

修士学位論文

顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）の 神経保護効果

The neuroprotective effects by granulocyte-colony stimulating factor

平成 24 年 1 月 5 日 提出

首都大学東京大学院

人間健康科学研究科 博士前期課程 人間健康科学専攻

フロンティアヘルスサイエンス系神経再生科学分野

学修番号：08898606

氏 名：西尾 里志

（指導教員名：井上順雄教授）

要旨

本研究は中枢神経疾患の新治療法開発の基礎研究として実施した。顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は脳梗塞・脊髄損傷に対し国内外での治験が報告されているが、犬の中枢神経障害の治療効果及び難治性癲癇の抗癲癇効果の研究報告は皆無である。本研究では、G-CSF を犬の中枢神経障害の自然発症例と難治性癲癇モデルマウス (EL マウス) に投与しその効果を検討した。犬の中枢神経障害の症例は MRI 検査で重度の脊髄浮腫を確認した 6 例 (脳脊髄炎 3 例、脊髄梗塞 1 例、椎間板ヘルニア 2 例) に対し実施した。犬への投薬量は G-CSF $5\mu\text{g/kg/day}$ SC もしくは $10\mu\text{g/kg/day}$ SC 5 日間投与を行った。犬の 6 例は全頭歩行回復した。脊髄炎 3 症例は MRI 検査上顕著な改善を示した。G-CSF に起因する有害事象の発生はみられなかった。犬の脊髄の炎症浮腫に対しては、G-CSF 治療は効果的であり安全であると考えられた。抗癲癇効果は EL マウス 23 頭に対し実施した。EL マウス 18 頭に対し G-CSF $50\mu\text{g/kg/day}$ IP 5 日間投与を行った。投与開始後 2 日目より痙攣抑制効果を認め 7 日目に 12 頭で全般発作は消失していた。14 日目に全頭で痙攣発作を確認した。EL マウスの抗癲癇効果は確認したが抗癲癇原性効果は得られなかった。G-CSF の想定される薬理作用のうち炎症性サイトカイン (インターロイキン (IL) $\cdot 1\beta$ 、TNF- α 等) の収束効果及び G-CSF が誘導する血管内皮前駆細胞 (EPC) 等骨髄幹細胞による損傷組織修復効果の確認は今後の研究課題とする。脳脊髄炎・脊髄損傷・脳梗塞等の急性中枢神経疾患の病態悪化は、炎症性サイトカインの神経細胞毒性による浮腫・炎症・壊死といった過剰な生体反応が惹起されることにより重篤化する。癲癇の病態悪化も、海馬領域での IL- 1β による神経細胞毒性による発作の全般化が指摘され、痙攣重積発作では激しい脳浮腫を形成し死に至る危険がある。中枢神経疾患においても G-CSF は急性期の炎症性サイトカイン収束効果や EPC 等骨髄幹細胞を末梢血中に誘導することにより、中枢神経の損傷組織に移行し血管新生及び血管発生を活性化することにより中枢神経保護や神経再生に関与していると考え得る。今後投与時期、投与薬用量、投与期間を検討していくことで更なる効果を確認できる可能性がある。G-CSF は既存の薬剤であることから、早期の中枢神経治療法の開発が期待される薬剤である。

キーワード

G-CSF 脊髄浮腫 EL マウス 神経保護 抗てんかん

Abstract

This study was done as the basic study for making the new treatment of the disease of central-nervous system (CNS). The neuroprotective effects by granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) had been reported in cerebral infarction and spinal cord injury. However, there are not reported the effects by G-CSF in the disease of the dog's CNS and in the intractable epilepsy. So this study was examined the effects by G-CSF in the dogs that had got the spontaneous disease of CNS, and this study was examined the effects by G-CSF in the intractable epilepsy model mouse (ELmouse).

The G-CSF group of the dogs (n=6 : encephalomyelitis n=3, spinal cord infarction n=1, Intervertebra disk disease n=2) was diagnosed by clinical sign & MRI. The group was injected G-CSF for 5days(5 μ g/kg/day SC or 10 μ g/kg/day SC). This group was examined the safety and the neuroprotective effects by G-CSF.

In the exam for epilepsy, the G-CSF group (n=18) of the ELmouse was injected G-CSF for 5days(50 μ g/kg/day IP). This group was examined the effect by G-CSF in anti-epilepsy or anti-epileptogenesis.

There was not appeared the adverse event by the injection of the G-CSF. There was greater improvement in neurologic function in the G-CSF group of the dogs. In the walking function, the all dogs could be recovered the walking. The neuroprotective effects of G-CSF were checked by the MRI. The neuroprotective effects by G-CSF improved the spinal long cord lesion and disappeared spinal cord edema and myelitis on the MRI.

In the exam for epilepsy, all of the G-CSF group had improved the attack. At the 7days after the first injection, EL mice were separated at the four groups. The group of the disappeared epilepsy (n=12), the group of the middle degree (n=3), the group of the weak degree (n=3) and the group of the same level as control(control n=3). But at the 14days, all of the EL mouse reappeared the attack of epilepsy at the same level as control (n=21). There was greater effect in anti-epilepsy. There was no effect in anti-epileptogenesis in this study.

This study suggested that the G-CSF has the neuroprotective effects and the anti-epilepsy effects.

Key words : G-CSF , spinal cord edema, EL mouse , neuroprotective, anti-epilepsy

諸言

再生医療の治療法開発は、直接的には損傷組織に対し培養細胞・組織を移植し組織再生を目的としている。中枢神経障害に対しては脳梗塞¹⁾、脊髄損傷²⁾³⁾⁴⁾、パーキンソン病⁵⁾、てんかん等で神経幹細胞移植や骨髄幹細胞移植による神経再生の研究が行われている。しかし、細胞移植には安全性や倫理問題、多大な研究開発費用、そして熟練研究者の培養技術に頼ることなく工業生産並みに安定確実に細胞を供給できるかという難題を有する。一方間接的な治療法の開発は、再生医療の研究過程において得られた知見を基に、損傷を受けた細胞の保護や組織再生の誘導を目的に様々な投薬治療が開発、実用化されつつある。塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) による骨折癒合不全治療⁶⁾や虚血組織への血管新生療法⁷⁾、肝細胞増殖因子 (HGF) による劇症肝炎⁸⁾や肝硬変治療、エリスロポエチン (EPO) による頭部外傷⁹⁾¹⁰⁾や脳梗塞¹¹⁾治療はその代表である。

顆粒球コロニー刺激因子：G-CSF (ノイトロジン：中外製薬) は、顆粒球の増加のみでなく、末梢血への造血幹細胞等の骨髄幹細胞誘導を行う。この効果により白血病患者における末梢血造血幹細胞移植¹²⁾を可能にした薬剤である。再生医療分野で最も古くから治療方法として確立している骨髄移植・骨髄再生に必要不可欠な薬剤である。G-CSF は血管内皮前駆細胞 (EPC) の骨髄増殖活性及び末梢血誘導効果を持つことから末梢血中での骨髄幹細胞回収・培養・組織再生治療研究にも使用され、虚血性心疾患や壊死組織の血管新生効果は臨床研究されている。G-CSF は損傷組織で発生する炎症性サイトカイン (TNF- α 、インターロイキン (IL) 1 β 、IL-6) への抗炎症性サイトカイン作用により局所の炎症や浮腫を抑制することで組織保護効果が期待される。また G-CSF による EPC の末梢血を介した損傷組織への誘導作用は、損傷組織の血管新生、血管発生効果により炎症・浮腫・虚血等による損傷組織の保護、再生力増強効果を期待されている。G-CSF は急性期中枢神経損傷 (脳梗塞¹³⁾、脊髄損傷¹⁴⁾) や慢性圧迫性脊髄症 (椎間板ヘルニア、脊柱靱帯硬化) の急性憎悪病態¹⁵⁾¹⁶⁾に対しては、医学での治験が実施されている。しかしながら犬の中枢神経疾患への研究報告は皆無である。難治性癲癇への研究報告も皆無である。

犬の中枢神経疾患は脳脊髄炎・椎間板ヘルニア・脳腫瘍・水頭症等自然発症症例は医学同様の病態が存在する。獣医療においても MRI 検査が導入され病態の把握は可能になってきているが、脳脊髄の浮腫・炎症・虚血という急性期中枢神経障害の悪循環に対して有効的な治療方法は限られている。

ヒト癲癇モデルマウス (EL マウス) はヒトの難治性癲癇のモデルマウスとして確立している。癲癇発作は IL-1 β の大脑海馬領域での活性増大が神経細胞内への Ca²⁺の流入を増大し神経細胞損傷・細胞死という毒性を引き起こすことが指摘されている。

このような背景を基に今回犬の自然発症中枢神経疾患及び EL マウスに G-CSF を投与しその神経保護効果を検討した。尚、犬の自然発症症例は筆著者の動物病院を受診した重篤な脊髄浮腫を生じた 6 例に対し飼い主への十分な説明と承諾のもと治療を実施した。EL マウスは学内実験動物倫理規定に基づき申請し、許可を得て実施した。

方法

1) G-CSF による犬の中枢神経疾患治療

研究を実施した犬 6 例は、筆著者（獣医師）の動物病院（動物救急センター 埼玉県）を受診した四肢麻痺や両後肢麻痺等の重篤な中枢神経疾患症例であり、全症例自然発症症例である。診断は MRI 検査を実施し、脊髄に生じた浮腫や炎症が重篤であると診断した 6 症例であり、脊髄炎が 3 例、脊髄梗塞が 1 例、椎間板ヘルニアが 2 例である。MRI 検査は日立メディコ社製（永久磁石型 0.4Tesla）を使用して、投与前検査を 6 例すべてに、投与後再検査は脊髄炎 3 例に実施した。

G-CSF の投与方法は 1 日 1 回 $5\mu\text{g/kg}$ もしくは $10\mu\text{g/kg}$ 、5 日間連続を基本とし、皮下注射で投与をおこなった。安全性は毎日の健康状態の観察と、投与開始から 3 日目と 7 日目に血液検査を実施し確認した。血液検査は白血球数（WBC）の推移を中心にした血球観察、及び、血液生化学検査により肝臓酵素・腎臓機能・血糖値について評価を行った。椎間板ヘルニア症例については、手術後に投与を開始した。脊髄炎の 3 症例は治療後の MRI 検査によって比較が可能であったことから詳細を記載する。

なお、G-CSF 投与治療については、飼い主への十分な説明と承諾のもとに実施した。

① 症例 1 犬種シベリアンハスキー 11 才 ♀ 避妊手術済 混合ワクチン接種済
当院来院の 2 週間前より後肢の振戦、もつれによる歩様異常がみられ主治医を受診し、プレドニゾロン 1mg/kg 等の注射投薬を受ける。翌日に良化したが 1 週間後に再度状態が悪化し再受診。プレドニゾロン 1mg/kg SID を行うが状態が急速に悪化し、当院来院前日より起立困難、横臥姿勢となり当院に紹介を受けた。

来院時の所見は横臥状態であり神経学的検査では四肢の姿勢反応は消失しており、四肢の脊髄反射は顕著な更新状態であった。知覚は表在痛覚は四肢正常であり脳神経検査では特記事項はみられなかった。

MRI 検査結果は、頸椎 1-5 の広範囲に異常所見が確認された（T2WI 高信号、FLAIR 高信号、T1WI 等～低信号、T1 造影増強効果散在）。顕著な脊髄浮腫による CSF の流通障害も確認され横断性脊髄炎が最も疑われる所見であった。

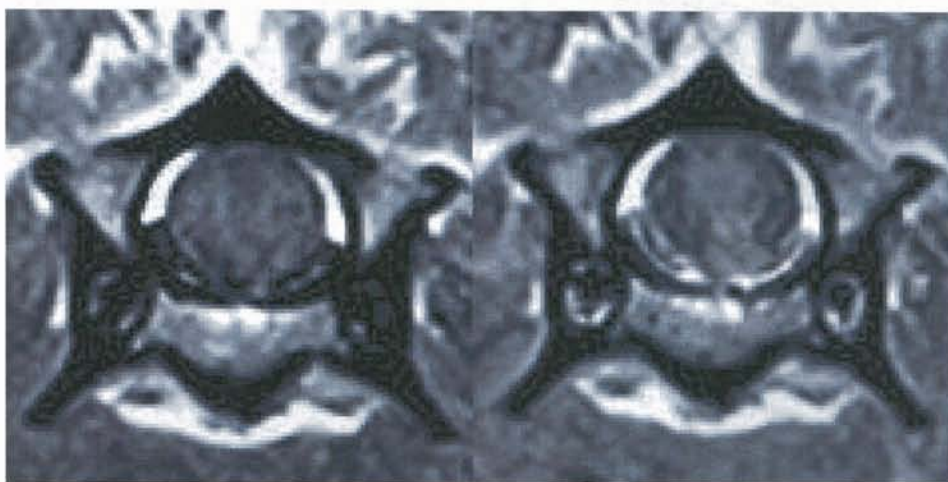
CSF 検査結果は単核細胞数 532 個/ $10\mu\text{l}$ と多数の細胞が出現しており、特に成熟リンパ球様細胞が 90%を示していた。CSF の生化学検査では CK は 148u/l と上昇、AST は 108u/l と上昇、GLU 64mg/dl と正常、比重 1.006 と正常範囲内であった。PCR 検査での犬ジステンパーウィルスは陰性であり、リンパ腫のクローナリティー検査も否定的であった。これらの所見よりから脊髄炎と診断した。治療は MRI 撮像中に病変が激しいことからコハク酸メチルプレドニゾロン（MPSS） 30mg/kg IV を行った。飼い主と相談の結果、ステロイド治療は副作用を懸念し、その後使用を希望せず G-CSF $5\mu\text{g/kg}$ を 5 日間、皮下投与で行った。8 日目に経過観察の MRI 検査を実施した。



画像上 T2WI 画像中 FLAIR 画像下 Gd-T1

図1 症例1 四肢麻痺の脊髄炎 来院時のMRI Sag 画像

C1-C5 の広範囲 Long cord lesion(LCL) に浮腫・炎症を確認



左 T1WI

右 Gd-T1

図2 症例1 来院時MRI 頸髄 AX 画像 C3 領域 造影増強効果あり

② 症例2 チワワ 9才 メス 避妊済 混合ワクチン接種済
脳脊髄炎既往歴について

9か月前に左半身中心の四肢不全麻痺・横臥姿勢となり当院を受診しMRI検査で脳脊髄炎（右前頭葉～後頭葉・中脳腹側・延髄左側～C2左側にT2WI高信号FLAIR高信号T1WI等～低信号T1造影部分的な増強効果あり肉芽腫性脳脊髄炎GMEを疑う）と診断し、

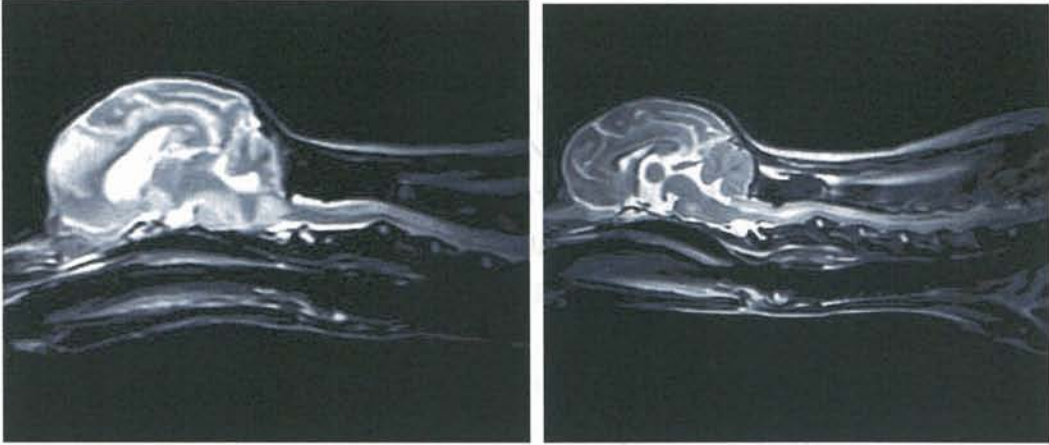
MPSS30mg/kg 投与後48時間の持続点滴を 2.5mg/kg/hr で実施した後プレドニゾロン 2mg/kg SID 7日間投与。順調に回復し起立歩行は正常になった。その後の継続治療はプレドニゾロン 0.125mg~0.25mg/kg/day の投薬をしていた。

今回の治療

9ヶ月经過後強い疼痛と横臥姿勢になったことから再度当院を受診した。来院時の所見は横臥状態であり神経学的検査では四肢の姿勢反応は消失し、四肢の脊髓反射は顕著な亢進状態であった。知覚は表在痛覚は四肢正常であり脳神経検査では特記事項はみられなかった。腹囲は膨満し皮膚は菲薄化し毛が粗毛になり長期ステロイドによる影響と思われた。

MRI 検査結果は、頸椎 1-6 の広範囲に異常所見が確認された (T2WI 高信号、T1WI 等～低信号、T1 造影増強効果散在)。顕著な脊髓浮腫による CSF の流通障害も確認され脊髓炎の悪化が疑われる所見であった。頭蓋内病変は大脳病変・脳幹部病変はほぼ収束しており中脳腹側にグリア瘢痕様の病巣が確認されたが活動的な病巣は頸髄であると考えられた。

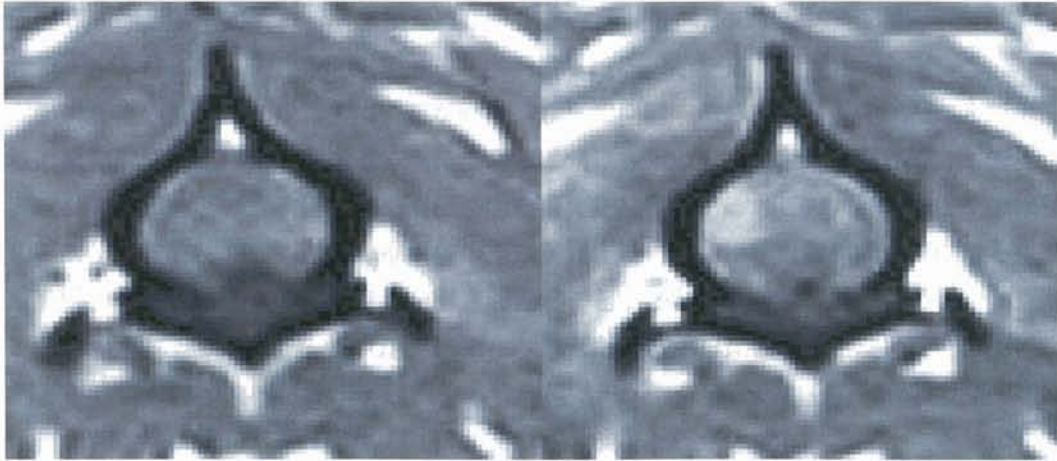
9ヶ月間のステロイド治療の結果、クッシング様の風貌を呈していたこともあり、飼い主と相談の結果、G-CSF10 μ g/kg SC 5日間投与を実施した。MRI 撮像中に MPSS30mg/kg IV したが、プレドニゾロンは翌日より 0.5mg/kg EOD を3回行い休薬した。



左 G-CSF 治療開始9か月前発症時

右 G-CSF 治療開始日当日

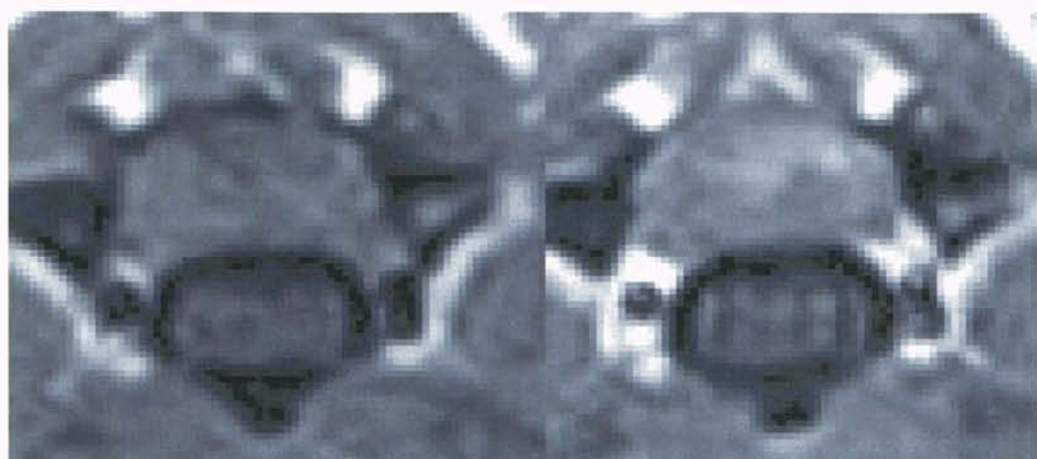
図3 症例2 MRI T2WI 脳脊髄炎症例の9か月前の発症時と今回発症時の画像



左 T1WI

右 Gd-T1

図4 症例2今回発症時のMRI AX画像 C2部 T1低信号領域の造影増強効果あり



左 T1WI

右 Gd-T1

図5 症例2 今回発症時のMRI AX画像 C4部 T1低信号領域の造影増強効果あり

③ 症例3 チワワ 8才 メス 未避妊 混合ワクチン接種済

散歩中より後肢のふらつきが始まり翌日には起立困難となりプレドニゾロン治療を行うが麻痺が進行したことから3日目に当院を紹介。

来院時の所見は両後肢起立困難な状態であり第4腰椎-仙椎までの広範囲の背部痛を顕著に訴えた。神経学的検査では両後肢の姿勢反応は消失し脊髄反射は膝蓋腱反射の消失、会陰反射消失、排尿失禁状態であり顕著なLMNsを呈していた。両後肢の知覚は表在痛覚は低下していた。脳神経検査及び両前肢においては特記事項はなかった。

MRI検査の結果は第12胸椎-仙椎領域の広範囲で異常が検出された。(T2WI高信号 T1WI等信号 T1造影増強効果なし) 顕著な脊髄浮腫によるCSFの流通障害も確認された。横断性脊髄炎が最も疑われる所見であった

飼い主と相談の結果、高容量のステロイドパルス療法は希望されず、G-CSF 10 μ g/kg SC5日間投与を行った。プレドニゾロン 1mg/kg3日間後0.5mg/kgを2日間使用した。

症例4 両後肢麻痺で来院 MRI検査の結果脊髄梗塞と診断

症例5 両後肢麻痺 MRI検査により重篤な椎間板ヘルニアを確認し即手術を実施

症例6 両後肢不全麻痺 MRI検査により重篤な椎間板ヘルニアを確認し即手術を実施

症例4-6はG-CSF10 μ g/kgを5日間皮下投与した。

犬の胸腰椎の椎間板ヘルニアは脊髄が腰椎5-6まで位置することから人の頸髄ヘルニア同様の重篤な脊髄損傷を引き起こし両後肢麻痺に陥りやすい。特に症例5と6はミニチュアダックスフントという軟骨形成の遺伝疾患を抱えた品種である。この犬種では椎間板髄核の石灰化変性を起こしており、椎間板ヘルニア発現時には、椎間板髄核の逸脱による重篤な脊髄損傷から両後肢の完全麻痺を引き起こすことが多々ある。

この3症例は経過のMRI検査が実施できなかったことから比較ができないこと、更に症例5と症例6は椎間板ヘルニア症例であり外科効果が大きいことから脊髄保護効果・機能回復の判定には使用せずWBCの推移と安全性の検証とした。

2) ELマウスへのG-CSF投与による癲癇発作抑制

2)-1 ELマウス

研究には、あらかじめ週 1 回の放り投げ刺激により、てんかん原性を獲得し、誘発をしなくても頻繁に発作を起こすようになった生後 20 週令～24 週令の EL マウスを用いた。

2)-2 EL マウスへの G-CSF 投与

全群 (21 頭) を、G-CSF 投与群 (18 頭) とコントロール群 (3 頭) に分け、G-CSF 投与群には、G-CSF(一般名 Lenograstim) (中外製薬: Neutrogen) を $50 \mu\text{g/kg}$ 、5 日間腹腔内へ投与した。コントロール群には G-CSF 溶解剤である注射用水を、同様に 5 日間腹腔内へ投与した。

2)-3 EL マウスへの発作誘発刺激試験

G-CSF 投与を行った 5 日間は、投与前に、痙攣誘発刺激を毎日実施し、誘発される発作の有無、及び、発作の程度を観察した。5 日間投与終了後は、投与開始から 7 日目、14 日目、21 日目、及び 28 日目に、痙攣誘発刺激を実施し観察をおこなった。観察の評価についてはコントロール群のてんかん発作の発現状態を基準とし発作のレベルによって (スコア 0-3) に 4 段階に分類した。コントロール群においては、すでに放り投げ刺激を行わずとも飼育ケージから取り出すという、弱い刺激により、全般発作が 100% 誘発される個体群を実験に使用している。このコントロール群同様の刺激で発作が誘発された個体を全く発作が抑制されない、コントロール同レベル個体群 (スコア 3) と判断した。実験では、放り投げ刺激は最大 3 度を実施したが、抗てんかん作用については飼育ケージから取り出した時点で発作が誘発されなければ、てんかん発作閾値があがっていると判断することが可能である。しかし、本研究では抗てんかん原性効果つまり発作焦点の消失の確認についても目的の一つとしているため、1 度の放り投げ刺激では不十分と考え、強い放り投げ刺激に対しても全般発作を誘発しない、ということを発作消失群 (スコア 0) とするために 3 度実施した。尚、コントロール群と発作消失群との中間型の分類として、飼育ケージから取り出す弱い刺激では全般発作は起こさなかったが誘発刺激 3 回までに全般発作を起こした個体群を弱いながらも発作が抑制されている事実から、発作抑制弱群 (スコア 2) とした。更に全般発作は起こさなかったが焦点発作が 3 度の刺激の中で 1 度でも発現した個体群を中等度の発作抑制群 (スコア 1) とした。全般発作を引き起こした個体はその時点でスコア 1 と評価し誘発刺激は終了した。焦点発作のみを起こした個体及び発作を起こさなかった個体は、放り投げ刺激を 3 度まで実施し評価した。具体的には 1 度目の誘発試験により全般発作を引き起こさなかった個体に対しては 3 分間観察後、2 度目の放り投げ刺激を行い 2 度目の放り投げ刺激後に 3 分間観察した。2 度目の放り投げ刺激で全般発作を引き起こさなかった個体には 3 度目の放り投げ刺激を行い 3 分間観察し最終評価をおこなった。

なお、本研究は、首都大学東京研究倫理委員会 (動物) の承認を受けて、実施した。

結果

1) G-CSF による犬の中枢神経疾患治療

犬の中枢神経疾患への投与の安全性 (表 1)

全 6 症例において白血球数 WBC は投与 3 日目には顕著に上昇し、投与終了後に収束した。赤血球数・血小板数において特記すべき事柄はなかった。血液生化学検査において、肝酵素、肝機能、腎機能、血糖値への G-CSF に起因する異常は全症例みられなかった。発熱、胃腸障害、呼吸器障害など重篤な副反応は観察されなかった。

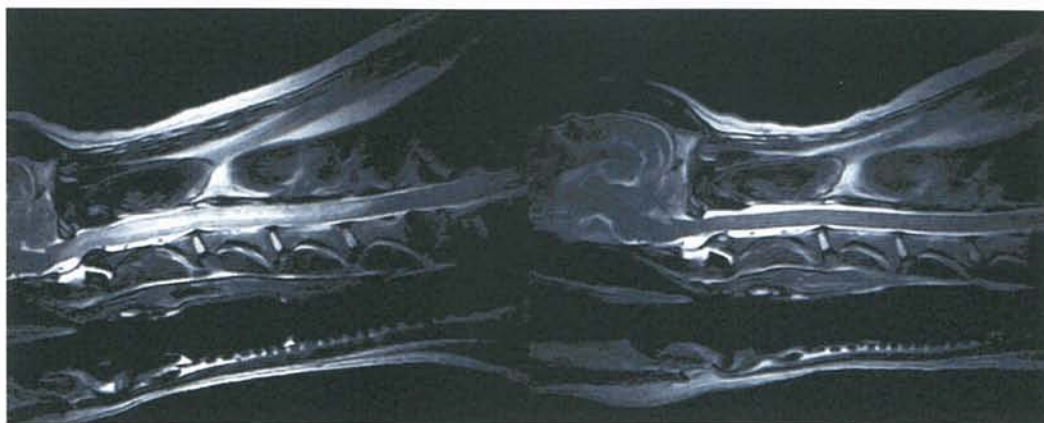
脊髄炎 3 例は MRI 画像の比較により顕著な脊髄浮腫の改善・炎症の収束を確認した。

神経機能の回復に関しては、全 6 例すべてが、回復の時期の差はあったが歩行回復を可能にした。

表 1 G-CSF 投与症例における WBC の推移

	来院時の状態	診断	神経学的検査	G-CSF 投与量	WBC 数の推移 (個/ μ l)		
					初診時	3日目	7日目
症例1	横臥姿勢四肢不全麻痺	脊髄炎	四肢UMNs	5 μ g/kg 5日間	8200	37700	18200
症例2	横臥姿勢四肢不全麻痺	脳脊髄炎(再発)	四肢UMNs	10 μ g/kg 5日間	27300	25300	9900
症例3	両後肢起立困難不全麻痺	脊髄炎	両後肢LMNs	10 μ g/kg 5日間	32800	49500	13900
症例4	両後肢麻痺	脊髄梗塞	両後肢UMNs	10 μ g/kg 5日間	14800	56500	13600
症例5	両後肢麻痺	椎間板ヘルニア	両後肢UMNs	10 μ g/kg 5日間	23600	73900	25500
症例6	両後肢不全麻痺	椎間板ヘルニア	両後肢UMNs	10 μ g/kg 5日間	7500	50300	18800

① 症例1の結果 起立歩行可能に回復 MRI 検査及びCSF 検査での顕著な改善を確認
 治療開始5日目にはふらつきながらも起立可能になった。8日目のMRI 検査において頸髄
 は良好に改善した：T2等信号 FLAIR等信号 T1等信号 T1造影増強効果なし(図6—
 図9) CSF 検査(細胞数115個/10 μ l CK24 AST27 Glu57)も良化中であった。
 入院9日目に退院し経過観察となった。現在3か月の経過をみているが症状の再燃なく、
 歩行・走行も可能な生活をしている。

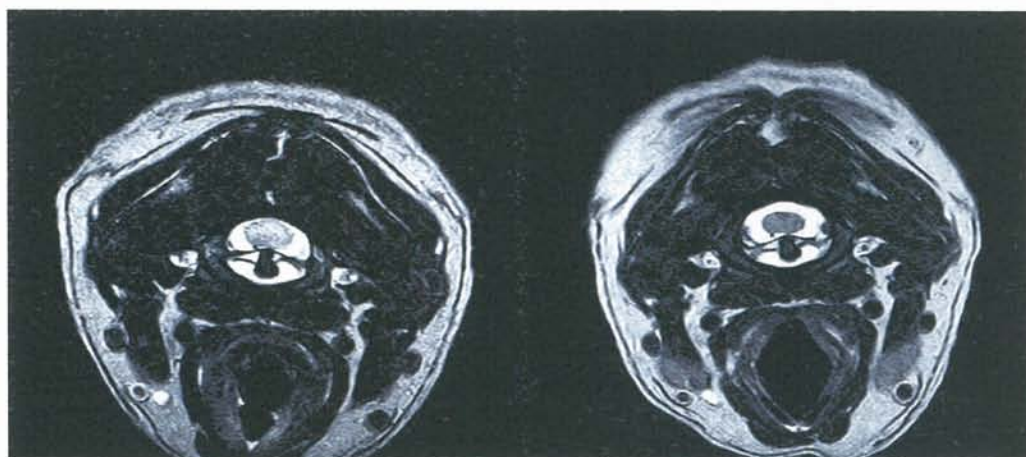


左 G-CSF 治療初日

右 G-CSF 治療8日目

図6 症例1 MRIによるG-CSFの治療効果の確認 T2WI SAG画像

G-CSF 治療により C1-C5 の広範囲の障害 (Long cord lesion) は収束した

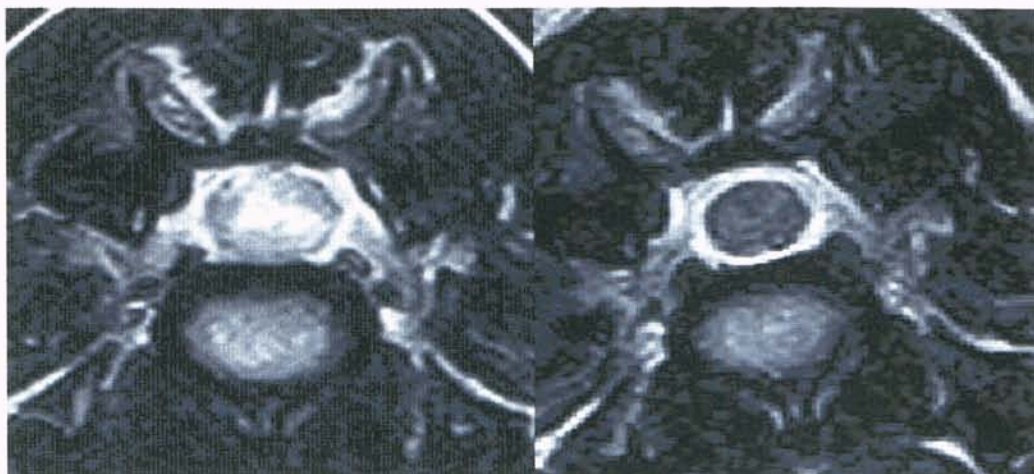


左 治療開始前

右 G-CSF 治療開始8日目

図7 症例1 MRIによるG-CSFの治療効果の確認 T2WI AX画像

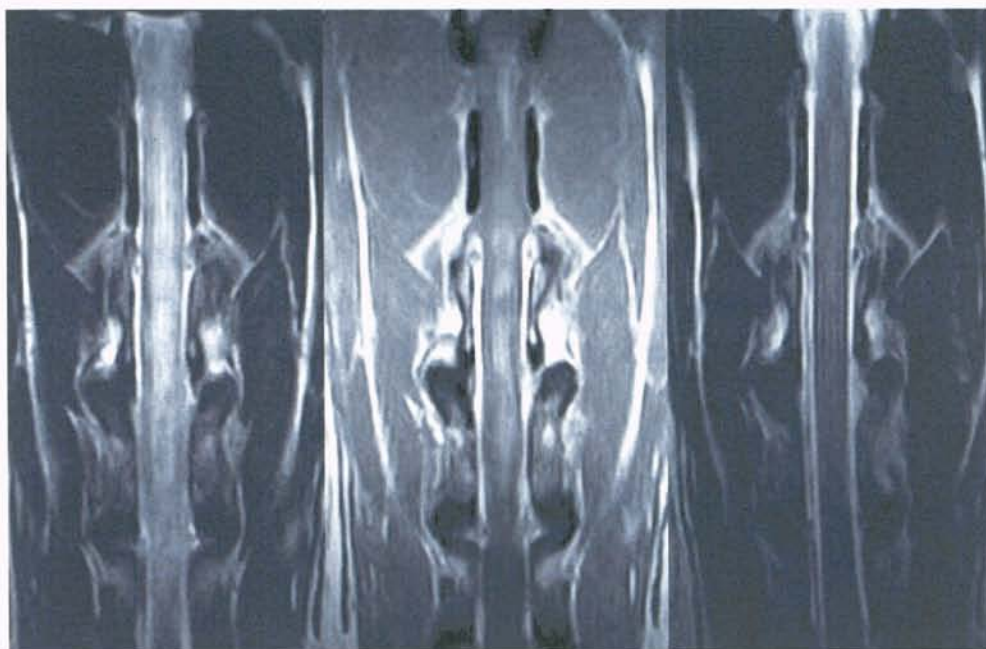
撮像部位 C1 歯突起部 重度の脊髄炎による浮腫により CSF の流れが特に背側で
 障害されていたが治療後には浮腫・炎症が収束し CSF の流れが改善した



左 治療開始前

右 G-CSF 治療開始 8 日目

図 8 症例 1 MRI による G-CSF の治療効果の確認 MRI T2WI AX 画像
撮像部位 C3-4 重度の脊髄浮腫・横断性脊髄炎は収束した



左 治療開始前 T2WI

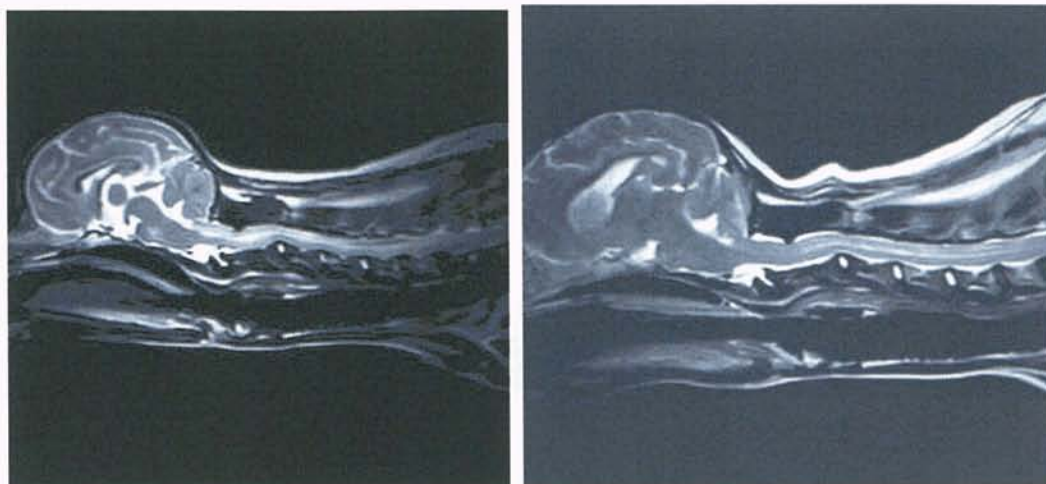
中 治療開始前 Gd-T1

右 治療 8 日目 T2WI

図 9 症例 1 MRI による G-CSF の治療効果の確認
広範囲の頸髄横断性脊髄炎は収束した

② 症例 2 の結果 起立歩行回復

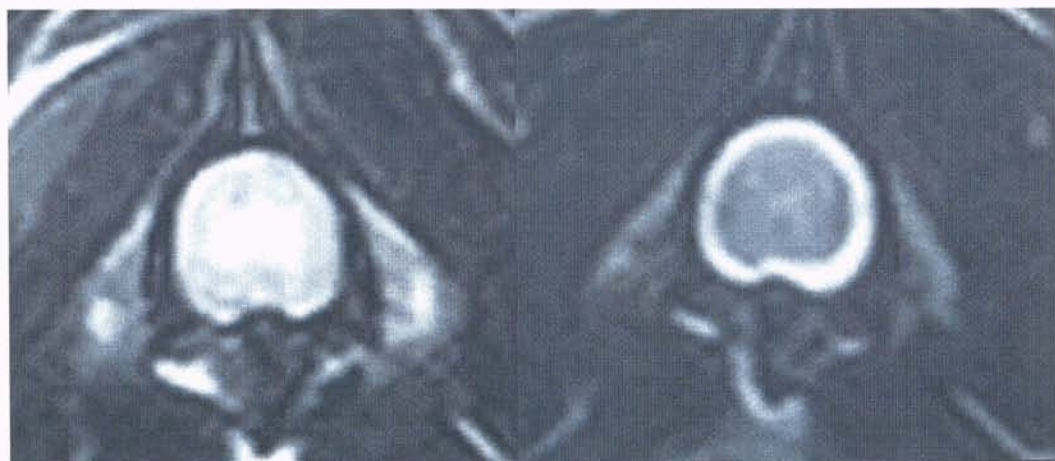
治療開始 8 日目にはふらつきながらも起立可能になり立位での排便排尿が可能になった。入院から 13 日目に歩行良好になり退院した。2 ヶ月後腰部痛を主訴に再来院した。起立歩行、神経学的検査での異常はみられなかったが、腰部痛の精査と脊髄炎の経過観察を目的に MRI 検査を実施した。MRI 検査（前回病変部位は良好に改善し顕著な脊髄浮腫も消失 L2-3 L3-4 線維輪による椎間板ヘルニア）の結果頸髄は良好であった。（図 10 図 11）その後定期的な観察を行っているが治療開始後 8 か月を過ぎプレドニゾロンの投薬はせずに良好に歩行・走行とも可能な生活をしている。



左 G-CSF 投与前

右 G-CSF 投与 2 か月後

図 10 症例 2 MRI による G-CSF の治療効果の確認 T2WI SAG 画像
頸髄病変は C1-C5 と広範囲 LCL に生じていたが、治療後改善した

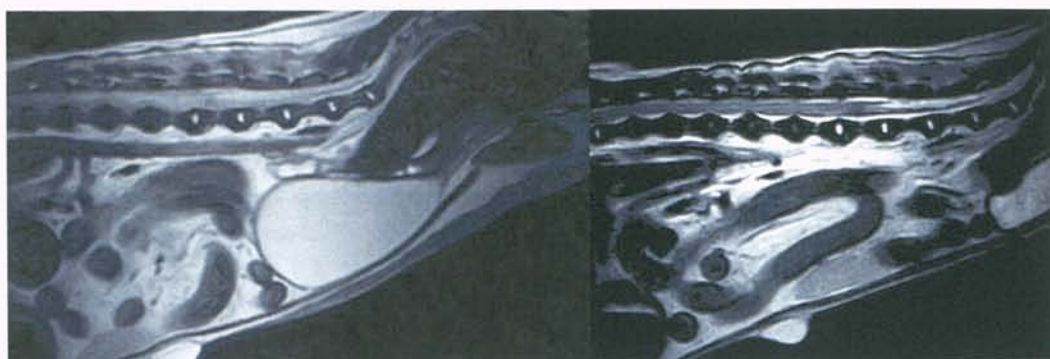


左 G-CSF 投与前

右 G-CSF 投与 2 か月後

図 11 症例 2 MRI による G-CSF の治療効果の確認 T2WI AX 画像
撮像範囲 C4 領域 脊髄横断性の重篤な浮腫・炎症は収束した

③ 症例 3 の結果 比較的歩行回復に時間がかかったが 3 か月後には四肢歩行可能
 G-CSF 治療開始から 10 日後に在宅での介護をご希望され退院。退院時陰反射及び尿失禁は改善したが両後肢での起立は困難であった。治療開始から 1 ヶ月後には左後肢での起立が可能になり耳を掻くなどの仕草が可能になった。治療開始から 1 ヶ月後に MRI 検査を行ったが広範囲の脊髄損傷・脊髄浮腫が改善しているのを確認した。(図 12・図 15)
 治療開始から 3 ヶ月後には両後肢での歩行が可能になり現在 7 ヶ月を過ぎ歩行可能。麻痺期間が長かったことから関節の硬結感があり走行はつらい時もあるが排泄行動や歩行などの日常生活に支障がないまでに改善している。

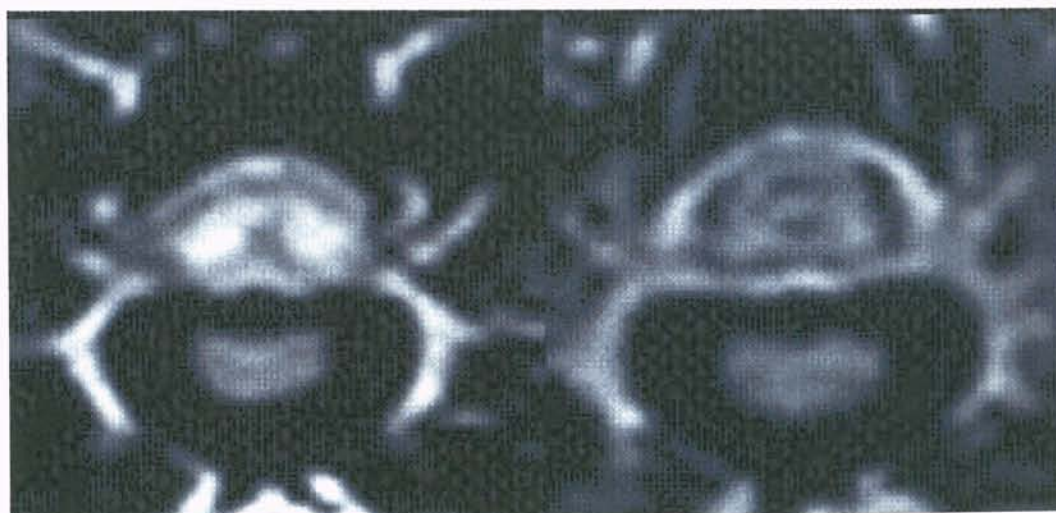


G-CSF 治療初日

G-CSF 治療 1 か月後

図 12 症例 3 MRI による G-CSF の治療効果の確認 T2WI SAG 画像

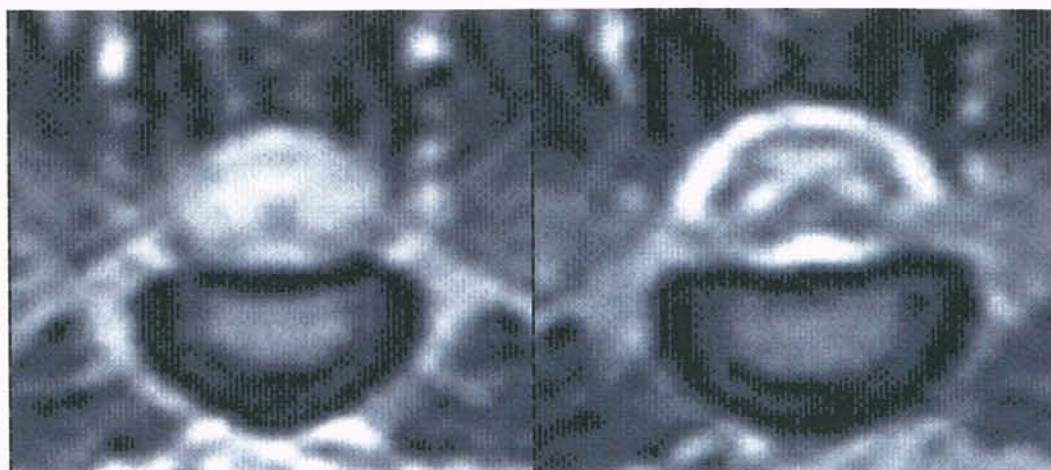
T12-S 領域までの広範囲の障害 LCL 両後肢 LMN s 会陰弛緩症例
 G-CSF を投与し広範囲の脊髄浮腫が収束し会陰弛緩や膀胱麻痺は改善
 L5-S 脊髄背側にグリア瘢痕様の信号領域あり



G-CSF 治療初日

G-CSF 治療 1 か月後

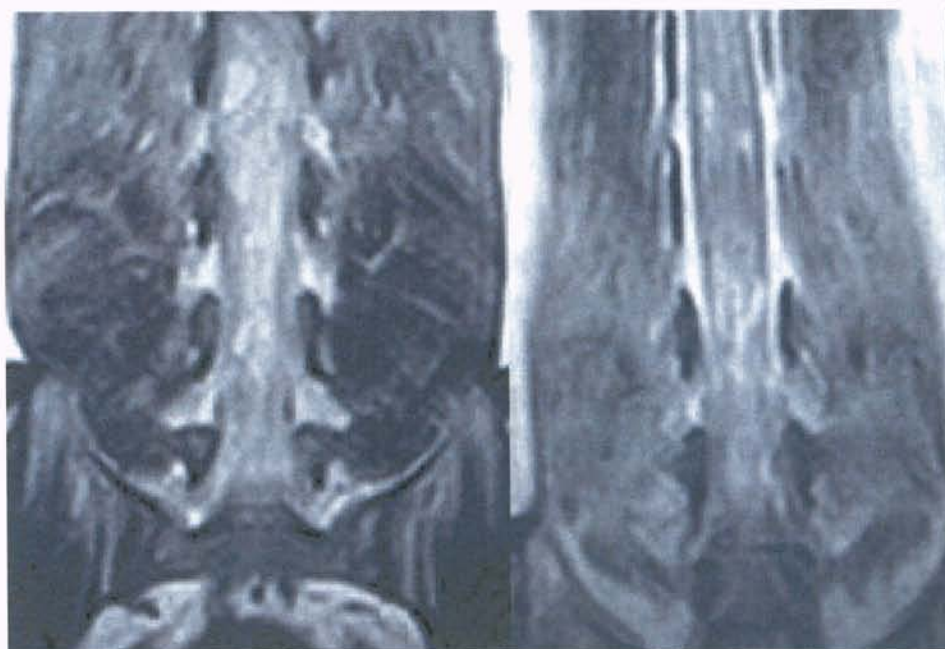
図 13 症例 3 MRI による G-CSF の治療効果の確認 T2WI AX 画像 L2 領域
 L2 周囲の脊髄横断性病変は収束している



G-CSF 治療初日

G-CSF 治療 1 か月後

図 14 症例 3 MRI による G-CSF の治療効果の確認 T2WI AX 画像 L4 領域



左 G-CSF 治療前

右 G-CSF 治療 1 か月後

図 15 症例 3 MRI による G-CSF の治療効果の確認 T2WI COR 画像

L4-S 領域にみられた脊髄炎が収束し L5-S のグリア瘢痕様が残存

2) EL マウスへの G-CSF 投与による癲癇発作抑制 (表 2、表 3)

EL マウスへの G-CSF 投与に際し、G-CSF 投与に起因すると思われる有害事象は確認されなかった。またコントロール群も含め、腹腔内投与に伴う注射手技による個体への悪影響も確認されず、全頭を評価するに値すると判断した。

コントロール群の EL マウスは、飼育ケージから取り出す際の興奮のみで痙攣を誘発する状態まで、痙攣発作の閾値は下がっており、放り投げ痙攣誘発刺激は必要としなかった。G-CSF 投与中、及び投与終了後 2 日目（投与開始から 7 日目）までの痙攣抑制効果を、抗てんかん効果とした。投与開始から 14 日目、21 日目、28 日目と長期的な痙攣消失効果を、抗てんかん原性効果とした。

G-CSF 投与群 18 頭のうち、投与終了後 2 日目（投与開始から 7 日目）での痙攣誘発刺激による反応は、スコア 3 が 0 頭、スコア 2 が 3 頭、スコア 1 が 3 頭、スコア 0 が 12 頭であった。

スコア 2 の 3 頭は、コントロール同様の飼育ケージから出すという弱い刺激での発作誘発が生じず、放り投げ刺激による痙攣誘発発作により、全般痙攣発作を誘発した。投与開始から 14 日目には、7 日目にスコア 2 の 3 頭はすべてスコア 3 レベルの全般発作を飼育ケージから出すだけで発現した。21 日目 28 日目においても同様スコア 3 であった。

スコア 1 の 3 頭は、明らかに焦点発作レベルの発作のみに、痙攣発作が抑制されていた。3 頭とも投与開始 7 日目においても痙攣発作は抑制されていた。投与開始から 14 日目には、7 日目にスコア 1 の 3 頭はすべてスコア 3 レベルの全般発作を飼育ケージから出すだけで発現した。21 日目 28 日目においても同様スコア 3 であった。

スコア 0 の 12 頭は G-CSF 投与中に発作の抑制がみられ、発作消失は G-CSF 投与開始から 3 日目には観察されるようになった。それらの個体は放り投げ刺激を 3 度行っても痙攣発作は誘発されず通常通りの日常行動が観察された。投与開始から 7 日目において痙攣発作は 12 頭で消失していたが、投与開始から 14 日目には、7 日目にスコア 0 の 12 頭は、すべてスコア 3 レベルの全般発作を飼育ケージから出すだけで発現した。21 日目 28 日目においても同様スコア 3 であった。

投与開始 7 日目	スコア 0	スコア 1	スコア 2	スコア 3
G-CSF 投与群	12 頭	3 頭	3 頭	0 頭
コントロール群	0 頭	0 頭	0 頭	3 頭

表 2 EL マウスへの G-CSF 投与による抗てんかん効果

スコア分類 0: 発作消失群 1: 発作抑制中等度群 2: 発作抑制弱群 3 発作抑制なし群

投与開始 14 日目	スコア 0	スコア 1	スコア 2	スコア 3
G-CSF 投与群	0 頭	0 頭	0 頭	18 頭
コントロール群	0 頭	0 頭	0 頭	3 頭

表 3 EL マウスへの G-CSF 投与による抗てんかん原性効果

考察

本研究は、再生医学分野での G-CSF の幹細胞誘導作用や抗炎症性サイトカイン作用等の基礎研究及び臨床治験を背景に、犬の自然発症中枢神経疾患とヒト癲癇モデルマウスに対して G-CSF を投与し、その安全性と効果について検討した。

犬の急性中枢神経障害に対しての G-CSF の安全性について

G-CSF は人体薬として発売以来、獣医療においても使用してきた薬剤である。犬に対しては、化学療法後の顆粒球減少症対策に対し 10 年以上の豊富な使用経験があり、安全に使用してきたが、中枢神経損傷への投与の安全性や効果は確認されていなかった。今回投与した全症例において G-CSF による重篤な副作用は発現せず、安全性は高いと考えられた。G-CSF の作用である WBC 上昇が顕著に確認されたが、これはヒトで観察される骨髄幹細胞を誘導した WBC 上昇と考えられる。犬においても化学療法での骨髄抑制が強い個体においては、G-CSF を投与し骨髄活性をしておくケースがあり、その際の WBC 上昇と同様の反応であったことから異常反応ではない。しかし犬においても内因性幹細胞が、末梢血中に誘導され、更に損傷組織に定着しているかは現時点では確認されていない。犬においては、幹細胞を特定する細胞表面分子マーカーは、一部のみ確立しているにすぎず、また組織への定着の確認も、動物愛護の観点から困難な状況であるが、今後の基礎研究の発展が重要と考える。

犬の急性中枢神経障害に対しての G-CSF の神経保護効果について

今回の研究結果では、犬の中枢神経障害に対しての G-CSF の神経保護効果については、MRI 画像及び臨床症状の顕著な改善から、少なくとも中枢神経浮腫抑制、炎症収束作用をもつことは明らかであった。これは周辺組織への障害の波及を考えた時に、重要な作用である。急性中枢神経損傷は、1 次性損傷と、引き続き生じる 2 次性損傷 (TNF- α ・IL-1 β ・IL-6 等炎症性サイトカイン、NO 等による細胞毒性・重篤な浮腫形成) により、中枢神経系は回復不可能な状態に陥ることは、広く知られている¹⁷⁾。脳脊髄炎や脊髄梗塞等虚血性疾患においても、激しい浮腫・虚血から 2 次性損傷が発生する。神経細胞への TNF- α や IL-1 β の細胞毒性は、細胞内 Ca²⁺ の過剰な上昇を惹起することが確認されており、細胞死を引き起こし神経機能の回復を困難にさせる。そして IL-1 β は、脳障害後のてんかん原性の発現¹⁸⁾にも関与している。また TNF- α や IL-1 β は、血液脳関門を構成するアストロサイトの足突起に存在するアクアポリン 4 (AQP4) の活性を増大させ、AQP4 活性の増大は、アストロサイトの浮腫・膨化という細胞障害性浮腫を引き起こし、血液脳関門を破綻させ、更に病態が周辺組織に及んでいく。これは、頭蓋内や脊柱管内という閉鎖環境内での内圧の上昇によるものであり、神経細胞保護のためには、中枢神経の浮腫や炎症を早期に収束させることが最重要である。現時点では、AQP4 拮抗薬は開発されていない。それでは浮腫を形成させないために、抗炎症性サイトカインの拮抗剤が有望であるかという点、IL-1 β は低活性状態では細胞保護に働くことも確認されている。また IL-6 の拮抗薬である抗 IL6 受容体抗体を用いての、IL-6 抑制効果においても完全な遮断は逆に組織への悪影響が懸念されている。TNF- α においても、同様に完全な拮抗による組織の病態悪化の懸念がある。一方抗 IL-6 受容体抗体の投与により、関節リウマチ・多発性骨髄腫など様々な病態で効果が確認され、脊髄損傷では損傷部の軽減のみでなく、機能回復や将来的な幹

細胞移植のためにも、初期抑制効果は重要であると考えられている¹⁹⁾。現状では一度惹起された炎症性サイトカインは、完全な拮抗を目的とするより、緩衝的な作用による調整が重要であると考えられる。この点からも G-CSF に注目をしている。G-CSF は、TNF- α や IL-1 β の拮抗薬としての作用はないが、炎症性サイトカインの活性抑制効果²⁰⁾ をもつと考えられている。更に G-CSF が誘導する内因性幹細胞の損傷組織への誘導と生着²¹⁾ による血管新生効果や、直接の神経細胞死を抑制する²²⁾、等複合的な効果が考えられる薬剤である。この作用が、中枢神経系の浮腫の原因となる IL-1 β や TNF- α を直接調整している可能性は指摘されているが、アストロサイトに存在する AQP4 の活性を、G-CSF が直接抑える可能性についても大変興味深いテーマと考える。特に今回早期の神経症状の回復と安定した効果の持続が、過去の高容量ステロイド療法と比較しても、優れている可能性を感じる結果であったことから、G-CSF に抗 AQP4 作用があるかと感じてしまう結果であった。つまり炎症性サイトカインが惹起され、局所のサイトカインストームに陥った後にはあまりにも早い症状の改善であったからである。G-CSF が抗 AQP4 作用があるのであれば、脳浮腫・脊髄浮腫治療の特効薬となる可能性があると考えられる。この点も今後の研究課題とする。

今回の投薬は、高用量ステロイド療法を副作用を懸念し希望しない飼い主に、代替案として、効能外使用である事も含め説明をし、承諾を得て使用した。今回の治療効果が、即高用量ステロイド療法より優れた治療方法であるとは、現時点では科学的に判断できないが、少なくとも高用量ステロイド療法に対しては重篤な副作用から、使用に抵抗のある飼い主へ提示する代替案としての選択肢の一つには、なり得ると考えている。今後の課題は、長期投与や頻回投与での安全性と有効性の検討が、必要であると考えている。今回 G-CSF 治療を行った脊髄炎 3 症例は、経過観察中であるが、G-CSF の投薬は発症急性期の投与のみであり、長期投与や頻回投与は実施していない。G-CSF は、ヒト蛋白遺伝子組み換え製剤であるため、犬においては EPO の長期投与でみられる抗 EPO 抗体産生と同様に、抗 G-CSF 抗体産生リスクがあると考えられる。再生医療研究の恩恵を獣医療が受けるためにも、犬の自然発生病態の治療が医療に還元される為にも、犬の遺伝子組み換え製剤の製造・発売を待ち望んでいる。

難治性癲癇に対しての G-CSF の効果について

EL マウスを用いた G-CSF 投与の研究結果からは、抗癲癇効果に関しては、投与中及び投与終了後 2 日目（投与開始から 7 日目）までは、個体差はあるものの十分な抗癲癇効果を確認することができた。これが神経保護効果によるものであるかについては、海馬の炎症性サイトカインの活性が抑えられていることや、浮腫形成が抑制されているか等を、神経科学的解析及び病理学的解析から行う必要があり、今後の継続研究とする。抗癲癇原性作用に関しては、本研究では確認できなかった。しかしながら、G-CSF のもつ骨髄幹細胞誘導、特に EPC 誘導作用（骨髄から末梢血、そして損傷組織への誘導作用）は、損傷組織の血管新生及び血管発生を引き起こし、脳梗塞・心筋梗塞など虚血壊死組織の細胞生存率の上昇、惹いては組織機能回復効果が確認されている。つまり癲癇病態においても、大脳海馬領域への EPC の浸潤による血管新生と血管発生を誘導することによる脳組織の保

護効果が期待できる。これは癲癇発作の発現時に生じる、IL-1 β の細胞毒性による癲癇原性の確立・発作の全般化を防ぐ可能性がある、と考えられることから、例えば、人生での初発の発作時の投薬（特に遺伝的てんかんの背景がある家系での初発発作発現時等）というような治療時期によっては、癲癇原性を確立せず、その後の癲癇発作の発病を引き起こさない（つまり難治性にならず単回の痙攣発作のみになる）可能性は否定できない。更に今後の投薬量や局所への埋没（高濃度の局所での持続的 G-CSF 供給を可能にする）等、薬剤運搬方法の改良によっても、抗癲癇原性作用を得る可能性はあると考えている。また海馬領域の神経幹細胞誘導が、G-CSF により引き起こされることが可能であれば、内因性神経幹細胞による脳組織の修復の可能性があり、抗癲癇原性を確立した個体群においても抗癲癇原性作用を得る可能性はあると考えられる。

このような視点からも、遺伝的に 100%痙攣発作を発現する EL マウスを研究に用いる有用性は高く、EL マウスを用いた多様な研究がもたらす結果に期待をする。特に海馬に直接 G-CSF を注入する研究や、持続的 G-CSF 供給による効果の研究は、骨髓幹細胞と神経幹細胞の海馬への G-CSF による誘導の有無について確認する研究とともに重要であると考え、今後の継続した研究課題として考えている。

参考文献

- 1) Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Shimazaki T, Okano H, Mizusawa H
: Human neuronal stem cells improve sensorimotor and cognitive impairment in Mongolian gerbils after ischemia. *J. Neurosci. Res.* 78:215-223, 2004.
- 2) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M et al.
: Transplantation of in vitro expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J. Neurosci. Res.* 69(6): 925-933, 2002.
- 3) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, Kanemura Y, Mori H, Kobayashi S et al.:
Transplantation of human neural stem/progenitor cells promotes functional recovery after spinal cord injury in common marmoset. *J. Neurosci Res.* 80:182-190, 2005
- 4) Cummings BJ, Uchida N, Tamaki D, Salazar D L, Hooshmand M, Summers R, et al :
Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102:14069-14074, 2005
- 5) Freed C R, Greene P E, Breeze R E, Tsai W, Mouchel W D, Kao R, et al:
Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344: 710-719, 2001.

- 6) 岸上義弘, 伊波裕規, 大東勇介, 小倉政光, 長村徹, 佐々木靖弘 他 : 骨折癒合不全症に対し、線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) とドラッグデリバリーシステム (DDS) を利用した、骨再生によって治療した 5 例 *Japanese journal of veterinary anesthesia & surgery* 35, 168, 2004
- 7) 丹原 圭一, 藤田 正俊, 田畑 泰彦, 米田正始 : 塩基性線維芽細胞増殖因子による虚血性心疾患の血管新生療法 *Journal of the Japanese Coronary Association* 8(3), 71-74, 2002
- 8) 坪内博仁 : 劇症肝炎に対する HGF 治療法の確立 難治性の肝疾患に関する研究 平成 14 年度 総括・分担研究報告書 : 東京, 厚生労働省, 106-107, 2003
- 9) Brines M, Cerami A: Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 6:484-494, 2005
- 10) 安原隆雄、伊達勲 : 頭部外傷を再生医療から考える *Jpn J Neurosurg Tokyo* 19:210-215, 2010
- 11) Brines M L, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, Lanerolle N C, Cerami C, et al Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97(19):10526-31, 2000
- 12) 佐藤典宏, 茂木祐子, 金井ひろみ, 中瀬俊枝, 池淵研二, 関口定美: 同種末梢血幹細胞移植 (allo-PBSCT) における G-CSF 動員後末梢血 CD34 陽性細胞数の目標値の設定 *日本アフェリシス学会雑誌* 17(Supplement), 72, 1998
- 13) Shyu WC, Lin SZ, Lee CC, Liu D D, Li H: Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke : a randomized controlled trial. *CMAJ* 174(7):927-933 2006
- 14) 高橋宏, 山崎正志, 大河昭彦, 国府田正雄, 橋本将行, 橋本光宏 他: 急性脊髄損傷に対して顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor : G-CSF) 投与による神経保護療法を施行した 6 症例 *千葉医学* 86 :175-183, 2010
- 15) 佐久間毅, 山崎正志, 国府田正雄, 橋本将行, 高橋宏, 林浩一, 他: 圧迫性脊髄症の急性増悪期に顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 投与による神経保護療法を施行した 5 症例 *千葉医学* 86:11-18:2010
- 16) 佐久間毅, 山崎正志, 国府田正雄, 高橋宏, 加藤啓, 林浩一, 他: 脊柱靱帯骨化症に伴う脊髄障害性疼痛に対し顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) が著効した 2 例 *千葉医学* 86(5):185-189, 2010
- 17) Nakamura M, Houghtling RA, MacArthur L, Bayer BM, Bregman BS : Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Exp Neurol* ; 184:313-325, 2003
- 18) 朱剛, 岡田元宏, 吉田淑子, 若林孝一, 兼子直 : IL-1 β のてんかん原性機序 : 海馬アデノシン遊離に対する効果の検討 *てんかん研究* 24(3), 110, 2006
- 19) 西本憲弘、平野俊夫 : *Interleukin-6 /Bench to Bedside* : 東京, メディカルレビュー社 2007

- 20) 門田領, 国府田正雄, 大河昭彦, 山崎正志: 脊髄損傷における顆粒球コロニー刺激因子の神経保護作用: 日本脊髄障害医学会雑誌; 20:180-181:2007
- 21) Koda M, Nishio Y, Kamada T, Someya Y, Okawa A, Mori C, et al : Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. Brain Res ; 1149:223-231:2007
- 22) Nishio Y, Koda M, Kamada T, Someya Y, Kadota R, Mannoji C, et al: Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. J Neuropathol Exp Neurol ; 66:724-731:2007

謝辞

本研究を行うにあたり、大学院入学以来多大な協力とアドバイスをいただいた担当教授である井上順雄先生に、心より感謝を申し上げます。貴重なモデルマウスである EL マウスのご提供から本研究の指導を、直接、熱心にしてくださった村島善也先生に、心より感謝を申し上げます。