

後縦靭帯骨化症実験モデル(twy/twy)における脊髄内軸索再生 および組織修復に関する統合的研究

内田 研造 (福井医科大学医学部整形外科), 馬場 久敏 (福井医科大学医学部整形外科),
前沢 靖久 (福井医科大学医学部整形外科), 久保田 力 (福井医科大学医学部整形外科),
吉澤今日子 (福井医科大学医学部整形外科), 古川 昭栄 (岐阜薬科大学分子生物学)

KEYWORD = 後縦靭帯骨化症, twy mouse, 脊髄圧迫, 軸索変性, 軸索再生

【研究要旨】

[目的] 慢性圧迫によって生じた脊髄伝導路障害に対する軸索再生, 機能修復の変化を明らかにすること。[方法] 生後8, 14, 20週齢のtwyマウス(各n=6)を用いた。灌流固定後, 延髄から上位頸髄を取り出し, 後固定後, 横断連続切片を作製した。toluidine blue染色, Kluver-Barrera染色, Luxol fast blue (LFB)染色, また, 抗neurofilament抗体, 抗growth-associated protein 43 (GAP43)を用い, ABC法に準じて免疫染色を行なった。[結果] 圧迫群(twyマウス)の白質は, 全体に粗となっており, 前索, 側索の特に辺縁部にその変化は顕著であった。中等度の圧迫では, 軸索の膨化, 断裂が認められた。高度に圧迫された脊髄では, 海綿状壊死, 髄鞘と軸索の離開, 脱落が観察された。免疫染色の結果では, 圧迫群(twyマウス)では両抗体共に, 軸索の染色性が強陽性となり, 加えて軸索の膨化, 変形が明瞭に認められた。抗GAP43抗体は圧迫が高度になるほどその変化が著明であった。[総括] 慢性圧迫状態にある白質内において, 圧迫による変性所見に伴い, 軸索再生, 修復機転が生じている可能性が示唆された。

A. 研究目的

脊髄は外傷等の急性圧迫に対してきわめて脆弱であり, 重篤な機能障害を発現するが, 慢性圧迫に対しては驚くほどの機能的耐性を示す。これは後縦靭帯骨化症においてもしばしば経験され, 明らかに脊髄が変形あるいは萎縮していながらその機能が維持されていることは, その背景に脊髄の可塑性, すなわち組織構造の変化にもかかわらず, 機能を維持する機構が関与しているとの仮説を想定させる。この仮説に関して様々な研究が成されてきたが, 多くは急性実験であり, 慢性圧迫においてこの機構の存在を実証しようという研究はなされていない。脊髄圧迫損傷を想定した動物モデルのほとんどが, 実際は急性損傷であり, 人為的操作が加わることより, 非特異的な炎症を生じるため, 我々が実際臨床で治療を要する頸椎症性脊髄症や, 後縦靭帯骨化症にみられるような, 脊髄が慢性に, 緩徐に, 漸増的に, 圧迫される病態とはかけ離れたものと考えられる。

我々はこれまでに全身に異所性骨化と, 関節強直を生じるtwyマウスの上位頸髄を観察し, このモデルの慢性圧迫のモデルとしての妥当性¹⁾²⁾, また灰白質において, 圧迫状態にある前角細胞は変性, 萎縮を生じながらも, その圧迫吻尾側部において前角

細胞自体が生存維持機構を有し, グリア細胞もまたその機能修復に関与していると論述した³⁾。

今回, 圧迫によって生じた脊髄伝導路障害に対する軸索再生, 機能修復の変化を明らかにするために, twyマウスの脊髄の特に白質を中心に, 損傷軸索の再生と機能修復に関する免疫組織学的変化を, 時間的経過と共に検討したので論述する。

B. 研究方法

経時的な組織学的観察のために, 8, 14, 20週齢のtwyマウス(それぞれn=6)を観察した。正常対象群には同週齢のICRマウス6匹を用いた。ネンブタール麻酔下(0.05mg/g)に8%パラホルムアルデヒド緩衝液にて灌流固定後, 延髄から上位頸髄を取り出し, 後固定後, 4 μ mパラフィン切片を作製した。各パラフィン切片につき, H.E染色, Luxol fast blue (LFB)染色を行なった。髄鞘の詳細な観察には, グルタルアルデヒド灌流固定し, 頸髄を取り出しオスミウム酸で再固定し, エポキシ樹脂に包埋し, 1 μ mの切片を切り出しトルイジンブルーによる染色を行った。

免疫染色は麻酔下に2%パラホルムアルデヒド緩衝液(0.1MPBS)にて灌流固定後, 直ちに延髄から

第5頸髄までの脊髄を顕微鏡視下に摘出し、同固定液による1時間の後固定をおこなった。30%ショ糖緩衝液で48時間浸潤し、20 μ mの凍結横断連続切片を作製し、0.3% Triton X-100を含む0.1M Tris-HCl buffer, pH7.6, に24時間浮遊させた。一次抗体には抗neurofilament抗体, 抗growth-associated protein 43 (GAP43)抗体を用い48時間4℃で反応させた後, biotinylated anti-rabbit IgG antibodies (Vecter lab. ABC elite kit)を添加, 12時間4℃で反応させ, ABC法に準じて免疫染色をおこなった。twyマウスは個々の圧迫形態が異なるため, 後側方より圧迫されている脊髄(特に白質)を, 最大圧迫部位を含めその隣接部全体を観察した。

C. 研究結果

Luxol fast blue (LFB) 染色ではコントロール群に比べ, 20週齢では点状に白く抜けて見え, 全体にsparseとなっており, 前索, 側索の特に辺縁部にその変化は顕著であった。空洞変性, 海綿状壊死などの高度の変性像は認められず, 形態学的に白質全体としては保たれていた。強拡所見では前索, 側索を中心に, 髄鞘と軸索の離開, 軸索の膨化, 変形が観察された(図1)が, 前索, 側索の髄鞘の詳細な観察では, 神経線維は粗, すなわち有髄線維間の間

質の拡大, 髄鞘の崩壊を伴う神経線維の膨化が認められた(図2)。免疫染色の結果では, 軽度-中等度の圧迫群においては, 抗neurofilament抗体は白質を中心に, 抗GAP43抗体は白質および灰白質の前角, 介在ニューロンにその染色性が弱陽性であった。20週齢のtwyマウスでは両抗体共に, 軸索の染色性が強陽性となり, 加えて軸索の膨化, 変形が明瞭に認められた(図3)。前索部を8, 14, 20週齢のimmunoreactivityを比較すると, 週数齢, 圧迫程度に対し増加傾向にあった。(図4, 5)

D. 考察

今回観察したtwyマウス脊髄は前索, 側索内において軸索の髄鞘と軸索の離開, 軸索の膨化, 変形といった脊髄変性所見が認められた。また強拡所見では, 有髄線維間の間質の拡大, 髄鞘の崩壊を伴う神経線維の膨化が観察された。これらの変化は即ち浮腫であり, 圧迫により生じた局所の循環障害の異常が起っていると推察される。脊髄, 神経根に対する圧迫障害は血流障害によるものとの報告がある⁴⁾⁵⁾。今回みられた慢性圧迫病変は機械的圧迫とのものと循環障害, 主として静脈系の循環障害が関与しているかもしれない。

白質内には上行性, 下行性の多くの縦走線維が存

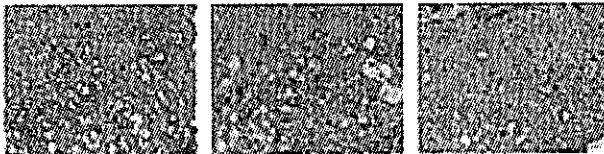


図1 Luxol fast blue (LFB) 染色

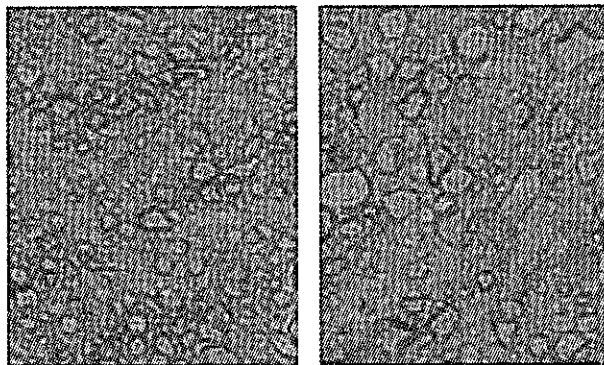


図2

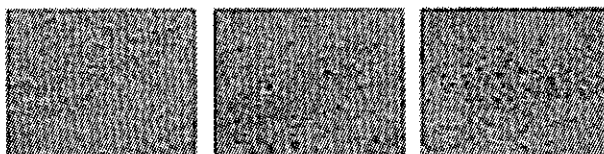


図3

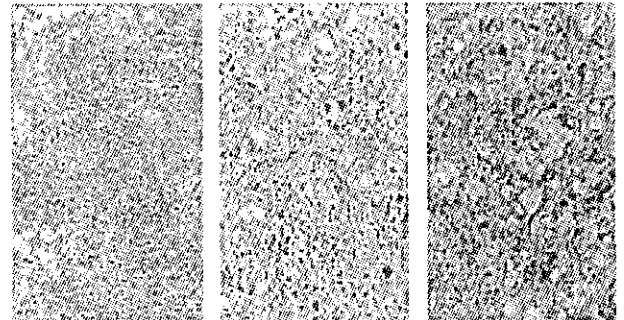


図4

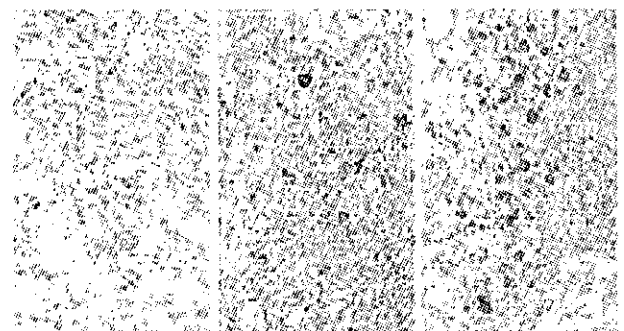


図5

在し、細胞骨格蛋白、膜蛋白の軸索内輸送が行われている。今回の研究では、圧迫状態の白質内、特に前索、側索に軸索の膨化、変形を認め、またその部位に一致して、成熟軸索の細胞骨格に必要とされる neurofilament⁶⁾、軸索内輸送膜蛋白の一つとして軸索再生、伸長に関与していると考えられる GAP43 の発現が増加していた⁷⁾⁸⁾。

GAP43 は軸索の成長と再生に関与した蛋白であり、神経細胞体で合成され、早い軸索輸送が行われる。軸索と成長円錐の形質細胞膜の細胞質側に位置し、核としての細胞骨格を形成している。GAP43 は、成長の時の細胞体、あるいは再生軸索に発現する。それゆえ、軸索の成長と再生に関与していると考えられる⁷⁾⁸⁾。脊髄における GAP43 の報告も散見されている。Curtis ら⁹⁾は圧迫部周囲の神経細胞体や軸索に GAP43 活性が増加していることを証明し、Schreyer や Skene ら¹⁰⁾は損傷後坐骨神経、後根神経節からの上行性脊髄内軸索に遅発性に GAP43 が増加しその再生に関与すると述べた。今回観察された圧迫によって生じた軸索内の GAP43 immunoreactivity の増加は、圧迫により軸索流が障害され、その結果、圧迫部や圧迫近傍部に軸索、軸索の腫脹が生じていることを意味する。これらの変化は圧迫による二次的な軸索流の停滞、再生に伴う軸索輸送の変化かもしれないし、あるいは神経細胞による再合成の増加を示唆する所見かもしれない。

E. 結論

慢性圧迫状態にある白質内において、圧迫による変性所見に伴い、軸索再生、修復機転が生じている可能性が示唆された。

〔参考文献〕

- 1) Baba H, Maezawa Y, Imura S, Kawahara N, Nakahashi K, Tomita K. Quantitative analysis of the spinal cord motoneuron under chronic compression: an experimental observation in the mouse. *J Neurol* 1996; 243: 109-116.
- 2) Baba H, Maezawa Y, Uchida K, Imura S, Kawahara N, Tomita K, Kudo M. Three-dimensional topographic analysis of spinal accessory motoneurons under chronic mechanical compression: an experimental study in the mouse. *J Neurol* 1997; 244: 222-229.
- 3) Uchida K, Baba H, Maezawa Y, Furukawa S, Furusawa Y, Imura S. Histological investigation of spinal cord lesions in the spinal hyperostotic mouse (twy/twy): morphological changes in anterior horn cells and immunoreactivity to neurotrophic factors. *J Neurol* 1998; 245: 781-793.
- 4) Holtz A, Nystrom Bo, Gerdin B. Spinal cord blood flow measured by ¹⁴C-iodoantipyrine autoradiography during and after graded spinal cord compression in rats. *Surg Neurol* 1989; 31: 350-60.
- 5) Olmarker K, Rydevik B, Holm S, et al. Effects of experimental graded compression on blood flow in spinal nerve roots. A vital microscopic study on the porcine cauda equina. *J Orthop Res* 1989; 7: 817-23.
- 6) Lasek RJ. Studying the intrinsic determinants of neuronal form and function. In: Lasek RJ and Black MM, eds. *Intrinsic Determinations of Neuronal Form and Function*. New York: Alan R. Liss, p1-60.
- 7) Skene JHP, Willard M. Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems. *J Cell Biol* 1981; 89: 96-103.
- 8) Skene JHP, Willard M. Changes in axonally transported proteins during axon regeneration in toad retinal ganglion cells. *J Cell Biol* 1981; 89: 86-95.
- 9) Curtis R, Green D, Lindsay RM, Wilkin GP. Up-regulation of GAP43 and growth of axons in rat spinal cord after compression injury. *J Neurocytol* 1993; 22: 51-64.
- 10) Schreyer DJ, Skene JHP. Fate of GAP-43 in ascending spinal axons of DRG neurons after peripheral nerve injury: delayed accumulation and correlation with regeneration potential. *J Neurosci* 1991; 11: 3738-51.

慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy)における脊髄細胞のアポトーシスと脊髄変性の進展

米 和徳 (鹿児島大学医学部整形外科教室), 中原 真二 (鹿児島大学医学部整形外科教室),
山浦 一郎 (鹿児島大学医学部整形外科教室), 石堂 康弘 (鹿児島大学医学部整形外科教室),
小宮 節郎 (鹿児島大学医学部整形外科教室), 松永 俊二 (鹿児島大学医学部整形外科教室)

【研究要旨】

慢性的な脊髄圧迫により一旦形成された神経障害は、たとえ完全な除圧がなされても機能障害が残存することも多く、神経障害の形成機序には機械的な圧迫による伝導しようがいのみならず、病理組織学的変化も関与していると考えられている。近年、中枢神経系において、虚血や外傷後に起こる二次的な神経細胞死や脱髄にアポトーシスが関与すると報告され、大きな注目を集めている。我々はtwyマウスを用いて、慢性圧迫による脊髄変性所見の拡がりを組織学的に観察し、さらに、TUNEL法とグリアの特異的染色により脊髄細胞のアポトーシスの局在を観察した。その結果、空胞変性やmyelin ovoidsなどの軸索変性所見とoligodendrocyteのアポトーシスがともに、圧迫部より中枢では後索に、末梢では前側索に認められ、慢性圧迫における脊髄変性がoligodendrocyteのアポトーシスにもたらされることが示唆された。

A. 研究目的

頸椎症性脊髄症や後縦靭帯骨化症などにおいては、慢性的な脊髄圧迫により脊髄神経障害が発生する。一旦形成された神経障害は、たとえ完全な除圧がなされても機能障害が残存することも多く、神経障害の形成機序には機械的な圧迫による伝導障害のみならず、病理組織学的変化も関与していると考えられている。しかし、慢性圧迫による脊髄障害形成機序についての詳細なメカニズムは不明な点も多い。近年、中枢神経系において、虚血や外傷後に起こる二次的な神経細胞死や脱髄にアポトーシスが関与すると報告され、大きな注目を集めている。しかし、これまで慢性脊髄圧迫におけるアポトーシスの誘導については明らかにされていない。本研究の目的は、慢性圧迫によるアポトーシスの誘導と脊髄変性機序におけるその関与を明らかにすることである。

B. 研究方法

1. 標本の作成

靭帯骨化の自然発症モデルであるtwyマウスを用いた。第1, 2頸椎部の後環軸膜石灰沈着により、脊髄に後方から著明な圧迫を生じた20週齢マウスと、未だ靭帯骨化を生じず脊髄圧迫のみられない4週齢マウスを使用した。全麻下に10%ホルマリンにて灌流固定後、頸髄を一塊として摘出した。再度、10%ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋し、厚さ4 μ mの横断面切片と矢状断面切片を作成した。

1. 組織学的観察

hematoxylin, eosin (H.E.)染色とKluver-Berera (K.-B.)染色を行い、組織学的観察を行った。

2. 組織生化学的観察

アポトーシスの観察としてterminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated deoxyuridine triphosphate [dUTP] nick-end labeling (TUNEL)染色を行った。各切片における、TUNEL陽性細胞数を計測し、横断面上、矢状断面上のアポトーシス細胞の拡がりを検討した。

1. TUNEL法とグリア特異抗体による二重染色

TUNEL陽性のグリア細胞の種類を特定するためにTUNEL法とoligodendrocyteのマーカーであるMAB-328抗体, astrocyteのマーカーであるGFAP抗体による二重染色を行った。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いについては、鹿児島大学医学部附属実験施設による実験動物取り扱い規則に従って行った。

C. 研究結果

1. 組織学的観察

H.E.染色において4週齢では明らかな変化は見られなかったが、20週齢では、脊髄は後方よ

り高度に圧迫され扁平化しており、空胞形成、白質の神経線維密度の減少を認めた。K.-B.染色においても、4週齢では何ら明らかな変性所見を認めなかったが、20週齢では、圧迫部を中心に吻側では後索部、尾側では前側索部を中心に myelin ovoids や空胞形成がみられ軸索変性が示唆された (図1)。

2. 組織生化学的観察

TUNEL染色では、4週齢では陽性細胞は認めなかったが、20週齢では、圧迫部を中心に吻側へは3mm、尾側へは10mmの部位までTUNEL陽性細胞を認めた。また、陽性細胞は灰白質と白質の何れにもみられたが、圧迫部より吻側では後索に、尾側では前側索に多く見られた (図2)。

3. TUNEL法とグリア特異抗体による二重染色

20週齢マウスのTUNEL染色とグリア細胞のマーカーによる二重染色では oligodendrocyte にのみアポトーシスが生じていることが認められた。

D. 考察

我々はこれまで、急性脊髄損傷におけるアポトーシスの誘導と神経障害形成における役割について報

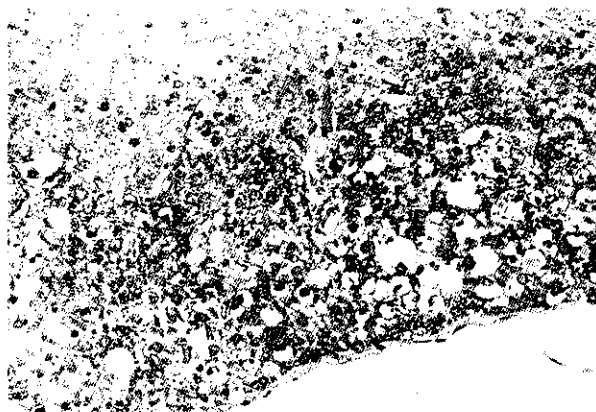


図1

TUNEL 陽性細胞数

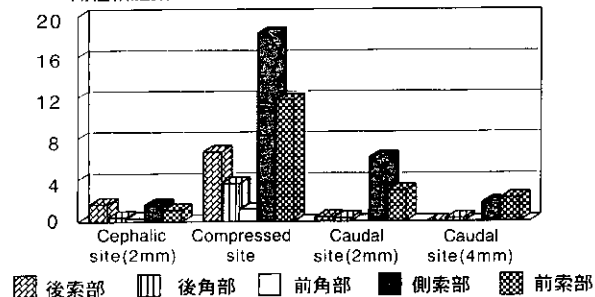


図2

告を行ってきたが、今回、慢性的な圧迫を受けている脊髄においても、アポトーシスが誘導されることを明らかにした。神経線維の変性は障害高位より神経末梢側に顕著であり、いわゆる Waller 変性の組織像を呈していた。軸索変性所見と oligodendrocyte のアポトーシスがほぼ同一の領域に著明にみられることより、慢性圧迫における脊髄変性に oligodendrocyte のアポトーシスが関与することが示唆された。

E. 結論

慢性脊髄圧迫における神経障害形成にアポトーシスが関与することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shinji Nakahara, Kazunori Yone, Takashi Sakou, Shoichi Wada, Tomonori Nagamine, Takahito Niiyama, Hidenori Ichijo, Induction of Apoptosis Signal Regulation Kinase 1 (ASK1) after Spinal Cord Injury in Rats: Possible Involvement of ASK1-JNK and -p38 Pathways in Neuronal Apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 442-450, 1999.
- 2) Shoichi Wada, Kazunori Yone, Yasuhiro Ishidou, Tomonori Nagamine, Shinji Nakahara, Takahito Niiyama, Takashi Sakou, Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventive effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurosurg (Spine1)* 91: 98-104, 1999.
- 3) 米 和徳, 中原真二, 石堂康弘, 和田正一, 長嶺智徳, 急性脊髄損傷におけるアポトーシスのシグナル伝達経路脊椎脊髄ジャーナル, 12: 931-935, 1999.

2. 学会発表

- 1) 中原真二, 酒匂 崇, 米 和徳, 長嶺智徳, 石堂康弘, 一條秀憲, 今村健志, 宮園浩平, 馬場久敏, 脊髄慢性圧迫におけるアポトーシスの観察 第27回日本脊椎外科学会, 1998.
- 2) 山浦一郎, 米 和徳, 中原真二, 吉野伸司, 長嶺智徳, 永野 聡, 馬場久敏, 内田研造, 慢性脊髄圧迫における脊髄変性機序 第34回日本パラプレジア医学会, 1999.

圧迫性脊髄損傷におけるBDNF, TrkBの発現, 局在とその役割

池田 修 (千葉大学医学部整形外科), 山崎 正志 (千葉大学医学部整形外科),
村上 正純 (千葉大学医学部整形外科), 国府田正雄 (千葉大学医学部整形外科),
守屋 秀繁 (千葉大学医学部整形外科)

KEYWORDS=spinal cord injury, BDNF, Trk B

【研究要旨】

【目的】 圧迫性脊髄損傷における脳由来神経栄養因子 (BDNF) の役割と治療効果を解明することを目的とした。【方法】 ラット脊髄圧迫損傷モデルで, 定量的PCR, In situ hybridization (ISH) にてBDNF mRNA・TrkB mRNAの発現につき検討した。さらにBDNF投与によるSuperoxide dismutase(SOD)・Myelin basic protein(MBP)mRNAの変化をNorthern blot analysis, ISHにて検討し, 行動学的評価も行った。【結果】 BDNFは損傷後24時間以内の急性期に急増しTrkBは損傷後1週以降に増加した。BDNFを2週間持続投与するとSODが一時的に増加し, MBPは投与終了後も持続的に増加した。またSODは神経細胞のほかoligodendrocyteでも発現を認めた。行動学的にも機能回復が促進された。【結論】 BDNFは急性期には保護にその後は修復に作用すると思われた。

A. 研究目的

これまで脊髄障害を引き起こす様々な病態の解析が進むなかで脊髄の持つ複雑な生理的機能を傷害するいわゆる障害因子も明らかにされてきた。例えば, 圧迫による虚血, 出血後の炎症, 組織障害性の強いフリーラジカル, 神経細胞の過興奮を引き起こし細胞死へと導く興奮性アミノ酸などである。これらの因子により本来の機能を失った脊髄はその後の修復反応により機能を再獲得するが損傷の程度によっては重篤な機能障害が残存することがある。特に脊髄白質を形成する索路は再生しないと考えられている。これらが脊髄は脆弱であると言われる主な理由であると思われる。しかしながら極めて合理的に作られている生体で, 重要な機能を持つ脊髄を傷害から守り修復に導く機構は存在しないのだろうか。神経栄養因子は神経細胞の生存維持, 突起伸展, 機能充進など多彩な作用を持つ蛋白で1994年にSchnellらが背側部分切断した脊髄の錐体路が伸展したと報告¹²⁾して以来注目され損傷脊髄に対するその作用を解明すべく多くの基礎的研究が行われるようになってきた^{4,7,13)}。これまでに明らかとなってきたその能力はまだその一部分であると思われるが難治性脊髄疾患の治療に携わる臨床家に希望を与えるものである。

我々は神経栄養因子のひとつである脳由来神経栄

養因子 (BDNF) に注目し損傷脊髄におけるその役割を解明することを目的としラット圧迫性脊髄損傷モデルを用いて研究を行ってきた。BDNFとその高親和性レセプターであるTrkBの損傷脊髄内での発現, 局在を解析し, それらの結果をもとにBDNF蛋白を投与しその作用, 効果につき検討を行った。

B. 研究方法

1. 脊髄損傷モデルの作成

雄性Wistarラット (8週令, 180g~200g) を用いた。Halothene麻酔下に第8胸椎椎弓切除後, 硬膜管背側より直径3.2mmの圧迫子を介して30g~50g, 5分間の圧迫を加え胸髄不全損傷とした⁸⁾。Sham群には椎弓切除後圧迫は加えなかった。

2. BDNF投与

脊髄損傷作成直後に直径0.5mmのシリコンチューブを第3/4腰椎椎弓間より髄腔内頭側に約1cm挿入し, チューブ端に浸透圧性ミニポンプを接続した。ポンプ内にはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて1 μ g/mlに調整したrecombinant human BDNFを充填し0.5 μ g/h (BDNF, 12 μ g/day) で2週間持続投与した。コントロールとしてPBSを同様に投与した。

3. cDNAの作成

ラットBDNF cDNA, ラットTrkB cDNA, ラットCu, Zn Superoxide dismutase (SOD) cDNA, ラットMyelin basic protein (MBP) cDNAのそれぞれに特異的な領域をPCRで増幅後pBluescript II vector にサブクローニングした。

4. 定量的PCR

損傷脊髄内におけるBDNF mRNAおよびTrkB mRNAの時間的变化を調べるために定量的PCRを行った。30g, 5分間の圧迫損傷後, 6時間, 24時間, 3日, 1週, 2週, 4週で損傷部を中心に約12mmの脊髄を摘出し, AGPC法にてtotal RNAを抽出した。逆転写反応後, 標的DNAとprimerを競合するcompetitive DNAを加え同じチューブ内で反応させることにより定量した。この際検出感度を増強するために α -32 P-dCTPを用いて内部標識を行った。またコントロールにはSham脊髄を用いた。TrkBはTyrosine kinase domainを有するfull length formに特異的な領域に設定した^{3, 5)}。

5. In situ hybridization (ISH)

4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後パラフィン標本を作製し4 μ mで薄切片を染色に用いた。Digoxigenin およびFITCでラベルしたcRNAプローブを用いてin situ hybridizationを行い BDNF, TrkBmRNAの発現を損傷後1週~4週で観察した。またCu, Zn Superoxide dismutase, Myelin basic protein mRNAの発現を損傷後1週のBDNF投与群 (BDNF群) とPBS投与群 (Vehicle群) で観察した。

6. Immunohistochemistry (IHC)

SOD mRNA陽性細胞の種類を同定するためISHの隣接切片を用いてIHCを行った。oligodendrocyteのマーカーとして抗adenomatous polyposis coli (APC) 抗体を, またastrocyteのマーカーとして抗glial fibrillary acid protein (GFAP) 抗体を用いてABC法にて染色を行った。

7. Northern blot analysis

損傷後6時間, 24時間, 3日, 1週, 2週, 4週でBDNF群, Vehicle群より, またコントロールとしてSham群より損傷部を中心に約12mmの脊髄を摘出しtotalRNAを抽出した。各サンプル10 μ gをアガロースホルムアルデヒドゲルに電気泳動しブロッティング後32Pラ

ベルDNAプローブを用いてSOD, MBPmRNAの経時的变化を調べた。

8. BDNF投与効果を機能的に評価するため行動学的評価を行った。

BDNF群とVehicle群の損傷前および損傷後1週間ごとに6週までビデオ撮影を行いBaffourらのbehavioral scoring system (1, 6) に従い4人の脊椎外科医により盲目的評価を行った。テストはmotor score, righting, swim, toe spread, placing, withdrawal reflex, rightingを行い各テストのスコアの総和が100点になるように作られている。

9. 統計学的解析

結果はRepeated measure ANOVAで解析後, 有意差のあるもの(p<0.05)に対してはSheffのpost hoc testを行った。

C. 研究結果

BDNF, TrkBmRNAの定量

BDNFmRNAは損傷後6時間で急増し (P<0.01), 24時間でコントロールの約3倍でピークとなり (P<0.01), 3日にはコントロール値に戻り2週から4週にかけて漸減傾向を示した (Fig. 1A)。TrkBmRNAはBDNFmRNAと対照的で, 損傷後3日まで漸減傾向を示したが1週でコントロールの約2倍に急増し (p<0.01) 2週から4週にかけて漸減するも比較的高値は保たれていた (Fig. 1B)。

BDNF, TrkBmRNAの局在

BDNFmRNAはShamでは灰白質の神経細胞と白質に比較的均一に存在するグリアにも多数の陽性細胞が認められた (Fig. 2A)。損傷後24時間ではこれら陽性細胞のシグナルは増強しその変化は大型の神経細胞ばかりでなく白質のグリアでも著しかった (Fig. 2B, C)。1週ではこれらのシグナルはやや減弱したが損傷の激しい後索に陽性細胞の集積を認めた (Fig. 2D, C)。これは他の切片を用いたCD11b陽性細胞の検討よりmicrogliaであると思われた。TrkBmRNAもShamでは灰白質の神経細胞と白質の多数のグリアに陽性細胞を認めた (Fig. 3A)。損傷後24時間では白質のグリアの他に, 破壊された組織内に広がる赤血球に混在して比較的小型の陽性細胞を認めた。1週にはこれらは消退し白質のグリアでの発現が目立った (Fig. 3B, C)。2週から4週では空洞形成が認

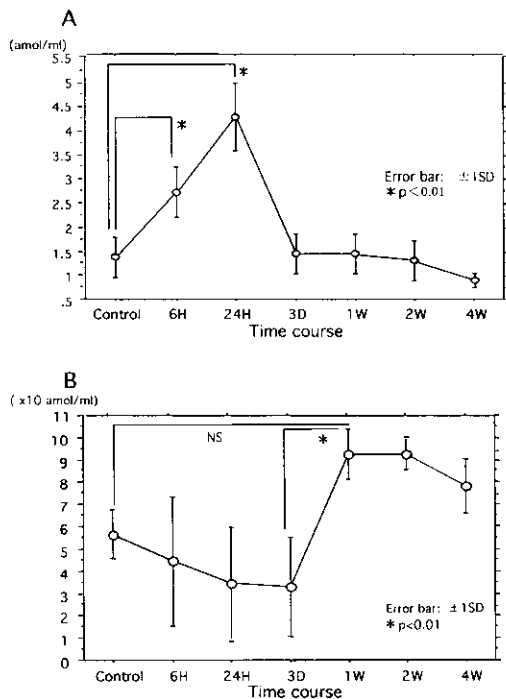


Fig. 1 BDNF (A), TrkBmRNA (B) 発現量の時間的変化

BDNFは損傷後6時間で急増し ($P < 0.01$) 24時間でコントロールの約3倍でピークとなった ($P < 0.01$)。その後3日にはコントロール値に戻り1週から4週で漸減傾向を認めた (A)。TrkBは損傷後3日まで漸減傾向を示し1週で急増した ($P < 0.01$)。その後4週まで比較的高値が保たれた (B)。

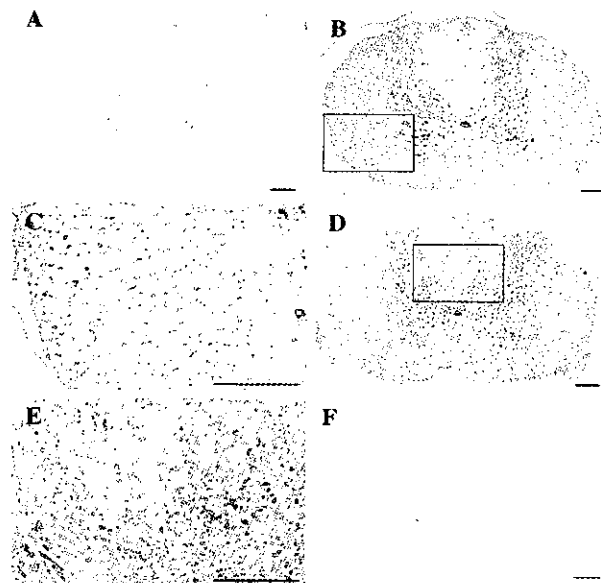


Fig. 2 BDNFmRNA の分布の変化

Shamでは神経細胞と白質の多数のグリアに発現を認めた (A)。損傷後24時間では神経細胞とグリア共にシグナルの増強を認めた (B, C)。損傷後1週では損傷の著しい後索周囲に陽性細胞の集積を認めた (D, E)。sense probeでは染色されなかった (F)。BとDの四角内拡大像をそれぞれC, Eに示す。Scale bar: $150\mu\text{m}$

められ空洞壁およびその周囲には陽性細胞が集積し隣接切片を用いたIHCと比較してこれらの多くはGFAP陽性でありastrocyteと思われた (Fig. 3D~G)。

BDNF 投与による SOD, MBPmRNA の変化

SODはSham脊髄で強い発現を認めるがVehicle群では損傷6時間から24時間で急減し3日でやや回復し1週でコントロールより増加するが2週で再度低下し4週まで維持された。これに対しBDNF群では6時間から24時間で減少するがその程度は軽く3日には急増し2週まで比較的高値を保った。BDNFを投与中の2週間は全ての時期でBDNF群がVehicle群に比較し強い発現を示した (Fig. 4)。MBPはVehicle群では損傷後24時間までに急減し以降回復を認めなかったのに対してBDNF群では減少は比較的軽度で抑えられ3日以降漸増を認めた。BDNF投与終了後の4週でも発現の増加は持続していた (Fig. 4)。

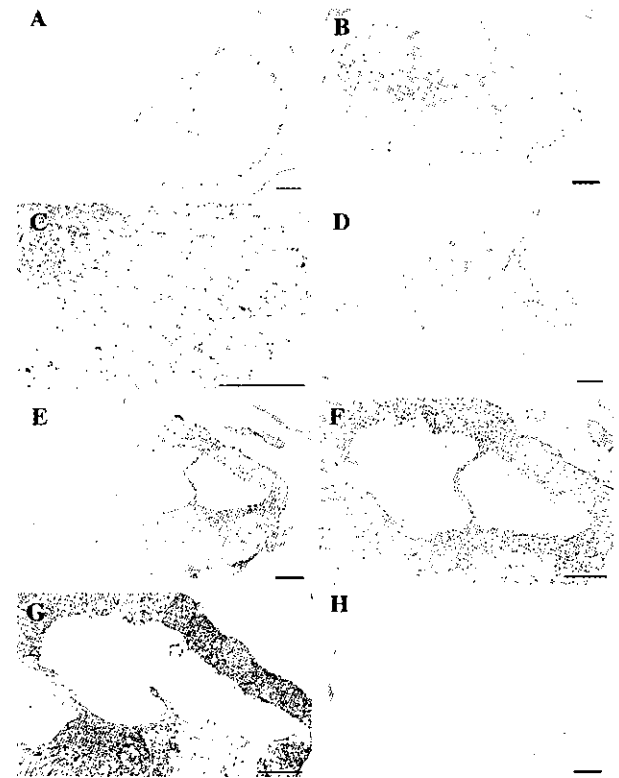


Fig. 3 TrkBmRNA の分布の変化

ShamではBDNFと同様に神経細胞と白質のグリアに発現を認めた (A)。損傷後1週では白質のグリアでシグナルの増強を認めた (B, C)。2週 (D) から4週 (E, F) にかけて空洞が形成され周囲に陽性細胞の集積を認めた。これらはGFAP陽性細胞 (G) と分布が似ておりastrocyteであると思われた (F, G)。sense probeでは染色されなかった (H)。Scale bar: $150\mu\text{m}$

SOD, MBPmRNA の局在

SODmRNAはShamでは神経細胞の他、白質の多数のグリアにも発現を認めた (Fig. 5A, B)。損傷後1週でも残存する神経細胞と白質のグリアに発現を認め、隣接切片を用いたIHCの結果よりこれら白質に広がる陽性細胞の多くはoligodendrocyteであり一部astrocyteも含まれていた (Fig. 5C-G)。またSODの局在についてはBDNF群とVehicle群との間に明らかな差異は認められなかった。

MBPmRNAはShamでは白質に多数、灰白質にも少数の陽性細胞を認めた (Fig. 6A, B)。損傷後1週では比較的形態の保たれた白質周辺に比較的強い発現を認め、損傷の著しい中心付近では発現は乏しかった (Fig. 6C-E)。またBDNF群

とVehicle群との間に明らかな差異は認められなかった。

行動学的評価

BDNF群はVehicle群と比較し運動機能を表すmotor score ($P<0.05$), inclined plane ($P<0.05$), swim test ($P<0.01$) の3つのテストで高値を示した (Fig. 7A-C)。特にmotor scoreとswim testで著しい回復を認めた。またtoe spread, placing, withdrawal reflex, rightingではBDNF群が比較的高値を示す傾向にあったが有意差は認められなかった (Fig. 7D-G)。これらの総和で表されるtotal scoreでもBDNF群が高値を示した ($P<0.01$) (Fig. 7H)。

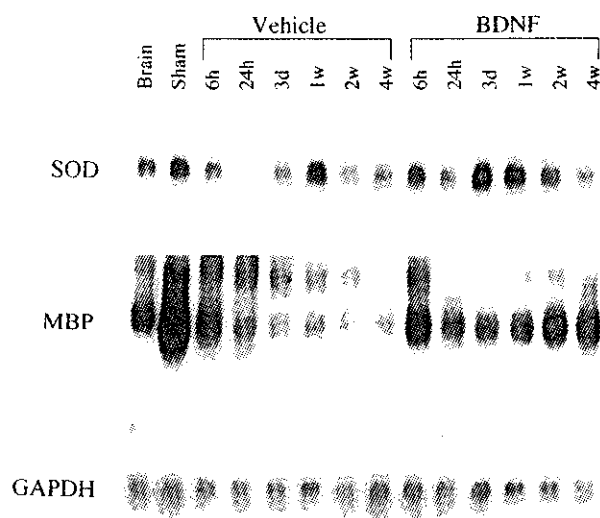


Fig. 4 BDNF投与によるSOD, MBPmRNAの変化

SODはVehicle群では損傷後6時間から24時間にかけて減少後3日から1週で回復し、その後再び低下した。BDNF群では24時間まで減少は軽減し3日で急増した。その後2週まで比較的強い発現が維持され投与終了後の4週で低下した。MBPはVehicle群では損傷後6時間から24時間にかけて急減しその回復は認めなかった。BDNF群では24時間までの低下は軽減し3日から4週まで漸増した。最下段にコントロールとしてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を示す。

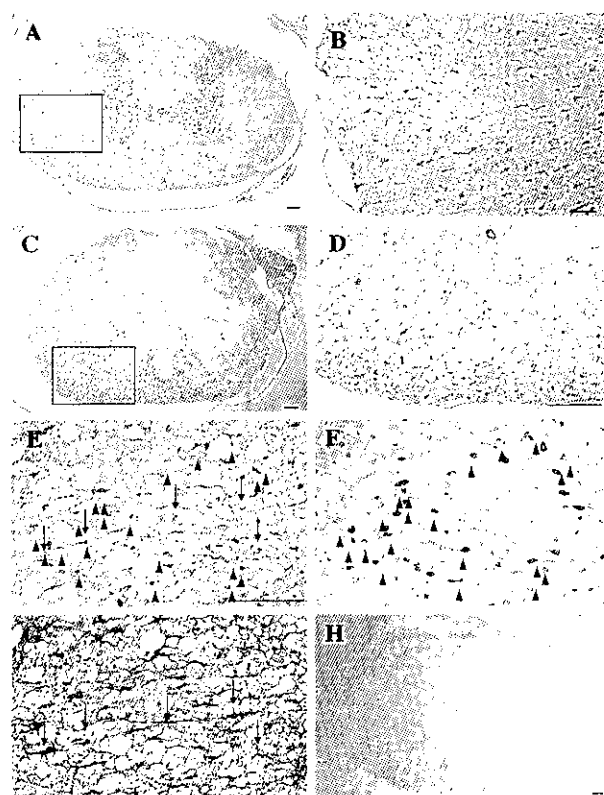


Fig. 5 SODmRNAの分布

Sham群ではSODは神経細胞のほか白質のグリアにも発現が認められた (A, B)。損傷後1週では傷害を逃れた神経細胞とグリアに発現を認めた (C, D)。BDNF群とVehicle群との間に明らかな差異は認められなかった。隣接切片を用いたIHCの結果より白質に認められたSOD陽性細胞 (E) の多くはAPC陽性 (E) でありoligodendrocyteであった。また一部はGFAP陽性 (G) でありastrocyteも発現していることがわかった。sense probeでは染色されなかった (H)。AとCの四角内拡大像をそれぞれB, Dに示す。Scale bar: $150\mu\text{m}$

D. 考察

今回の我々の実験ではBDNFとその高親和性レセプターであるTrkBは脊髄損傷時に神経細胞ばかりでなくoligodendrocyteを主として白質のグリアでも発現の増強が誘導されていた。BDNFは損傷後24時間以内の急性期に急増しその後速やかに低下したのに対しTrkBは対照的に損傷後1週で増加しその後も比較的強い発現が維持されていた。脊髄損傷後の組織内反応の経時的变化についてBeattieらは、損傷後48時間以内に血球成分が組織内に広がりこれに引き続き脱髄変化が進行する。その後壊死組織の吸収が始まり5日後頃よりシュワン細胞が入り込み修復反応へと移行すると報告している²⁾。これを参考に結果を分析するとBDNFは組織破壊進行期に、TrkBは修復期に髄節および索路で作用している、

つまりTrkBを介するBDNFの作用は時期により異なるのではないかと推測できる。また特に脊髄白質におけるこれらの反応は興味深い。

そこで次にこの仮説を証明すべくBDNFの投与実験を行った。ラジカルスカベンジャーであるCu, Zn superoxide dismutase (SOD)を急性期に働く組織保護のマーカーとして、また髄鞘の構成蛋白であるMyelin basic protein (MBP)を索路修復のマーカーとして選択しBDNF投与によるこれらの変化を調べるとSODは増加し投与中の2週間比較的高値を維持した。これは神経細胞の他oligodendrocyteでも発現が認められた。いっぽうMBPは急性期の減少がある程度抑制されその後の増加が促進された。さらにこの増加は投与終了後の4週でも維持されていた。MBPmRNAは組織破壊

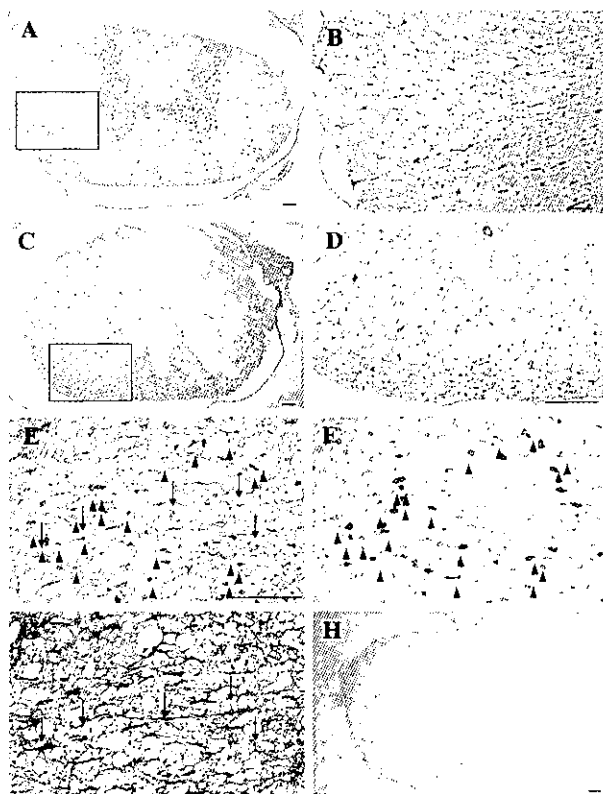


Fig. 6 MBPmRNAの分布

Sham群ではMBPは白質に多数、灰白質にも少数の陽性細胞が認められた(A, B)。損傷後1週では比較的形態の保たれた白質周辺に陽性細胞が認められた(C, D, E)。BDNF群とVehicle群との間に明らかな差異は認められなかった。sense probeでは染色されなかった(F)。Cの上, 下の四角内拡大像をそれぞれD, Eに示す。メチルグリーンで対比染色を行った。Scale bar: 150 μ m

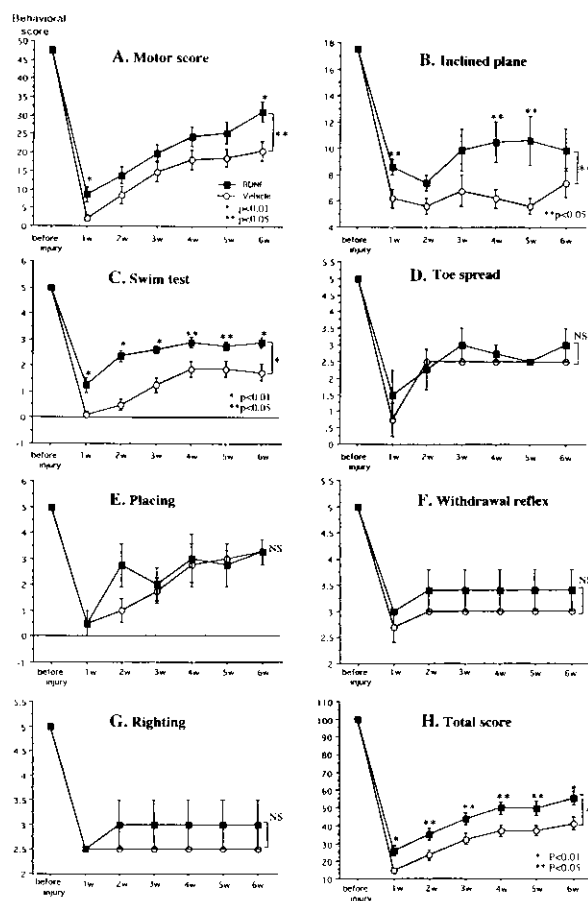


Fig. 7 BDNFの投与効果(行動学的評価)

BDNF群はVehicle群と比較しMotor score(A) ($P<0.05$), Inclined plane test (B) ($P<0.05$), Swim test (C) ($P<0.01$)で高値を示した。またこれらはすべて損傷後1週ですでに高値を示した。Toe spread (D), Placing (E), Withdrawal reflex (F), Righting (G)ではBDNF群が高値を示す傾向にあったが有意差は認められなかった。Total score (H)でもBDNF群が高値を示し回復促進効果が認められた ($P<0.01$)。

の比較的少ない周辺の白質に発現されていた。行動学的評価でも投与群は損傷後1週の早期より高値を示し6週まで維持された。つまり少なくとも1週以内の急性期に作用し機能回復を促進したと考えられる。またその効果は投与終了後も維持されており一時的なものではないといえる。以上の結果をまとめるとBDNFは脊髄損傷急性期にSODを増加させることにより髄節や索路傷害を軽減し、その後の修復期にはミエリンを再生し索路の修復を促進した。これらの作用により機能回復が促進されたと考察できる。

これまでに脊髄損傷に対するBDNFの保護的作用について、NovikovaらはBDNFを投与して脊髄半切後の運動神経細胞死が抑制されまた空洞が小さくなったと報告しているがこれは主に神経細胞に対する作用でありまたその機序についての詳細は不明である¹¹⁾。我々は今回の結果よりBDNFがoligodendrocyteのSOD発現を調節し神経細胞ばかりでなく髄鞘の保護にも関与するのではないかと考えている。またBDNFの修復作用についてはMcTigueらは損傷部脊髄にBDNF産制性線維芽細胞を移植してoligodendrocyteの分化が誘導されミエリンと神経線維の再生が認められたと報告している¹⁰⁾。我々はBDNF群とVehicle群との間にMBP mRNAの分布の違いが明らかでなかったことより損傷から逃れた髄鞘の維持にも作用している可能性があると考えている。また行動に対する作用ではJakemanらは神経細胞に対する直接的刺激作用による効果を報告している⁹⁾が我々の結果では投与終了後も効果は持続しており神経組織の構造に対する効果であると考えている。

脊柱靭帯骨化症による脊髄症は慢性進行性の病態であるが時に外傷を契機として急性の経過をとることも珍しくない。また手術治療にも神経症状を悪化させてしまう危険を伴う。そのような症例には脊髄保護の効果を期待してメチルプレドニゾロンが使われることがあるが効果の限界や感染などの副作用の問題もあり万能薬ではない。BDNFは異なる作用機序により保護と修復の両方を期待できる点で優れている。日本でも現在筋萎縮性側索硬化症を対象に臨床試験が進められており今後の整形外科的疾患に対する臨床応用も期待されている。

しかしながら今回の結果でもグリア性瘢痕に対する関与の可能性も考えられ今後副作用、至適投与量、投与時期、投与方法などに関する十分な検討が課題と思われる。

E. 結論

圧迫性脊髄損傷においてBDNFは急性期には保護に、その後は修復に主として作用すると思われる。

[参考文献]

- 1) Baffour, R., K. Achanta, J. Kaufman, J. Berman, J. L. Garb, S. Rhee, P. Friedmann: Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and methylprednisolone on neurological function after experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 83: 105-110. 1995.
- 2) Beattie, M. S., J. C. Bresnahan, J. Komon, C. A. Tovar, M. Van Meter, D. K. Anderson, A. I. Faden, C. Y. Hsu, L. J. Noble, S. Salzman, W. Young: Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Exp. Neurol.* 148: 453-463. 1997.
- 3) Becker-Andre, M., and K. Hahlbrock: Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res.* 17: 9437-9446. 1989.
- 4) Bregman, B. S., M. McAtee, H. N. Dai, P. L. Kuhn: Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp. Neurol.* 148: 475-494. 1997.
- 5) Celi, F. S., M. E. Zenilman, and A. R. Shuldiner: A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 1047. 1993.
- 6) Gale, K., H. Kerasidis, and J. R. Wrathall: Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp. Neurol.* 88: 123-134. 1985.
- 7) Grill, R., K. Murai, A. Blesch, F. H. Gage, and M. H. Tuszynski: Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 17: 5560-5572. 1997.
- 8) Holtz, A., B. Nystrom, and B. Gerdin: Spinal blood flow measured by ¹⁴C-iodoantipyrine autoradiography during and after graded

- spinal cord compression in rats. *Surg. Neurol.* 31: 350-360.1989.
- 9) Jakeman, L. B., P. Wei, Z. Guan, and B.T. Stokes: Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 154: 170-184.1998.
- 10) McTigue, D. M., P. J. Horner, B. T. Stokes, and F. H. Gage: Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 18: 5354-5365. 1998.
- 11) Novikova, L., L. Novikov, and J. O. Kellerth: Brain-derived neurotrophic factor reduces necrotic zone and supports neuronal survival after spinal cord hemisection in adult rats. *Neurosci. lett.* 220: 203-206. 1996.
- 12) Schnell, L., R. Schneider, R. Kolbeck, Y. A. Barde, and M. E. Schwab: Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367: 170-173. 1994.
- 13) Ye, J. H., and J. D. Houle: Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons. *Exp. Neurol.* 143: 70-81.1997.

脳脊髄液中のヒアルロン酸濃度について

菊池 明 (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)

【研究要旨】

【はじめに】脳脊髄液 (以下CSF) 中にもヒアルロン酸 (以下HA) は存在するが、その濃度、分子量などについての報告は少ない。今回我々は脊髄造影時や腰椎麻酔時に採取したCSFを用い、年齢、性別、疾患などに関するHA濃度の差について検討した。

【対象、方法】弘前大学附属病院並びに関連病院で採取したCSFを検討の対象とした。測定結果を性別や年齢、疾患別に分け、疾患群と対象群との間の差について比較した。

【結果】脊椎疾患のない対象群の男性では、加齢に伴いHA濃度が増加した。女性でも同様に濃度が増加するが、男性に比べ相関係数は低値であった。これに対し、疾患群では対象群とは異なる濃度分布を示した。例えばLDH群では対象群と同程度の濃度を示すものから非常に高濃度を示す例まで、非常に広範な濃度分布を示した。

【考察】今回の結果では特に男性において加齢に伴いHA濃度が上昇すること、また各疾患群において高値を示す傾向があることから、脊髄や神経根などへの急性、慢性の圧迫に伴いHA濃度が変化する可能性が示された。

A. 研究目的

ヒアルロン酸 (以下HA) は皮膚や軟骨組織の細胞外マトリックス、及び硝子体、関節液、血液などの体液中に存在している。これまで各組織におけるその濃度や機能についての研究が進められている。脳脊髄液中にもHAは含まれているが、その濃度、分子量などについての報告は少ない¹⁾。

脊髄損傷時には初期の外力による1次損傷後に、炎症、浮腫などの2次的変化が進行し、種々の有害物質による脊髄変性が進行する。フリーラジカルも脊髄変性に関与するが、HAはフリーラジカルと反応し低分子化することで、ラジカルスカベンジ作用を有すると報告されている。動物実験では脊髄損傷急性期に脳脊髄液中にHAを灌流することで、2次損傷をある程度抑制することも報告されている²⁾。

ヒトにおいても同様の効果が期待できるが、まずは正常時のHAの状態についての理解が必要と思われる。

今回我々は脊髄造影時や腰椎麻酔時に脳脊髄液を採取し、年齢、性別、疾患などについてのHA濃度の差について検討したので報告する。

B. 研究方法

1998年1月から1999年8月にかけて弘前大学付属病院並びに関連病院で、脊髄造影時や腰椎麻酔時に

採取した脳脊髄液を検討の対象とした (男性198例、女性144例、平均年齢49歳)。HA濃度測定にはヒアルロン酸測定用プレート (©中外製薬) を用いた。

測定結果を性別や年齢、また腰椎椎間板ヘルニアや脊柱管狭窄症、靭帯骨化症などの疾患別に分けて、疾患群と対象群との間の差について比較した。統計学的比較にはMann-WhitneyのU検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

C. 研究結果

脊椎疾患のない対象群の男性では、加齢に相関してHA濃度の上昇が認められた ($R^2=0.943$)。女性においても同様に加齢に伴う濃度の上昇を認めたが、男性に比べ相関係数は低値であった ($R^2=0.699$)。加齢に伴うHA濃度上昇は男性の方により著明で、60代、70代では女性に比べ、男性の方が有意に高値であった (図1)。

これに対し、腰椎椎間板ヘルニア (以下LDH群)、腰部脊柱管狭窄症 (以下LSCS群)、OPLLなどの靭帯骨化症 (以下靭帯骨化群) などの疾患群では、対象群とは異なる濃度分布を示した。例として30代男性LDH群と対象群との濃度分布を示す (図2)。LDH群では対象群と同程度の濃度を示す例もあったが、中には平均の約3倍と非常に高濃度を示す例もあり、対象群と比べ非常に広範な濃度分布を示し

ていた。平均値を比較すると、30代の男性では有意にLDH群が高値であった。

図3に男性の50代から70代までのLSCS群と対象群との濃度分布を示す。50代のLSCS群は30代のLDH群と同様に対象群に比べ広範な濃度分布を示し、平均値も有意に高値であった。一方60代、70代では対象群に比べ分布が広範な傾向があったが、平均値は対象群と有意差を認めなかった。

靭帯骨化群では例数が少ないため男性でのみ比較した(図4)。この症例群は同年代の対象群に比べ高値をとる傾向にはあったが、有意差は認めなかった。

D. 考察

生理的にも脳脊髄液中にはHAが含まれているが、その機能についてはほとんど理解されていない。今回我々は脳脊髄液中のHA濃度を調べ、脊椎疾患がHA濃度に変化を生じるかについて検討した。

対象群では男性、女性共に加齢に伴うHA濃度が上昇する傾向が認められた。また、特に50代以降に

男性が女性よりも高値を呈していた。加齢により脊椎の変性が進むこと、また一般に男性の方がより脊椎の変性が進行しやすいことを考えると、脊椎の変性、またはそれに伴う脊髄や神経根への圧迫と、HA濃度との間に関係があることが示唆される。

LDH群では同年代の一般群と同程度の濃度を呈するものもあるが、対象群平均の2倍を超える数値を呈する症例も認められた。各年代とも対象群よりも広い濃度分布を呈しており、また高値をとる症例は30代から70代のどの年代にも認められた。今回はヘルニア塊による神経圧迫の程度との相関関係は検討しなかったが、ヘルニア塊による神経根圧迫の程度、またそれに伴う炎症などが濃度変化に関与する可能性が示唆された。

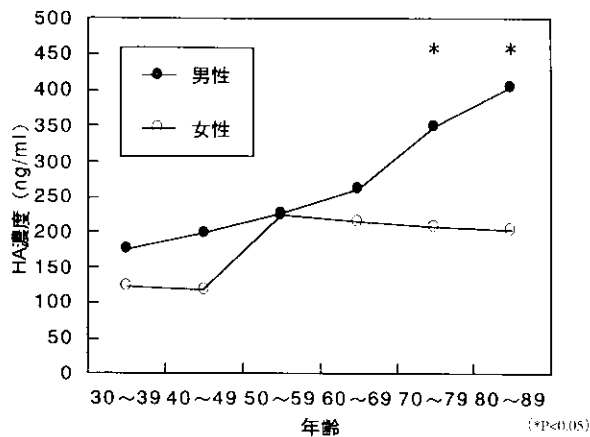


図1 対象群男女HA濃度

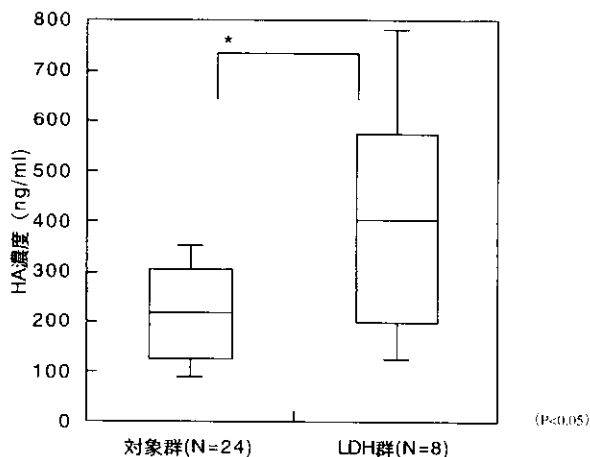


図2 30代男性の対象群とLDH群の比較

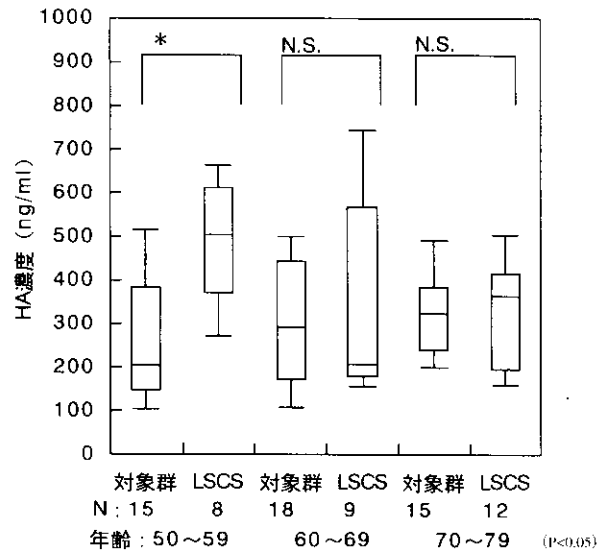


図3 対象群とLSCS群との比較

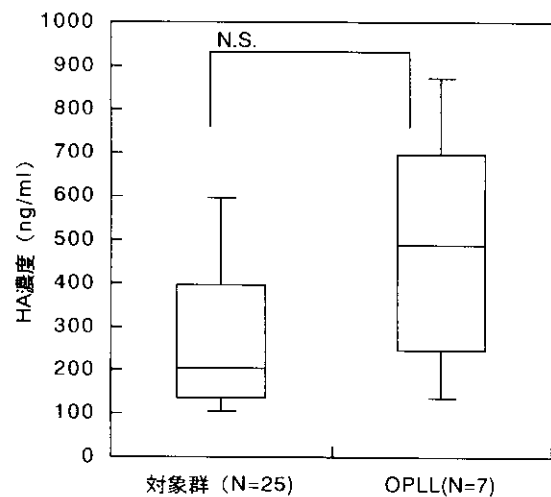


図4 対象群とOPLL群との比較

LSCS群では男性、女性共に50代で有意に高値を呈していた。また、今回の結果では50代の方が60代、70代に比べ高値を呈していた(有意差なし)。このことは疾患に伴う炎症の急性期に濃度が上昇し、慢性化に伴い炎症が沈静化して、濃度が低下しているのかもしれない。

靭帯骨化群では好発年代が50代から70代と、対象群でも高濃度を呈する年代であるためか、濃度に有意差は認めなかった。今回は対象群に比べ靭帯骨化症の症例数が少なかった。症例数が増えると統計学的な有意差が得られるかもしれない。

今回の結果では特に男性において加齢に伴いHA濃度が上昇すること、また各疾患群において高値を示す傾向があることから、脊髄や神経根などへの急性、慢性の圧迫に伴いHA濃度が変化する可能性が示された。今後はこの濃度変化の意義について検討していきたい。

[参考文献]

- 1) Laurent UBG, et al.: Hyaluronan in human cerebrospinal fluid. Acta Neurol Scand 1996; 94: 194-206.
- 2) 小林徹也 他: 急性脊髄損傷に対するヒアルロン酸を用いた脊髄灌流の効果 日本パラプレジア医学界雑誌 1998; 11(1): 76-77.

頸椎後縦靱帯骨化症における髄液中Nitric oxide(NO)濃度の検討

弓手 康正 (国立岡山病院整形外科), 中原進之介 (国立岡山病院整形外科),
田中 雅人 (国立岡山病院整形外科)

【対象】

頸椎疾患群39例(うち頸椎OPLL9例)と対照群として脊椎脊髄疾患の既往のない患者34例であった。

【方法】

- ①髄液を1.5cc採取
- ②水酸化ナトリウム(NaOH)と硫酸亜鉛(ZnSO₄)により除蛋白
- ③遠心後フィルターにて濾過
- ④NO₃→NO₂変換器(TCI-NOX1000, さぬき工業社製)及び吸光計(Visible detector/S-3250, 東京化成社製)を用いてGriess法に従い測定を行った。

【結果】

- (a) 対照群は性差, 年齢差に有意な差がなく2.6 μ Mであった。
- (b) NOの濃度は頸椎疾患群は5.4 μ Mで対照群に比し高値を示した。
- (c) 圧迫レベルの多い頸椎OPLLではさらに高値の5.9 μ Mを示した。
- (d) 頸椎疾患群ではJOA scoreとNO濃度には逆相関が認められた。すなわち症状の程度が強いほどNO濃度の上昇が認められた。

【考察】

NOの産生原因は神経組織圧迫であり頸椎OPLLに特異的とは考えにくい, 圧迫レベルが多いほどまた臨床症状が悪いほどNO濃度が高値を示すことよりNO濃度が神経障害因子のパラメーターとして役立つのではないだろうか。

A. 研究目的

Nitric oxide(以下NO)と神経との関係は主として中枢神経について研究されてきた。今回の研究では頸椎後縦靱帯骨化症の髄液中のNO濃度を測定し, 病態及び臨床症状との関連を検討したので報告する。

B. 研究対象

頸椎疾患群39例(男32例, 女7例, 平均年齢65歳)の髄液中のNO濃度について検討を加えた。また対照群として脊椎脊髄疾患の既往のない患者34例(男10例, 女24例, 平均年齢50歳)についても検討を加えた。

C. 研究方法

髄液採取は疾患群では脊髄造影時に, 対照群は腰椎麻酔下時に1.5cc採取した。そして即時に凍結保存した。そして測定直前に常卸, さらに頸長で解凍し, NaOHとZnSO₄により除蛋白後, TCI-NOX1000(NO₃→NO₂変換器, さぬき工業社製)及びVisible detector/S-3250(吸光計, 東京化成社製)を用いてGriess法に従い測定を行った。

【検討項目】

検討はまず対照群と疾患群で髄液中NO濃度を比較した。頸椎疾患群は圧迫椎間数の少ない頸椎症性神経根症(以下頸椎症)と広範囲の圧迫による脊髄症状を主とする頸椎症性脊髄症(以下頸髄症), 頸椎後縦靱帯骨化症(以下頸椎OPLL)の3群に分類し各疾患群での検討を行った。臨床症状の評価は日本整形外科学会頸髄症治療成績判定基準(以下JOA score)に従い17点満点で評価し髄液中NO濃度との関連について検討を加えた。

D. 研究結果

対照群は平均2.6 μ Mで年齢差, 男女差は認めなかった。頸椎疾患群では平均5.4 μ Mともに対照群より有意に高値であった。頸椎疾患群では広範囲の脊髄圧迫症状のある頸椎OPLLでNO濃度が最も高く, 単一根症状示す頸椎症では対照群に比しやや高値を示す程度であった(表1)。頸椎疾患群のJOA scoreとNO濃度には逆相関が認められた(図1)。

すなわち症状の程度が強いほどNO濃度の上昇が認められた。

	症例 (n)	年齢	NO (μ M)
対照群	34	50	2.6 a,b
頸椎疾患	39	65	5.4
頸椎症	7	66	3.4
頸髄症	23	65	4.9 a
頸椎 OPLL	9	66	5.9 b

a:p<0.01,b:p<0.05

表1 頸椎疾患群の髄液中NO濃度

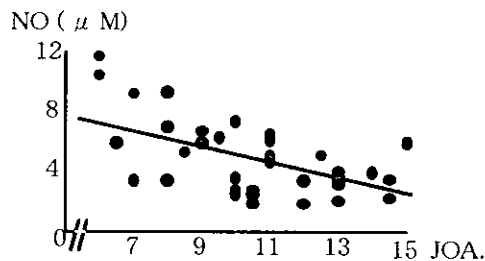


図1 頸椎疾患におけるJOA scoreとNOの関係

E. 考察

NOは1988年にFurchgott¹⁾らが血管内皮細胞由来因子として発表して以来様々な分野で検索が行われてきた。そして血管平滑筋、神経細胞、グリア細胞、内分泌細胞、消化管、血小板や好中球等で伝達物質・調節物質として機能していることが言われている。神経分野では細胞死、神経情報伝達の修飾、細胞の増殖と活性化などの報告がある。その中で細胞死に関してはNMDA受容体を介するグルタミン誘発性神経細胞死がハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病、てんかんで誘発されているとの報告が注目されている。さらにNOが核内に入りポリADPリボシル転移酵素の自己ADPリボシルを促進し活性化することでDNAの断片化すなわちアポトーシスへの関与も示唆されている。その一方で小脳ではNOは神経保護の報告²⁾³⁾がなされている。この相反する2面性は細胞種の違い、NOはラジカルとイオンの2つの状態を遷移することによるものだという考え方が一般的である。神経情報伝達に関する報告では主に痛みに関するものである。また脊髄でもMeller⁴⁾らが後角及び中心管にNO産生酵素が存在することを報告し脊髄にも脳内での痛みの制御と同様の機序が存在すると言われている。一方末梢組織では低濃度では末梢血管透過性の充進による炎症増悪作用と高濃度での侵害受容器への直接的抑制作用により痛みは軽減するとされている。ま

た浅原⁵⁾らは腰椎疾患でNOが上昇していることを報告している。現在主には血管内皮細胞にc-NOS, マクロファージにはi-NOS, 神経細胞にn-NOSの3種類の酵素が同定され、これらによりNOは産生されていると考えられている。今回の我々の頸椎における検討では圧迫がその病の病態の基本であり血行障害、直接の神経細胞障害、軸索に対する障害が考えられる。実際頸椎の圧迫椎間数の多い頸椎後縦靭帯骨化症で最も髄液中NOが高かった。さらに中枢神経である頸髄疾患においてはNO濃度とJOA scoreの逆相関が認められ、NO濃度は神経障害性の良い指標となる可能性が示唆された。

F. 結語

頸椎では臨床症状の障害の程度と髄液NOの上昇との間に逆相関がみとめられ圧迫が広範囲に及んでいる後縦靭帯骨化症では髄液中NO濃度が高かった。

[参考文献]

- 1) Furchgott, R. F. et al. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrate. Raven Press, New York, 1988, 401-414.
- 2) Dawson, V. L. et al. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6368-6371, 1991.
- 3) Kiedrowski, L. et al. Sodium nitroprusside inhibits N-methyl-D-aspartate-evoked calcium influx via a nitric oxide and cGMP-independent mechanism. Mol. Pharmacol. 41: 779-784, 1992.
- 4) Meller, S. T. et al. The role of nitric oxide in spinal nociceptive processing. In "Nitric Oxide -Roles in Neuronal Communication and Neurotoxicity" (Takagi, H., Toda, N. and Hawkins, R. D., eds), Japan scientific Society Press, Tokyo, and CRC Press, Boca Raton, 1994, 115-125.
- 5) Asahara, H. et al. Increased cerebrospinal fluid Nitrate and Nitrate levels in patients with lumbar spondylosis. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology. Vol.91, NO.1 January 1996, 77-83.

VI

OPLL患者のQOLと脊髄症機能評価

健康関連QOL測定による頸髄症患者の術後評価

前澤 靖久 (福井医科大学医学部整形外科), 内田 研造 (福井医科大学医学部整形外科),
古澤 修章 (福井医科大学医学部整形外科), 小久保安朗 (福井医科大学医学部整形外科),
久保田 力 (福井医科大学医学部整形外科), 吉澤今日子 (福井医科大学医学部整形外科),
馬場 久敏 (福井医科大学医学部整形外科)

KEYWORD=頸髄症, QOL, SF-36

【研究要旨】

【目的】主観的健康度を数量化した指標である健康関連QOLを用い、手術を受けた頸椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) 患者と頸椎症性脊髄症 (CSM) 患者の健康に関するQOLを評価した。

【対象と方法】1991年1月以降当科において手術を行い術後2年以上経過した頸髄症138例に対し、郵送調査法による自己記入式質問誌として日本語版SF-36 (V.1.20) とJOAスコアの各項目による調査をおこなった。所在不明10名、死亡4例であり、100名を検討対象とした (回収率80.6%)。対象は、男67例、女33例で、調査時平均年齢は64.3 ± 12.7歳 (42~90歳) であった。疾患の内訳は、OPLL 28例、SCM 72例であり、調査時平均JOAスコアは12.8 ± 3.2 (6~17) であった。また、平均経過観察期間は56.3 ± 22.9カ月 (24~107カ月) であった。原疾患(OPLL, CSM) による各サブ・スケールに与える影響と調査時JOAスコアが健康関連QOLに与える影響について検討した。【結果】OPLL群とCSM群では、全サブ・スケールにわたって有意差は認められなかった。JOAスコアは、歩行能力などの身体的機能 (PF)、精神的健康 (MH) の各サブ・スケールにおいて有意な寄与因子であった。患者背景因子では、年齢が、各サブ・スケールに対する有意な寄与因子であった。

【総括】OPLL患者も含めた頸髄症患者の臨床評価法としてQOL評価を取り入れるべきであり、日本語版SF-36は簡便で有用な方法であると考えられた。今後OPLL患者のQOL評価は、多施設の多くの症例から詳細に解析されるものと期待される。

A. 研究目的

頸髄症の手術成績は、日整会頸髄症治療判定基準 (JOAスコア) により論じられてきた。しかし、JOAスコアでは、個人が主観的に認識する健康度や日常生活への影響に関する評価が困難である。今回、主観的健康度を数量化した指標である健康関連QOLを用い、手術を受けた頸髄症患者の健康に関するQOLを評価し、JOAスコアとの関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1991年1月以降当科において手術を行い術後2年以上経過した頸髄症138例に対し、郵送調査法による自己記入式質問誌として日本語版SF-36 (V.1.20) とJOAスコアの各項目による調査をおこなった。所在不明10名、死亡4例であり、100名を検討対象とした (回収率80.6%)。対象は、男67例、女33例で、調査時平均年齢は66.7 ± 9.8歳 (41~90歳) で

あった。疾患の内訳は、頸椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) 28例、頸椎症性脊髄症 (SCM) 72例であり、調査時平均JOAスコアは10.2 ± 4.8 (5~15) であった。また、平均経過観察期間は58.1 ± 23.1カ月 (24~107カ月) であった。

SF36は、身体的機能 (Physical functioning: PF)、身体的役割 (Role-Physical: RP)、身体の痛み (Bodily Pain: BP)、一般的健康 (General Health: GH)、活力 (Vitality: VT)、社会生活機能 (Social Functioning: SF)、情緒的役割 (Role-Emotional: RE)、精神的健康 (Mental Health: MH) 8つのサブ・スケールからなり、各サブ・スケールを100点満点に転化しMAP-R (Multitrait/Multi item Analysis Program) を用い、SAS for Windows (ver. 6.12) により統計処理をおこなった。

【検討項目】

以下の項目について解析検討した。①頸髄症術後

患者におけるSF-36における欠損率，信頼性および妥当性，②調査時JOAスコアと健康関連QOLの各サブスケールの相関，③原疾患（OPLL，CSM）による各サブ・スケールに与える影響について検討した。

C. 研究結果

1. 欠損値率

各サブ・スケールにおいて各々50%以上の未回答例をmissing dataとした時の欠損値率は7.5%であった。内的整合性信頼性は，Cronbach's α 値が各サブ・スケールにおいて0.79～0.95と十分な値を示した。集束性・弁別性妥当性は，Vitalityの弁別妥当性が78.1%と最低値であったがその他の各サブ・スケールにおいて良好であった。

2. JOAスコアと各サブスケールとの相関は，Mental Healthの相関係数が0.396と最低値であったがすべてが相関していた（表1）。Physical HealthとMental Healthの各サブスケールとJOAスコアとの関係を見ると前者ではJOA=7.38+0.085 Physical Functioning ($r^2=0.68$, $p<0.0001$)と有意な相関がみられ，後者ではJOA=7.55+0.08Vitality+0.07Social Functioning ($r^2=0.38$, $p<0.0001$)とvitalityとsocial functioningが相関していた。さらに，標準回帰係数では，JOA*=0.26Vitality*+0.44 Social Functioning*であり，Social functioningがよりJOAスコアに反映されていた。

3. 原疾患（OPLL，CSM）は，全サブ・スケールにわたって有意差は認められなかった（表2）。

D. 考察

健康関連QOLは，医療行為によりもたらされる成果を評価するための新しい指標であり，SF-36は本人の健康に由来した機能状態とこれに伴う日常生活・社会機能の変化を測定するように作成されている。欧米では，臨床評価にSF-36などの健康関連QOLの測定がなされ報告された論文数も年々増加してきている。日本語版SF-36は，福原ら¹⁾²⁾によりその信頼性と妥当性が確立され，整形外科外科領域においても応用が期待されている。

今回，頸髄症患者は重症度に従い身体機能と社会的活動の妨げられていることが明らかとなったが，これらは従来のJOAスコアでは表わすことのできなかった重要な点である。今後，臨床評価にQOL

評価を取り入れるべきであり，日本語版SF-36は簡便で有用な方法であると考えられた。今後，日本人の国民標準値と比較できれば，OPLLも含めた頸髄症患者のQOLがより明らかになるものと期待される。

E. 結語

SF-36により患者サイドから頸髄症術後の健康関連QOLを評価した。JOAスコアは，術後の頸髄症患者の身体機能と精神的健康に相関した。

〔参考文献〕

- 1) Fukuhara S, Bito S, Green J, Hsiao A, Kurokawa K: Translation, adaptation, and validation of the SF-36 Health Survey for use in Japan. *Journal of Clinical Epidemiology*. 1998; 51: 1045-1053.
- 2) 福原俊一: MOS Short Form 36 items Health Survey—新しい健康アウトカム指標, 厚生省の指標, 1999年4月20日.

	Correlation coefficient	Regression coefficient	
		constant	Independent variable
Physical functioning (PF)	0.825*	7.38(0.43)	0.085(0.006)
Role-Physical (RP)	0.494*	10.8(0.46)	0.037(0.007)
Bodily Pain (BP)	0.559*	8.85(0.65)	0.064(0.010)
General Health (GH)	0.507*	9.00(0.73)	0.081(0.015)
Vitality (VT)	0.513*	9.08(0.71)	0.068(0.012)
Social Functioning (SF)	0.596*	7.92(0.69)	0.067(0.009)
Role-Emotional (RE)	0.493*	10.9(0.45)	0.034(0.006)
Mental Health (MH)	0.396*	9.15(0.92)	0.058(0.014)

*p < 0.001

表1 JOA SCOREとSF-36の相関

	CSM	OPLL
Physical functioning (PF)	60.6 ± 32.7	65.0 ± 28.8
Role-Physical (RP)	44.2 ± 43.7	62.5 ± 43.2
Bodily Pain (BP)	58.9 ± 27.7	57.8 ± 30.0
General Health (GH)	43.2 ± 20.7	47.5 ± 23.1
Vitality (VT)	49.3 ± 25.6	59.8 ± 21.3
Social Functioning (SF)	64.1 ± 30.5	75.5 ± 27.7
Role-Emotional (RE)	45.6 ± 47.0	66.7 ± 42.2
Mental Health (MH)	57.2 ± 22.2	66.2 ± 22.6
JOA score	12.3 ± 3.5	12.4 ± 3.2

ns

表2 疾患別の各サブスケール