原 著

実験的脊髄損傷におけるedaravoneの有用性の検討 —運動機能回復と軸索保護作用について—

籾 拓郎, 栗栖 薫, 山口 智, 岡崎 貴仁, 武田 正明

Effect of Free Radical Scavenger Edaravone on Experimental Spinal Cord Injury - Functional Recovery and Axonal Protection -

by

Takuro Magaki, M.D., Kaoru Kurisu, M.D., Satoshi Yamaguchi, M.D.,
Takahito Okazaki, M.D., Masaaki Takeda, M.D.

from

Department of Neurosurgery, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

Generation of free radical plays an important role in development of secondary spinal cord injury (SCI). Edaravone is a free radical scavenger, and has been used for protection against ischemia in patients with cerebral infarction. We investigated the effect of edaravone on severe experimental SCI. Treatment with edaravone (3mg/kg of body weight administered intravenously and subcutaneously (s.c.) immediately after injury, plus 3mg/kg s.c. on day 1 and day 2) was compared with saline treatment in rats subjected to severe 50 g · cm weight drop thoracic SCI. Neurological recovery was evaluated periodically over 3 weeks by BBB locomotor rating scale and inclined plane method (IPM). To investigate protective effect of edaravone on axons, we evaluated the preservation of rubrospinal tract by counting red nucleus (RN) cells labeled retrogradely from lumbar spinal cord with fluorescent tracer. Edaravone significantly improved recovery in early phase in both BBB scale and IPM. The number of labeled RN neurons of edaravone-treated group had a tendency to be larger than of control group. These results indicate that edaravone has therapeutic potential for protecting the injured spinal cord.

Key words: spinal cord injury, edaravone, free radical, secondary injury, axonal preservation

Spinal Surgery 19 (4) : 315~320, 2005

はじめに

脊髄損傷を含む中枢神経系損傷において、外傷に伴って発生する病態には、直接の機械的損傷による一次損傷と、虚血や浮腫、損傷部組織内への白血球の進入からグリオーシス形成や神経細胞の脱落に至る二次損傷があり [6, 11, 18], 後者により受傷後急性期から亜急性期にかけて症状増悪を引き起こされる。外傷治療の主眼はこの二次性損傷をいかに抑えるかであり、エビデンスに基づいた治療としてmethylprednisolone大量療法が行われている [4, 5] が、しかし重症損傷に対しては

methylprednisolone単独では効果に限界があるのが現状である。

中枢神経系の二次性損傷にフリーラジカルが関与していることは以前から報告されており [8, 9, 12], 損傷後にグルタミン酸を主とした興奮性アミノ酸の増加により細胞内カルシウム上昇が引き起こされ、フリーラジカル産生系が活性化される過程が明らかとなっている [12]。脊髄損傷においても一酸化窒素やペルオキシナイトライトの産生が増加することが報告されており [13], これら発生したフリーラジカルにより更なるフリーラジ

(Received : May 16, 2005, Accepted : July 13, 2005)

広島大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経外科 (連絡先: 籾 拓郎, 〒734-8551 広島市南区霞1-2-3) Address reprint request to: Takuro Magaki, M.D., Department of Neurosurgery, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima, 734-8551, Japan

Fig.1: Evaluation of Motor function using BBB locomotor rating scale

Fig.2: Evaluation of Motor function with inclined plane method

カルの産生や脂質過酸化, DNA障害などが促進され神経細胞死に至ると考えられている。

Edaravone (MCI-186; 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) はフリーラジカル消去作用を持つ薬剤であり, 脳梗塞急性期に伴う神経症候, 日常生活動作障害, 機能障害の改善を効能・効果として臨床応用されている。

今回我々は脊髄損傷における運動機能回復に対するedaravoneの有効性を検討した。また同薬剤の軸索保護作用について, げっ歯類で運動機能(主として歩行)と相関するとされる赤核脊髄路について検討を行った。

対象及び方法

本研究のプロトコルは広島大学動物実験施設の倫理委員会の承認を受けた。また動物の取り扱いにはNational Institutes of Health (NIH) のガイドラインに沿って施行した。

動物として成体雌Wistar系ラット (300–350g) を使用した。麻酔はpentobarbital (40mg/kg) の腹腔内注射により施行した。

損傷モデルとしてはAllenら [2] の方法に準じて weight dropping methodにより挫傷性脊髄損傷を作成した。動物を腹臥位とし, 胸腰部の皮膚を正中切開し傍脊柱筋を剥離して, 椎弓を露出, 手術用顕微鏡下に第7から第9胸椎レベルのlaminectomyを行った。第8胸椎レベルで硬膜外に脊髄背側へ10gの錘を50mmの高さから直径2.5mmのimpactor rod上へ落下させ50g・cmの損傷を加えた。

損傷作成後は尿路感染等の合併症を防止するため, 自尿が安定するまで膀胱圧迫による手動的な排尿管理を行

った。また損傷後7日間セフェム系抗生物質の腹腔内注射を行った。

Edaravoneの投与量と時期は脳虚血の実験 [10] に準じて施行した。edaravoneは原末を製造元 (三菱ウェルファーマ) より入手し溶解液を調整した。動物をedaravone投与群 (Ed-group) と対照群 (Cont-group) に無作為に割り当てた。Ed-groupに対しては損傷作成直後にedaravone 3mg/kgを静脈内に, さらに3mg/kgを皮下に投与した。さらに1日後, 2日後に3mg/kgを皮下投与した。Cont-groupには同量の生食を同時期に投与した。

受傷前, 受傷後1, 3, 5, 7, 14, 21日に運動機能の評価を行った。運動機能はBasso-Beattie-Bresnahan (BBB) locomotor rating scale [3], およびinclined plane method [17] により測定した。なお, 測定は動物がどちらの群に属するか分からない状態で行った。

受傷4週後に上記麻酔下に第11胸椎から第1腰椎のlaminectomyを行い, 逆行性蛍光色素であるFluoro-Gold (Fluorochrome, Englewood, CO) を0.2μlを左側腰膨大に定位的装置を用いて注入した。注入7日後にdiethyl ether吸入およびpentobarbital腹腔内注射にて深麻酔した後に4%paraformaldehydeの経心的灌流にてsacrificeし, 脳脊髄を一塊として採取, 水平断にて脳幹部の凍結切片を作成し, 蛍光顕微鏡下に対側赤核におけるFluoro-Goldにて標識された細胞数を計測した。なお, 腰髄の色素注入部も蛍光顕微鏡下で観察し色素の注入が成功していることを確認した。

統計解析についてはMann-Whitney U-testを用いて評価した。検定における有意水準は5%とした。

Fig.3: Fluorescence photographs of the red nucleus (RN) neurons retrogradely labeled with Fluoro-Gold (FG). Labeled neurons of RN were clearly observed both in Ed-group (left) and Cont-group (right). ($\times 100$)

結果

実験に使用した動物24匹中、6匹について脊髄損傷の作成が不適当なため除外となり、18匹について評価を行った。除外となったのは、衝撃負荷が不十分であった3匹 (Ed-group 1匹, Cont-group 2匹) と硬膜下に大きな血腫を形成し挫傷性損傷モデルに適合しなくなった3匹 (Ed-group 1匹, Cont-group 2匹) であった。従って評価に用いたラットはEd-groupが10匹, Cont-Groupが8匹であった。

適切な損傷が作成された動物では、手術用顕微鏡下の観察にて受傷直後から損傷部脊髄の強い腫脹が認められた。5週後の脊髄採取時には損傷部脊髄は特に背側で萎縮していた。

脊髄損傷に伴う合併症は、尿路感染が2匹 (Ed-group 1匹, Cont-group 1匹)、下肢の引きずり時の摩擦による挫創1匹 (Ed-group) で、両群に大きな差はなかった。

評価対象となった18匹すべてが損傷1日後に両下肢の完全麻痺を呈し、十分な損傷の負荷が加えられていることが確認された。BBB scoreにて3日後、5日後でEd-groupがCont-groupと比較して運動機能の回復が有意に良好であった (Fig.1)。Inclined plane scoreでは3日後でEd-groupがCont-groupと比較して有意に良好であった (Fig.2)。その後両群とも経時的に運動機能は回復したが、両者の差は縮小する傾向であった。

左側腰髄に注入したFluoro-Goldにより対側赤核にて同色素で標識された神経細胞が認められた。Fluoro-Goldは蛍光顕微鏡下でUV用フィルターを通して青白色の蛍光を発して観察された (Fig.3)。赤核の標識細胞数は、Ed-groupで 77.3 ± 22.5 個, Cont-groupでは 19.3 ± 7.3 個で、Ed-groupで多い傾向がみられたが有意ではなかった (Fig.4)。

Fig.4: Counts of retrogradely labeled FG neurons of RN

考察

Edaravoneはフリーラジカルとくにヒドロキシラジカルの消去作用を持つ薬剤で、フリーラジカル消去作用の結果として脂質過酸化抑制作用および血管内皮細胞障害抑制作用も示す。ラット虚血性脳血管障害モデルにおいて、脳浮腫、脳梗塞容積、神経症候および遅発性神経細胞死に対する抑制作用が確認され [1, 14, 20]、脳梗塞急性期に対し臨床応用されている。中枢神経系損傷に対しての検討としては、ラット脳挫傷モデルでの報告があり、フリーラジカルの低下と脳浮腫抑制作用が認められている [15]。同薬剤は、脳梗塞治療に用いられる他の多くの薬剤と異なり、出血を助長しない薬理機序である点が外傷治療への応用を考える際に大きな長所と考えられる。

本検討で作成した損傷モデルは、脊髄損傷負荷としては受傷直後に全例BBB 1を呈していること、および後述するように赤核脊髄路に障害が及んでいることから、重症脊髄損傷に相当するものと考えられる [3]。

今回の検討では受傷後早期の運動機能がedaravone投与群で有意に良好であった。脳虚血や脳損傷と同様、脊髓損傷においてもフリーラジカルは急性期に上昇することが報告されている [13]。運動機能に対する有効性が受傷後早期に認められたことは、この効果がedaravoneのフリーラジカル抑制作用によるものであることを示唆しているとともに、同薬剤については可能な限り早期に投与を開始する必要があることを示している。亜急性期以降においてもEd-groupの運動機能は経時的に回復したがCong-groupにおいても運動機能の回復がみられており、これはげっ歯類では歩行機能の自然回復がヒトと比較して良好なためと考えられる [3]。Edaravoneは脳虚血に対しては急性期の脳保護効果と長期予後改善効果が明らかとなっているが [7]、重症脊髓損傷において、本検討で示された急性期の運動機能改善効果をリハビリテーションによる長期機能予後改善に結びつけていけるか否かについて、今後臨床的な検討を行い明らかにしていく必要があると考えられる。

本研究ではedaravoneの軸索保護効果を赤核脊髓路について検討した。ラット等げっ歯類において、歩行運動については皮質脊髓路よりはむしろ赤核脊髓路の関与が強いことが報告されている [16, 19]。赤核脊髓路は脊髓側索の浅層を走行しており、脊髓中心から同心円状に損傷が拡大するweight dropping methodでは赤核脊髓路に障害が及ぶことはかなり強い二次性脳損傷をきたしている所見となる。軸索脊髓路における軸索保護の程度を評価する方法としてFluoro-Goldによる逆行性蛍光標識を用いて赤核の標識細胞数を計測した [16, 19]。標識された細胞は明瞭に確認可能であり、本方法は残存神経路の評価に有用である。今回の検討ではedaravone投与群は対照群と比較して残存軸索が多い傾向が認められた。しかし標識された細胞数について偏差が大きい結果となっており、今後は最も一般的な損傷負荷の方法であるweight dropping methodから更に精密な負荷を加えるべく改良して再検討する必要があると思われる。

本検討により実験的脊髓損傷におけるedaravoneの運動機能改善が示された。今回は実際の機能回復への応用可能性に焦点をおいて検討を行ったが、今後は損傷部組織内でのサイトカイン等生理活性物質の動態について解析を行い、同薬剤の作用機序の解明を行う必要があると考えられる。

文 献

1. Abe K, Yuki S and Kogure K: Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke* 19: 480-485, 1988
2. Allen AR: Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *JAMA* 57: 878-880, 1911
3. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC: A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12: 1-21, 1995
4. Bracken MB, Holford TR: Effect of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg* 79: 500-507, 1993
5. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeyer J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W: Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. *National Acute Spinal Cord Injury Study*. *JAMA* 1597-1604, 1997
6. Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L: Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol* 151: 77-88, 1998
7. Edaravone Acute Infarction Study Group (chair: Otomo E): Effect of novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis* 15: 222-229, 2003
8. Hall ED, Andrus PK, Yonkers PA: Brain hydroxyl radical generation in acute experimental head injury. *J Neurochem* 60: 588-594, 1993
9. 林 成之, 坪川孝志, Green BA, Abe K: 脊髓損傷におけるフリーラジカルと電子伝達系の障害. *脳外* 12:

1039-1046, 1984

10. Jin YJ, Mima T, Raicu V, et al.: Combined argatroban and edaravone caused additive neuroprotection against 15 min of forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci Res* 43: 75-79, 2002
11. Langfitt TW, Gennarelli TA, Obrist WD, Bruce DA, Zimmerman RA: Prospects for future in the diagnosis and management of brain injury. *Clin Neurosurg* 29: 353-376, 1982
12. Lewen A, Matz P, Chan PH: Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 17: 871-890, 2000
13. Liu D, Ling X, Wen J, Liu J: The role of reactive nitrogen species in secondary spinal cord injury: formation of nitric oxide, peroxynitrite, and nitrated protein. *J Neurochem* 75: 2144-2154, 2000
14. Mizuno A: Inhibitory effect of MCI-186, a free radical scavenger, on cerebral ischemia following rat middle artery occlusion. *Gen. Pharmac.* 30: 575-578, 1998
15. Nakamura H, Uzura M, Uchida K, Nakayama H, Furuya Y, Hayashi T, Sekino H, Ominato M and Owada S: Effects of edaravone on experimental brain injury in view of free radical reaction. *Acta Neurochir Suppl* 86: 309-311, 2003
16. Naso WB, Cox RD, McBryde JP, Perot PL Jr: Rubrospinal neurons and retrograde transport of Fluoro-Gold in acute spinal cord injury. *Neurosci Lett* 155: 125-127, 1993
17. Rivlin AS, Tator CH: Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg* 47: 577-581, 1977
18. Tator CH, Fehlings MG: Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanism. *J Neurosurg* 75: 15-26, 1991
19. Theriault E, Tator C: Persistence of rubrospinal projections following spinal cord injury in the rat. *J Comp Neurol* 342: 249-258, 1994
20. Yamamoto T, Yuki S, Watanabe T, Mitsuka M, Saito KI, Kogure K: Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. *Brain Res* 762: 240-242, 1997

Reviewer's comment : 冨永 悌二 (東北大学医学部 脳神経外科)

ラット脊髄損傷モデルを使用し、二次性脊髄損傷に対するfree radical scavengerの予防効果を検討した論文です。虚血性神経障害と共に外傷性中枢神経損傷に対するfree radicalsの役割は大きく、二次性損傷の惹起、進行に関与しています。

これまでも脳損傷モデルにてfree radical scavengerの静脈投与により、oxygen free radicalsの産生低下、脳浮腫軽減が証明されています。本研究では脊髄損傷モデルを使用し、free radical scavengerであるedaravone投与に伴う、運動機能向上および赤核脊髄路の神経経路温存について評価検討し、運動機能改善に有意差を認めています。すでにedaravoneは脳梗塞急性期にて実地使用されており、今後の外傷性脊髄損傷に対する臨床応用に向けて貢献する論文と考えます。

Reviewer's comment : 小柳 泉 (札幌医科大学 脳神経外科)

ラット重症脊髄損傷モデルを使用して、急性期edaravone投与の、損傷脊髄に対する保護作用を検討した論文です。実験では、ラットの第8胸椎レベルの脊髄に50g・cmの損傷を加え、直後から2日後までedaravoneを投与し、運動機能をBBBスケールと傾斜板法で3週間後まで検討、4週後にFluoroGoldを脊髄腰膨大部に注入して赤核脊髄路のintegrityの定量的解析を行っています。結果として、edaravone投与群では、運動機能に損傷後3日と5日後で有意の改善がみられ、赤核の染色細胞数も有意差に至らなかったものの、edaravone群で多く、急性期edaravone投与が、急性脊髄損傷でも保護作用がある可能性を示しています。実験はバイアスを除くため注意深く計画されています。有意差のみられた運動機能は、損傷後3週では完全に差はなくなっています。これは、edaravone投与を長く続けることでさらに改善が得られるのか、それとも、結果的に二次損傷を押さえる事はできなかったのか、多くの解釈や考察が可能です。また重量落下法は、作成した脊髄損傷の程度にばらつきが出やすい事も知られており、より一定の損傷モデルの作成も必要になるかもしれません。今後のさらなる発展が期待される研究です。