

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11575

研究課題名(和文) 脊髄損傷急性期の積極的平温療法は、二次損傷による神経学的予後の悪化を防ぐか

研究課題名(英文) Does Aggressive normothermia therapy in the Acute Phase of Spinal Cord Injury Prevent Deterioration of Neurological Prognosis Due to Secondary Injury?

研究代表者

竹葉 淳 (TAKEBA, JUN)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80598681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：8-12週齢のWistar系雌ラットを用いて、Th12レベルでの脊髄損傷モデルを作成した。損傷作成後直腸温を37℃で1時間維持する群と39℃で1時間維持する群を作成した。脊髄損傷受傷後6、24、48、72時間で損傷脊髄部のTNF- $\alpha$ を抽出しELISA法にて含有量を測定した。また各群でBBBスケールを用いて72時間後の後肢運動機能を評価した。損傷脊髄部のTNF- $\alpha$ 含有量はコントロール群に比較して受傷後6時間以降、72時間まで増加していた。TNF- $\alpha$ 含有量は直腸温を37℃に維持した群と39℃に維持した群間では有意な差は認められなかった。また後肢運動機能も両群間で有意な差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷に対する治療法が確立されていない現状では、脊髄二次損傷を抑制することが治療上重要である。脳神経損傷に対する低体温療法は、臨床応用されている。しかし、低体温療法は全身への負担が大きい。近年では平温療法でも脳神経保護効果が認められたとの報告もある。一方で脊髄損傷に対する低体温療法は、基礎研究では有用性が報告されているが、臨床応用はなされていない。全身管理が必要な低体温療法の治療ハードルが高いことがその要因と考えられ、今回、平温療法の有用性を検討した。今回の結果では有用性を見いだせなかったが、今後は体温の設定条件や、脊髄損傷の程度を調整して、更なる研究を継続する計画である。

研究成果の概要(英文)：A model of spinal cord injury at Th12 levels was created using 8-12 week old Wistar female rats. After the injury was created, two groups in which the rectal temperature was maintained at 37 degree or 39 degree for 1 hour were prepared. TNF- $\alpha$  of the injured spinal cord was extracted 6, 24, 48, and 72 hours after the spinal cord injury, and the content was measured by the ELISA method. In addition, the hindlimb motor function after 72 hours was evaluated using the BBB scale in each group. The TNF- $\alpha$  content in the injured spinal cord increased from 6 hours to 72 hours after the injury compared to the control group. There was no significant difference in TNF- $\alpha$  content between the group that maintained the rectal temperature at 37 °C and the group that maintained the rectal temperature at 39 °C. There was no significant difference in hindlimb motor function between the two groups.

研究分野：救急医療

キーワード：脊髄損傷 二次損傷 体温管理療法

## 1．研究開始当初の背景

脊髄障害は、その原因の多くは受傷時の機械的な外力による神経細胞や軸索の障害である一次損傷だが、受傷後に麻痺レベルの上行や麻痺の程度の悪化をしばしば経験し、これは二次損傷によるものと知られている。この二次損傷は、受傷部位の出血、浮腫、炎症により神経細胞や軸索でおこる炎症性サイトカインなどによる化学反応が原因であるといわれている。一次損傷に対する治療は未だ決定的なものはなく、また二次損傷に対する有効的な治療法も確立されていない。このような中、二次損傷を軽減させる目的で行われている、低体温療法は基礎研究により有効であることが示されている。また、脊髄損傷患者に対して冷却された生理食塩水を含むバルーンを血管内にカテーテルを用いて大腿静脈から挿入し、バルーン部分は下大静脈に位置させることで、外科的治療の際に血管内冷却が可能となり低体温療法が行えたことで効果があったという報告もされている。この全身低体温療法は心肺停止蘇生後や重傷頭部外傷など、もともと意識のない患者にたいして、筋弛緩薬投与し気管挿管、人工呼吸器管理下に、体表面や血管内の冷却装置を用いて、深部体温を32～34℃まで下げる治療法である。そのため意識のある脊髄損傷患者に対して、低体温療法を導入することは患者にとっての負担が大きく、現実的ではない。頸髄損傷患者は、末梢の体温調節機能が破綻し、急性期にしばしば39℃以上の高体温状態となる(うつ熱)。この高体温は、非ステロイド性消炎鎮痛薬や氷嚢による体表冷却などの一般的な方法では解熱が得られず、体温コントロールに難渋する症例がある。心肺停止後や重症頭部外傷後の高体温は神経学的予後を悪化させる事が知られており、脊髄損傷後の高体温について、二次損傷として神経学的予後を悪化させる可能性がある。しかし、このことについても詳細な検討の報告はなされていない。

## 2．研究の目的

本研究の目的は、脊髄損傷後の高体温は二次損傷を悪化させ、受傷後に体温を平温に維持することで脊髄二次損傷を軽減するという仮説をたて、動物実験にてその仮説を検証することである。

## 3．研究の方法

### 脊髄損傷モデルの作成

8～12週のWistar系メスラットを用いてイソフルレン麻酔下にT10～L2が露出するように皮膚、皮下組織を切開し傍脊柱筋を椎弓から剥離させた。脊髄に損傷を与えないようにT11～L1椎弓を慎重に切除し脊髄を露出した。この処置中は、直腸温をモニターしながらPhysio Suite for Mice and Rats(Kent Scientific CORPORATION)を用いて体温を37℃に維持した。脊髄損傷作成装置IH-0400 Impactor(室町機械株式会社)を用いて、露出部分の脊髄に一定の外力を加え脊髄損傷モデルを作成した。また、脊髄露出まで行ったラットをコントロール群とした。脊髄を露出させる際に脊髄に損傷を負ってしまったラットについては実験の対象外とした。損傷後1時間体温を37℃に維持した群(N群)と39℃に維持した群(H群)を作成した。



図 1; 脊髄損傷モデル作成装置により脊髄露出部分に一定の力で外力を加え脊髄を損傷させている

図 2; 受傷後 24 時間脊髄摘出時。脊髄に内出血を認める: 白矢印。

図 3; 体温維持装置を用いてラットの高体温を維持している。

#### 脊髄内 TNF- 抽出

脊髄損傷受傷後 6 時間後(N=4)、24 時間後(N=6)、48 時間後(N=6)、72 時間後(N=7)、コントロールラット(N=2)は手術後 24 時間で致死量のペントバルビタールを腹腔内に投与して深麻酔下にラットを安楽死させ、直ちに T12 を中心に脊髄を 1cm 摘出した。摘出した脊髄を氷冷した PBS1ml に浸して、10  $\mu$ l のプロテアーゼ阻害剤(protease inhibitor cocktail : SIGMA)を加えた後に、ホモジナイザーにて 4000 回転 8strokes の条件でホモジナイズした。ここからタンパク測定用に検体を 50  $\mu$ l 採取し、タンパク濃度測定まで -80 で保存した。残りの検体は 4 10000G の条件で 15 分遠心し、さらに得られた上清を再度 4 10000G の条件で 15 分遠心し、得られた上清を TNF- 測定まで -80 で保存した。

#### 脊髄内 TNF- 含有量測定

先に得られた上清内の TNF- $\alpha$  濃度をラット TNF- $\alpha$  ELISA キット(R&D)を用いて測定した。1サンプル 2 回の測定を行い、得られた値の平均値を解析に使用した。なお、得られた値はタンパク含有量 (Bradford 法にて測定)で補正した。

### 後肢機能評価

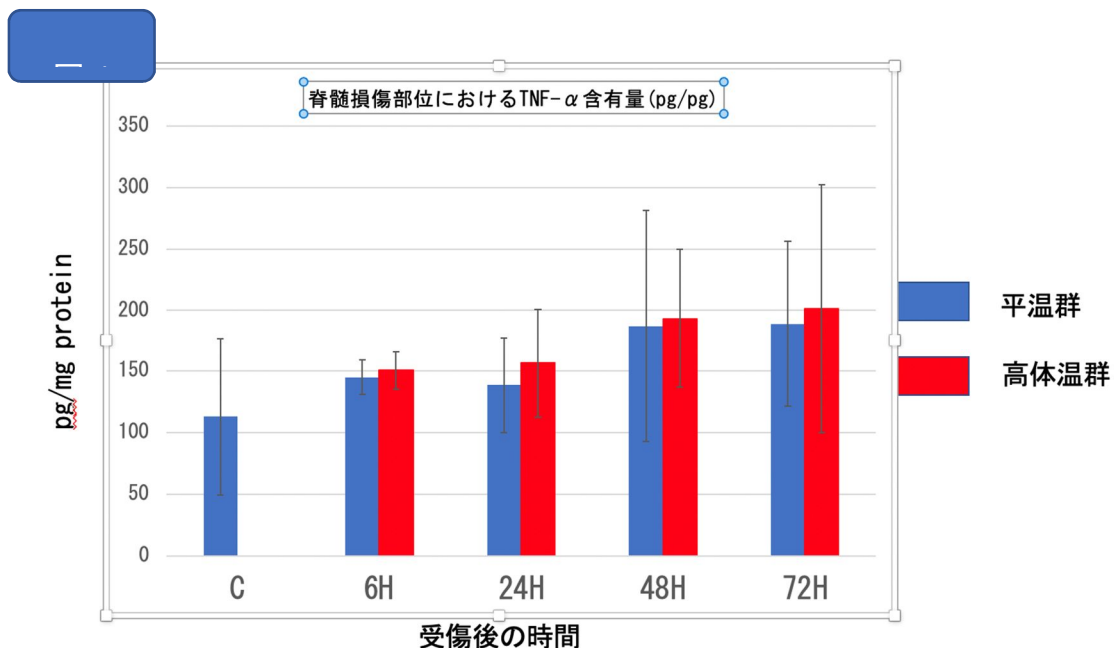
受傷後 72 時間での後肢機能を BBB スケールで評価した。

本実験は、愛媛大学動物実験委員会に申請し、愛媛大学動物実験規則に則って行った。

### 4. 研究成果

損傷脊髄部の TNF- $\alpha$  含有量はコントロール群に比較して、N 群、H 群ともに受傷後 6 時間以降、72 時間まで増加していた。N 群と H 群間では、含有量に差は無かった(図 4)。

受傷後 72 時間での BBB スケールによる後肢機能は N 群、H 群で差は無かった。



心肺停止蘇生後や、重症頭部外傷後の患者に対する全身低体温療法の有用性は散見されるが、一方で生命予後や神経学的予後の改善には寄与しなかったとの報告があり低体温療法については未だ不明な点が多い。また低体温療法で無く、平温維持療法でも神経保護効果があることも報告されている。その一方で心肺停止蘇生後や重症頭部外傷後の高体温は生命予後や神経学的予後の悪化を招くとされている。脊髄損傷後にはうつ熱により容易に高体温状態になるが、この高体温が神経学的予後にもたらす影響についての検討は、ほとんどなされていない。また、実臨床において低体温療法の適応は併発症を引き起こしたりする可能性が高くなるなど患者に対して脊髄損傷によるものとは別のリスクを負わせてしまうことになり、基礎研究において有効とされている低体温療法を実臨床に応用するのは現実的ではないといえる。そこで今回我々は、脊髄損傷モデルラットを用いて、脊髄損傷の受傷後における

高体温が神経学的予後の悪化をもたらすとの仮説を立て、研究を行った。今回の実験によって TNF-  
の脊髄損傷部位における含有量は、脊髄損傷受傷後 72 時間までは増加し続けることが分かった。し  
かし平温群と高体温群では脊髄内 TNF 含有量に差は認めなかった。また、受傷後 72 時間での後肢  
機能にも差は認めなかった。今後更なる研究として脊髄損傷の程度を更に強くすること、体温をもう少し  
高くすることを計画している。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菊池 聡  (Kikuchi Satoshi)  (00467854)	愛媛大学・医学系研究科・寄附講座講師   (16301)	
研究分担者	馬越 健介  (Umakoshi Kensuke)  (10467855)	愛媛大学・医学系研究科・助教   (16301)	
研究分担者	松本 紘典  (Matsumoto Hironori)  (70772531)	愛媛大学・医学系研究科・助教   (16301)	
研究分担者	安念 優  (Annen Suguru)  (10795305)	愛媛大学・医学系研究科・寄附講座助教   (16301)	
研究分担者	中林 ゆき  (Nakabayashi Yuki)  (30795307)	愛媛大学・医学部附属病院・助教   (16301)	
研究分担者	相引 眞幸  (Aibiki Mayuki)  (70148162)	愛媛大学・医学部附属病院・研究員   (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------