。

ケンブリッジ大学（英国）との共同研究により犬においても鼻粘膜由来 OECs 移植による脊髄再生療法が確立し、臨床治験が可能となった。さらに従来は侵襲性の高い開頭術によってしか得られなかった鼻粘膜を、近年の検討から内視鏡を用いて低侵襲に鼻腔から鼻粘膜を採取する方法を確立した。

2. 研究の目的

(1) 犬における自然発症の脊髄損傷症例に対する嗅粘膜 OECs 自家移植療法の phase I（安全性評価）そして phase II（有用性の評価） trial を目的とした。

(2) 犬の脊髄疾患症例における脳脊髄液中ミエリン・ベーシック・プロテイン（myelin basic protein: MBP）ならびにニューロン・スペシフィック・エノラーゼ（neuron specific enolase: NSE）測定による脊髄損傷の重症度ならびに予後判定の評価。

(3) 脊髄損傷症例における硬膜外カテーテルを使用した術中体性感覚誘発電位（SEP）検査の有用性に関する検討。

(4) 犬における経皮電極ならびに硬膜外カテーテルを用いた運動誘発電位（MEP）測定法の確立。

3. 研究の方法

(1) 犬における自然発症の脊髄損傷症例に対する嗅粘膜 OECs 自家移植療法の臨床治験方法に関する概要は以下の通りである（図1参照）。

- ① 不可逆的な脊髄障害を受けた臨床症例（犬）から OECs を含む鼻粘膜組織を内視鏡を用いて鼻腔を通じて採取する。
- ② OECs を精製し、約 3 週間培養する。
- ③ 培養・精製した OECs を脊髄損傷部位に移植する。
- ④ 移植後リハビリテーションを開始し、経時的に神経学的検査、電気生理学的検査、磁気共鳴画像（MRI）検査を実施し、移植療法の有用性を長期的に検討する。

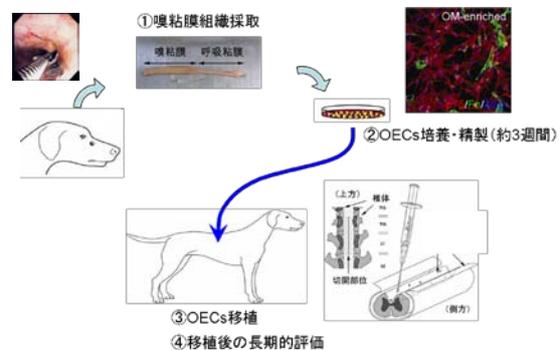


図1. OECs 自家移植による犬の脊髄再生療法

(2) 犬の脊髄疾患症例における脳脊髄液中 MBP ならびに NSE 測定による脊髄損傷の重症度ならびに予後判定の評価に関する概要は以下の通りである。

- ・症例：日本大学動物病院に来院し、椎間板ヘルニア（Hansen Type I : HI ならびに Type II : HII）、進行性脊髄軟化症、変性性脊髄症、あるいは線維軟骨塞栓症と診断した犬 33 例を対象とした。
- ・診断：椎間板ヘルニアならびに線維軟骨塞栓症の診断には MRI あるいは病理組織学的検査、進行性脊髄軟化症の診断には臨床症状ならびに MRI によって行った。また変性性脊髄症の診断は臨床症状に加え、MRI ならびに CT により他の疾患を除外して行った。
- ・脳脊髄液採取法：脳脊髄液の採取は大槽穿刺あるいは腰椎穿刺。
- ・MBP/NSE 測定法：ELISA 法を用いて測定。
- ・統計解析：Kruskal-Wallis test を用い、疾患群間の結果に有意差が認められた場合には Dunn's test を使用した。なお、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

(3) 脊髄損傷症例における硬膜外カテーテルを使用した術中体性感覚誘発電位 (SEP) 測定の有用性に関する検討の概要は以下の通りである。

- ・症例：日本大学動物病院に来院し、重度椎間板ヘルニアと診断し、手術を実施した症例。
- ・MRI 画像：MRI・T2 強調画像における脊髄信号強度が高信号を呈している場合、予後が悪いという過去の報告に基づき、T2 強調画像にて脊髄が高信号を呈している症例を選択。
- ・手術：片側椎弓切除術
- ・SEP 測定法：刺激および記録電極とも硬膜外カテーテル電極を使用。

測定条件として

- ① 体温：37～39℃
- ② Analysis time: 5～10msec
- ③ Stimulate rate: 15Hz
- ④ Duration: 0.2msec
- ⑤ Intensity: 4mA 前後

(4) 犬における経皮電極ならびに硬膜外カテーテルを用いた運動誘発電位 (MEP) 測定法の確立に関する概要は以下の通りである。

- ・供試犬：MRI 検査、神経学的検査および脳脊髄液検査を行い正常とみなされたビーグル犬 5 頭

・方法

- ① 前投与として鎮静薬を投与した後、プロポフォールで麻酔導入ならびに麻酔維持を行う。
- ② 刺激電極は頭部に設置
- ③ 肢端あるいは脊髄硬膜外に記録電極を設置
 <硬膜外カテーテルの設置>
 第 7 腰椎一仙椎間に 18G 留置針を挿入し、硬膜外に設置する。留置針をガイドにし、硬膜外カテーテルを挿入し、記録電極とする。
- ④ MEP 刺激装置を用いて運動神経を刺激し、脊髄硬膜外あるいは肢端に設置した記録電極を通じて筋電図装置 (Neuropack 2) により記録。

- ・測定項目：MEP 波形の検出、ならびに副作用・合併症の確認。

4. 研究成果

(1) 犬における自然発症の脊髄損傷症例に対する嗅粘膜 OECs 自家移植療法の臨床治験

適応症例が存在したにも関わらず、飼主の同意が得られなかったため、鼻粘膜由来 OECs 移植による脊髄再生療法の臨床治験を実施することができなかった。したがって研究期間内に移植による脊髄再生療法の有効性ならびに安全性を評価することはできなかった。

(2) 犬の脊髄疾患症例における脳脊髄液中 MBP ならびに NSE 測定による脊髄損傷の重症度ならびに予後判定の評価。

33 例中 13 例が椎間板ヘルニア (HI: 8 例、HII: 5 例)、2 例が進行性脊髄軟化症 (PM)、13 例が変性性脊髄症 (DM)、そして 5 例が線維軟骨塞栓症 (FCE) であった。

椎間板ヘルニア HI 群における MBP 平均値は 3.48ng/mL、NSE 平均値は 28.9ng/mL であり、HII 群における MBP 平均値は 3.66ng/mL、NSE 平均値は 30.9ng/mL であった (図 2, 3 参照)。進行性脊髄軟化症 (PM) 群において MBP 中央値は 8.31ng/mL で、NSE 中央値は 54.1ng/mL であった。また変性性脊髄症 (DM) 群において MBP 平均値は 1.0ng/mL で、NSE 平均値は 15.6ng/mL であった。線維軟骨塞栓症 (FCE) 群における MBP 平均値は 6.9ng/mL で、NSE 平均値は 30.44ng/mL であった。正常犬の MBP 平均値は 0.12ng/mL、NSE 平均値は 12.5ng/mL であった。椎間板ヘルニア群 (HI、HII)、線維軟骨塞栓症 (FCE) 群ならびに変性性脊髄症 (DM) 群で MBP 値に関して統計解析を行ったところ、各疾患群間に有意差が認められ (P=0.0147)、椎間板ヘルニア群 (HI、HII) と線維軟骨塞栓症 (FCE) 群における MBP 値は、変性性脊髄症 (DM) 群と比較して有意に高かった (P<0.001, P<0.05)。NSE に関しては各疾患群に優位差は認められなかったが、線維軟骨塞栓症 (FCE) 群は正常犬群と比較して有意に高値を示した (P<0.05)。

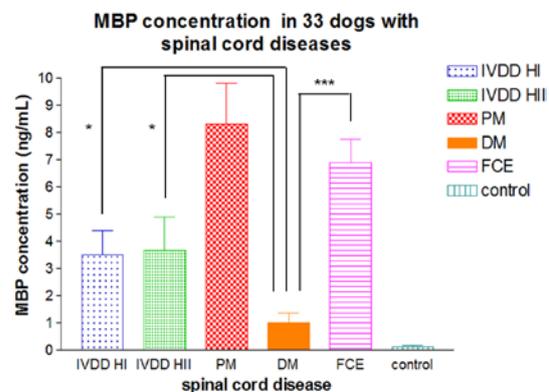


図 2. 各疾患における脳脊髄液中 MBP 濃度

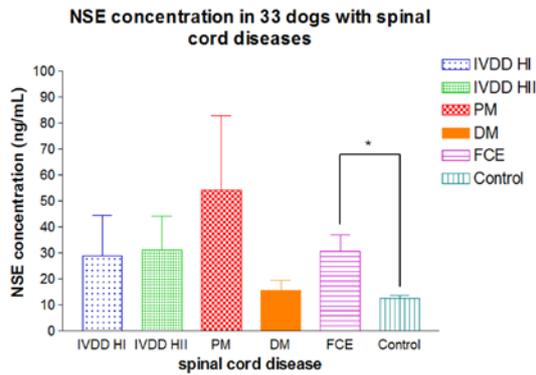


図 3. 各疾患における脳脊髄液中 NSE 濃度

さらに、脊髄疾患ごとに検討を行うと、神経症状が重症な症例ほど脳脊髄液中の MBP ならびに NSE 濃度が高値を示す傾向にあった (図 4)。

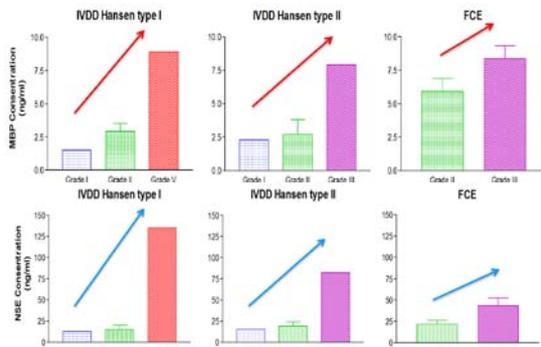


図 4. 各疾患における神経症状の重症度と脳脊髄液中 MBP ならびに NSE 濃度

本研究の結果、脊髄疾患によって MBP ならびに NSE 値が変化することが判明した。椎間板ヘルニア HII 群における MBP 値は、変性性脊髄症群と比較して有意に高かったことから、変性性脊髄症の診断が困難な症例においては MBP 値を測定することで鑑別可能であることが示唆された。また進行性脊髄軟化症群においては椎間板ヘルニア HI 群と比較して、MBP ならびに NSE 値が高値である傾向にあった。したがって椎間板ヘルニア HI を発症した症例においてはこれらの値を測定することで、進行性脊髄軟化症を併発しているか判断できる可能性が示唆された。さらに各疾患群において神経症状が重篤な症例ほど、これらの値が高くなる傾向にあることから、脳脊髄液中 MBP ならびに NSE を測定することで予後判断因子として用いることができる可能性が示唆された。

(3) 脊髄損傷症例における硬膜外カテーテルを使用した術中体性感覚誘発電位 (SEP) 検査の有用性に関する検討。

椎間板ヘルニア症例において硬膜外カテーテルによる SEP 測定が可能であった。予後不良と言われているグレード 5 の症例においても、術中 SEP 測定により波形が出現した症例では、術後歩行機能が改善した (図 1, 2, 3, 4)



図 1. 起立不能となった症例

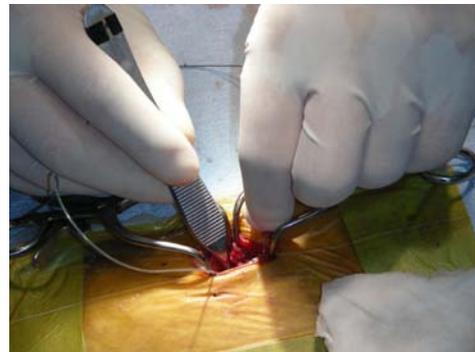


図 2. 術中に硬膜外カテーテル電極の設置

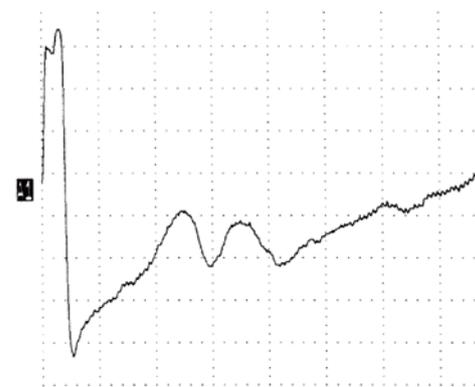


図 3. 術中に測定した SEP 波形



図 4. 術後、歩行可能となった症例

本研究の結果より、従来、予後不良とされていた症例においても術中 SEP を測定することによって誘発電位を得られた場合は歩行機能が改善することがわかり、予後をさらに詳細に把握できることが判明した。したがって従来の予後判定因子に加え、術中 SEP を測定することによって、早期に脊髄再生療法の対象症例を選択することが可能となった。

(4) 犬における経皮電極ならびに硬膜外カテーテルを用いた運動誘発電位 (MEP) 測定法の確立

① 硬膜外カテーテル電極による MEP の記録
頭部に設置した刺激電極からの情報を腰髄 (L4 付近) に設置した硬膜外カテーテル電極で記録することは困難であった。

② 肢端に設置した経皮電極による MEP の記録

頭部に設置した刺激電極からの情報を後肢肢端に設置した経皮電極で記録することは可能であった (図 1)。その際の刺激条件として

- ・ 電圧: 400V
- ・ Intense: 4mA
- ・ Analyze time: 50msec
- ・ Delay: -1
- ・ Stimulation mode: single
- ・ Duration: 0.2msec

が最適であることが判明した。

MEP 測定による疼痛や麻痺などの副作用・合併症は認められなかった。

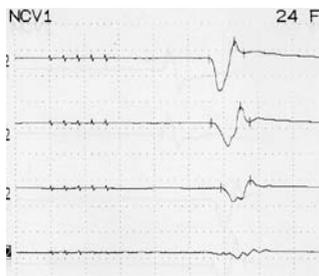


図 1. 健常犬から得た MEP 波形

本研究から、犬において SEP と同様に硬膜外カテーテル電極を用いて MEP を測定することは困難で、肢端から測定しなければならないことが判明した。しかし犬においても MEP 測定は容易かつ低侵襲であるため、術後の脊髄運動神経機能の評価や、脊髄再生医療実施後の神経再生を評価する上で有用であることが示唆された。

本研究期間内に臨床治験を実施することはできなかったが、その他の検討により、脊髄再生療法の症例選択法ならびに移植後の電気生理学的検査法が確立された。これらのことにより、飼い主への説明にも根拠を示すことができ、今後本研究分野が発展することが大いに予想される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 伊藤 大介: 犬の脊髄疾患 28 例における脳脊髄液中 MBP ならびに NSE の解析、獣医内科学アカデミー、2011 年 3 月 12 日、日本
- ② Ito D: Myelin basic protein and neuron specific enolase concentration in cerebrospinal fluid in 33 dogs with spinal cord disease, ECVN 2011 Sep, 23rd, 24th England (Cambridge)
- ③ Ito D: Spinal cord injury: New developments, BSAVA Congress 2012 Apr. 13th England (Birmingham)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 大介 (ITO DAISUKE)
日本大学・生物資源科学部・助教
研究者番号: 40508694

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

()
研究者番号: