

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791707

研究課題名(和文) 脊髄虚血神経保護における抗炎症薬の臨床応用に関する研究

研究課題名(英文) Evaluation for clinical utilization of anti-inflammatory agents in spinal cord ischemia.

研究代表者

山下 敦生 (YAMASHITA, Atsuo)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50379971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：抗TNF- α 抗体であるインフリキシマブが脊髄虚血による神経損傷を軽減するかどうか検討した。家兔を対照群、インフリキシマブ5mg/kg投与群(5mg群)、10mg/kg投与群の3群に分けた。家兔の腹部大動脈を15分間遮断し脊髄虚血を作成した。再灌流後、7日間後肢運動機能(5段階評価、4:正常、0:麻痺)を評価し、病理組織標本で脊髄前角正常細胞数を測定した。3群間に後肢運動機能のスコアの差はみられなかった。脊髄前角正常細胞数では対照群と比較して5mg群で有意に正常細胞数が多かった。インフリキシマブ5mg/kg投与群で脊髄虚血保護効果の可能性が示唆されるが、臨床応用は慎重にするべきと思われた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the ischemic spinal cord injury in rabbits was reduced by infliximab, an anti-tumor necrosis factor- α agent. We assigned rabbits to three groups (n=5, expect high dose infliximab group); a control group, low dose infliximab group (5mg/kg), high dose infliximab group (10mg/kg). Spinal cord ischemia was produced by occluding the abdominal aorta for 15 min. After the reperfusion, hindlimb motor function (score range: 4, normal to 0, paraplegia) was assessed daily for 7 days, and then the number of normal neurons in the anterior spinal cord was counted. There were no significant intergroup differences in neurological scores. On the other hand, the numbers of normal neurons of low dose infliximab group had significantly more than a control group. This results indicate that low dose infliximab (5mg/kg) may protect ischemic spinal cord injury, but clinical utilization of infliximab for spinal cord ischemia should be discreet.

研究分野：脳・脊髄虚血

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 麻酔・蘇生学

キーワード：脊髄虚血 遅発性対麻痺 再灌流障害 炎症反応 抗TNF- α 抗体 インフリキシマブ 麻酔科学 脳・神経科学

1. 研究開始当初の背景

胸腹部大動脈瘤手術後に生じる脊髄虚血(対麻痺)は、様々なモニタや術中管理の改良により減少傾向にあるものの、その発生を完全に防止できないのが現状である。特に近年の報告では手術後遅発性に対麻痺が生じる割合が増加傾向で、われわれも胸部大動脈ステントグラフト内挿術で4例の遅発性対麻痺症例を経験している。遅発性対麻痺の原因として術後発症した脊髄虚血(低灌流、塞栓などが原因)の他に、術中発生した虚血の病態進行による遅発性神経細胞死が考えられている。遅発性神経細胞死の機序としてアポトーシスを支持する報告もあるが、我々は家兔を用いた脊髄虚血モデルでTUNEL染色による病理組織学的評価と虚血後脊髄組織のDNA解析からアポトーシスとの関連は乏しいこと、病態進行と一致した経時的なマクロファージの集積所見から炎症反応の関与を報告した。活性化したマクロファージは好中球などの炎症性細胞を活性化し各種炎症性サイトカインを放出するといわれ、これらのシグナル伝達により血管透過性亢進、循環障害が生じ、細胞傷害、組織傷害に至るとされる。この病態初期に放出される代表的なサイトカインはTNF- α やIL-1 β であり、脳虚血においてこれらの増加が認められ、その制御が神経保護に働く可能性を示唆した報告が散見される。脊髄虚血においてTNF- α やIL-1 β の増加や抗体・受容体拮抗薬投与による脊髄虚血保護の報告は少ない。したがって脊髄虚血の病態にTNF- α やIL-1 β 関与することを調べ、その抗体・受容体拮抗薬投与による保護効果の検討は、病態メカニズム解明と治療への応用が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、近年本邦でも市販され臨床使用可能となった抗TNF- α 抗体であるインフリキシマブが、脊髄虚血における神経保護に有効かつ副作用なく投与可能かどうかを実験

動物を用いて綿密に評価し、その臨床応用の可能性の検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 家兔におけるインフリキシマブ安全性の検討

頻度は低いものの人間においても投与中の発熱、低血圧などの副作用報告がある。また免疫に関与する薬剤のため、手術前後の投与は感染の問題が懸念される。したがって薬剤投与のみや薬剤投与後 sham 手術(脊髄虚血は行わない)を行い家兔に異常が生じないか検討した。

全身麻酔を施した家兔(New Zealand White Rabbit)に1時間かけてインフリキシマブ1mg/kg(2羽)、3mg/kg(2羽)、5mg/kg(3羽)、10mg/kg(3羽)を持続静注した。薬液は生理食塩水を用いて総量を20mlに希釈し、投与に際してはフィルターを介して沈殿粒子を除去した。インフリキシマブ投与中は、食道温と大腿動脈圧をモニタした。インフリキシマブ1mg/kg群と3mg/kg群は1羽ずつ、5mg/kg群と10mg/kg群は2羽ずつ sham 手術を施した。全例投与7日目に評価を終了した。

評価項目は、食欲、糞尿の性状、体重、活動性について毎日観察し、投与前と投与7日目に採血を行い、腎機能(BUN, Cre)、肝機能(AST, ALT)、栄養状態(A1b)を検査した。また投与中の体温、血圧をモニタした。

(2) 家兔におけるインフリキシマブ脊髄虚血保護効果と安全性の検討

家兔(New Zealand White Rabbit, 2.5 \pm 0.2kg)を用いた。これら14羽を対照群(C群、生理食塩水投与)、インフリキシマブ5mg/kg群(5mg群)、インフリキシマブ10mg/kg群(10mg群)の3群に分けた(C群と5mg群は5羽ずつ、10mg群は4羽)。前日より一晩絶食にしたのち(飲水可)、イソフルランによる緩徐導入で全身麻酔をかけ、耳の静脈か

ら点滴ルートを確認し、乳酸リンゲル液 40ml/hr で輸液した。ペントバルビタール 30mg を静注し、深麻酔下で気管挿管を行った。気管挿管後にベクロニウム 1mg 投与し筋弛緩を得た。酸素濃度 40%で人工呼吸を行い、イソフルラン 2~3%、ベクロニウム 1mg の適宜単回投与（総量 4mg 前後）、フェンタニル 10 μ g/kg の適宜単回投与（総量 30 μ g/kg 前後）で麻酔維持した。体温は食道温と傍脊柱温（腰椎レベル）をモニタし、傍脊柱温が 38 度前後になるように、冷却、加温した。血圧をモニタするために、中枢側血圧として耳動脈に 24G 動脈留置針を挿入し、末梢側血圧として右大腿動脈よりカテーテル（PE-60）を 5cm 挿入した。またここからの採血により血液ガス分析を行った。血圧は中枢側の平均動脈圧が 60mmHg 以上になるように麻酔薬やフェニレフリン持続投与でコントロールした。また PaCO₂ が 40 \pm 2mmHg になるように、一回換気量、呼吸回数を調節した。

家兎を側臥位とし、肋弓下を頭尾側方向に 5cm 切開し、後腹膜経路で腎動脈下レベルの腹部大動脈を表出させた。PE-60 カテーテルで腎動脈下腹部大動脈をテーピングし、遮断用のゴム管の中を通した。

薬液は全身麻酔導入後から 1 時間かけて耳の静脈から持続静注し、大動脈遮断前までに終了した。インフリキシマブ（レミケード、田辺三菱）は市販薬を用いた。

ヘパリン 500 単位を静注したのち、ゴム管にて大動脈を 15 分間絞扼遮断した。再灌流後 15 分間観察し、ジアゼパム 0.2mg/kg とセファゾリンナトリウム 100mg を筋肉注射し、閉創した。麻酔薬投与を中止し、麻酔覚醒、抜管した。

再灌流後 7 日目まで毎日、後肢運動機能を観察した。運動機能スコアは Drummond らの方法（4：正常、3：後肢を体下に引き込むことができるが、正常ではない、2：重力に抗して後肢を動かすことは出来るが、体下に引

き込むことが出来ない、1：重力に抗して後肢を動かすことは出来ない、0：完全麻痺）を利用した。また術後の活動性や創治癒も観察した。再灌流 7 日後、全身麻酔下に脊髄を取り出しホルマリン固定を行い、ヘマトキシリンエオジン染色にて病理組織学的評価を行った。この際、L5 レベル脊髄前角正常細胞数を数え、定量的評価も行った。

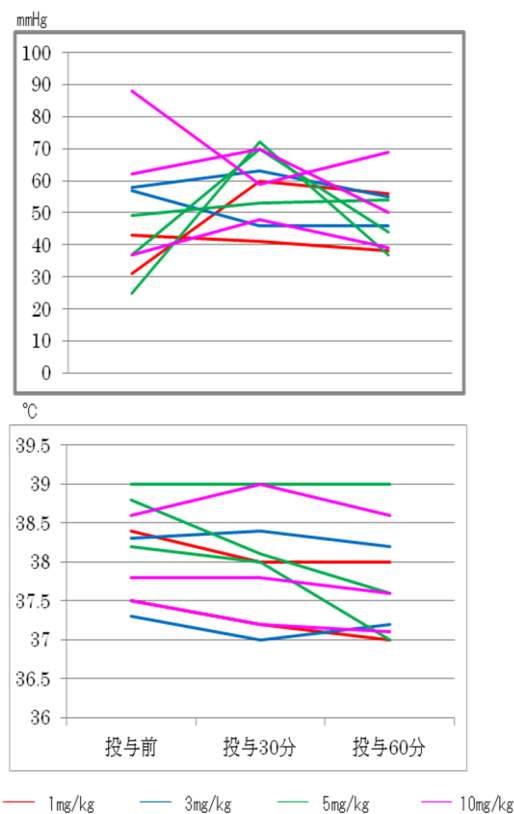
データ値は平均 \pm 標準偏差で示した。生理学的諸量は分散分析を行い、群間の差を調べ、差の部位は多重比較検定（Scheffe 検定）で確認した。後肢運動機能スコアと第 5 腰髄レベルの正常前角細胞数は、ノンパラメトリック検定（Kruskal-Wallis 検定）を行った。P<0.05 で有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 家兎におけるインフリキシマブの安全性の検討

全ての投与量においてインフリキシマブ投与中の著明な血圧低下や発熱は見られなかった（図 1）。また投与前後で体重、活動性、

図 1 インフリキシマブ投与中の平均血圧と体温の変化



食欲、糞尿の変化は見られず、血液生化学検査では、肝逸脱酵素の投与後増加傾向が見られた (表 1)。

表 1 血液生化学検査

	BUN(mg/dl)	Cre(mg/dl)	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	Alb(g/dl)
1mg/kg 群					
投与前	16.7±0.4	0.9±0.3	19±4	21±1	4.2±0
投与7日後	17.5±1.6	0.8±0.2	19±3	33±9	4.7±0.1
3mg/kg 群					
投与前	13.6±1.5	0.8±0.1	13±0	31±8	4.5±0.4
投与7日後	18.9±7.4	0.9±0.1	10±3	27±4	4.6±0.3
5mg/kg 群					
投与前	20.1±6.2	0.9±0.3	14±0	26±2	4.5±0.2
投与7日後	16.5±4.1	1.0±0.5	21±17	29±16	4.5±0.4
10mg/kg 群					
投与前	16.7±2.1	0.9±0.2	25±20	50±31	4.7±0.1
投与7日後	12.5±2.5	1.0±0.3	34±1	84±68	4.4±0.2

創部は術後家兔自身が舐めることで過去にも離開することはあったが、今回の sham 手術を施行した家兔では全例で創部離開が生じ、通常より多い印象を受けた。これらの結果からインフリキシマブの臨床用量での投与はおおむね安全と考えられたが、創傷治癒に影響がある可能性が示唆され、継続評価とした。

(2) 家兔におけるインフリキシマブ脊髄虚血保護効果と安全性の検討
生理学的諸量で3群間の差はなかった(表2)。

表2 生理学的諸量

	平均動脈圧 (中枢)(mmHg)	平均動脈圧 (末梢)(mmHg)	食道温 (°C)	傍脊柱温 (°C)
対照群				
虚血前	52±3	52±4	38.0±0.3	37.9±0.1
虚血5分後	63±9	11±1	38.1±0.2	38.1±0.2
再灌流15分後	47±12	57±10	38.1±0.3	38.1±0.2
5mg/kg 群				
虚血前	52±8	43±3	38.0±0.3	38.0±0.2
虚血5分後	54±9	8±1	38.1±0.2	37.9±0.1
再灌流15分後	52±5	66±3	38.2±0.2	38.2±0.2
10mg/kg 群				
虚血前	51±3	48±11	38.1±0.1	38.0±0.1
虚血5分後	56±9	9±1	38.2±0.2	37.8±0.2
再灌流15分後	52±10	64±6	38.3±0.2	38.0±0.3

	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	血糖値 (mg/dL)	Hct (%)
対照群					
虚血前	7.37±0.08	202±17	39±1	152±28	33±2
虚血5分後					
再灌流15分後	7.33±0.09	203±23	40±2	140±16	32±1
5mg/kg 群					
虚血前	7.37±0.07	217±19	41±3	131±20	32±3
虚血5分後					
再灌流15分後	7.34±0.06	215±19	42±2	142±22	33±3
10mg/kg 群					
虚血前	7.34±0.06	196±12	43±4	119±9	33±1
虚血5分後					
再灌流15分後	7.33±0.07	186±10	41±1	124±8	34±6

再灌流 7 日目の後肢運動機能は対照群で 2 : 2 羽、1 : 1 羽、0 : 2 羽、5mg 群で 4 : 2 羽、2 :

2 羽、0 : 1 羽、10mg 群で 4 : 1 羽、0 : 3 羽であった。5mg 群で運動機能が保たれている傾向があったが、3 群間で有意な差はなかった (図 2)。

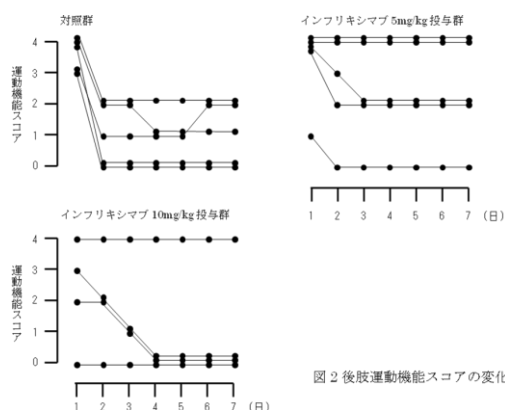
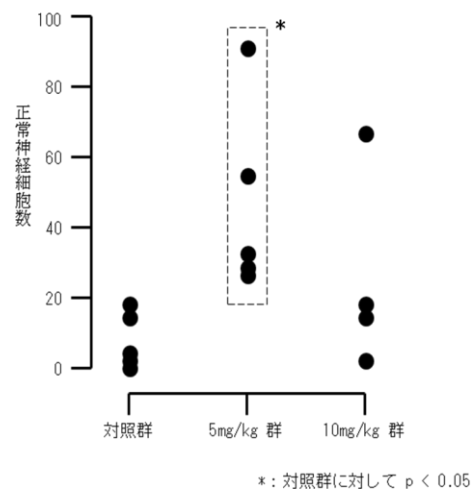


図 2 後肢運動機能スコアの変化

腰椎 L5 レベルの脊髄前角の正常神経細胞数も、対照群で 0-17 個、5mg 群で 25-90 個、10mg 群で 2-64 個 (図 3) で、対照群と比較して 5mg 群で正常細胞数が多かった。

図 3 脊髄前角正常神経細胞数 (L5 レベル)



* : 対照群に対して p < 0.05

高度運動機能障害 (スコア ≤ 1) を来した家兔は、脊髄前角に殆ど正常な神経細胞はみられず、炎症細胞の浸潤を認めた (図 4)。

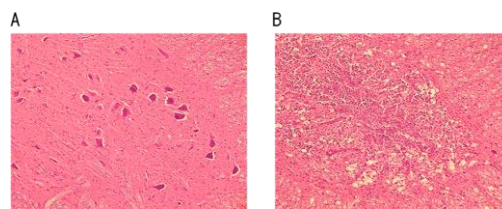
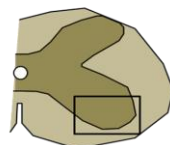


図 4 第 5 腰椎レベル病理組織像 (HE 染色、× 100)

A : 後肢運動機能スコア 4
B : 後肢運動機能スコア 0



今回の検討でも家兔の創離開は高率にみられた。インフリキシマブ 5mg/kg 投与群で脊髄虚血保護効果がありそうであるが、投与量を増加した場合、保護効果が消失することと創治癒への影響の観点から、臨床応用するには更なる検討が必要と思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

山口大学医学部 麻酔科蘇生科ホームページにて、結果を公表予定

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 敦生 (YAMASHITA, Atsuo)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50379971

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

松本 美志也 (MATSUMOTO, Mishiya)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60243664