

平成 29 年 4 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462233

研究課題名(和文)放射線照射が硬膜に及ぼす影響 照射後髄液漏の原因究明

研究課題名(英文)Effects of Radiation on Spinal Dura Mater and Surrounding Tissue in Mice

研究代表者

村上 英樹 (Murakami, Hideki)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70334779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、マウス脊椎への放射線照射後に硬膜外腔の繊維化(fibrosis)が誘発されることが確認され、fibrosis発生の中心的役割を果たすとされるサイトカイン、TGF- β 1の過剰発現も認められた。また、髄膜の透過性に強く関与するくも膜バリア細胞層が放射線照射後に菲薄化することが確認された。これらの放射線障害は、照射後の脊椎手術における合併症発生(硬膜損傷や髄液漏)の一因になり得る。

研究成果の概要(英文)：This study confirms that epidural fibrosis is induced in the late stages after high-dose irradiation in mice, and that overexpression of TGF- β 1 occurs in a manner similar to radiation-induced fibrosis in other tissue. Additionally, thinning of the ABC was observed in the late stages after irradiation. Thus, consideration should be given to the possibility that these phenomena can occur as radiation-induced injuries of the spine.

研究分野：脊椎脊髄外科

キーワード：放射線障害 硬膜外fibrosis 硬膜損傷 髄液漏

1. 研究開始当初の背景

脊椎分野における放射線傷害として、術後の創感染や創治癒遅延などが発生しやすいことはよく知られている¹。これに加え我々は、照射後の脊椎手術において、硬膜損傷や術後髄液漏が高率に発生することを報告してきた^{2,3}。これは照射による硬膜周囲の癒着が主要因と考えられ、皮膚や肺などに生じる照射後 fibrosis⁴と同様に、硬膜外腔にも fibrosis が誘発されることが予想された。

2. 研究の目的

本研究では、硬膜外 fibrosis に主眼を置き、照射後の硬膜及び硬膜周囲組織の経時的変化を病理組織学的に評価した。

3. 研究の方法

(1) 体重30~32gの生後10週齢、ddy系マウス雌の胸腰椎移行部に、小動物用 X 線照射装置 (MBR-1520R-3) を用いて10 Gy あるいは20 Gy の単回外部照射を行った。照射後1週、2週、4週、8週、12週、16週、20週、24週の時点で5匹ずつ屠殺し、灌流固定後に照射脊椎を一塊に摘出し、摘出標本の椎弓間部水平断面を同齢の非照射群 (各5匹) とともに病理組織学的に評価した。

(2) まず、Masson's trichrome 染色を行い、He らの椎弓切除後癒着スコア⁵に準じて硬膜外 fibrosis のスコアリングを行った (図1)。

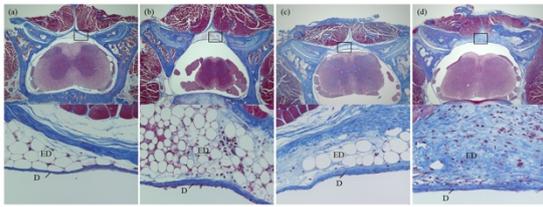


図1：硬膜外 fibrosis の代表的組織像。(a) Grade 0 = fibrosis なし (b) Grade 1 = 硬膜外腔に薄い線維性組織 (c) Grade 2 = 硬膜外腔の2/3以下に fibrosis (d) Grade 3 = 硬膜外腔の2/3以上に fibrosis (D: 硬膜、ED: 硬膜外腔、Masson's trichrome 染色、上: ×40、下: ×400)

(3) 次に、fibrosis 形成の中心的役割を果たすとされる TGF-β1⁶の免疫組織学的染色を行い、硬膜における TGF-β1 の発現量を経時的に評価した (図2)。

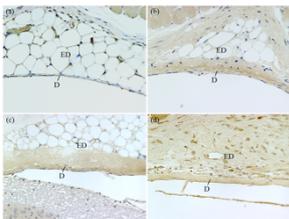


図2：TGF-β1 免疫染色像。(a) Grade 0 = 陽性細胞なし、(b) Grade 1 = 陽性細胞が全体の30%未満、(c) Grade 2 = 全体の30%以上60%未満、(d) Grade 3 = 全体の60%以上 (D: 硬膜、ED: 硬膜外腔、×400)

(4) さらに、上記とは別に照射後1週、12週、24週および同齢の非照射群 (各3匹) の標本作製し、電子顕微鏡を用いて硬膜とその周囲組織の微細構造を評価した。

4. 研究成果

(1) 成果1：硬膜外 fibrosis

非照射群では硬膜外 fibrosis の発生は認めなかったが、10 Gy 照射群では照射後16週より Grade 2以上の硬膜外 fibrosis が散見された。20 Gy 照射群では照射後12週頃より Grade 2以上の硬膜外 fibrosis が発生し始め、16週以降は全例で硬膜外 fibrosis が観察された (図3)。

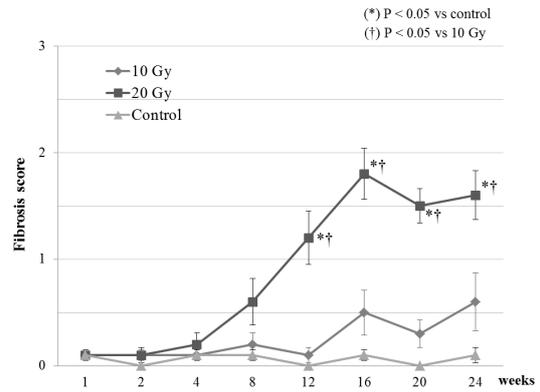


図3：硬膜外 fibrosis 平均スコアの推移

(2) 成果2：TGF-β1の発現量

非照射群と比較して、10 Gy 照射群および20 Gy 照射群では照射後1週と12週以降で TGF-β1 の過剰発現が観察された (図4)。

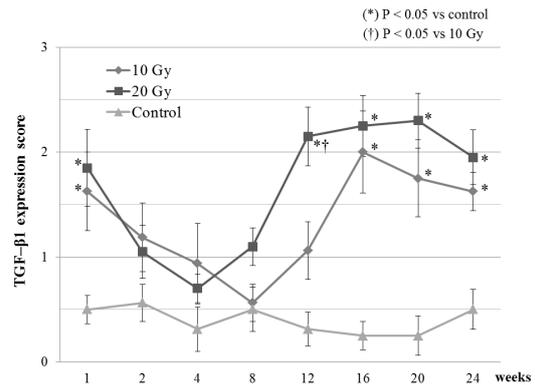


図4：TGF-β1 発現量の平均スコアの推移

(3) 成果3：硬膜とその周囲組織の微細構造

硬膜の微細構造に目立った照射後変化は認めなかったが、くも膜の最外層である arachnoid barrier cell 層は照射後1週で肥大化し、1

2週および24週では菲薄化していた(図5)。

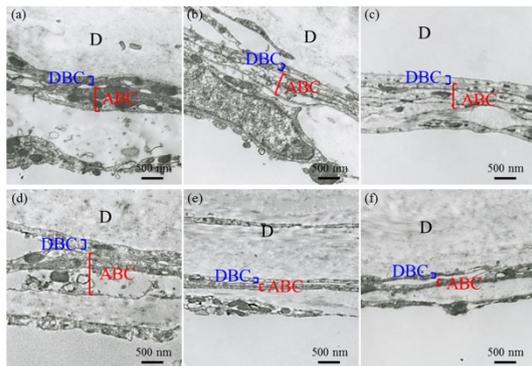


図5：硬膜とその周囲組織の電子顕微鏡像。
(a) 非照射群1週 (b) 非照射群12週 (c) 非照射群24週 (d) 照射群1週 (e) 照射群12週 (f) 照射群24週 (D:硬膜、DBC:dural border cell、ABC:arachnoid barrier cell、 $\times 10,000$)

(4) 考察

マウス脊椎への放射線照射により硬膜外 fibrosis が誘発されることが確認され、他の組織での放射線 fibrosis と同様に TGF- β 1 の過剰発現を認めた。特に高線量照射後に硬膜外 fibrosis は発生しやすく、こうした環境下での手術では硬膜周囲の癒着に伴う術中硬膜損傷のリスクは非常に高いと考えられる。また、照射後に菲薄化がみられた arachnoid barrier cell 層は、細胞間に tight junction を有し、強固なバリアーとして髄膜透過性に強く関与する⁷。したがって、arachnoid barrier cell 層の菲薄化に伴い髄膜透過性が亢進する可能性があり、これが照射後手術における術後髄液漏発生の一因になるものと推察される。

近年の各種癌に対する集学的治療の進歩により癌患者の生存率は飛躍的に改善しており、これに伴う脊椎転移患者の増加も著しく、疼痛や神経障害に対する姑息的手術や生命予後の延長を目的とした根治手術の需要が高まっている。一方、脊椎転移の標準治療として放射線治療が広く普及しており、手術の際にすでに放射線治療を施行されている症例は非常に多い。本研究で得られた知見は、こうした照射後脊椎手術における治療方針の決定や周術期合併症対策の一助になるものと期待される。

<引用文献>

- ①Ghogawala Z, Mansfield FL, Borges LF, Spinal radiation before surgical decompression adversely affects outcomes of surgery for symptomatic metastatic spinal cord compression, *Spine (Phila Pa 1976)*, Vol. 26, 2001, pp. 818-824
- ②Yokogawa N, Murakami H, Demura S, Kato S, Yoshioka K, Hayashi H, et al, Perioperative complications of total en bloc spondylectomy: adverse effects of

preoperative irradiation, *PLoS One*, Vol. 9, 2014, pp. e98797

③Yokogawa N, Murakami H, Demura S, Kato S, Yoshioka K, Hayashi H, et al, Postoperative cerebrospinal fluid leakage associated with total en bloc spondylectomy, *Orthopedics*, Vol. 38, 2015, pp. e561-566

④Rodemann HP, Bamberg M, Cellular basis of radiation-induced fibrosis, *Radiation Oncol*, Vol. 35, 1995, pp. 83-90, Review

⑤He Y, Revel M, Loty B, A quantitative model of post-laminectomy scar formation. Effects of a nonsteroidal anti-inflammatory drug, *Spine (Phila Pa 1976)*, Vol. 20, 1995, pp. 557-563

⑥Martin M, Lefaix J, Delanian S, TGF- β 1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Vol. 47, 2000, pp. 277-90

⑦Vandenabeele F, Creemers J, Lambrichts I, Ultrastructure of the human spinal arachnoid mater and dura mater, *J Anat*, Vol. 189, 1996, pp. 417-430

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ①Noriaki Yokogawa, Hideki Murakami, Satoru Demura, Satoshi Kato, Katsuhito Yoshioka, Miyuki Yamamoto, Shoichi Iseki, Hiroyuki Tsuchiya, Effects of radiation on spinal dura mater and surrounding tissue in mice, *PLoS One*, 査読有, Vol. 10, 2015, pp. e0133806, doi.org/10.1371/journal.pone.0133806

[学会発表] (計3件)

- ①Noriaki Yokogawa, Hideki Murakami 他, Effects of radiation on spinal dura mater and surrounding tissue in mice, AAOS (アメリカ整形外科外科学会), 2016年3月1日~3月5日, オーランド, アメリカ合衆国

- ②横川文彬, 村上英樹 他, 放射線照射が硬膜とその周囲組織に与える影響, 第43回日本脊椎脊髄病学会, 2015年4月16日~4月18日, 福岡, 福岡国際会議場

- ③横川文彬, 村上英樹 他, 放射線照射が硬膜とその周囲組織に与える影響, 第124回中部日本整形外科災害外科学, 2015年4月10日~4月11日, 金沢, ホテル日航金沢・ANAクラウンプラザホテル金沢

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 英樹 (MURAKAMI, Hideki)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：70334779

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

横川 文彬 (YOKOGAWA, Noriaki)
金沢大学・医学系・大学院生
研究者番号：なし