

後縦靭帯骨化症患者の血清プロテオミクスからは、患者群での比較分析を行ったところ、患者群で減少したタンパク質と増加したタンパク質が検出できた（図-1, 2）。

D. 考察

後縦靭帯骨化症の特異的タンパク質を発見したが、統計学的に検証が可能な検体数が必要であり、解析症例を増やす必要がある。さらに、患者の個人差等の遺伝学的検証を行う必要がある。

E. 結論

後縦靭帯骨化症患者の血清には、特異的なタンパク質があることが判明したので、これを解析することにより、バイオマーカーや創薬への発展が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

データ開示不可能

2. 学会発表

データ開示不可能

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得申請準備中

後縦靭帯骨化症に関する詳しい特異的タンパク質の特許出願準備中

2. 実用新案登録

3. その他

参考文献

1. Radhakrishna S. Tirumalai, King C. Chan, DaRue A. Prieto, Haleem J. Issaq, Thomas P. Conrads, and Timothy D. Veenstra. Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* 2: 1096-1103, 2003.

三次元有限要素法による脊髄の生体力学的検討

分担研究者 田口敏彦、加藤圭彦 山口大学整形外科

研究要旨

頸椎後縦靭帯骨化症（OPLL）や頸椎症性脊髄症に代表される圧迫性頸部脊髄症の病態解明を目的とした三次元 FEM 脊髄モデルを作成した。三次元脊髄モデルに、前方より準静的および動的圧迫を加え、脊髄内応力分布解析を行った。準静的圧迫より動的圧迫に、非圧迫レベルより圧迫レベルに、白質より灰白質に高い応力を認めた。三次元モデルの応力分布と二次元モデルを使用して行った解析結果と比較し、同様の傾向を確認した。したがって、今回作成した三次元モデルは、応力解析に有用な妥当なモデルと判断した。

A. 研究目的

圧迫性脊髄症の原因として、静的あるいは動的因子によって生じる脊髄内の応力が重要であると推察される。しかし、現在まで、脊髄の力学特性を考慮した脊髄内の応力解析の報告は少なく、特に三次元解析による報告はみられていない。今回、脊髄内の応力解析を目的とした三次元有限要素法脊髄モデルおよび解析プログラムを作成し、準静的、動的圧迫下での脊髄内応力分布解析を行った。

B. 研究方法

脊髄横断面を二次元平面でメッシュ分割し、各節点の座標をコンピュータ入力し、二次元モデルを作成した。二次元モデルを6層重ね合わせることで、三次元脊髄モデルを作成した。構成要素は灰白質、白質および軟膜とした。総節点数は3643、総要素数は780であった。解析プログラムは、本解析用に作成した非線形粘弾性三次元要素法プログラムを使用した。脊髄後方は平板上因子によって後方から支持した。前方から平板上の圧迫因子により圧迫を加えた。

圧迫は第1～3層と第5、6層とし、第4層は非圧迫層とした。圧迫の程度は脊髄前後径の20%とし、圧迫速度は準静的圧迫では0mm/sec、動的圧迫では2mm/secとした。解析には相当応力を用いた。

（倫理面での配慮）

今回の研究は、コンピュータ・シミュレーションであり、倫理面での問題はないと考えている。

C. 研究結果

準静的圧迫では応力の上昇は非圧迫レベル、圧迫レベルともに、非常に軽度であった。同一面上では、白質に比較して灰白質に高い応力を認めた。動的圧迫では準静的圧迫に比較して、高い応力を認めた。圧迫レベルは非圧迫レベルと比較して全体的に応力が高かった。準静的圧迫と同様に、白質部分と比較して灰白質部分に高い応力を認めた。

D. 考察

圧迫性脊髄障害の原因としては、静的圧迫因子と動的因子によって生じる脊髄内の応力によるものと推察される。しかしなが

ら、圧迫により生じる脊髄内の応力分布については未だ不明な点が多く、詳細な報告はみられていない。今回、三次元脊髄モデルの作成し、準静的圧迫と動的圧迫を加え、応力解析を行った。準静的圧迫では応力の上昇は非常に軽度であった。同一面上では、白質に比較して灰白質に高い応力を認めた。動的圧迫では準静的圧迫に比較して、圧迫レベルは非圧迫レベルと比較して全体的に応力が高かった。今回の解析結果と過去にわれわれが行った二次元解析の結果を比較した。その結果、応力値に若干の相違があるものの、応力分布形式や変形形態も類似してした。従ってわれわれが作成した三次元有限要素法プログラムおよび脊髄モデルは妥当なものとして判断し、応力解析に有用なものと考えた。

E. 結論

頸部脊髄症の病態解明を目的とした三次元 FEM 脊髄モデルを作成し、準静的、動的圧迫下での脊髄内応力分布解析を行った。準静的圧迫より動的圧迫に、非圧迫レベルより圧迫レベルに、白質より灰白質に高い応力を認めた。二次元モデルと比較して同様の傾向を確認し、妥当なモデルと判断した。

F. 研究発表

1.論文発表

1) 加藤圭彦、今城靖明、田口敏彦：三次元有限要素法による脊髄の生体力学的検討。日本臨床バイオメカニクス学会誌 27;127-130, 2006

2.学会発表

1) 三次元有限要素法による脊髄の生体力

学的検討. 加藤圭彦、今城靖明、田口敏彦.
第 32 回日本臨床バイオメカニクス学会
2005 年 10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1.特許取得

本研究においてはなし

2.実用新案登録

本研究においてはなし

3.その他

本研究においてはなし

圧迫ならびに虚血負荷によるラット脊髄神経回路網機能障害に関する
膜電位イメージング解析

分担研究者 戸山 芳昭 慶應義塾大学大学整形外科教授

研究協力者 福田健太郎, 中村雅也, 松本守雄, 千葉一裕, 慶應義塾大学整形外科

研究要旨 OPLL などによる脊髄圧迫による機能障害は、脊髄そのものの機械的圧迫によるものと、局所血流障害などによる二次的なものによるものとが考えられる。そこでラット脊髄摘出灌流標本を用いて、脊髄の圧迫負荷と虚血負荷に対する脊髄神経回路網障害について光計測法を用いた膜電位イメージングにより検討した。圧迫負荷によりその直下の灰白質内でシナプスレベルでの伝達障害がまず観察された。圧迫負荷解除により髄内興奮は経時的に回復した。虚血負荷によってもまずシナプスレベルでの伝達障害が生じ、この時点での障害は可逆的であった。しかし長時間の虚血では組織傷害を伴った不可逆的な障害を生じ、これらの障害は脊髄深層部でより顕著であった。本研究の結果より、脊髄組織破壊を伴わない機械的圧迫による障害は本質的には可逆的であり、循環障害が軽度でかつ組織破壊を伴わない脊髄圧迫臨床例において、脊髄機能の回復には早期の除圧が重要であると示唆された。

A. 研究目的

OPLL などによる脊髄圧迫による機能障害は、脊髄そのものの機械的圧迫によるものと、局所血流障害などによる二次的なものによるものとが考えられる。これら髄内神経活動の障害は脊髄病態生理学上の重要な問題であるが、その発生メカニズムはニューロンネットワークレベルではほとんど解明されていない。脊髄内の神経活動は、多数の神経細胞間の複雑な相互作用により形成されるため、その病態をニューロンネットワークレベルで解明するためには髄内神経活動の多点同時解析が必要である¹⁾²⁾。そこで本研究では膜電位感受性色素を用いた光計測法によって、ラット脊髄における圧迫および虚血負荷の影響についてのイメージング解析を行った。

B. 研究方法

脊髄スライス標本の作製

幼若 Wistar 系ラット (5-7 日齢) を使用した。エーテル深麻酔下にラット頸髄を速やかに摘出し、酸素化人工脳脊髄液 (以下 CSF) 内で後根および前根をつけたままの脊髄横断スライス標本 (C4-6 レベル各 1 髄節厚) を作製した。スライス標本を膜電位感受性色素 (di-4-ANEPPS) を含んだ酸素化人工 CSF に浸して染色した。スライス標本を記録用チャンパー内に固定し、26 °C 人工 CSF (11mM glucose 含有) を用いて灌流・維持した。人工 CSF は 95% O₂、5% CO₂ 混合ガスで通気した。

電氣的刺激および光学的計測

ガラス吸引電極から矩形波電流 (1.2 mA, 80 μ s) で脊髄後根あるいは前根を刺激し、脊髄後角あるいは前角内の神経興奮を惹起

させた。電気刺激による神経興奮は高速高感度光計測システム (BrainVision 社製 MiCAM01) によって計測した。記録用チャンバーを蛍光顕微鏡 (Nikon 社製 Optiphot-2-UD) のステージ上に設置した。タンガステン-ハロゲン光源から励起フィルター ($\lambda = 535 \pm 10$ nm) を通した緑色励起光で脊髄スライス標本の断面を照射した。関心領域からの赤色蛍光を、フィルター ($\lambda > 610$ nm) を通して MiCAM01 の CCD カメラ (60×90 ピクセル) で記録し、各ピクセルでの初期蛍光輝度 (F_0) に比した蛍光輝度変化 (ΔF) を 2msec 毎に記録した。記録は 10 秒間隔で 10 回行い、記録信号の平均加算を行った。スライス内での色素量や蛍光量を標準化するため、各ピクセル各フレームでの背景の蛍光輝度 (F) に対する ΔF の率、すなわち蛍光輝度の微小な変化 ($\Delta F/F$) を用いた。なお、陰性の $\Delta F/F$ は膜電位の変化に相当した。

実験プロトコール

圧迫負荷は、脊髄スライス標本を前後径の 25%、5 分間、絶縁した圧迫棒で圧迫することで行った。後根刺激による後角内神経活動を圧迫直下で負荷前、中、圧迫解除 2 分、30 分後に計測した。同様に圧迫負荷による前角内神経活動への影響を同様のプロトコールで計測した。

虚血負荷は、虚血負荷は酸素およびグルコースをともに除した人工 CSF で灌流することにより行った。標本に虚血負荷を 40 分間行い、後根刺激による後角内神経活動を負荷前、負荷開始後 10 分、20 分、40 分後に計測した。次いで負荷解除後の回復過程を、標準人工 CSF 灌流へ切り替え後 10 分、30 分後に計測した。同様に虚血負荷による

前角内神経活動への影響を同様のプロトコールで計測した。

組織学的検討

組織学的検討のため、圧迫および虚血負荷後のスライス標本を作製し、4% パラホルムアルデヒド液で固定し、4 μ m 厚の矢状断とした後、ヘマトキシリンエオジンで染色した。アポトーシスの存在を TUNEL 免疫ペルオキシダーゼ染色により検討した。スライス標本の横断面から 50-300 μ m の深さでの後角および前角領域の組織像を撮影した。退縮や空胞変性のない健常な細胞の密度を後角および前角内の観察領域 (0.04 mm^2) における細胞数で測定した。

統計学的検討

統計学的検定には post-hoc multiple comparison test による one-way ANOVA を用いたが、対応する 2 群の比較には、paired *t*-test を用いた。データは平均±標準誤差で表記し、 $P < 0.05$ で統計学的有意差ありとした。

(倫理面での配慮)

本研究における一連の実験は、慶應義塾大学・動物実験委員会の承認を受けたうえで、日本生理学会の実験動物取り扱い規約に準拠して行ない、実験動物の使用数や動物に与える苦痛は最小限となるように努めた。

C. 研究結果

コントロール状態における後根刺激による脊髄内神経興奮 (図 1)

脊髄後根の電気刺激により後角内に脱分極性の興奮が伝播したが、これは刺激後急峻に立ち上がり持続の短い (<8-10 msec) シナプス前性興奮すなわち fast component

(FC) と、その後の数百 msec にわたって続く持続の長い (>800 msec) シナプス後性興奮すなわち slow component (SC) とから形成されていた²⁾³⁾。白質の領域では FC のみが観察された。

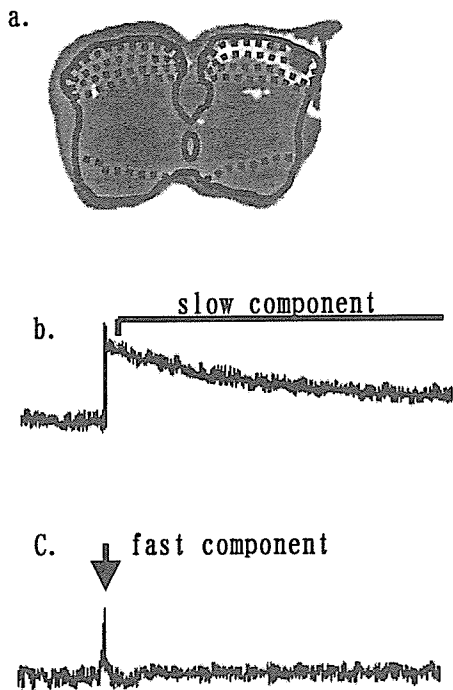


図 1. 後根刺激後髄内神経活動の例

- a. 後根刺激後 60msec 時での膜電位イメージング画像。
- b. 後角内後根入口部近傍での脱分極性興奮。
- c. 白質内での脱分極性興奮。

圧迫負荷による後角内神経活動への影響 (図 2)

脊髄後方からの圧迫により、その直下後角内の脱分極性興奮は減弱した。圧迫解除により脊髄形態の回復に先立って神経興奮は回復した。FC に比べると SC はより顕著に減弱した ($P < 0.05$)。

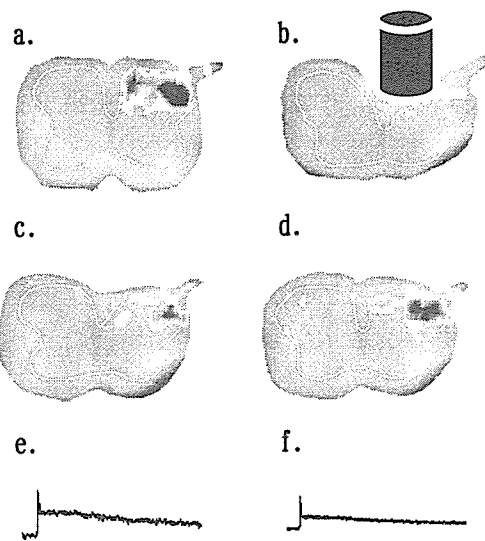


図 2. 圧迫負荷による後角内神経活動への影響

- a. b. c. および d. はそれぞれ、圧迫前、圧迫中、圧迫解除 2 分後および圧迫解除 30 分後の膜電位イメージング画像。
 - e. および f. は、圧迫前および圧迫中の後根刺激による後角内脱分極性興奮
- #### 圧迫負荷による前角内神経活動への影響

脊髄前根を逆行性に刺激すると脱分極性の反応が前角および lamina IX 前方の白質部にみられた。前根刺激による前角内の興奮は短く、持続が 6msec 以内の大きな興奮と、それに続く持続 30msec 以内の小さな脱分極を認めた。脊髄前方からの圧迫により、その直下、前角内での興奮は減弱したが、やはり圧迫の解除により速やかに回復した。圧迫による FC の優位な変化はみられなかった。

虚血負荷による後角内神経活動への影響 (図 3 および 4)

虚血負荷により SC は FC に比べて有意に抑制された ($P < 0.0002$)。後角内深層 (lamina III-IV) では浅層 (lamina I-II) に比べて早期にシナプス後性興奮が抑制された。一

方、神経線維は虚血に対して耐性を示し、特に後根入口部付近は虚血負荷前の $80 \pm 9\%$ への低下にとどまった。後角内においては FC が十分に残存していれば、たとえ SC が低下していてもその抑制は可逆的であった。FC の抑制が虚血負荷前の 20% 以下の群と 20% 以上抑制された群とでは虚血解除後の SC の大きさに有意差を認めた ($P < 0.05$)。長時間の虚血負荷により SC はほぼ消失し、FC も虚血負荷前の $59 \pm 8\%$ まで低下した。

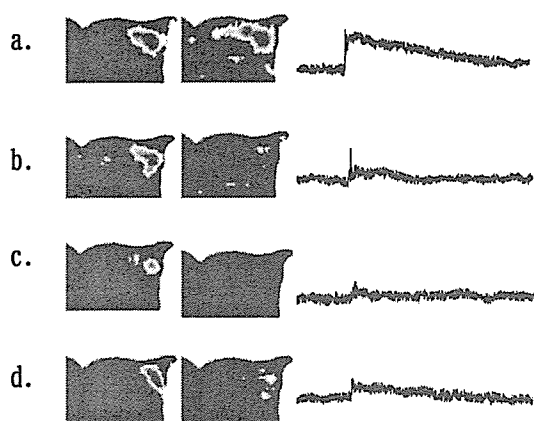


図 3. 虚血負荷による後角内神経活動への影響 (非回復例)

- a. 虚血負荷前
- b. 虚血負荷 20 分後
- c. 虚血負荷 40 分後
- d. 虚血解除 30 分後

各段左および中列は、後根刺激 2msec 後および 60msec 後の膜電位イメージング(一部)。右列は後角内での脱分極性興奮。

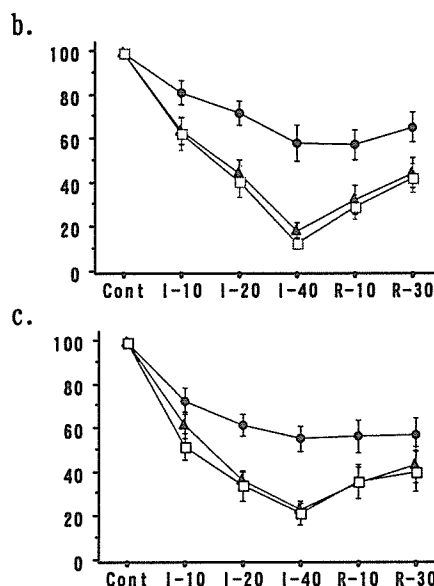
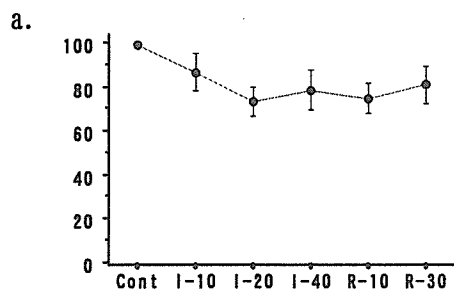


図 4. 虚血負荷による後角内神経活動の相対的变化

- a. 白質内神経活動変化
- b. 後角内浅層での神経活動変化
- c. 後角内深層での神経活動変化

Cont: 虚血負荷前, I-10, 20, 40: 虚血負荷開始 10, 20, 40 分後, R-10, 30: 虚血解除 10, 30 分後

● : fast component

□, ▲: slow component

虚血負荷による前角内神経活動への影響

虚血負荷を行うと、開始後 20 分までは神経活動に明らかな減弱はみられなかったが、負荷開始後 40 分では前角浅層、深層、および白質での神経興奮が、それぞれ負荷前の $58 \pm 6\%$ 、 $63 \pm 7\%$ および $70 \pm 8\%$ にまで急激に減弱した。虚血負荷解除後の神経活動の回復は乏しかった。前角内浅層部と深層部とでは虚血負荷による神経活動への影響に明らかな相違はみられなかった。

組織学的検討

圧迫負荷群では脊髄の形態は見られるものの細胞構造は正常であった。圧迫解除後

には脊髄の形態も回復した。組織学的に細胞死は認められなかった。一方、長時間の虚血負荷群では組織学的に差異を認め、細胞の退縮や空胞変性などの形態的損傷がみられた。後角内での細胞傷害は lamina I-II よりも lamina III-IV で顕著であった ($P < 0.0001$)。前角内では運動ニューロンの多くに細胞体の萎縮性の変性がみられたのに対し白質では虚血負荷後でも明らかな形態的变化はみられなかった。また TUNEL 免疫染色にはコントロール群、虚血負荷群ともに陰性であった。

D. 考察

今回の研究結果から、圧迫および虚血負荷による後角内における神経機能の障害は、まずシナプス伝達系の阻害により始まり、またこの段階では機能障害は可逆的であることが示唆された。さらに前角内では長時間の虚血負荷により、ある時点で急激に運動ニューロンの形態的变化を伴った不可逆的な機能障害が発生した。従来の報告のほとんどは体性感覚誘発電位など脊髄入出力関係のみの解析によるものであるが、本報告は圧迫および虚血負荷の影響を脊髄内部のニューロンネットワークレベルで時間的・空間的な障害パターンを解析しえた初めての報告である。

本研究では *in vitro* 標本を使用した。が、*in vitro* 標本は *in vivo* 標本と比較して酸素やグルコースあるいは温度などの虚血に対する感受性に影響を及ぼしうるいくつかの生理学的な変化をそれぞれ独立して制御できるという利点を有する。しかしながら *in vitro* での結果から *in vivo* での状況を推定するには注意が必要である。たとえば

本研究の脊髄スライス標本では酸素供給の制限を補うため比較的低温で実験を行った²⁾⁴⁾。温度の低下は虚血負荷に対して神経組織の庇護効果を示すことになる⁵⁾。将来新しい実験手技が開発され *in vivo* でも脊髄内のニューロンネットワークレベルでの機能解析が直接的に可能となり、本研究の結果が追認されることを期待したい。

本研究では幼若動物を使用した。が、成熟動物とは圧迫や虚血に対する反応の感受性やメカニズムも異なる可能性があり、さらなる研究により発達による圧迫や虚血への脊髄内ニューロンネットワーク機能の反応の違いを検討していく必要がある。

長時間の虚血負荷による後角および前角内の不可逆的な細胞障害は、ATP の枯渇、ナトリウムポンプおよびカルシウムポンプの機能障害、グルタミン酸放出、カルシウム流入を介して最終的に細胞死へと導かれるものと考えている。さらにわれわれの組織学的検討は長期間の虚血負荷により細胞の重度の形態学的障害が特に lamina III-IV および IX において引き起こされることを示した。本研究では虚血負荷後の細胞で TUNEL 免疫染色が陰性であったので、本研究で観察された細胞死は主としてネクロシス（例えば細胞内カルシウムオーバーロードにより引き起こされる）によるものであると考えられ、この所見は過去の *in vivo* 実験⁶⁾に矛盾しない。本研究で虚血負荷したスライス標本ではアポトーシスがみられなかった理由の一つとして、スライス標本の虚血負荷後の生存時間がアポトーシスを検出するには十分でなかった可能性は否定しきれない⁶⁾⁷⁾。

脊髄では神経線維は重要な役割を担っており、虚血負荷により障害を受ける⁸⁾。しかし、SCではなく、FCの方がストレス負荷に対して比較的抵抗性を持つという本研究の観察結果は、後角内において神経線維は細胞体やシナプスほど脆弱ではないことを示している。この考察は長期間の虚血負荷の後でも白質は灰白質に比べて損傷されにくいという本研究の組織学的検討によって支持された。

参考文献

- 1) Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, et al.: Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. Clin Neuropharmacol 24: 254-264, 2001
- 2) Yoshida H, Okada Y, Maruiwa H, et al.: Synaptic blockade plays a major role in the neural disturbance of experimental spinal cord compression. J Neurotrauma 20: 1365-1376, 2003.
- 3) Arai Y, Momose-Sato Y, Sato K, et al.: Optical mapping of neural network activity in chick spinal cord at an intermediate stage of embryonic development. J Neurophysiol 81: 1889-1902, 1999.
- 4) Okada Y, Mückenhoff K, Holtermann G, et al.: Depth profiles of pH and P_O₂ in the isolated brain stem-spinal cord of the neonatal rat. Respir Physiol 93: 315-326, 1993.
- 5) Marsala M, Vanicky I, Galik J, et al.: Panmyelic epidural cooling protects against ischemic spinal cord damage. J Surg Res 55:21-31, 1993.

6) Kato H, Kanellopoulos GK, Matsuo S, et al.: Neuronal apoptosis and necrosis following spinal cord ischemia in the rat. Exp Neurol 148: 464-474, 1997.

7) Matsushita K, Wu Y, Qiu J, et al.: Fas receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia. J Neurosci 20: 6879-6887, 2000.

8) Stys PK: Anoxic and ischemic injury of myelinated axons in CNS white matter: From mechanistic concepts to therapeutics. J Cereb Blood Flow Metab 18: 2-25, 1998.

E. 結論

本研究においては、膜電位イメージング解析によって脊髄内のニューロンネットワーク活動を直接的に観察し、圧迫および虚血負荷による脊髄障害の過程をニューロンネットワークレベルで解析することに初めて成功した。後角内のシナプス伝達は特に深層部においてストレス負荷により早期に抑制された。高度の虚血負荷は神経細胞の不可逆的な機能障害を引き起こすとともに、後角および前角内での細胞死を引き起こした。神経線維はこれらのストレス負荷に対して比較的抵抗性を持っていた。これらのストレス負荷によるシナプス伝達障害の精細なメカニズム解明には更なる研究が必要であるが、本研究の成果は、OPLLをはじめとする様々な病態における圧迫および虚血性脊髄機能障害の病態生理学的メカニズムを解明するための基礎的知見を提供するものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ischemia-induced disturbance of neuronal network function in the rat spinal cord analyzed by voltage-imaging
Fukuda K, Okada Y, Yoshida H, Aoyama R, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y
Neuroscience 140: 1453-1465, 2006

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

頸髄固有ニューロンの機能検査法の確立

—腕の運動にかかわる脊髄固有ニューロンの左右差について—

分担研究者 里見 和彦 杏林大学整形外科教授
共同研究者 市村 正一、佐野 秀仁（杏林大学整形外科学教室）
大木 紫（杏林大学統合生理学教室）

研究要旨 我々は、いままでに脊髄固有ニューロンの機能検査法の確立を試み、右利き被験者で左右差がみられることを報告した。今回はさらに症例数を増やして検討した。右利き 11 人と左利き 3 人の正常被験者の右または左上腕二頭筋から表面筋電図を記録し、随意収縮中に反対側運動野の磁気刺激と同側尺骨神経の電気刺激の組み合わせ刺激を行った。磁気刺激は上腕二頭筋の運動誘発電位が 100-300 μ V になる強度、電気刺激は第一背側骨間筋で見た運動閾値の 110% 以下の強度で系統的に変化させた。両入力と同時に脊髄固有ニューロンに収束するよう、尺骨神経刺激を 8.0-15.0ms 先行させた。全被験者で左右とも、組み合わせ刺激で空間的促通効果が観察される条件が存在した。右利きの被験者では右側で促通効果が強い傾向が見られたが、左利きの被験者では左右差は特異的ではなかった。この結果は、左右の脊髄内運動経路の伝達効率が、手の使用頻度により変化する可能性を示した。

A. 研究目的

C3-C4 脊髄固有ニューロン (propriospinal neuron、以下 PN) は、ネコで最初に報告された第 3 から第 4 頸髄に存在する一群の介在ニューロンである。このニューロンは脳皮質から運動器官へ至る下行性経路を中継しており、脳皮質運動野から運動ニューロン髄節に直接投射する直接経路とともに、間接的な corticomotoneuronal pathway を形成している。

一方、これまで整形外科分野での圧迫性脊髄病変の病勢評価は、錐体路を中心とした索路障害の効果にのみ注目が集まっていた。しかし前述の動物実験の知見をみると、ヒトにおいても PN を介した間接経路が機能的に重要な役割を果たす可能性が考えられる。そこで我々はこの PN の役割に注目し

た新しい脊髄機能評価法の考案を計画し、今回利き手による間接経路の左右差について解析したので報告する。

B. 研究方法

Informed consent を得た年齢 23~45 歳の右利き 11 人と、左利き 3 人の正常被験者を用いた。方法は Pierrot-Deseilligny らが開発した方法 (Pauvert et al., 1998) を発展させた。これは PN に錐体路からの下行性入力と末梢からの感覚入力に収束していることを利用し、空間的促通を観察するものである。

記録と刺激方法：被験者には最大収縮時の 10% 程度の持続的随意収縮を上腕二頭筋に行わせ、右または左上腕二頭筋から表面筋電図を記録し、随意収縮中に反対側運動野の磁気刺激 (MagStim 200 と 8 の字コイル)

と同側尺骨神経の電気刺激（手関節位置に神経の走行に沿って貼った2枚の表面電極により刺激を行った）の組み合わせ刺激を行った。磁気刺激は上腕二頭筋の運動誘発電位が100-300 μ Vになる強度、電気刺激は第一背側骨間筋で見た運動閾値の110%以下の強度で系統的に変化させた。両入力と同時に脊髄固有ニューロンに収束するよう、神経刺激を8.0-15.0ms先行させた。

（倫理面での配慮）

被験者には、検査の目的、起こりうる合併症の説明を行い、同意を得た。

C. 研究結果

利き腕側では、ControlのMEP振幅を約60 μ Vになるよう刺激強度を調節し、そこに運動閾値の100%の尺骨神経刺激を組み合わせると、神経刺激から約20msのところより興奮性反射効果が観察された。非利き腕側でも、組み合わせ刺激による空間的促通効果が観察されたが、磁気刺激と神経刺激の強度を系統的に変化させて調べても、得られた促通効果は利き腕側より弱い結果であった。

14人全被験者の結果をまとめると、どの被験者でも利き腕側、非利き腕側とも組み合わせ刺激により空間的促通効果が観察される条件が存在した。右利き正常被験者では利き腕側で促通効果が強い傾向であったが、左利きの被験者では左右差は特異的ではなかった。

D. 考察

脊髄固有ニューロン(PN)は、ネコで最初に報告された一群の脊髄介在ニューロンで

あり、細胞体はC3-4の灰白質に存在し、軸索は直接前肢運動ニューロンにシナプス結合する。このニューロンは大脳皮質から運動器官へ至る下行性経路を中継しており、大脳皮質運動野から運動ニューロン髄節に直接投射する直接経路とともに、間接的なcorticomotoneuronal pathwayを形成している。近年、サルやヒトにもこのニューロンを介した経路が存在することが報告されてきている。

今回我々は、被験者の利き腕による促通効果の差を調べた結果、右利き被験者で促通効果に有意な左右差が観察された。

E. 結論

正常被験者における脊髄固有ニューロンの機能を、運動野と末梢神経の組み合わせ刺激による空間的促通効果で評価した。全被験者で利き手、非利き手側とも、組み合わせ刺激による促通効果が観察される条件が存在した。右利き正常被験者では右側で促通効果が強い傾向であったが、左利きの被験者では左右差は特異的ではなかった。

以上の結果は、左右の脊髄内運動経路の伝達効率が、手の使用頻度により変化する可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 里見和彦、市村正一：頸椎症性脊髄症診療ガイドラインの意義と問題点. 日整会誌 80: 724-731, 2006.
2. 佐野秀仁、小川 潤、里見和彦、大木紫：腕の運動にかかわる脊髄固有ニューロンの左右差について. 脊髄機能診断学 28: 53-61, 2006.

2. 学会発表

1. 小川 潤、他:ラットの C3-C4 脊髄固有ニューロン. 第 28 回脊髄機能診断研究会、東京、平成 18 年 2 月 4 日.
2. 佐野秀仁、他:腕の運動に係る脊髄固有ニューロンの左右差について. 第 28 回脊髄機能診断研究会、東京、平成 18 年 2 月 4 日.
3. 相川大介、他:ラットにおける経頭蓋的電気刺激・脊髄誘発電位の検討. 第 28 回脊髄機能診断研究会、東京、平成 18 年 2 月 4 日.
4. 滝 徳宗、他:マウスにおける系図以外電気刺激・筋誘発電位の基礎的研究. 第 28 回脊髄機能診断研究会、東京、平成 18 年 2 月 4 日.
5. 滝 徳宗、他:頸髄症患者における術前・術後の定量的上肢運動機能評価. 第 35 回日本脊椎脊髄病学会、東京、平成 18 年 4 月 21~22 日.
6. 太田道紀、他:脊髄誘発電位を用いた頸髄症の予後評価. 第 35 回日本脊椎脊髄病学会、東京、平成 18 年 4 月 21~22 日.
7. 長谷川雅一、他:高齢者頸部脊髄症の治療成績—壮年者との比較. 第 35 回日本脊椎脊髄病学会、東京、平成 18 年 4 月 21~22 日.
8. 市村正一、他:頸椎片開き式脊柱管拡大術後の項頸部痛に対する C7 棘突起温存の効果. 第 35 回日本脊椎脊髄病学会、東京、平成 18 年 4 月 21~22 日.
9. 五十嵐一峰、他:OPLL 患者の経髄介在ニューロン機能評価法の開発に

向けて(第 2 報).平成 18 年度脊柱靱帯骨化症に関する調査研究—第 2 回班会議、東京、平成 18 年 11 月 11 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

18FDG-PETによる頸椎後縦靭帯骨化症の脊髓グルコース代謝解析

福井大学医学部 器官制御医学講座 整形外科領域

内田 研造、馬場 久敏、中嶋 秀明、彌山 峰史、佐藤 竜一郎

研究要旨 高分解能 PET を用いて後縦靭帯骨化症の頸髄グルコース代謝の画像化と定量化を行い、頸髄症の重篤度、他の画像検査との比較検討をおこなった。頸髄グルコース代謝量は、頸髄症無し群に比べ、有意に、頸髄症中等度群において高値を、頸髄症高度群においては低値となっていた。脊柱管狭窄、最大脊髓横断面積にも頸髄症の重篤度の間にも相関がみられたが、動的因子は関与しなかった。今回 FDG-PET により求めた頸髄グルコース代謝量は脊髓実質の代謝量を反映するものであり、後縦靭帯骨化症においては、脊髓症発症の有無、手術適応、手術時期について大きな示唆を与えるものであると考えられた。

A, 研究目的

頸椎後縦靭帯骨化症において、脊髓症の発症のメカニズムは未だ不明な点が存在する。発育性脊柱管狭窄、静的因子以外にも動的因子の関与も重要と考えられる。Fluoro-deoxy glucose (FDG)-Positron emission tomography (PET) は、神経組織のグルコース代謝量、活性を定性 (可視化)、定量化することが可能な画像装置である。脊髓に対する PET 検査は、解像度の問題から物理学的に不可能と考えられてたが、1983 年に Di Chiro らが、解像度 7 mm の Neuro PET と 18FDG を使用し、延髄から第 3 頸髄までの頸髄グルコース代謝活性の定量化および画像表示を報告した。その後我々はこれまでに高分解能を有する positron emission tomography (PET) を用いて脊髓実質の組織代謝の側面から、圧迫性頸髄症においてその臨床意義について報告してきた 1)、2)。今回、後縦靭帯骨化症 (連続型、混合型) の頸髄のグルコース代謝を測定し、その頸髄症の重篤度、他の画像所見、臨床症状と比較検討した。

B, 研究方法

頸椎後縦靭帯骨化症症例において、FDG-PET 施行に同意を得た男性 11 例 (平均年齢 64.9 歳) を対象とした。骨化形態は、分節型をのぞく連続型 6 例、混合型 OPLL 6 例であり骨化範囲はいずれも 2 椎体以上に靭帯骨化を認めていた。11 例中 7 例は外科的手術を要した。臨床症状は Nurick score、日整会頸髄症治療成績判定基準 (JOA スコア) で評価した。単純 X-p および断層写真から、脊柱管狭窄の程度として、Narrowing ratio (%), pavlov ratio、動的因子の評価として Range of motion (°)、脊髓因子として MRI を用いた最大圧迫部脊髓横断面積 (%), 髄内輝度変化の有無を評価した。頸髄のグルコース摂取率の測定は吸収補正のために、Ga (ガリウム)-68 線源を用いた transmission scan を施行後、日本鋼管 (NKK) 製 12MeV 超小型サイクロトロンと自動合成装置を用いて作成した放射性グルコース (18F-FDG) を、10mCi (370MBq) 被検者に投与、投与後 0-60min までの 18F の放射濃度を、GE Advance PET scanner (空間分解能は 4.25 mm、断面内分解能、軸方向分解能は共に 4.2mm) で撮

像した。Hanning filter をもちいて、放射線画像を作成後、体重、投与量でグルコースの標準摂取量を補正、画像再構築を行った。経時的に採血を行った glucose 代謝率は、まず Sokoloff model を用いて brain cortex における反応速度定数と一括定数を適応して計算致した。画像解析装置 (Sun Sparc 20 Workstation) を用い、35 slice の横断像において横径 10.3 mm の関心領域 (ROI: range of interest) を設定、最大 count 数をもって各々の関心領域における metabolic tissue activity とした。頸髄循環 glucose 代謝量の簡易指標として、SUV [standardized uptake value = ROI (KBq/cc)/Injected Dose (MBq) x Body Weight (Kg) x 60 (kg/W)] を計算し、平均値として表示した。便宜上、頸髄症なし群 (I 群; Nurick grade0 かつ JOA17 点)、頸髄症中等度群 (II 群; Nurick grade1-2 かつ JOA12-16 点)、頸髄症重度群 (III

群; Nurick grade3-5 かつ JOA12 点以下) の 3 群に分け、それぞれの群間において、有意差検定 (one-way ANOVA, Fisher post hoc test) を行った。

C, 結果

頸髄症中等度群 (II 群; JOA スコア: 12-16) では、頸髄グルコース代謝量は 2.45mg/ml であり、頸髄症なし群 2.08mg/ml に比べ有意に高値を示していた。頸髄症重度群 (III 群; JOA スコア、12 以下) では平均グルコース代謝量は 1.61mg/ml であり、非手術群、中等度群に対して有意に低値を示していた。従来の画像診断との比較では、脊柱管狭窄 (Pavlov ratio)、最大脊髄横断面積 (T1、T2 強調画像共に) にも頸髄症の重篤度の間にも相関がみられたが、動的因子は関与いなかった。(Table1)

Table 1. Radiographic data of patients with cervical OPLL.

Category	I (n=4)	II (n=4)	III (n=3)	P value [one-way ANOVA, post-hoc test (Fisher test)]
Narrowing ratio (%)	42.3± 5.5	50.8± 13.0	54.4± 7.2	p=0.256, ^a n.s.(p=0.230), ^b n.s. (p=0.126), ^c n.s. (p=0.626)
Pavlov ratio	0.81±0.04	0.75± 0.05	0.69± 0.04	p=0.018, ^a n.s. (p=0.100), ^b p=0.006, ^c n.s. (p=0.083)
ROM (°)	38.9± 7.8	45.2± 10.8	53.0± 3.8	p=0.150, ^a n.s. (p=0.317), ^b n.s. (p=0.587), ^c n.s. (p=0.259)
Transverse area of the spinal cord at the site of maximal compression (mm ²)				
T1-weighted images	59.2± 5.9	51.9± 6.2	38.5± 11.9	p=0.027, ^a n.s.(p=0.230), ^b p=0.009, ^c n.s. (p=0.058)
T2-weighted images	58.7± 5.6	51.7± 6.5	42.2± 8.5	p=0.041, ^a n.s.(p=0.273), ^b p=0.015, ^c n.s. (p=0.078)
SUV (mg/ml)	2.08±0.05	2.45± 0.13	1.61± 0.04	p=0.0001, ^a p=0.003, ^b p=0.0001, ^c p=0.0001

Data are mean ± standard deviation

n.s.= not significant

^a Comparison between category I and category II, ^b Comparison between category I and category III,

^c Comparison between category II and category III

D, 考察

脳組織において、局所ブドウ糖利用率の測定

がなされてから、18F-2-fluoro- deoxyglucose (FDG)-PET により、多くの神経疾患において

従来の画像診断が猫出しえなかった機能異常を検出することが可能となった。神経組織においては、神経系の主要な機能は興奮伝導であり、そのエネルギー消費の大部分は神経細胞の膜電位を維持し、興奮伝導の後に、膜電位を回復するためのイオンの能動輸送に用いられていると考えられる。神経組織の活動エネルギーはほとんどグルコースの酸化代謝によってなされ、脳のグルコース代謝は解糖系とクエン酸回路を主道としている。従って局所の神経組織が活動した場合には、それはそのままグルコース代謝と酸素代謝の増大(血流量の増減)としてあらわれるものと考えられている。また、虚血性疾患などの血管障害と異なり、変性および退行性変性の場合には通常血流と代謝はマッチしていると考えられる。すなわち、グルコース代謝は神経組織の活動性をあらわす極めてよい指標になると考えられる。今回、18FDG-PET によって測定した圧迫状態にある脊髄の代謝量は、後縦靭帯骨化による脊髄症の有無を反映していた。一般に 18FDG-PET が測定しているグルコース代謝の低下は1)シナプスの機能低下、2)神経細胞の脱落、と考えられているが、圧迫部位を含めた脊髄組織にみられる病理学的変化と矛盾しない。しかし、今回、高分解能 PET を用いたとはいえ、小さな被写体(脊髄)と半値幅より生じる部分容積効果(partial volume effect)の影響もあると考えられるので、関心領域(ROI)の最大カウント数を求めたが、今後は実験モデルをもちいたリカバリー係数の補正も必要と考えられる。後縦靭帯骨化症では、従来の画像診断では、麻痺の可逆性の予測、手術効果、手術のタイミング、予後予測といった問題が未だ存在する。今回の検討では頸髄症中等度群では、頸髄グルコース代謝量は、非手術群に比べ有意に高値、

頸髄症重度群では非手術群に対して有意に低値を示していた。18FDG-PET による頸髄グルコース代謝量(SUV)は脊髄実質の代謝量を反映するものであり、後縦靭帯骨化症においては、神経症状の重篤度に関係し、手術時期、そしてその治療予後についても、大きな示唆を与えるものであると考えられた。

E, 結論

後縦靭帯骨化症に対して高分解能 PET を用い、頸髄グルコース代謝の画像化と定量化を行なった。FDG-PET による頸髄グルコース代謝量は脊髄実質の代謝量を反映するものであり、後縦靭帯骨化症においては、脊髄症発症の有無、手術適応、手術時期について大きな示唆を与えるものであると考えられた。

参考文献

- 1) Baba H, Uchida K, Sadato N et al. Positron usefulness of 18F-2-fluorodeoxy D-glucose-positron emission tomography in cervical compression myelopathy. Spine 24: 1449-1454, 1999
- 2) Uchida K, Kobayashi S, Yayama T et al. Metabolic neuroimaging of the cervical spinal cord in patients with compression myelopathy: a high-resolution positron emission tomography study. J Neurosurg (Spine)1: 72-79, 2004.

G, 研究発表

・論文発表

- (1) Baba H, Uchida K, Sadato N et al. Positron usefulness of 18F-2-fluorodeoxy D-glucose-positron emission tomography in cervical compression myelopathy.

Spine 24: 1449-1454, 1999.

- (2) Uchida K, Kobayashi S, Yayama T et al.
Metabolic neuroimaging of the cervical
spinal cord in patients with compression
myelopathy: a high-resolution positron
emission tomography study. J Neurosurg
(Spine1)1: 72-79, 2004.

Flexercell strain unit™を用いた機械的伸展ストレスに対する 初代培養脊髄神経細胞・グリア細胞の生存応答

福井大学医学部 器官制御医学講座 整形外科学領域
内田研造、中嶋秀明、犬飼智雄、高村敬晴、久保田力、
彌山峰史、佐藤竜一郎、馬場久敏

研究要旨 脊柱管内臓器としての脊髄は脊柱運動により常時力学的影響に曝されている。特に屈曲の際において、後縦靭帯骨化などの圧迫要素がある場合には、脊髄に加わる伸張力が強まり、脊髄内に緊張帯が生じると考えられる。今回、脊髄神経細胞、グリア細胞の mechanical stress に対する神経栄養因子発現を *in vitro* で観察した。細胞の機械的ストレスには FX-3000™-Flexercell Strain Unit を使用した。最大の細胞障害が生じる前の約 6 時間の時点で、GFAP 陽性細胞の BDNF および NT-3 両方の immuno-reactivity の増加が観察された。この変化より、反応性アストロサイトが、機械的ストレスに対する応答として、神経栄養因子を発現させていると考えられた。この変化は機械的ストレスに対して、特に反応性アストロサイトが神経栄養因子発現を増加させ、神経細胞の生存維持、機能修復に関与している可能性が *in vitro* で示唆された。

A, 研究目的

脊柱管内臓器としての脊髄は静的状態においても脳脊髄液、血液循環によりメカニカルな刺激を受け、脊柱運動により更に大きな力学的影響に曝されていると考えられる。即ち生理的には脊柱伸展、特に屈曲の際には脊髄に加わる伸張力により軸方向への移動および脊髄内に緊張帯が生じる。後縦靭帯骨化などの圧迫要素の存在があればこの動態現象は更に増強する (図 1)。

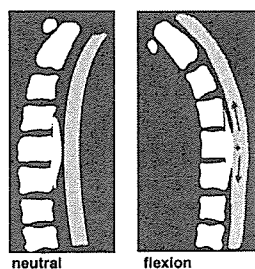


図 1. dynamic phenomenon

我々は慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy mice)を用い、形態学的、免疫組織化学的側面より、圧迫を受けた脊髄組織における生存維持、軸索再生および組織修復に関する基礎的実験を行い、圧迫刺激を受けた際に、神経細胞およびグリア細胞自身が神経栄養因子、特に Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) や NT-3 を強発現し、神経細胞、特に前角ニューロンの生存維持に関与していることを報告した³⁾。また、残存神経細胞は、その吻側尾側に再分布し、soma size, dendritic tree 増大といった形態学的変化を示すことを報告した^{1,2)}。

しかし、組織に対する損傷圧迫は、組織の虚血および炎症など神経細胞周囲の環境の影響が生じているため、細胞単独での生物学的活性を知ることは不可能であり、細胞レベルでの機械的ストレスの変化を観察した報告はいまだ見受けられない。Flexercell strain unit は培養細胞に周期的牽引負荷を与えることができる細胞伸縮装置⁴⁾であり、筋肉細胞、血管内皮細

胞、造骨細胞の mechanical signal のメカニズム解明に応用されている⁵⁾。

今回、我々はこの装置を用いて、脊髄神経細胞、グリア細胞の mechanical stress の応答に神経栄養因子 (BDNF, NT-3) が関与しているかを in vitro で明らかにすることを目的とした。

B, 研究方法

1) メカニカルストレスによる培養脊髄細胞の形態変化 (図2)

培養脊髄細胞は生後 1-2 日 Sprague-Dawley ラットより摘出した。Hank 液排出後、5ml の 0.25%トリプシンと 5 滴の 0.2%DNase 液を加え、37°C で 30 分間保温した。培養液は Dulbecco's Modified Eagle Medium (MEM) で、これに 10%非働化ウマ血清、5mg/mL グルコース、ペニシリン 100 U/ml、100ug/ml ストレプトマイシンを添加し 6 日間培養した。細胞の機械的ストレスには FX-3000TM-Flexercell Strain Unit (Flexercell International Corporation, Hillsborough, NC) を使用した。細胞は 3x10⁴ /well にて Flex I flexible bottomed plate (ストレス処置群)、Flex II flexible control plate (コントロール群) に播種し、5%CO₂ incubator 内で機械的刺激を開始した。機械的ストレスは ELLIS ら⁴⁾の報告を参考に 1 秒間伸展/弛緩 (最大 20%牽引) を継続的に加えた。細胞障害の指標として Hank 液中の nitric oxide (NO)、Lactate dehydro-genase (LDH) を測定した。NO は Griess 法⁶⁾に準じ測定しそれぞれ経時的に観察した。刺激開始後、経時的に (1, 2, 6, 24 時間) 細胞形態を観察した。

FX-3000TM-Flexercell Strain Unit

(Flexercell International Corp., Hillsborough, NC)

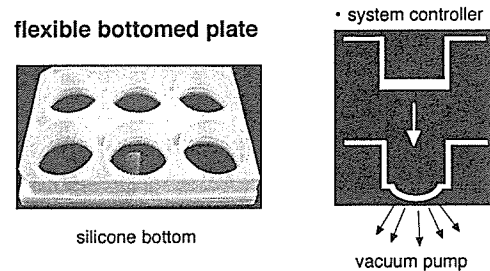


図2. Methods (Flexercell Strain Unit)

2) 免疫染色

細胞特異型マーカーとして、神経細胞は、Microtubule-Associated Protein 2 (MAP-2)、アストロサイトは Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) を用いて fluorescein (FITC) で識別、抗 BDNF、抗 NT-3 は rhodamine で標識し、double stain で評価した。

C, 結果

1) 経時的形態変化と細胞障害の程度

neuron soma の縮小、細胞膜の肥厚、細胞間質の拡大が 6 時間以上のストレスで観察された。LDH、NO 値もその形態変化とほぼ一致して 6 時間以降で高値を示した (図3)。半定量として行った Western blotting では、6 時間以降で BDNF、NT-3 共に蛋白発現を認めた (図4)。

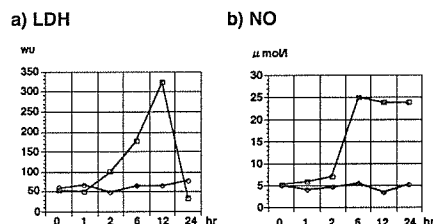


図3. Cell injury

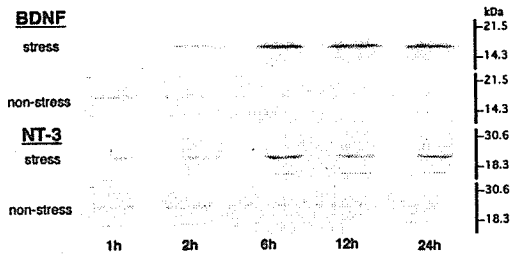


図 4. Western blotting

2) 免疫染色

MAP2 陽性細胞数は、時間と共に減少するのに対し、GFAP 陽性細胞は比較的ストレスに対してその数は比較的保たれていた。MAP2 細胞同様に BDNF 陽性細胞も減少し、double stain の結果では、抗 MAP2/ BDNF 抗体陽性細胞はストレス時間に伴い数は減少していた(図 5)。astrocyte については、抗 GFAP/ BDNF 抗体陽性細胞はストレス時間に伴い比較的その数は保たれていたが、経時的な観察により、残存する抗 GFAP 陽性細胞の immunoreactivity は高かった。抗 GFAP/NT-3 抗体陽性細胞の変化も同様であり、6 時間で immunoreactivity がピークに達していた(図 6)。一方ニューロンの標識では、BDNF 同様、抗 MAP2/ NT-3 抗体陽性細胞数は減少していったが残存する MAP2 は高率で NT-3 陽性であった(図 5)。

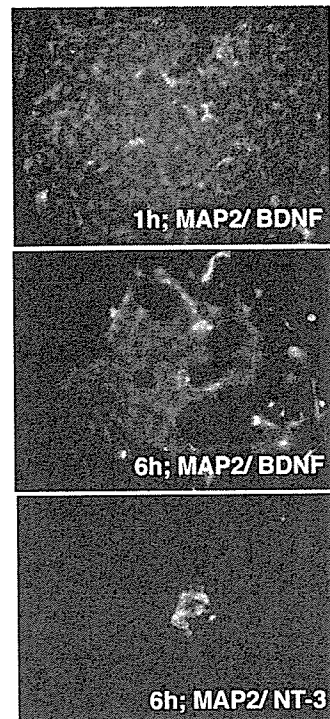


図 5. immunohistochemistry (neuron)

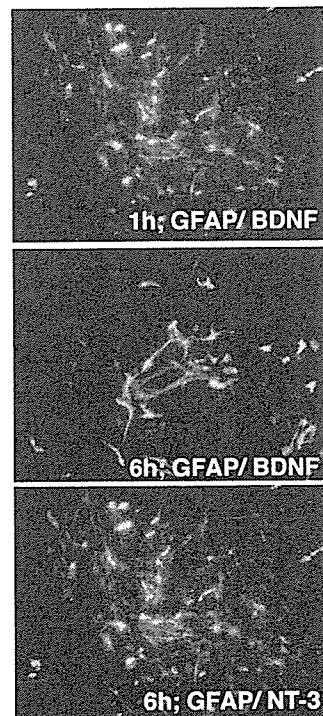


図 6. immunohistochemistry (astrocyte)