

C. 研究結果

培養後3週が経過しても、cAMP添加群の軟骨細胞は球形を呈し、トルイジンブルーによる染色性は良好で、各種の軟骨特異的マーカーのmRNAも発現しており、分化状態を維持していた。次に、サブトラクション法により約120個のcDNAクローンが得られたが、それらの部分塩基配列の解析から、17種の既知遺伝子と18種の未知遺伝子とに分類された。これらのDNA断片を含む遺伝子の発現を両群間で比較し、cAMP添加群において発現の高かった未知遺伝子については、その全長cDNAのクローニングを行って、アミノ酸配列を決定した。

CDEPの解析 クローン102がEzrin-like domainを含んでいたことからこの遺伝子産物をCDEP (Chondrocyte Derived Ezrin-like domain containing Protein) と命名し、RACE法によりその全長cDNAのクローニングを行ったところ、CDEPのcDNAは約3.4 kb、1044個のアミノ酸をコードしていた。アミノ酸解析の結果、CDEPは低分子量GTP結合蛋白質であるRhoファミリーのguanine nucleotide exchange protein (GEP)である可能性が高く、すなわちこの新規蛋白質は、細胞形態の維持や運動を司るアクチン系細胞骨格の機能を調節しているRhoファミリーの活性を制御する因子であることが示唆された。

DEC1の解析 クローン37が有する遺伝子産物をDEC1 (Differentiated Embryonic Chondrocyte 1) と命名し、RACE-PCR法にてその全長を含むcDNAクローンを作製、その塩基配列を決定したところ、これは全長約3kbで412個のアミノ酸をコードしており、ホモロジーサーチの結果、DNA結合モチーフであるbHLH (basic helix-loop-helix) 領域を有していることから、新規のbHLH型転写因子である可能性が示唆された。

肋軟骨成長板組織におけるCDEP mRNAの発現

CDEP mRNAは肋軟骨組織 (in vivo) において肥大層であるG3に最も高レベルに発現していた (Fig. 1)。

肋軟骨成長板軟骨細胞培養系におけるCDEP mRNAの発現 成長板軟骨細胞培養系 (in vitro) においてCDEP mRNAは各時期に発現を認めたが、やはり肥大期にその発現は最高レベルに達していた (Fig. 2)。

D. 考察

これらの結果をまとめると、今回私どもがクロー

ニングしたCDEPとDEC1遺伝子は、ウサギ肋軟骨組織および成長板軟骨細胞培養系、すなわち *in vivo* ならびに *in vitro* において肥大期に特に高レベルで発現していた。したがって、これらの新規因子は、軟骨分化における細胞の肥大化という形態変化と肥大化に伴う種々の遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。

今後、CDEPによる細胞分化の制御機構ならびにDEC1による転写制御機構を解明し、これらの生理的役割およびそのターゲット遺伝子を明らかにすることは、内軟骨性骨化のメカニズムの解明に重要と思われる。脊柱靭帯骨化症は、靭帯組織に異所性に発現した軟骨細胞が内軟骨性骨化の過程を経て骨化す

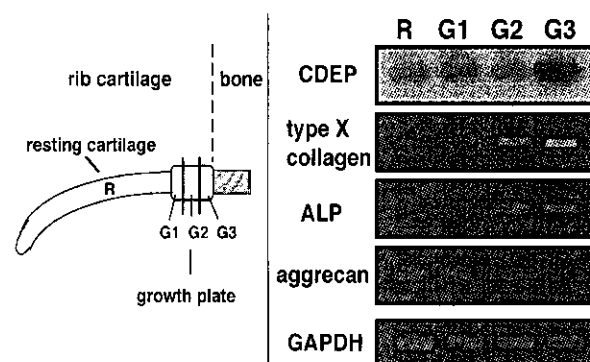


Figure 1 : Expression of CDEP mRNA and several markers of cartilage differentiation in the growthplate (G) and resting (R) cartilage of rabbit rib by RT-PCR. CDEP was expressed at a higher level in G3 (the hypertrophic zone) than in any other zones *in vitro*.

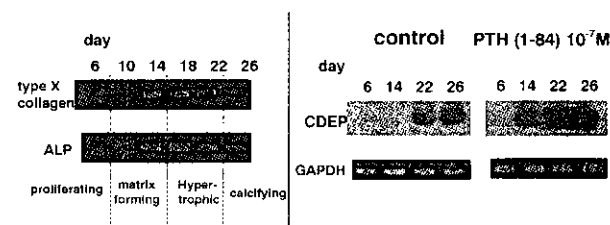


Figure 2 : Expression of CDEP mRNA by RT-PCR during chondrocyte differentiation *in vitro* and effects of PTH(1-84). Chondrocytes were isolated from the rib growth plate of 4-week-old Japanese white rabbits and seeded and cultured at high density. In this system, cells expressed several differentiation makers such as type X collagen and ALP in a sequential manner as seen *in vivo*. The result of this experiment shows that CDEP are expressed at high levels in day 22 and day 26, in the hypertrophic and calcifying stages. Furthermore CDEP expression is enhanced by the addition of PTH (1-84) for 24hrs.

るものと考えられているが、この異所性の軟骨の分化を制御している因子は未だ明らかにはされていない。しかし、転写因子をはじめとする種々の因子群がカスケードを形成し、未分化間葉系細胞を軟骨細胞に分化させ、さらに最終分化へと導いているものと推測される。以上より、今回、私どもがクローニングしたCDEPやDEC1遺伝子の機能を解明し、また、靭帯細胞におけるそれらの発現を検討することは、脊柱靭帯骨化症の発症のメカニズムを解明してゆく上で重要であると考えられる。

〔参考文献〕

- 1) Yasuhiko Koyano, Takeshi Kawamoto, Ming Shen, Weiqun Yan, Mitsuhide Noshiro, Katsuyuki Fujii and Yukio Kato : Molecular Cloning and Characterization of CDEP, a Novel Human Protein Containing the Ezrin-like Domain of the Band 4.1 Superfamily and the Dbl Homology Domain of the Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors Biochem. Biophys. Res. Commun. : 1997; 241, 369-375
- 2) Ming Shen, Takeshi Kawamoto, Weiqun Yan, Kazuko Nakamasu, Mami Tamagami, Yasuhiko Koyano, Mitsuhide Noshiro, and Yukio Kato : Molecular Characterization of the Novel Basic Helix-Loop-Helix Protein DEC1 Expressed in Differentiated Human Embryo Chondrocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. : 1997; 236, 294-298

III

軟 骨 基 質

ヒト黄色靭帯小型プロテオグリカンの構造解析

湯川 昌広 (弘前大学医学部整形外科), 原田 征行 (弘前大学医学部整形外科),
植山 和正 (弘前大学医学部整形外科), 板橋 泰斗 (弘前大学医学部整形外科)

【研究要旨】

脊柱靭帯骨化症の発生機序に、細胞外マトリックス成分に含まれる小型プロテオグリカン (PG) が関与していると考え、その構造解析を行った。ヒト黄色靭帯約220gより、3種の小型PG (I, II, III) を分離・精製し、酵素消化、HPLC分析等により解析した。それぞれのコアタンパクのアミノ酸配列解析の結果、Iはデコリン、IIIはバイグリカンと同定された。IIは、N末端アミノ酸配列はデコリンと一致したが、そのコアタンパクはデコリン抗体と反応しなかった。また、デコリンの糖鎖がコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸で構成されているのに対し、IIはデルマトン硫酸で構成され、不飽和二糖分析の結果、デコリンは Δ Di-4S, 6S (26:74)のみから成るのに対し、IIは Δ Di-4S : Δ Di-6S : Δ Di-diSE (39:56:5) で構成されていた。すなわち、ヒト黄色靭帯には、デコリンの亜型と思われるPGを含め、3種の小型PGが存在し、その相互作用、組成変化などが加齢変化、靭帯骨化に関与していると考えられた。

A. 研究目的

脊柱靭帯骨化症の機序は十分には解明されていない。今まで我々は脊柱靭帯の加齢変化、及び靭帯骨化の発生機序を明らかにするために、ヒト黄色靭帯の細胞外マトリックスの主要な構成成分であるプロテオグリカン (PG) について検討し、加齢変化としては、PGを構成するグリコサミノグリカン (GAG) 糖鎖のコンドロイチン硫酸の割合が増加し、デルマトン硫酸が減少すること。分子サイズが減少していること¹⁾。4位に結合する硫酸基が減少し、6位に結合する硫酸基が増加していること。グリコサミノグリカン糖鎖のハイドロキシアパタイトに対する結合性が低下していること^{1,2)}。骨化靭帯におけるプロテオグリカンの性状としては、分子サイズが減少していること。低分子プロテオグリカンを構成するGAG糖鎖はコンドロイチン4-及び6-硫酸であり、さらに6位の硫酸基の割合が著明に増加していること^{3,4)}。構造解析としては、黄色靭帯を構成するプロテオグリカンは、アグリカントタイプの高分子プロテオグリカン、低分子プロテオグリカンとしてはバイグリカン、デコリントタイプのものと、3種類から成り、さらにヒト黄色靭帯ではデコリンが主要なプロテオグリカンであり、そのGAG糖鎖はデルマトン硫酸とコンドロイチン硫酸のハイブリッド型であること、などを明らかにしてきた^{5,7)}。また、低分子プロテオグリカンには既知のプロテオグリカンとは異なる新しいプロテオグリカンが含まれることを報告してき

た⁸⁾。

今回は、今までの実験で得られたデータをもとに、細胞外マトリックスにおけるPGの役割を考察し、報告する。

B. 研究方法

1. 材料

腰椎手術時に摘出された正常黄色靭帯200gを用いた。

2. PGの調製

黄色靭帯をメスで細切り、Physoctron (Nition, Funabashi, Japan) によって液体窒素下に細粉化した。粉末化した黄色靭帯に、湿重量の10倍量の4M グアニジン塩酸/50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.8) (以下4M グアニジン塩酸と略記する) を加え、プロテアーゼ阻害剤 (10mM EDTA, 10mM NEM, 5mM ベンズアミジン塩酸塩, 1mM PMSF) 存在下で4℃, 24時間抽出を行った。抽出液を28,000gで1時間遠心し、上清を塩化セシウムで密度調整 (1.45g/ml) し、30,000rpmで72時間遠心し、1.37~1.46g/mlの画分を回収した。つづいて、このサンプルを透析により7M尿素/50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.0) へ緩衝液の交換を行い、同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacel イオン交換カラム (1.0×15.0cm) にアプライした。カラムに吸着した画分を0~1MのNaClに

よる直線的濃度勾配により溶出した。溶出液のウロン酸をカルバゾール硫酸法⁹⁾で、タンパク質をBio-Rad protein assay法¹⁰⁾で検出した。ウロン酸陽性分画を回収し、これをPG分画としてプールし、濃縮した。濃縮したPG分画を、4M グアニジン塩酸により平衡化したSephacrose CL-4Bゲル濾過カラム(1.0×133cm)にアプライし、同緩衝液にて溶出した。溶出液中のウロン酸をカルバゾール硫酸法により検出し、高ウロン酸分画をプールし、蒸留水で3日間透析し凍結乾燥した。更なる精製のため、この分画を2M グアニジン塩酸に24時間透析し、つづいて2M グアニジン塩酸で平衡化したOctyl-Sepharose CL-4B疎水性カラムにアプライした¹¹⁾。そして、2-6M グアニジン塩酸の直線的濃度勾配を利用して溶出し、低分子プロテオグリカン画分を回収した。

3. 電気泳動

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、5-20% acrylamide gradient slab gelで4℃ 200Vで4時間行った。ゲルをCoomassie brilliant blue R-250, つづいてAlcian blueで染色した¹²⁾。

4. 免疫染色法

抗ヒトデコリン抗体を用いたプロテオグリカンに対するWestern blotting immunoassayをTowbinらの方法¹³⁾によって行った。抗ヒトデコリン抗体はヒトデコリンのカルボキシル基側のペプチドを用いて免疫されたウサギのポリクローナル抗血清から得られた。

5. 蛍光標識法

調製したGAG糖鎖の還元末端を2-アミノピリジンとカップリングさせ、ピリジルアミノ化GAG糖鎖を得た¹⁴⁾。

6. アミノ酸組成分析及び配列解析

サンプルを6N塩酸を用いて、135℃で3時間、減圧シール下に塩酸加水分解処理を行った。その加水分解液を減圧乾固し、蒸留水に再溶解した。この溶液をアミノ酸自動分析計(日立L-8500)を用いて分析した。

N末端アミノ酸配列分析を、また臭化シアン分解を行って内部アミノ酸配列分析をプロテインシーケンサー(Hewlett Packard G100A)を用いて行った。

7. 不飽和二糖分析

サンプルをchondroitinase ABCにより、消

化し(酵素0.01U, 20mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.2), 37℃, overnight), 得られた分解産物を分析した¹⁵⁾。

8. 高速液体クロマトグラフィー

KB-0012カラム(7.8×100mm, Koken Co., 東京)を用いたaffinity HPLCは、リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)を用いて流速1.0ml, 30℃で10-40分の直線的濃度勾配法(10mM-100mM)によって溶出した。検出には、励起波長320nm及び測定波長400nmを利用した(日立F-1150)¹⁵⁾。

YMC-Pack Polyamine IIカラムによる不飽和二糖分析は、リン酸ナトリウム緩衝液(NaH₂PO₄: A, 16mM; B, 1M)を用い、60分でBを47%に直線的に増加させて溶出した。検出には、232nmを利用した¹⁶⁾。

E. 結果

低分子プロテオグリカンの分離

超遠心, 超遠心, DEAE-Sepacelによるイオン交換クロマトグラフィー, Sepharose CL-4Bカラムによるゲル濾過クロマトグラフィー, Octyl-Sepharose CL-4Bカラムによる疎水性クロマトグラフィーにより, 低分子プロテオグリカン画分を回収した。最終の精製段階であるOctyl-Sepharose CL-4Bカラムより, カルバゾール反応陽性の2つの低分子PGのピークがみられ, 黄色靱帯にはコアタンパクの疎水性の異なる2種類以上の低分子PGが含まれていることが示唆された。それぞれピーク1, ピーク2とした。

SDS-PAGE及び免疫染色法による分析

ピーク1, 2に含まれるPGをSDS-PAGEによって分析した。ピーク1は70,000-95,000に単一のバンドを示したが, ピーク2は180,000-200,000と70,000-95,000に2つのバンドを示した。それぞれをPG1, PG2及びPG3と称した。PG1, PG2及びPG3に対して抗ヒトデコリン抗体を用いたWestern blotting immunoassayを行った。PG1は抗ヒトデコリン抗体に反応を示したが, PG2及びPG3は反応を示さなかった。

このことからPG1はデコリンであり, PG2及びPG3はそれとは異なるコアタンパクを有するPGであることが示唆された。

コアタンパクのアミノ酸組成及びアミノ酸配列解析

PG1のアミノ酸組成分析の結果、ヒト骨デコリン及びヒト胎児膜と比較するとその組成は一致するものではなかったが、比較的相似性を示していた。

N末端アミノ酸配列解析の結果、PG1は、N末端から15残基が既知のヒトデコリンの配列と一致することが示され、従来報告されてきたものと同じものと同定された。

PG2, IIIについてはN末端側10残基明かとなり、PG2は上述のデコリンのものと一致し、PG3はバイグリカンと一致した。

GAG糖鎖部分の解析

PG1, PG2及びPG3のGAG糖鎖を同定するために、アクチナーゼE及びエンド- β -キシロシダーゼ消化によって得られたグリコサミノグリカン糖鎖を2-アミノピリジンで蛍光標識した¹⁴⁾。ハイドロキシアパタイトに対する、デルマタン硫酸とコンドロイチン硫酸の結合性の違いが知られているので¹⁵⁾、これを利用して、ハイドロキシアパタイト親和性カラムを用い、溶出した。この結果、PG-1のグリコサミノグリカン糖鎖はデルマタン硫酸とコンドロイチン硫酸で構成され、PG-2はコンドロイチン硫酸、PG-3はデルマタン硫酸が分布していることが示された。

不飽和二糖分析

各サンプルのchondroitinase ABC消化産物の分析により、PG1はDDi-4S (74%), DDi-6S (26%), PG2はDDi-4S (56%), DDi-6S (39%), DDi-diSE (5%), PG3はDDi-4S (58%), DDi-6S (42%)であった。

D. 考察

ヒト黄色靭帯より、3種のPGを精製し、その構造を解析した。PG1はデコリン、PG3はバイグリカンであると同定された。PG2の分子サイズはデコリンと同程度で、バイグリカンよりも小さく、約85000Daであった。しかし、デコリンとはクロマトグラフィー上の挙動が異なり、そのコアタンパクは抗デコリン抗体とは反応しなかった。またこのPGのGAG糖鎖は、デルマタン硫酸鎖で構成されていた。したがってデコリンとは異なるPGだといえる。しかし、N末端アミノ酸配列はデコリンと一致

するため、その亜型ではないかと推定される。

われわれは以前に、PGを構成するGAG糖鎖のうち、デルマタン硫酸鎖が靭帯骨化を抑制するということを、ハイドロキシアパタイトとの親和性から推定した。したがって、PG2が靭帯骨化に抑制的に作用することが考えられ、その発現や細胞外マトリックスにおける機能を解明することが今後の課題である。

E. 結論

ヒト黄色靭帯より、3種のPGを分離し、その構造を解析した。糖鎖の構成の異なるPGが、細胞外マトリックスの特異的な構築に影響を与えていると考えられる。

[参考文献]

- 1) 岡田晶博, 原田征行, 植山和正ほか: 年代別黄色靭帯の生化学的分析. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成元年度報告書: 134-136, 1990.
- 2) 岡田晶博, 原田征行, 植山和正ほか: 年代別黄色靭帯の生化学的分析—加齢に伴うプロテオグリカンの変化—. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成2年度報告書: 124-132, 1991.
- 3) 武田裕介, 原田征行, 植山和正ほか: 骨化黄色靭帯プロテオグリカンの構造. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成3年度報告書: 237-242, 1992.
- 4) 武田裕介, 原田征行, 植山和正ほか: 黄色靭帯グリコサミノグリカン糖のヒドロキシアパタイトに対する結合性の加齢による変化. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成4年度報告書: 72-76, 1993.
- 5) 成田穂積, 原田征行, 植山和正ほか: 骨化を抑制するデルマタン硫酸オリゴ糖の構造解析. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成5年度報告書: 80-83, 1994.
- 6) 成田穂積, 原田征行, 植山和正ほか: 黄色靭帯のプロテオグリカン. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成6年度報告書: 98-100, 1995.
- 7) 竹内和成, 原田征行, 植山和正ほか: 黄色靭帯骨化症に伴う細胞外マトリックスの変化. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成7年度報告書: 123-126, 1996.
- 8) 湯川昌広, 原田征行, 植山和正ほか: ヒト黄色靭帯の新規小型プロテオグリカン. 厚生省特定疾

患脊柱靱帯骨化症調査研究班平成10年度報告書：
87-90, 1998.

- 9) Bitter, T., Muir, H. M.: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 4, 330-334, 1962.
- 10) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
- 11) Choi, H. U., Johnson, T. L. et al.: Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. *J. Biol. Chem.*, 264, 2876-2884, 1989.
- 12) Fisher, L. W., Termine, J. D. et al.: Proteoglycans of developing bone. *J. Biol. Chem.*, 258, 6588-6594, 1983.
- 13) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 4350-4354, 1979.
- 14) Kon, A., Takagaki, K., Kawasaki, H. et al.: Application of 2-aminopyridine fluorescence labeling to glycosaminoglycans. *J. Biochem.*, 110, 132-135, 1991.
- 15) Narita, H., Takeda, Y., Takagaki, K., Nakamura, T., Harata, S., Endo, M.: Identification of glycosaminoglycans using high-performance liquid chromatography on a hydroxyapatite column. *Anal. Biochem.* 232, 133-136, 1995.
- 16) Yoshida, K., Miyauchi, S., Kikuchi, H., Tawada, A., Tokuyasu, K.: Analysis of Unsaturated Disaccharides from Glycosaminoglycan by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* 177, 327-332, 1989.

ヒト黄色靭帯プロテオグリカンの特性とエラスチンとの親和性

板橋 泰斗 (弘前大学整形外科), 原田 征行 (弘前大学整形外科),
植山 和正 (弘前大学整形外科), 湯川 昌弘 (弘前大学整形外科),
高垣 啓一 (弘前大学第一生化学), 遠藤 正彦 (弘前大学第一生化学)

【研究要旨】

黄色靭帯は、コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸、プロテオグリカンなどの分子が相互に関連して細胞外マトリックスを形成している。その中でも主要な構成成分であるプロテオグリカンとエラスチンに着目し、その構造的特性及び分子間の親和性を検討する。ヒト黄色靭帯70gより4Mグアニジン塩酸可溶画分を回収。超速心、各種クロマトグラフィーにより3つのPGを分離・精製し、ウェスタン・ブロット法、アミノ酸配列分析等により解析した。また、エラスチンを熱アルカリ抽出法により精製し、表面プラスモン共鳴バイオセンサーでPGとの親和性を検討した。精製された小型PGは、PG I (デコリン)、PG II、PG III (バイグリカン)で、その中のPG IIはデコリンとはクロマトグラフィー上挙動が異なり、抗デコリン抗体に反応せず、アミノ酸の内部配列はチロシンキナーゼと相同性を示した。また、PG II、PG IIIがエラスチンと特に親和性が認められたことから、組織構築におけるsmall PGとエラスチンとの関係が明らかになった。

A. 研究目的

黄色靭帯の細胞外マトリックスにおけるプロテオグリカン (PG)、コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸などの分子は、脊柱靭帯において骨化や石灰化に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。これまで我々は脊柱靭帯骨化の発生メカニズムを解明するため、ヒト黄色靭帯の細胞外マトリックスの主要な構成成分であるPGに着目し、その加齢変化及びその構造解析を検討してきた。現在までの研究で、新規PGを含む4種類の低分子PGを見出し、加齢及び骨化靭帯でのPGを構成するグリコサミノグリカン (GAG) 糖鎖の変化などを明らかにした^{1,2,3,4)}。

今回、新規PGの構造解析を行うとともに、黄色靭帯に豊富に含まれるエラスチンにも着目し、両者の親和性について検討した。

B. 研究方法

材料

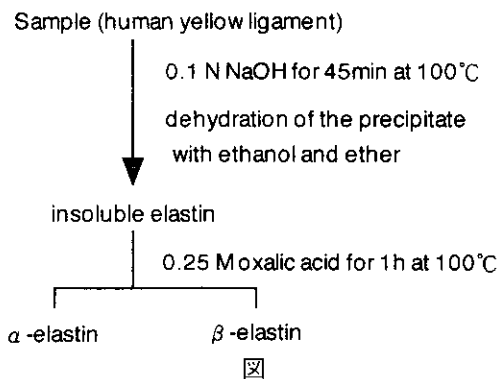
腰椎手術時に摘出された黄色靭帯70gを用いた。

PG及びエラスチンの調整

PGの精製方法は、岡田らの方法¹⁾に準じて行った。黄色靭帯をPhyscotron (Niti-on, Funabashi, Japan)によって液体窒素下に細粉化し、プロテアーゼ阻害剤 (10mM EDTA,

10mM NEM, 5mM ベンズアミジン塩酸塩, 1mM PMSF) の存在下で質量量の10倍量の4Mグアニジン塩酸/50mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.6) (以下4Mグアニジン塩酸と略記する) により抽出した。抽出液を遠心後、密度調整 (1.45g/ml) し、PG画分を回収した。つづいて、このサンプルを透析により7M尿素/50mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.0) に置換し、DEAE-Sephacelイオン交換カラム (4.6×35.5cm) で溶出した。溶出液をカルバゾール硫酸法⁵⁾及びBio-Rad protein assay法⁶⁾で検出した。カルバゾール硫酸法にて得たウロン酸陽性分画をPG分画とし、4Mグアニジン塩酸により平衡化したSephacel CL-4Bゲル濾過カラム (3.3×175cm) で溶出し、溶出液を再度カルバゾール硫酸法にて高ウロン酸分画を得た。この分画を2Mグアニジン塩酸に24時間透析し、同緩衝液で平衡化したOctyl-Sepharose CL-4B疎水性カラム (2.4×100cm) にアプライした⁷⁾。そして、2-6Mグアニジン塩酸の直線的濃度勾配を利用して溶出し、低分子PG画分を回収した。

また、4Mグアニジン塩酸での不溶画分を熱アルカリ抽出法¹⁰⁾に従い、0.1N NaOHで加水分解し、生じた不溶性エラスチンを0.25Mシュ



ウ酸で可溶化し、 α -エラスチンと β -エラスチンを精製した(☒)。

電気泳動

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、5-20% acrylamide gradient slab gelを用い、泳動後、ゲルをCoomassie brilliant blue R-250、つづいてAllcian blueで染色した⁸⁾。

免疫染色法

抗ヒトデコリン抗体を用いたPGに対するWestern blotting immunoassayをTowbinらの方法によって行った⁹⁾。

アミノ酸組成分析

PG及びエラスチンを6N塩酸を用いて、各々135°Cで3時間、110°Cで24時間、減圧シールド下に塩酸加水分解処理を行った。その加水分解液を減圧凝固し、蒸留水に再溶解した。これらの溶液をアミノ酸自動分析計(日立L-8500)を用いて分析した。

表面プラズモン共鳴バイオセンサ

表面プラズモン共鳴バイオセンサ(Pharmacia Biotech.)を使用し、リガンドとして α -エラスチンを固定化、アナライトとしてPG(PG1, PG2, PG3)およびコンドロイチナーゼABC後の各PGを注入し、測定した。

C. 研究結果

低分子PGの分離、精製

4Mグアニジン塩酸によりPGを抽出後、超遠心、DEAE-Sepacelイオン交換クロマトグラフィー、Sephacel CL-4Bゲル濾過クロマトグラフィー、Octyl-Sepharose CL-4B疎水性クロマトグラフィーにより、低分子PG画分を回収した。疎水性クロマトグラフィーにより、カルバゾール反応陽性の3つの低分子PGのピーク

が見られた。前回の我々の報告では2つのピークのみが見られたが、カラムサイズを長くすることにより3つのPGを分離することができ、それぞれピーク1、ピーク2、ピーク3とした。

PGのSDS-PAGE及び免疫染色法による分析

各PGの分子量を測定するため、ピーク1, 2, 3のPGをSDS-PAGEを用いて分析した。ピーク1, 2は70000-95000、ピーク3は180000-200000にバンドを示し、それぞれをPG1, PG2, PG3と称した。

PG1, PG2及びPG3に対し、抗ヒトデコリン抗体を用いたWestern blotting immunoassayを行った。PG1は抗ヒトデコリン抗体に反応を示したが、PG2及びPG3は反応を示さなかった。これにより、PG1はデコリンであり、PG2及びPG3はそれとは異なるコアタンパクを有することが示唆された。

PGのコアタンパクアミノ酸組成及びアミノ酸配列解析

PG1のアミノ酸組成分析の結果、ヒト骨デコリン及びヒト胎児膜と比較的相似性を有していた。

エラスチンのSDS-PAGEによる分析

0.25Mシュウ酸によって可溶化されたエラスチンをSDS-PAGEで分析したところ、分子量70000-85000に単一のバンドが現れ、過去に報告されている α -エラスチンであることが示唆された。 β -エラスチンを示すバンドは現れなかった。

エラスチンのアミノ酸組成分析

アミノ酸組成自動分析計での測定結果は、後縦靭帯におけるエラスチンの組成とほぼ一致していた。

表面プラズモン共鳴バイオセンサによる分析

PG1及びコンドロイチナーゼABC消化後の各PGと、エラスチンとの親和性は認められなかった。しかし、PG2及びPG3と、エラスチンとの親和性の存在が認められた。

D. 考察および

E. 結論

ヒト黄色靭帯より、3種のPGを精製し、その構造を解析した。PG1はデコリン、PG3はバイグリカンであると同定された。PG2の分子サイズはデコリンと同程度で、バイグリカンよりも小さく、約85000Daであった。しかし、デコリンとはクロマ

トグラフィー上の挙動が異なり，そのコアタンパクは抗デコリン抗体とは反応しなかった。またこのPGのGAG糖鎖は，デルマタン硫酸とコンドロイチン硫酸で構成され，後者の割合が増加していた。したがってデコリンとは異なるPGであることが，示唆された。

黄色靱帯，後縦靱帯にはエラスチンがそれぞれ約46%，7%含まれ，弾性線維としての役割を担っている¹¹⁾。特に黄色靱帯ではその量が多いことにより，石灰化，骨化にも何らかの関係があると考えられる。PGがエラスチンの構造を制御し，また加齢によって弾性線維にカルシウムが沈着するとの報告もあることから¹²⁾，今回の表面プラズモン共鳴バイオセンサによる親和性の存在は組織構築において両者が深く関係していると考えられた。

[参考文献]

- 1) 岡田晶博，原田征行，植山和正ほか：年代別黄色靱帯の生化学的分析—加齢に伴うプロテオグリカンの変化—。厚生省特定疾患脊柱靱帯骨化症調査研究班平成2年度報告書：124-132, 1991.
- 2) 成田穂積，原田征行，植山和正ほか：黄色靱帯のプロテオグリカン。厚生省特定疾患脊柱靱帯骨化症調査研究班平成6年度報告書：98-100, 1995.
- 3) 竹内和成，原田征行，植山和正ほか：黄色靱帯骨化症に伴う細胞外マトリックスの変化。厚生省特定疾患脊柱靱帯骨化症調査研究班平成7年度報告書：123-126, 1996.
- 4) 湯川昌広，原田征行，植山和正ほか：ヒト黄色靱帯の新規小型プロテオグリカン。厚生省特定疾患脊柱靱帯骨化症調査研究班平成10年度報告書：87-90, 1998.
- 5) Bitter, T., Muir, H. M.: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 4, 330-334, 1962.
- 6) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
- 7) Choi, H. U., Johnson, T. L. et al.: Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. *J. Biol. Chem.*, 264, 2876-2884, 1989.
- 8) Fisher, L. W., Termine, J. D. et al.: Proteoglycans of developing bone. *J. Biol. Chem.*, 258, 6588-6594, 1983.
- 9) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 4350-4354, 1979.
- 10) Lansing AI, Rosenthal TB, et al.: The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. *Anat Rec.*, 114, 555-575, 1952.
- 11) Hiroshi Nakagawa, Yoshihiro Mikawa et al.: elastin in the human posterior longitudinal ligament and spinal dura. *Spine*, 19, 2164-2169, 1994.
- 12) V. Podrazky, S. Stokrova et al.: Elastin-proteoglycan interaction. *Connective tissue res.*, 4, 51-54, 1975.

IV

細胞とメカニカルストレス

メカニカルストレスに起因する骨棘形成過程における骨形成因子 およびレセプター遺伝子の発現様式 —マウス脊椎症モデルを用いた解析—

中瀬 尚長 (大阪大学整形外科), 有賀 健太 (大阪大学整形外科),
奥田 真也 (大阪大学整形外科), 米延 策雄 (大阪大学整形外科),
岩崎 幹季 (大阪労災病院整形外科), 宮本 紳平 (大阪警察病院整形外科)

【研究要旨】

マウス脊椎症モデルを用い、メカニカルストレスにより誘導される骨形成因子およびレセプター遺伝子の発現様式について解析した。

A. 研究目的

本研究の目的は、脊柱靭帯骨化症の病態で重要な鍵を握る因子のうちのひとつである骨形成因子の遺伝子発現がメカニカルストレスによりどのような制御を受けるのかといった点について明らかにすることである。脊柱靭帯骨化症の発症や進展は遺伝的素因を礎として、様々な外的因子により修飾を受けると考えられる。外的因子の中でも骨形成因子 (Bone morphogenetic protein: BMP) は近年における幾つかの報告から脊柱靭帯骨化症の病態に関与する重要な液性因子であることが示唆されているがBMPの発現の制御因子については未だ不明な点が多い。一方、脊柱靭帯骨化症の病態に関連する環境因子としてメカニカルストレスが重要な意義を有することは、メカニカルストレスの集中する部位が脊柱靭帯骨化症の好発部位と相関するという臨床的事実からも容易に想像しうることである。従って、メカニカルストレスによる骨形成因子の発現制御の可能性やその制御機構を明らかにすることは、脊柱靭帯骨化症の病態解明の一助となるはずであり、このような観点から本研究は立案された。

B. 研究方法

5週齢マウス (ICR オス) を用いて脊椎不安定性モデルを作成し、経時的に頸椎を採取の上組織切片を作成しサフラニンOファーストグリーン染色と、cRNAプローブを用いたDIG非RIシステムのin situ hybridization法を行った。用いたプローブはマウスのBMP-4, BMP-6, GDF-5およびBMP receptor type IB, IIである。対照群として、同週齢の非手術マウスを用いた。手術に際しては十分な麻

酔処置を行ったうえで施行し、十分な栄養と水分を補給して飼育した。

C. 研究結果

骨棘形成の明らかでなく不安定性の強い初期 (術後4-8週) には、靭帯付着部周辺には多くの軟骨細胞様細胞が増殖し、これらの細胞にBMP-4とBMPレセプター type IB, type IIの遺伝子発現を認めた。GDF-5やBMP-6の発現は認められなかった。椎間板高が減じ骨棘形成が明らかとなり安定性が増す後期 (術後16-24週) には、骨軟骨棘を形成している軟骨細胞においてわずかなBMP-4の発現と共にGDF-5, BMP-6およびBMPレセプター type IB, IIの遺伝子発現を認めた。また、これらの所見は第4・5頸椎間の前方隅角部において最も顕著であった。

D. 考察

本モデルでは、後方支持要素を切除することにより前方への荷重負荷を増大させることにより、脊椎前方部でのいわゆる添加性の内軟骨性骨形成としての骨軟骨棘形成を誘導することができる。特に前方隅角部の靭帯付着部はmechanical overloadの集中する部位と考えられ、事実、術後初期ではこの部位における軟骨細胞様の細胞の増殖が顕著となる。BMP-4は骨折治癒においても初期における骨軟骨形成調節因子として重要であり、本結果においてもやはり初期においてその遺伝子が誘導されていた。また、同時に同部位でそのレセプター遺伝子も誘導され、メカニカルストレスに反応した細胞がBMP-4の遺伝子を発現し、BMP-4がparacrine/antocrine的に作用して、その後の骨軟骨棘形成を制御してい

ることが示唆された。

E. 結論

マウス脊椎症モデルの骨棘形成過程において、BMP-4 遺伝子の発現はBMPレセプター IB, IIと共に不安定性の強い早期から認められ、これらに加え骨棘形成が明らかとなる後期にはBMP-6, GDF-5の遺伝子も発現する。

F. 研究発表

27th Annual Meeting of Cervical Spine Research Society, December 16-18, 1999.
Seattle, Washington, US.

メカニカルストレスに起因する骨棘形成過程における 軟骨性コラーゲン遺伝子の発現様式 —マウス脊椎症モデルを用いた解析—

有賀 健太 (大阪大学整形外科), 中瀬 尚長 (大阪大学整形外科),
奥田 真也 (大阪大学整形外科), 米延 策雄 (大阪大学整形外科),
岩崎 幹季 (大阪労災病院整形外科), 宮本 紳平 (大阪警察病院整形外科)

【研究要旨】

メカニカルストレスに反応して生じる靭帯付着部の骨棘形成過程の軟骨基質蛋白遺伝子発現について実験的脊椎症モデルを用いて解析した。

A. 研究目的

メカニカルストレスにより生じる脊柱靭帯付着部の骨棘形成過程におけるコラーゲン遺伝子の発現様式を経時的に検討することにより、同部位での骨化の進展様式と特にその初期において反応する細胞を明らかにすることである。本研究は脊柱靭帯骨化症の発症予防あるいは進行防止策へ繋がる基礎的情報を提供しうると考えられる。

B. 研究方法

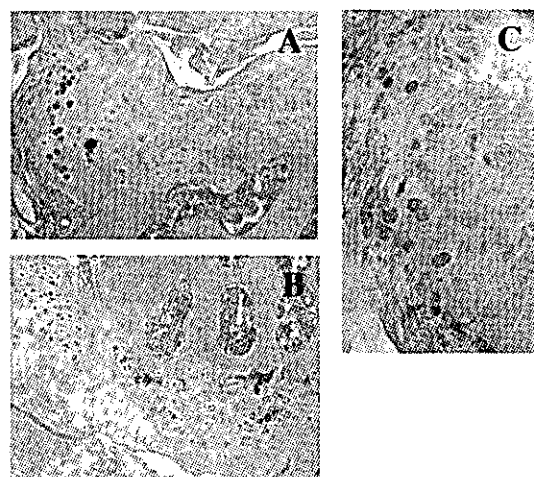
十分な麻酔を施したうえで、5週齢のICRマウスに対し後方正中切開にて傍脊柱筋を脊柱より剥離し、頸胸椎の棘突起および棘間・棘上靭帯を一塊に切除する手術を施行し、実験的脊椎症モデルを作成した。術後は十分な栄養と水分を与え飼育し、術後早期(8週)、中期(24週)、後期(1年)に頸椎を採取して組織切片を作成し、I型、II型、IX型、X型、XI型コラーゲン及びアグリカンの各cRNAプローブを用いてin situ hybridization法を行った。

C. 研究結果

骨棘形成の明らかでない初期には、軟骨細胞様細胞にアグリカンおよびII型コラーゲンの遺伝子発現を認め、骨棘形成が明らかとなる後期には、X型コラーゲン遺伝子が発現し、アグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子の発現細胞は減少していた。また、これらの所見は前方隅角部とその靭帯付着部の細胞において最も顕著であった。IX、XI型コラーゲン遺伝子も骨棘形成部と靭帯付着部で発現を認めた。

D. 考察

本モデルは脊柱前方要素には直接操作しないため、脊柱へのメカニカルストレスにより変形が生じるモデルと考えられる。そのため、メカニカルストレスを介した刺激により、靭帯付着部を中心とした局所的な細胞の反応が生じ、それらの細胞により軟骨基質形成については内軟骨性骨化が進行し、骨棘形成に至ると考えられる。本検討においては靭帯付着部の細胞が特異的に反応していたが、靭帯細胞自体が遺伝的要因を含めた何らかの原因でこのメカニカルストレスに反応しうるといった場合に靭帯骨化が進展する可能性が考えられる。



図A 術後24週 骨棘形成部におけるII型コラーゲン遺伝子発現
図B 術後1年 骨棘形成部におけるX型コラーゲン遺伝子発現
図C 術後24週 靭帯付着部におけるIX型コラーゲン遺伝子発現

E. 結論

マウス脊椎症モデルの骨棘形成過程において、不安定性の強い早期にはアグリカン，II型コラーゲンの遺伝子発現が優位で，骨棘形成が顕著な後期にはX型コラーゲン遺伝子の発現が優位となる。特に椎間板の前方隅角部と靭帯付着部の細胞において各軟骨基質蛋白遺伝子の発現を認めた。

F. 研究発表

第14回日本整形外科学会基礎学術集会

G. 知的所有権の取得状況

なし。

後縦靭帯骨化症の骨化の発生・進展における メカニカルストレスの影響

丹野 雅彦 (弘前大学医学部・整形外科), 古川 賢一 (弘前大学医学部・薬理学)
植山 和正 (弘前大学医学部・整形外科), 元村 成 (弘前大学医学部・薬理学)
原田 征行 (弘前大学医学部・整形外科)

【研究要旨】

頰椎脊柱靭帯骨化症(OPLL)の骨化進展の一因として靭帯組織にかかる局所の機械的刺激が指摘されている。そこで今回培養靭帯細胞に機械的伸展刺激を加えることによって発現が誘導あるいは抑制される遺伝子が存在するかどうかの検索と、正常靭帯と脊柱靭帯骨化症由来の靭帯との間でその遺伝子発現にどのような差異があるかをRT-PCRならびにDD-PCR法を用いて検討した。その結果、脊柱靭帯細胞に特異的に、伸展刺激に応答して発現を変化させる遺伝子が存在することが示唆された。今後、その遺伝子の同定とその病態における意義を明らかにしたいと考えている。

A. 研究目的

OPLLの発症のメカニズムには遺伝的背景に加えて、機械的伸展刺激(メカニカルストレス)などの環境因子も深く関わっていることが示唆されている^{1,2,3,4)}。近年、骨の組織や細胞においてメカニカルストレスがひとつのシグナルとして様々 genomic action を引き起こし、骨形成やその構築学的強度の維持に重要な働きをしていることが示されており^{5,6,7)}、OPLL靭帯骨化の発生・進展においてもなんらかの細胞応答がなされているものと推測される。そこで本研究では脊柱靭帯細胞に伸展刺激を加え、それによって発現誘導される遺伝子の検索を行い、また正常の靭帯と脊柱靭帯骨化症患者の靭帯を比較検討することによってメカニカルストレスが骨化誘導にどのように関わっているかを検討した。

B. 研究方法

靭帯細胞の培養

術中摘出したOPLL患者およびnon-OPLL患者(頰椎椎間板ヘルニア、頰椎症性頰髄症)の脊柱靭帯(後縦靭帯、黄色靭帯)よりoutgrowth法により靭帯細胞を単離し、10%FBS添加DMEM培地にて培養し継代5代目をシリコンチャンパーに播種した。細胞がconfluentに達した後、培地血清濃度を1%に下げ24時間経過したものに一軸方向に1Hz、20%長の伸展刺激を加え、以下の実験に用いた。

実験1 骨形成系細胞への分化に対する機械的刺激の影響

刺激負荷時間を0, 3, 6, 9時間の4群に分け、実験終了後各群同時に細胞からtotal RNAを抽出し、骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)のmRNA発現量をRT-PCR法を用いて定量し、OPLL群とnon-OPLL群との間で比較した。

伸展刺激を負荷した細胞ならびに負荷しなかったコントロールの細胞からそれぞれ全RNAを抽出した。ゲノムDNAの混入を防ぐため、抽出したRNAにDNase処理を施した。

実験2 Differential Display-PCR法による遺伝子発現パターンの解析

OPLL患者由来脊柱靭帯細胞において、伸展刺激を6時間加えたもの(刺激群)と加えなかったもの(control群)より、実験1と同様に抽出したRNAを鋳型にして、ポリTのオリゴDNAの3'末端に任意の2塩基を追加したアンカープライマーを用いて逆転写反応によりcDNAを合成した。次にそのcDNAを鋳型にして同じアンカープライマーと任意の20塩基からなるプライマーとの間で、ある程度のミスマッチを許す条件下にPCR反応を行った。そのPCR反応の産物をアクリルアミドのゲル電気泳動にかけて、cDNAの任意の部分配列を増幅し、さまざまなサイズのPCR産物を分離した。ゲル中のDNAをSYBR-Greenにより染色し、

UVイルミネーター上でPCR産物のバンドの位置と量を検出した。

(倫理面への配慮)

ヒト正常靭帯および脊柱靭帯骨化症患者の靭帯の摘出ならびに研究への供与については弘前大学医学部倫理委員会の勧告に基づき、十分なインフォームドコンセントを行っており、倫理的に問題がないと判断している。

C. 結果

1. 靭帯細胞の培養の確立

培養ディッシュにゼラチンコートしたものをを用いることによって、形態学的に見て均一な線維芽細胞状の細胞を培養することができた。またそのコーティングにより、伸展刺激負荷による細胞の剥離も消失した。

2. 伸展刺激負荷による遺伝子発現の誘導

OPLL群では伸展刺激負荷時間に依存して有意にALP mRNAの発現が亢進したが、non-OPLLでは変化がみられなかった(図1)。

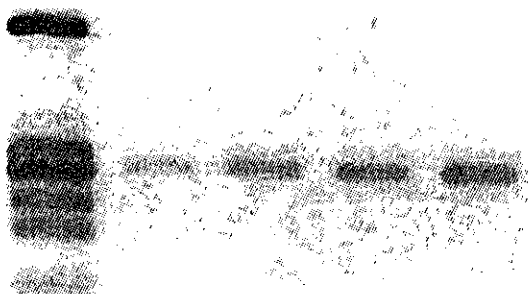


図1 Effect of mechanical stress on expression of ALP mRNA in OPLL spinal ligament cells

次にDD-PCR法によって遺伝子発現の変化をアクリルアミドゲル上のDNAバンドパターンの変化として検出した。DD-PCRはアンカープライマーとして3種類、任意プライマーとして3種類を用いた。コントロール群と刺激群との間に発現量の差が認められたDNAフラグメントは14種類あった。そのフラグメントをゲルから抽出し、同一の組み合わせのプライマーによってセカンドPCRを行なったところ、再現されたものが3種類となった。現在そのDNA配列の解析を行っているところである。

D. 考察

頸椎OPLLの観血的治療後に骨化が増大する原因として、それが前方法より後方法の後に多く認められることより、頸椎の構築学的不安定性の関与が重要であると考えられている^{1,2)}。実際松永らは頸椎運動の際の椎間板の歪み分布に異常が認められる部位に骨化が進展しやすいとし³⁾、また大竹は骨化巣が後縦靭帯の応力が大きい高位に存在すると報告している⁴⁾。今回我々はこのような局所の不安定性に基づく靭帯への刺激を、培養靭帯細胞に対する一軸方向の伸展刺激で再現を試み、遺伝子レベルにおける影響を検討した。その結果、OPLL群においてALP mRNA発現量が時間経過とともに増大することを確認できた。このことはOPLLの靭帯細胞が正常とは異なりすでに形質転換しているというこれまでの報告を支持するとともに、メカニカルストレスを介した靭帯骨化メカニズムが存在することを示すものと考えられる。今後は他の骨芽細胞系分化マーカーやBMPなどのgrowth factorとの関連を検討し、さらにOPLL靭帯骨化におけるメカニカルストレス情報伝達機構の解明を進めたいと考えている。

今回実験2としてOPLL靭帯細胞に負荷した伸展刺激で発現を変化させる遺伝子の検索をDD-PCRによって行った。アンカープライマーとして3種類、任意プライマーとして3種類の組み合わせで検索を行ったが、変化が認められたDNAフラグメントは14種類、そのうちセカンドPCRで再現性が得られたのは3種類であった。考えるアンカープライマーは12種類あり、任意プライマーについてははるかに多くの未使用のものがあるので、今回使用したものの以外のプライマーの組み合わせを用いることで、変化が認められるDNAフラグメントは更に増加すると期待される。更にプライマーの組み合わせを変えて検索を行う予定である。また再現性が得られたDNAフラグメントの配列決定とコードされている遺伝子の同定を現在進めている。

E. 結論

ヒト培養靭帯細胞に一軸方向の伸展刺激を負荷したところ、正常靭帯と脊柱靭帯骨化症の靭帯由来の細胞間で遺伝子発現による応答の違いが認められた。このことは局所の不安定性に基づく機械的刺激が脊柱靭帯骨化症の骨化の発生ならびに伸展に関与していることを示唆するものである。

F. 研究発表(11年度中はなし)

G. 知的所有権の取得状況（11年度中はなし）

〔参考文献〕

- 1) 富田卓：頸椎後縦靱帯骨化症の骨化進展についてのX線学的検討—骨化進展におよぼす手術の影響について。臨整外 34: 167-172, 1999.
- 2) E.Taketomi: Progression of Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament in the Cervical Spine. 日脊会誌, 1997.
- 3) S.Matsunaga: Effects of Strain Distribution in the Intervertebral Discs on the Progression of Ossification of the Posterior Longitudinal Ligaments. Spine 21: 184-189, 1996.
- 4) 大竹進：頸椎後縦靱帯骨化症の頸椎周囲の応力に関する生体力学的研究。弘前医学 43: 250-260, 1991.
- 5) D.M.Rabb-Cullen, M.A.Thiede, D.N.Petersen, D.B.Kimmel, R.R.Recker: Mechanical Loading Stimulates Rapid Changes in Periosteal Gene Expression. Calcif. Tissue Int. 55: 473-478, 1994.
- 6) Akira Kawata and Yuko Mikuni-Takagaki : Mechanotransduction in Stretched Osteocyte-Temporal Expression of Immediate Early and Other Genes. Biochem. Biophysic. Res. Commun. 246: 404-408, 1998.
- 7) Skerry TM.: Identification of novel signaling pathways during functional adaptation of the skeleton to mechanical loading: the role of glutamate as a paracrine signaling agent in the skeleton. J Bone Miner Metab. 17: 66-70, 1999.

V

脊髄の可塑性と脊髄機能

脊髓，白質，灰白質の力学特性

市原 和彦（山口大学整形外科），河合 伸也（山口大学整形外科）

【研究要旨】

脊柱靱帯骨化症による頸部脊髓症の病態を解明する際、脊髓の力学特性を正確に把握する事が肝要である。われわれは牛脊髓を用い材料力学的手法により脊髓白質、灰白質の力学特性を求め、臨床的意義を考察した。

A. 研究目的

脊髓白質、灰白質の力学特性を求め、臨床的意義を考察すること。

B. 研究方法

牛頸椎から脊髓を取り出し、採取した脊髓の白質、灰白質を打ち抜き試料を作成し、引張り試験を行なった。この結果から有限要素法を用い脊髓圧迫シミュレーションを行った。また、牛脊髓を実際に圧迫しMRI撮影し、脊髓圧迫シミュレーションの妥当性を検討した。

C. 研究結果

白質よりも灰白質のほうが応力および応力勾配（すなわち傾き）が大きかった。破断は白質よりも灰白質のほうが早かった。引張り試験結果を用いたFEMシミュレーションは、MRI像と形態学的傾向が一致した。

D. 考察

従来の概念では、脊髓灰白質は白質よりも柔らかいとされ、柔らかいということは脆く、障害されやすいと認識されていた。引張り試験結果から、脊髓灰白質は白質よりも応力および応力勾配が高く、破断が早かった。すなわち、灰白質は白質よりも硬く、脆いということが分かった。

これらの結果の臨床的意義を考察した。引張り試験結果における白質、灰白質の破断点が白質、灰白質の障害を引き起こす臨界点とすると、脊髓が圧迫されると初めに灰白質のみ障害される。これは中心性脊髓損傷や頸部脊髓症における服部のI型、Crandall分類のCentral cord syndromeの病態と一致すると考えられる。さらに脊髓が圧迫されると

灰白質、白質ともに障害され、これは横断型脊髓損傷や服部のII, III型、Crandall分類のTransverse lesion syndromeと一致すると考えられる。よって慢性疾患である頸部脊髓症の増悪時と外傷性疾患である頸部損傷は同様のメカニズムで生じると推察される。

E. 結論

脊髓灰白質は白質よりも応力および応力勾配が高く、破断が早かった。すなわち、灰白質は白質よりも硬く、脆いことが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

脊髓の力学特性

臨整外・34巻4号・549～551・1999年

脊髓の力学特性から考える頸髄症の病態と臨床症例の比較検討

日本脊椎外科学会雑誌・10巻1号・215・1999年

2. 学会発表

脊髓の力学特性から考える頸髄症の病態と臨床症例の比較検討

第28回日本脊椎外科学会 1999年

G. 知的所有権の取得状況

特になし。