

D, 考察

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きた。神経細胞の機械的ストレス実験の報告については1995年 ELLIS ら^{4,7)}の脳皮質の報告があるが、彼等の伸縮条件は伸縮率を30-70%にし、50m秒のパルスで行っているが、これは生体内では存在し得ない条件であった。今回我々は予備実験の結果より伸縮率15%、伸縮回数が毎秒1回程度の比較的軽度なストレス条件を設定した。その結果ストレス開始後6時間で形態変化、神経細胞より放出されるLDH活性の増加、NO活性の増加が観察された。中枢神経系におけるNOの機能的役割についてはシナプス可塑性、細胞の増殖と活性化、細胞死などが考えられているが^{8,9)}、アストロサイトの活性の増加を考えれば、今回のNO値の変化はニューロン死の結果と推測される。

過去における in vitro level においては、薬物注入や、虚血などの細胞レベルのストレス実験がなされて、BDNF、NT-3などを代表とする神経栄養因子との関連が指摘されてきた。今回の免疫染色の結果では、ニューロンでは、抗MAP2/BDNF、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陽性細胞は高率で両抗体と共に陽性であった。一方アストロサイトは抗GFAP/BDNF抗体陽性細胞、抗GFAP/NT-3抗体陽性細胞共に細胞障害が生じる前の6時間の時点での immuno-reactivity が増加していた。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、Neurotrophin を発現させていると考えられた。

E, 結論

メカニカルストレスに対する脊髄細胞、グリア

細胞自体が生存維持、機能修復に関与している可能性が in vitro で示唆された。

参考文献

- 1) Baba H, Maezawa Y, Imura S, et al. 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, et al. 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, et al. 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) Ellis EF, Mckinney JS, Willoughby KA et al. A new model for rapid stretch-induced injury of cells in culture: characterization of the model using astrocytes. *J. Neurotrauma* 1995; 12: 325-39.
- 5) Albert JB, Mari T, Juro Y, et al. Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical

signals. *Biochem Cell Biol* 1995; 73:
349-65.

6) Colasanti M, Persichini T, Meneqgazzi M,
et al. Induction of nitric oxide synthase
mRNA expression. Supression by exogenous
nitric oxide. *J Biol Chem* 1995; 10:
26731-3.

7) Rzigalinski BA, Weber JT, Willoughby KA,
et al. Intracellular free calcium dynamics
in stretch-injured astrocytes. *J Neurochem*
1995; 70: 2377-85.

8) Nomura, Y and Kitamura Y. Inducible
nitric oxide synthase in glial cells.
Neurosci Res 1993; 18: 103-107.

9) Goureau O, Hicks D, Courtois Y, et al.
Induction and regulation of nitric oxide
synthase in retinal muller glial cells. *J*
Neurochem 1994; 63: 310-317.

OPLL 脊髄症 (twy/twy) に対する AdV-BDNF 遺伝子逆行性導入による 神経保護効果とアポトーシス抑制

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 慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy)を用いて、圧迫部位に位置する前角細胞群に逆行性に神経栄養因子遺伝子導入を行い、その神経保護効果について免疫組織化学的に検討した。胸骨乳突筋内に投与された LacZ gene marker (AdV-LacZ) は C1-C3 に分布する脊髄副神経内側核に発現していた。20 週齢において、特に圧迫部においては ICR 群や AdV-LacZ injected twy 群に比べ、AdV-BDNF injected twy 群では抗 BDNF 抗体陽性細胞の染色性は強く、Nissl 染色、ChAT 免疫染色、AChE 染色いずれにおいても有意に前角部陽性細胞数は増加していた。また、TUNEL 染色にて AdV-BDNF injected twy 群における apoptosis 抑制効果が確認された。慢性脊髄圧迫モデルに対する adenovirus vector を用いた逆行性神経栄養因子導入は、圧迫状態にある前角ニューロンに対する生存維持、再生能力の賦活化に寄与することが実験的に示唆された。

A, 研究目的

後縦靭帯骨化症に代表される圧迫性脊髄症では、圧迫の程度に応じて脊髄が壊死、変性に陥ると報告されている。しかしながら、高度の圧迫があっても麻痺が軽度であったり、予後不良と考えられる症例でも脊髄の除圧を行えば、予想以上の麻痺回復をしめすことがある。その背景には組織構造の破綻にもかかわらず、機能を維持する機構、すなわち脊髄の可塑性の存在が推測される。このような観点より、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) 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^{1,2,6-8)}。

近年、脊髄再生の試みとして神経栄養因子、再生因子などの補充療法が散見される。しかしながらその投与方法については様々な問題点が指摘されている。今回障害脊髄に非侵襲的な方法として、adenovirus vector を筋肉内に注入することで、逆行性に脊髄前角細胞内に神経栄養因子遺伝子を導入することを企図した(targeted retrograde gene delivery)。慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy)を用いて、圧迫部位に位置する前角細胞群に逆行性に神経栄養因子遺伝子導入を行い、その神経保護(neuroprotection) 効果について免疫組織化学的に検討した。

B, 研究方法

1) 非増殖型 adenovirus-vector (AdV) の作製
 β -galactosidase、mouse BDNF をそれぞれ組み込んだ非増殖型 adenovirus vector (AdV-LacZ,

AdV-BDNF)をCOS-TPC法にて作製した³⁾。増殖、精製し、 5×10^{10} まで力価を調節した。

2) X-gal 染色

生後16週齢のtwyマウス6匹、正常対象群には同週齢のICRマウス6匹を用いた。ネンブターール腹腔内注射後、顕微鏡視下に左胸骨乳突筋内にマイクロシリンジにてAdV-LacZを $25 \mu\text{l}$ (1.0×10^9 PFU)注入した。注入後4週後(生後20週齢)に、灌流固定後、直ちに延髄から第5頸髄までの脊髄を摘出し、 $25 \mu\text{m}$ の凍結横断連続切片を作製した。X-gal反応液にて24時間 37°C で反応させた後、鏡視した。脊髄高位は便宜的にC1前根より、C2後根まで(圧迫吻側部)、C2後根からC3後根まで(最大圧迫部)、C3後根からC4後根まで(圧迫尾側部)の3つに分け、評価した。

3) 組織学的検討

生後16週齢のtwyマウス12匹(AdV-LacZ注入6匹、AdV-BDNF注入6匹)、正常対象群には同週齢のICRマウス6匹を用いた。注入4週後、ネンブターール腹腔内注射後、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。20%ショ糖緩衝液で48時間浸潤し、 $20 \mu\text{m}$ の凍結横断連続切片を作製した。一次抗体には抗BDNF抗体を用い、48時間 4°C で反応させた後、biotinylated anti-rabbit IgG antibodies (Vecter lab .ABC elite kit)を添加、12時間 4°C で反応させ、ABC法に準じて免疫染色をおこなった。発色はDABで行い、可視化した。また残存ニューロン賦活化効果については $50 \mu\text{m}$ の凍結横断連続切片を作製しNissl染色、choline acetyltransferase(ChAT)による免疫染色、acetylcholine esterase (AChE)染色での陽性

細胞数(前角部; medial, ventrolateral, dorsolateral pool)の検討を行った。また、それぞれのモデルに対し、TUNEL染色を行い、前角細胞のapoptosisの程度を評価した。

4) Western blotting

生後16週齢のtwyマウス6匹(AdV-LacZ注入3匹、AdV-BDNF注入3匹)、正常対象群には同週齢のICRマウス3匹を用いた。注入4週後、ネンブターール腹腔内注射後(0.05 mg/g)、頸髄をen blocに摘出し、RIPA buffer (50mM pH 7.5 TRIS-HCl, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, $20 \mu\text{g/ml}$ leupeptin and 1mM PMSF)に溶解し、homogenizeし、 -80°C で保存した。12.5% SDS-PAGE ($80 \mu\text{g/lane}$)にて70分間電気泳動を行い、polyvinylidene difluoride membraneに転写した。membraneをPBSにて洗浄後、抗BDNF抗体を用い、12時間 4°C で反応させ、ENVISIONにて30分反応させた。

C, 結果

1) X-Gal 染色

twyマウス、ICRマウス共に、C1-C3に分布する左脊髄副神経内側核に陽性細胞が確認された(図1)。

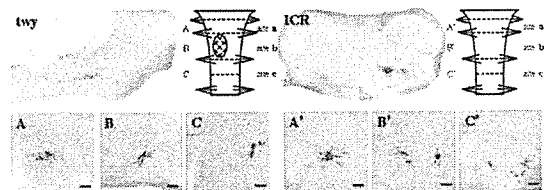


図1. X-gal staining

2) 免疫染色、Western blotting、残存ニューロン細胞数、TUNEL 染色

前角細胞のBDNFによる染色性は、特に最大圧迫部、尾側部にて、ICR群、AdV-LacZ twy群に比べ、AdV-BDNF twy群で有意に高かった(図2)。Western blottingにおいても、AdV-BDNF twy群で有意にdensityが高く、AdV-LacZ twy群で

は内因性BDNFと思われるbandを認めた(図3)。Nissl染色、ChATによる免疫染色、AChE染色では、ICR群、AdV-LacZ twy群に比べAdV-BDNF twy群では有意にその染色性は強かった(図4)。前角部での陽性細胞数の比較を図5に示す。Nissl染色、ChAT免疫染色、AChE染色いずれにおいても特に最大圧迫部位において有意に陽性細胞数は多かった。

圧迫部で評価した TUNEL 染色では、AdV-LacZ twy に比べ、AdV-BDNF twy では、TUNEL 染色陽性前角細胞が有意に減少していた(図6)。

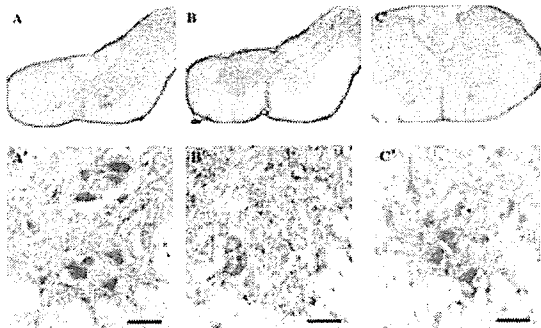
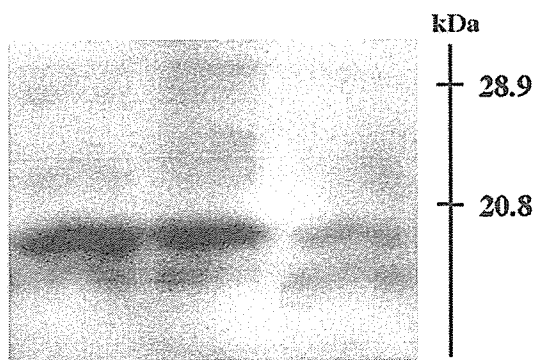


図2. BDNF immunoreactivity (A, A':AdV-BDNF twy, B, B':AdV-LacZ twy, C, C':ICR)



AdV-BDNF twy AdV-LacZ twy AdV-LacZ ICR
図3. Immunoblot analysis of BDNF

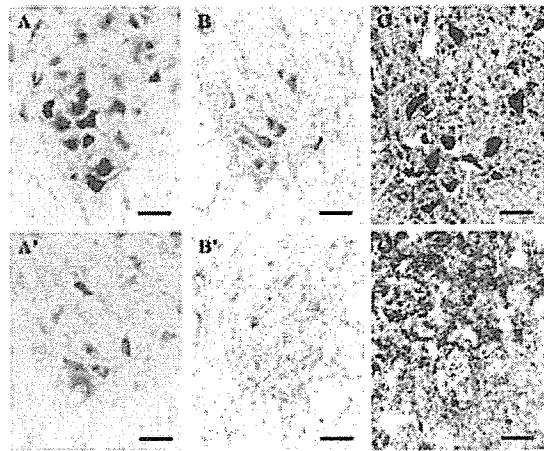


図4. A, A':Nissl, B, B':ChAT, C, C':AChE
上段:AdV-BDNF twy、下段:AdV-LacZ twy

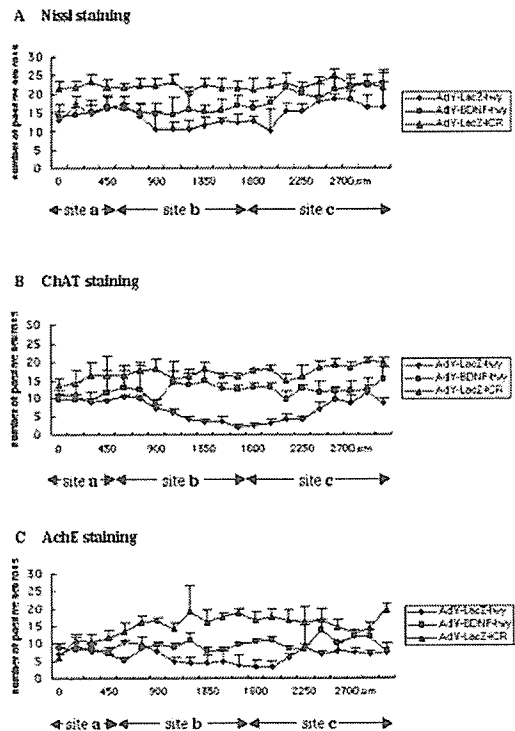


図5. 残存ニューロン数の評価

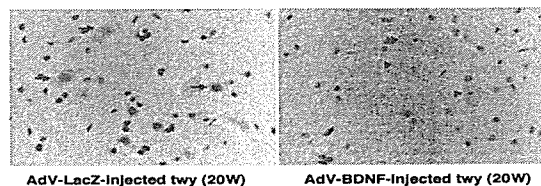


図6. TUNEL 染色

D, 考察

BDNF を代表とする神経栄養因子は、特異的レセプターを介してニューロンに作用し、神経突起の伸展促進、生存維持、分化誘導などの活性を示す蛋白性分子群である。最近では損傷脊髄において軸索再生が生じない一つの理由として内因性の神経栄養因子の欠乏が報告されている。そのため損傷脊髄内への神経栄養因子補充療法においての、組織修復効果、軸索伸長効果については異論がないとされているが、しかしながら重要な課題はこれらの増殖因子を如何に損傷部位に効率的、選択的、しかも持続的に作用させ得るかという点である。

今回の導入方法は、筋肉内から軸索流にのり、逆行性に前角細胞へ直接輸送する方法で、障害脊髄に対して非侵襲的であり、慢性圧迫状態であっても、adenovirus が強力な retrograde tracer として働くため直接導入と遜色ない導入効率を示すと考えられた。また、免疫反応を最大限に抑制することができることや apoptosis 助長効果がないことも報告されている^{4,5)}。本研究においては、上位頸髄前角細胞に分布する胸骨乳突筋を target organ に設定したが、損傷部位に応じた target organ の選択も可能であることも逆行性遺伝子導入の大きな利点のひとつと考えられる⁵⁾。

障害脊髄周囲での cholinergic enzymes (ChAT, AChE) の活性上昇は、前角細胞生存の指標として重要であり、特に運動機能と相関があるとされている⁴⁾。AdV-BDNF 群では、細胞死 (apoptosis) の抑制、cholinergic enzymes 活性上昇、長期間の神経栄養因子補充など、頸髄前角細胞に対して非常に有益な効果をもたらしていた。

E, 結論

Adenovirus vector を用いた逆行性神経栄養因子遺伝子導入は、脊髄に非侵襲的な導入方法であり、前角細胞に選択的、効率的で、かつ長期間の神経栄養因子の神経保護効果が期待され、圧迫状態にある前角ニューロンに対する生存維持、再生能力の賦活化、apoptosis 抑制に寄与する可能性が示唆された。

G, 研究発表

・論文発表

- 1) Xu K, Uchida K, Nakajima H, Kobayashi S, Baba H. Targeted retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain derived neurotrophic factor gene prevents loss of mouse (twy/twy) anterior horn neurons in vivo sustaining mechanical compression. *Spine* 31: 1867-1874, 2006
- 2) Nakajima H, Uchida K, Kobayashi S, Inukai T, Horiuchi Y, Yayama T, Sato R, Baba H. Rescue of rat anterior horn neurons after spinal cord injury by retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene. *J Neurotrauma*, in press
- 3) Nakajima H, Uchida K, Kobayashi S, Kokubo Y, Yayama T, Sato R, Baba H. Targeted retrograde gene delivery into the injured cervical spinal cord using recombinant adenovirus vector. *Neurosci Lett* 385: 30-35, 2005

参考文献

- 1) Baba, H., Maezawa, Y., Imura, S., Kawahara, N., Nakahashi, K., Tomita, K. (1996) Quantitative analysis of the spinal cord motoneuron under chronic compression: an

- experimental observation in the mouse. *J Neurol.* 243; 109-16.
- 2) Baba, H., Maezawa Y., Uchida K., Imura S., Kawahara N., Tomita K. Three-dimensional topographic analysis of spinal accessory motoneurons under chronic mechanical compression : an experimental study in the mouse *J Neurol* 244 (4): 222-229, 1997
 - 3) Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C., Saito, I. (1996) Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93; 1320-4.
 - 4) Nakajima H, Uchida K, Kobayashi S, Inukai T, Horiuchi Y, Yayama T, Sato R, Baba H. Rescue of rat anterior horn neurons after spinal cord injury by retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene. *J Neurotrauma*, in press
 - 5) Nakajima H, Uchida K, Kobayashi S, Kokubo Y, Yayama T, Sato R, Baba H. Targeted retrograde gene delivery into the injured cervical spinal cord using recombinant adenovirus vector. *Neurosci Lett* 385: 30-35, 2005
 - 6) Uchida, K., Baba, H., Maezawa, Y., Furukawa, S., Furusawa, N., Imura, S. Histological investigation of spinal cord lesions in the spinal hyperostotic mouse (twy/twy): morphological changes in anterior horn cells and immunoreactivity to neurotropic factors. *J Neurol.* 245; 781-93, 1998
 - 7) Uchida, K., Baba, H., Maezawa, Y., Furukawa, S., Omiya, M., Kokubo, Y., Kubota, C., Nakajima, H. Increased expression of neurotrophins and their receptors in the mechanically compressed spinal cord of the spinal hyperostotic mouse (twy/twy). *Acta Neuropathol.* 106; 29-36, 2003 .
 - 8) Uchida, K., Baba, H., Maezawa, Y., Kubota, C. Progressive changes in neurofilament proteins and growth-associated protein-43 immunoreactivities at the site of cervical spinal cord compression in spinal hyperostotic mice. *Spine.* 27; 480-6, 2002

自家細胞移植による損傷脊髄再生の可能性 - 骨髄間質細胞由来シュワン細胞移植の検討 -

染谷幸男(千葉大学大学院医学研究院整形外科学), 国府田正雄(千葉県立東金病院整形外科), 出澤真理(京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座機能微細形態学), 門田朋子(千葉大学大学院医学研究院環境生命医学), 橋本将行(千葉県立東金病院整形外科), 鎌田尊人(千葉大学大学院医学研究院整形外科学), 西尾 豊(千葉大学大学院医学研究院整形外科学), 門田 領(千葉大学大学院医学研究院整形外科学), 萬納寺誓人(千葉大学大学院医学研究院整形外科学), 宮下智大(千葉大学大学院医学研究院整形外科学), 大河昭彦(千葉大学大学院医学研究院整形外科学), 山崎正志(千葉大学大学院医学研究院整形外科学), 守屋秀繁(千葉大学大学院医学研究院整形外科学)

【研究要旨】

近年、我々は骨髄間質細胞 (BMSC) から *in vitro* に分化誘導とし、骨髄間質細胞由来シュワン細胞 (BMSC-SC) が得られることを示し¹⁾、脊髄完全切断モデルへの BMSC-SC 移植にて軸索再生を促進することを報告した²⁾。今回、より臨床に近いモデルである脊髄圧挫損傷モデルに対しての BMSC-SC 移植の有用を検討した。

ラット脊髄圧挫モデルを作成し、脊髄損傷後 1 週で、損傷部にマトリゲルと BMSC、BMSC-SC、シュワン細胞 5×10^5 個をマトリゲルに混和したものを移植し、組織学のおよび行動学的検討を行った。ラット脊髄圧挫損傷モデルに対する BMSC-SC 移植は、損傷脊髄の空洞面積を抑制した。移植細胞は生着し、その細胞特性は維持されていた。免疫電顕より GFP 陽性の移植細胞と神経組織由来の細胞は高い親和性を持つことが示唆された。また、軸索再生もしくは、残存を促進した。脊髄損傷に対する BMSC-SC 移植の有効性が示唆された。

A. 研究目的

成体哺乳類の脊髄は、一度障害を受けるとその再生は困難であると考えられてきた。しかし、最近の幹細胞研究の進歩により、ES 細胞³⁾、神経幹細胞^{4), 5)}などの細胞移植により、適切な環境が導入されることで損傷された脊髄であっても修復されることが示された。しかし、これらの細胞を臨床に応用する場合、胎児組織使用に伴う倫理問題や他家移植に起因する免疫学的拒絶などの問題が生じる。自家移植は、これらの問

題を解決する可能性がある。我々は、骨髄において、造血幹細胞 (HSC) や骨髄間質細胞 (BMSC) などの幹細胞様の性質をもつ細胞が存在することに注目し、損傷脊髄への自己移植可能なソースとして、HSC、BMSC 移植の有用性を報告してきた^{6), 7)}。これらのことより、骨髄細胞には損傷脊髄を修復し、機能改善を促進する可能性が示唆された。諸家よりも BMSC の有用性を示唆する報告は数多くなされている⁸⁾⁻¹²⁾。しかしながら、脊髄に非神経系の細胞を移植するには、いくつ

かの問題がある。特に、脊髄内における移植細胞の分化の問題があげられる。神経系の細胞へあらかじめ分化させておくのは、これらの問題解決の1つである。最近、我々は *in vitro* にて、BMSC からシュワン細胞に分化誘導可能であることを報告し（骨髄間質細胞由来シュワン細胞；BMSC-SC）、ラット損傷坐骨神経の再生を促進することを示した¹⁾。さらに、ラット脊髄完全切断モデルにおいて、BMSC-SC 移植が効果的に損傷軸索の再生を促進させ、後肢運動機能を改善させることを報告した²⁾。

本研究の目的は、より臨床に近いモデルである脊髄圧挫損傷モデルを用いて、BMSC-SC 移植の有用性を評価することである。

B. 研究方法

a. BMSC-SC の特徴 (*in vitro*)

GFP transgenic Wistar ラット (provided by The YS Institute Inc. Utsunomiya, Japan) の大腿骨より骨髄を採取し、付着性の細胞を継代培養し得られた細胞を BMSC とした。さらに、この細胞を以前に報告したプロトコールにて¹⁾、分化誘導し BMSC-SC を得た。すなわち、 α MEM に 10% FBS を加えた培養液に 1 mM β -メルカプトエタノールを加え 24 時間処理後、35 ng/ml レチノイン酸で 3 日間処理し、続いて、5 μ M Forskolin、10 ng/ml bFGF、5 ng/ml PDGF-AA、200 ng/ml Heregulin にて 7 日間処理し分化誘導した。新生 GFP transgenic Wistar ラット坐骨神経を採取しコナゲナーゼ処理し得られた細胞を Ara-C 処理し、シュワン細胞を得た。

これらの細胞の形態、免疫染色での特徴およびそれぞれより RNA を抽出し、シュワン細胞特

異的遺伝子である Krox20、Krox24、P0 を RT-PCR にて解析した。

b. BMSC-SC 移植有用性の評価 (*in vivo*)

Wistar ラット (σ 10-11 週齢、225-250g) の、第 8-9 胸椎椎弓切除後、NYU impactor^{13), 14)} を用いて高さ 25mm より、10g のロッドを脊髄に落下させ、圧挫損傷モデルを作成した。脊髄損傷後 1 週で、損傷部にマトリゲル単独もしくは BMSC、BMSC-SC、シュワン細胞 5×10^5 個をマトリゲルに混和したものの総量 5 μ l をガラスマイクロピペットにて、損傷中心部に移植し、それぞれ、コントロール群、BMSC 群、BMSC-SC 群、SC 群とした (各 n=12)。全群にて、移植 1 日前より、移植後すべての期間において免疫抑制剤であるシクロスポリン A を皮下注射にて投与した。全群で、皮質脊髄路の評価のため、順行性トレーシングを施行した。移植後 3 週に大脳皮質運動野に順行性トレーサーである biotinylated dextran amine (BDA) を 4 カ所 (Bregma 後方 1, 3mm、側方 2.5mm) それぞれ 1 μ l ずつ注入した。移植後 5 週で 4% PFA にて灌流固定とした。

これらの動物より得られた損傷脊髄より、12 μ m 厚の矢状断凍結切片を作成し組織学的検討を行った。Cresyl-violet 染色により損傷部空洞を評価し、その面積を Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MA) にて測定した。また、グリア瘢痕の評価のため GFAP の免疫染色を行い、陽性の面積を Scion Image にて測定した。移植細胞のマーカーとして GFP を、さらに、BMSC のマーカーである Vimentin、Fibronectin、シュワン細胞のマーカーである P0、S-100、p75^{LN^{GR}} をそれぞれ免疫染色し、その免疫組織学的特徴の保持および移植細胞の生着を評価した。新生

軸索マーカーとして GAP43、下降性運動路のマーカーとしてチロシンヒドロキシラーゼ

(coeruleo-spinal tract のマーカー)、セロトニン (raphe-spinal tract のマーカー) の免疫染色を行い、損傷部中心および頭尾側 5mm 部での陽性線維数を計測とした。なお、免疫染色は、コンフォーカル顕微鏡 (LSM5 PASCAL; Carl Zeiss, Germany) を用い観察した。さらに、移植細胞のマーカーである GFP の免疫電子顕微にて、移植細胞の評価を行った。行動学的検討は、後肢運動機能を損傷 1、3、7 日以降、1 週ごとに BBB スコア¹⁵⁾にて評価した。

統計は、Mann-Whitney U 検定を用い、検討を行った。

C. 研究結果

a. BMSC-SC の特徴 (in vitro)

位相差顕微鏡像において、BMSC は分化誘導後、その形態は明らかに変化し、シュワン細胞に類似した双極性の形態を呈した (図 1 A、B、C)。また、免疫染色では、Vimentin、Fibronectin 陽性の BMSC は分化誘導後、シュワン細胞のマーカーである P0、S-100、p75^{LN^GFR} 陽性となり、形態のみでなくマーカーも同様のものを有していることが確認できた (図 1 D-K)。

シュワン細胞特異的遺伝子の RT-PCR であるが、BMSC-SC において BMSC と比較し、末梢性ミエリネーションに直接関わる膜糖タンパクである P0¹⁶⁾ の遺伝子発現増加を認めた。なお、Krox20 および Krox24 においては、その遺伝子発現に差は認めなかった。(図 2)

これらの結果より、誘導された BMSC-SC は、形態学だけでなく免疫染色のマーカーや遺伝子

発現においても、シュワン細胞と類似の特徴を示すことがわかった。

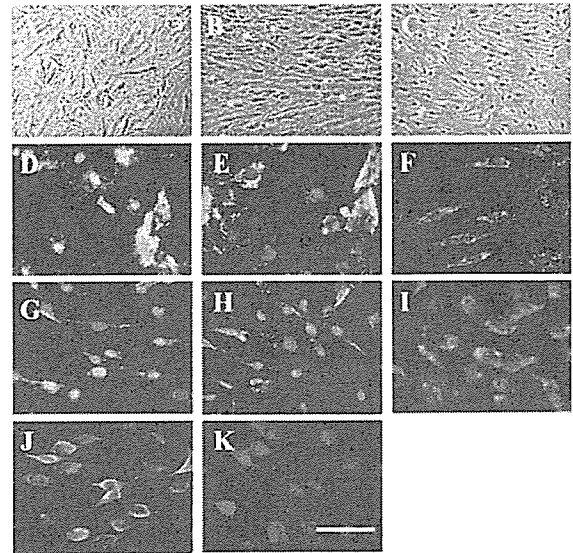


図 1 in vitro

A-C) 位相差顕微鏡像: BMSC (A), BMSC-SC (B), シュワン細胞 (C); D-K) 免疫染色像: BMSC Vimentin (D), Fibronectin (E), BMSC-SC P0 (F), S-100 (G), p75^{LN^GFR} (H), シュワン細胞 P0 (I), S-100 (J), p75^{LN^GFR} (K) Bar=50 μl

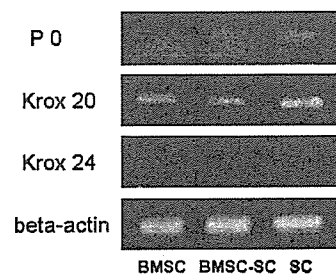


図 2 RT-PCR

b. BMSC-SC 移植有用性の評価 (in vivo)

移植 5 週後の損傷脊髄における Cresyl-violet 染色 (図 3 A、B、C、D) にて、空洞の領域を測定した。空洞面積は、細胞移植群すべてにおいてコントロール群より有意に小さく、BMSC-SC 群および SC 群は、BMSC 群と比較し空洞形成は小

さく、脊髄組織は残存していた ($p < 0.05$; 図 4 E)。これは、BMSC-SC には BMSC と比較してより強い神経保護の効果があることを示唆する。なお、BMSC-SC 群と SC 群間における空洞面積に有意差はなかった。また、GFAP の免疫染色では、各群間におけるグリア瘢痕化の面積に有意差はなかった。(図示せず)。

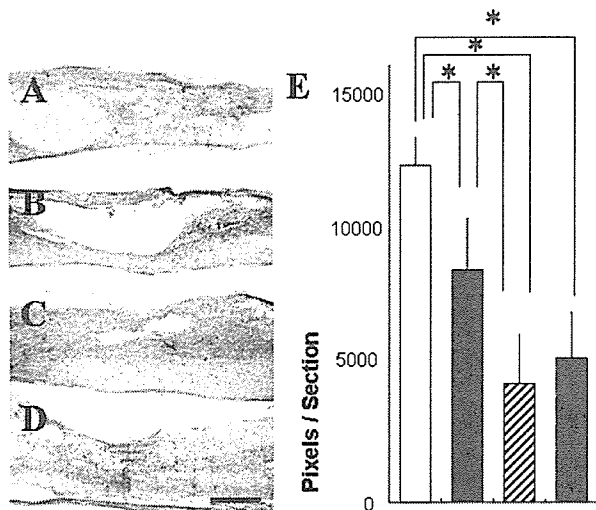


図 3 空洞面積

A-D) Cresyl-violet 染色像: コントロール (A), BMSC (B), BMSC-SC (C), シュワン細胞 (D) Bar=1mm

E) 空洞面積の比較: Open columns コントロール群; Closed columns BMSC 群; hatched column BMSC-SC 群; gray column SC 群 * $p < 0.05$, bars = \pm SE

GFP 陽性細胞数は、BMSC、BMSC-SC と SC 群において、 142.0 ± 18.0 、 386.3 ± 28.6 、 1301.8 ± 310.8 であった。(図 4 A、B、C) GFP 陽性の移植細胞数は、SC 群で BMSC 群および BMSC-SC 群より有意に多く、BMSC-SC 群で BMSC 群より有意に多かった ($p < 0.05$; 図 4 D)。GFP およびそれぞれの細胞マーカーの二重染色において、GFP 陽性の移植細胞は、BMSC 群は、Vimentin、Fibronectin 陽性であり、BMSC-SC 群は、P0 (図 5 A-C)、S-100

(図 5 D-F)、 $p75^{LNGFR}$ (図 5 G-I) 陽性であり、SC 群でも P0、S-100、 $p75^{LNGFR}$ 陽性であった。移植細胞は、全群で損傷脊髄に移植後もそれらの特異的マーカーを維持していることが示された。

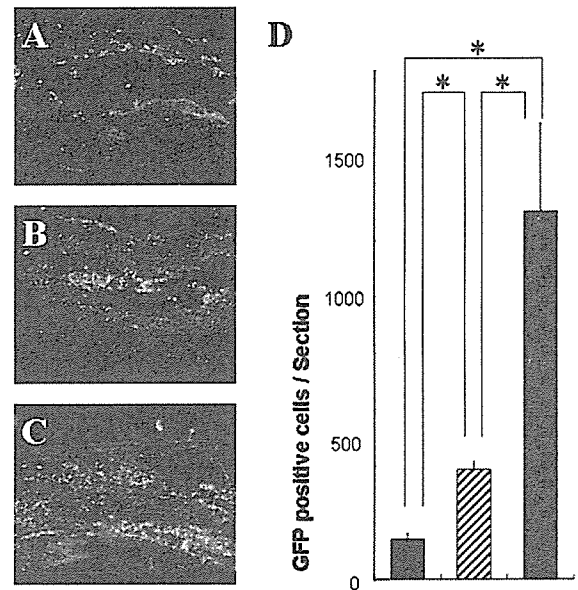


図 4 GFP 陽性細胞

A-C) 免疫染色像: BMSC (A), BMSC-SC (B), シュワン細胞 (C);

D) 生着細胞数の比較: Closed columns BMSC 群; hatched

column BMSC-SC 群; gray column SC 群 * $p < 0.05$, bars = \pm SE

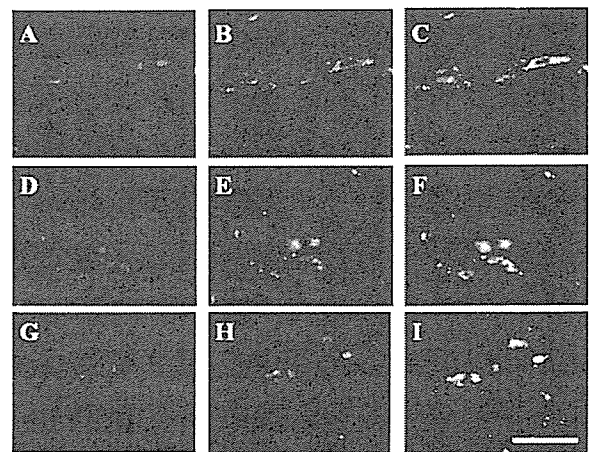


図 5 二重染色 (BMSC-SC 群)

A-I) 免疫染色像: P0 (A), GFP (B), Merged (C); S-100 (D), GFP

(E), Merged (F); $p75^{LNGFR}$ (G), GFP (H), Merged (I)

再生軸索のマーカである GAP-43 陽性の神経線維数が頭側において、SC 群がコントロール群より有意に多く ($p < 0.05$)、損傷部において、BMSC-SC 群および SC 群がコントロール群および BMSC 群とそれぞれ比較して有意に多かった。 ($p < 0.05$; 図 6 A-C, 図 7 A) Coeruleo-spinal tract のマーカであるチロシンヒドロキシラーゼ陽性の神経線維数は、損傷部において、BMSC-SC 群および SC 群がコントロール群より有意に多く ($p < 0.01$)、尾側において、BMSC-SC 群および SC 群がコントロール群より有意に多く ($p < 0.01$)、BMSC がコントロール群より、BMSC-SC 群が BMSC 群より有意に多かった ($p < 0.05$; 図 6 D-F, 図 7 B)。Raphe-spinal tract のマーカであるセロトニン陽性の神経線維数は、損傷部において、SC 群がコントロール群より有意に多く ($p < 0.05$)、尾側において、BMSC-SC 群がコントロール群および BMSC 群より有意に多かった ($p < 0.01$; 図 6 G-I, 図 7 C)。順行性トレーサーである BDA でラベルされた皮質脊髄路は、全群で頭側および損傷部では認められたが、損傷部を越え尾側部では認められなかった (図示せず)。

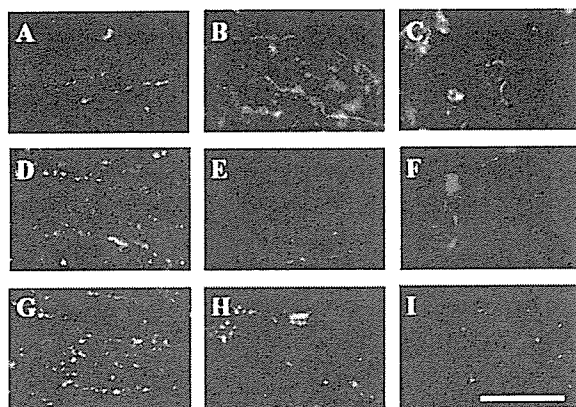


図 6 神経線維 (BMSC-SC 群)

A-I) 免疫染色像: GAP-43 頭側 (A), 損傷部 (B), 尾側 (C); チロシンヒドロキシラーゼ 頭側 (D), 損傷部 (E), 尾側 (F); セロトニン 頭側 (G), 損傷部 (H), 尾側 (I)

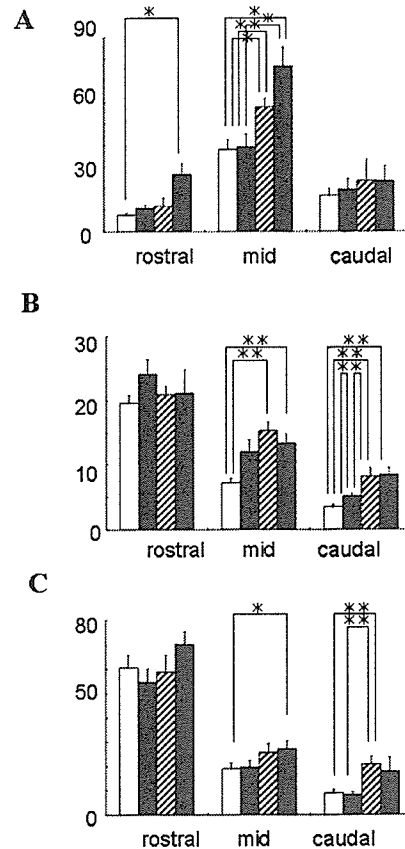


図 7 神経線維数

A) GAP-43 陽性神経線維数; B) チロシン・ヒドロキシラーゼ陽性神経線維数; C) セロトニン陽性神経線維数

Open columns コントロール群; Closed columns BMSC 群;

hatched column BMSC-SC 群; gray column SC 群

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

免疫電子顕微鏡における GFP 陽性の移植細胞は、BMSC-SC 群において、ミエリネーションは認められなかったが、細い突起を数本だし、周囲の神経組織由来の細胞に巻き付いている像を認めた (図 8)。

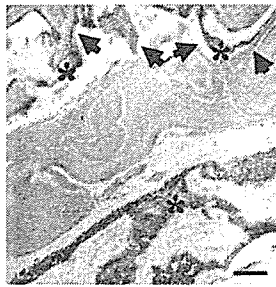


図8 免疫電子顕微鏡 (BMSC-SC 群)

* GFP 陽性移植細胞; → GFP 陽性の細い突起 (周囲の神経組織由来の細胞に巻き付いている) Bars = 2 μ m

後肢運動機能は BMSC-SC 群において、移植後 4 週にてコントロール群と、5 週にてコントロール群および BMSC 群と比較し有意に回復を認めた。また、SC 群と BMSC-SC 群間に有意差は認めなかった。なお、移植後 5 週の最終観察時 BBB スコアの平均であるが、BMSC-SC 群は、 10.3 ± 0.8 点。これは、時々足底で荷重をする歩行をするレベルであった。コントロール群では、 7.7 ± 0.6 点、BMSC 群で、 7.9 ± 0.6 点。これは、荷重はできないが、後肢の 3 関節はリズムカルに動かせるレベルであった。なお、SC 群は、 9.2 ± 0.8 点。これは立ち止まっている時のみ後肢で荷重が可能なレベルであった。

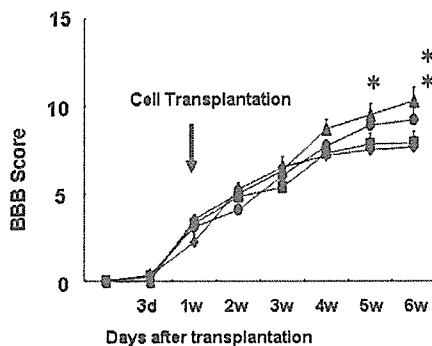


図9 後肢運動機能

◆ コントロール群; ■ BMSC 群; ▲ BMSC-SC 群; ● SC 群

* $p < 0.05$, ** $p < 0.03$ Bars: \pm SE

D. 考察

本研究において、ラット脊髄圧挫損傷における BMSC-SC 移植は空洞面積を減少させ、軸索の再生もしくは残存させ、後肢運動機能の回復を促進した。以前に、我々は、ラット脊髄完全切断モデルにおける BMSC-SC 移植は軸索再生を促進した報告した。しかし、その臨床応用には、圧迫もしくは圧挫挫傷での脊髄損傷モデルにおける有効性を証明する必要がある¹⁷⁾。本研究では、脊髄圧挫損傷モデルを作成するのに、広く用いられている装置である NYU impactor を用いて、BMSC-SC 移植の有効性を証明することができた。

機能的回復を促進した機序のうちの 1 つは、BMSC-SC の持つ神経保護作用があるかもしれない。空洞面積の減少と後肢運動機能の回復間には関連があることが報告しており^{11), 12), 18)}、本研究において、BMSC-SC 移植は、空洞面積を減少させた。また、グリア瘢痕の面積は、各群の間に有意差がなかった。これらのことより、我々は、移植細胞の持つ神経保護効果により、グリア瘢痕以外によって、空洞面積の減少が生じたと考えている。これらの脊髄組織の回復は、急性または亜急性期における組織破壊の進行を抑制するといった神経保護作用が反映するのかもしれない。BMSC-SC は、いくつかの神経栄養因子の分泌、または宿主脊髄の細胞と接触することによって、神経保護の効果を及ぼすと考えられる。諸家により、BMSC は BDNF、NGF、NT-3 や VEGF などを含むいくつかの神経栄養因子を分泌する

と報告されている^{8), 19)-24)}。本研究において、空洞面積はBMSC-SC群でBMSC群より有意に小さかった。これは、BMSC-SCは、BMSCと比較してより強い神経保護効果があることを示唆している。空洞面積においてBMSC-SC群とSC群間に有意差はなかったことより、BMSC-SC移植とシュワン細胞移植は、同等の神経保護作用があることが示唆した。しかしながら、生着細胞の数は、SC群よりBMSC-SC群において有意に少なかった。このことから、神経保護作用は、異なる機序があるのかもしれない。

機能的回復を促進した機序のもう一つの可能性は、BMSC-SCが軸索再生を促進するということである。我々は、以前に、脊髄完全切断モデルにおけるBMSC-SC移植が軸索再生を促進することを報告した²⁾。本研究においても、BMSC-SC移植により、損傷部においてGAP-43陽性線維数の増加を、尾側においてチロシンヒドロキシラーゼおよびセロトニン陽性線維数の増加をもたらした。しかし、これらの結果と対照的に、順行性トレーシングでは、障害部位を越えるBDAでラベルされた神経線維は認められず、皮質脊髄路の再生を示唆する所見は認めなかった。

Bareyreらは、損傷脊髄後にpropriospinal fiberが形成され、機能的回復を促進すると報告しており²⁵⁾、損傷部でのGAP-43陽性線維数は、これらpropriospinal fiberの新芽形成または再生を反映している可能性がある。また、チロシンヒドロキシラーゼとセロトニンはいずれも運動機能の関与が諸家により報告されており²⁶⁾⁻²⁹⁾、coeruleo-spinal tractやraphe-spinal tractなどの下行性運動線維やpropriospinal

fiberの新芽形成または再生などが機能的な回復に関与と考えられる。

本研究において、移植されたBMSC、BMSC-SCとシュワン細胞は、移植後長期にわたり本来のマーカートを維持していた。脊髄損傷におけるBMSC移植の有効性は多く報告されている⁷⁾⁻¹²⁾にも関わらず、BMSCの損傷脊髄内での神経系細胞への分化は未だ論争がある。Choppらは、損傷脊髄に対し、移植されたBMSCは、神経系マーカートを呈するようになると報告した⁹⁾。対照的に、BMSCは本来のマーカートを維持することを示唆する報告も存在する^{7), 10)}。また、BMSCの神経系細胞への分化は、in vitroにおいても、論争のあるところである。近年、in vitroにおけるBMSCからニューロンへの分化は、構造変化によって誘発されるマーカートの変化でしかないと報告された³⁰⁾。一方、BMSCは、neurospheresを生成することができ、ネスチン陽性の神経前駆/幹細胞様の細胞に分化誘発できるとの報告もされている³¹⁾。また、我々は、形態および免疫染色のマーカートだけでなく、電気生理的性質にもよってもBMSCからニューロンに分化誘導できることを報告している³²⁾。

BMSC-SCは、in vitroにてBMSCから分化誘発ができる。本研究において、BMSC-SCは、形態はシュワン細胞と類似していて、P0、S-100、p75^{NGFR}などのマーカートを表して、シュワン細胞に特異的な遺伝子であるP0の遺伝子の発現増加も認められた。また、以前の研究にて、BMSC-SCは、末梢神経への移植にてミエリンを形成することができることを示した¹⁾。本研究において、免疫電子顕微鏡では移植されたBMSC-SCによるミエリン形成は認めなかったが、宿主の脊髄組織と高親

和性を認めた。これは、末梢神経と中枢神経系のちがいのため、もしくは、本研究の実験期間がミエリン形成を見つけるには短期間であったからかもしれない。

シュワン細胞は、脊髄への細胞移植のソースの一つとして、諸家によりその有用性が多く報告されている³³⁾⁻³⁹⁾。しかし、その臨床応用は、採取部位での合併症や数量の問題がある。一方、BMSCは骨髄穿刺によって腸骨稜などから容易に採取でき、また、旺盛な増殖能を持つ^{23), 40), 41)}。しかしながら、生体内で移植されたBMSCの分化を制御することは難しい。このため、我々は、移植前にBMSCをBMSC-SCに誘導した。本研究において、BMSC-SC群は、BMSC群より生着細胞は有意に多かった。この機序として、神経系へ分化誘導をすることにより、宿主脊髄に親和性を増し、細胞死に対してより高い耐久性がある、または、移植の後に増殖するためと推測される。

E. 結論

本研究において、BMSC-SCは、BMSCより移植された細胞の残存し、軸索再生もしくは残存させ、後肢運動機能の回復を促進することを示した。その効果はシュワン細胞と同程度であった。これらのことより、BMSC-SCは、脊髄損傷に対する細胞治療のソースとして非常に有望であると、我々は考えている。

参考文献

1. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H (2001) Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of *in vitro* differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 14: 1771-1776.
2. Kamada T, Koda M, Dezawa M, Yoshinaga K, Hashimoto M, Koshizuka S, Nishio Y, Moriya H, Yamazaki M (2005) Transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells promotes axonal regeneration and functional recovery after complete transection of adult rat spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 37-45.
3. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW (1999) Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Med* 5: 1410-2.
4. Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, Bregman BS, Koike M, Uchiyama Y, Toyama Y, Okano H (2002) Transplantation of *in vitro*-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res* 15:925-33.
5. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, Gage FH, Anderson AJ (2005) Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 14069- 14074.
6. Koshizuka S, Okada S, Okawa A, Koda M,

- Murasawa M, Hashimoto M, Kamada T, Yoshinaga K, Murakami M, Moriya H, Yamazaki M (2004) Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:64-72.
7. Koda M, Okada S, Nakayama T, Koshizuka S, Kamada T, Nishio Y, Someya Y, Yoshinaga K, Okawa A, Moriya H, Yamazaki M (2005) Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport* 16:1763-7.
 8. Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB (2001) Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 190:17-31.
 9. Chopp M, Li Y (2002). Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 1: 92-100.
 10. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2199-2204.
 11. Wu S, Suzuki Y, Ejiri Y, Noda T, Bai H, Kitada M, Kataoka K, Ohta M, Chou H, Ide C (2003) Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord. *J Neurosci. Res.* 72, 343-351.
 12. Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K, Chou H, Ishikawa N, Matsumoto N, Iwashita Y, Mizuta E, Kuno S, Ide C (2004) Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol* 187: 266-278.
 13. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1996) Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol* 139: 244-256.
 14. Young W (1996) Spinal cord regeneration. *Science* 273: 450-451.
 15. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12: 1-21.
 16. Giese KP, Martini R, Lemke G, Soriano P, Schachner M (1992) Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 71: 565-576.
 17. Steeves J, Fawcett J, Tuszynski M (2004) Report of international clinical trials workshop on spinal cord injury. *Spinal Cord* 42: 591-7.
 18. Gorio A, Madaschi L, Di Stefano B, Carelli

- S, Di Giulio AM, De Biasi S, Coleman T, Cerami A, Brines M (2005) Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16379- 16384.
19. Sensebe L, Deschaseaux M, Li J, Herve P, Charbord P (1997) The broad spectrum of cytokine gene expression by myoid cells from the human marrow microenvironment. *Stem Cells* 15: 133-43.
 20. Jakeman LB, Wei P, Guan Z, Stokes BT. (1998) Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. *Exp Neurol* 154: 170-84.
 21. Dormady SP, Bashayan O, Dougherty R, Zhang XM, Basch RS (2001) Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res* 10:125-40.
 22. Chen X, Katakowski M, Li Y, Lu D, Wang L, Zhang L, Chen J, Xu Y, Gautam S, Mahmood A, Chopp M (2002) Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J Neurosci Res* 69: 687-691.
 23. Lu P, Jones LL, Tuszynski MH (2005) BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp Neurol* 191:344-60.
 24. Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG (2006) Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol* 198:54-64.
 25. Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O, Schwab ME (2004) The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci* 7: 269-77
 26. Shapovalov AI (1975) Neuronal organization and synaptic mechanisms of supraspinal motor control in vertebrates. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 72: 1-54.
 27. Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Reier PJ, Dai HN, McAtee M, Gao D (1993) Recovery of function after spinal cord injury: mechanisms underlying transplant-mediated recovery of function differ after spinal cord injury in newborn and adult rats. *Exp Neurol* 123: 3-16.
 28. Villanueva L, Bernard JF, Le Bars D (1995) Distribution of spinal cord projections from the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol* 352: 11-32.
 29. Deumens R, Koopmans GC, Joosten EAJ

- (2005) Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury. *Prog Neurobiol* 77: 57- 89.
30. Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I (2004) Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res* 15:192-204.
 31. Suzuki H, Taguchi T, Tanaka H, Kataoka H, Li Z, Muramatsu K, Gondo T, Kawai S (2004) Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 918-22.
 32. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Suzuki Y, Ide C (2004) Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 113:1701-10.
 33. Duncan ID, Aguayo AJ, Bunge RP, Wood PM (1981) Transplantation of rat Schwann cells grown in tissue culture into the mouse spinal cord. *J Neurol Sci* 49:241-52.
 34. Baron-van-Evercooren A, Avellana-Adalid V, Lachapelle F, Liblau R (1997) Schwann cell transplantation and myelin repair of the CNS. *Mult Scler* 3: 157-161.
 35. Bunge MB (2001) Bridging areas of injury in the spinal cord. *Neuroscientist* 7: 325-339.
 36. Bunge MB, Pearse DD (2003). Transplantation strategies to promote repair of the injured spinal cord. *J Rehabil Res Dev* 40: 55-62.
 37. Xu XM, Zhang SX, Li H, Aebischer P, Bunge MB (1999) Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell-seeded mini-channel implanted into hemisectioned adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* :1723-40.
 38. Martin D, Robe P, Franzen R, Delree P, Schoenen J, Stevenaert A, Moonen G (1996) Effects of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury. *J Neurosci Res* 45:588-97.
 39. Paino CL, Fernandez-Valle C, Bates ML, Bunge MB (1994) Regrowth of axons in lesioned adult rat spinal cord: promotion by implants of cultured Schwann cells. *J*

- Neurocytol. 23: 433-52.
40. Bianco, P; Riminucci, M; Gronthos, S; Robey, P G (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem Cells 19: 180- 192.
41. Sekiya, Ichiro; Larson, Benjamin L; Smith, Jason R; Pochampally, Radhika; Cui, Jian-Guo; Prockop, Darwin J (2002) Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality, Stem Cells 20: 530- 541.

非骨傷性頸髄損傷と後縦靭骨化症との関連

—保存的治療を行なった C3/4 非骨傷性頸髄損傷患者 129 例の検討—

分担研究者：岩本幸英（九州大学整形外科教授）

研究協力者：岡田誠司、前田 健、土井俊郎、松本嘉寛（九州大学整形外科）

芝啓一郎、植田尊善（総合せき損センター）

研究要旨

頸椎後縦靭帯骨化症（以下 OPLL）の合併が非骨傷性頸髄損傷に与える影響を明らかにする目的で、MRI 及び麻痺高位から受傷高位が C3/4 と断定でき、かつ受傷から 14 日以内入院し入院日数 50 日以上の非骨傷性頸髄損傷患者 129 例について OPLL の有無、脊柱管狭窄の程度、入院時及び退院時の運動麻痺を検討した。受傷高位と一致した OPLL を認めた症例（OPLL+群）は 13 例 10.1%であり、これらの患者の脊柱管前後径、C3/4 椎体椎弓間距離は OPLL を認めなかった群（OPLL-群）と比して有意に狭かった。しかし、入院時および退院時の麻痺状態・回復程度は C3/4 椎体椎弓間距離と相関がなく、また OPLL+群と OPLL-群間に於いても差は見られなかった。

A. 研究目的

頸椎後縦靭帯骨化症（以下 OPLL）は転倒などの比較的軽度の外傷で頸髄損傷を来す事があるが、OPLL が麻痺の程度や改善に与える影響についてはほとんど解析されていない。これまでに OPLL を伴った頸髄損傷症例について検討された報告はいくつかあるが^{1,2}、いずれの報告も損傷レベル、骨傷の有無、除圧術の有無などは統一されていないため、OPLL 合併の頸髄損傷に特殊性があるかどうかは不明であった。受傷後の治療法についても、OPLL を合併した頸髄損傷には除圧術の併用が望ましいという報告や^{3,4,5}、さらには頸髄損傷を回避するために予防的手術が望ましいなどとする意見がある一方で、狭窄率と麻痺の程度や改善率に相関はないという報告も多く^{6,7}、未だ一致した見解が得られていない。

今回我々は、MRI で損傷高位が確認された骨症のない C3/4 頸髄損傷患者を選別し、これらの非骨傷性脊髄損傷患者に於ける OPLL の有病率、麻痺の程度、改善率を検討し、OPLL と非骨傷性頸髄損傷との関連を調査した。

B. 研究方法

1990 年から 2005 年までに、受傷後 14 日以内に総合せき損センターおよび九州大学整形外科に入院した頸髄損傷患者のうち、MRI 及び麻痺の高位から受傷高位が C3/4 と断定でき、かつ入院期間が 50 日以上であった 129 例を対象とした。他部位での脊髄損傷合併例、前方脱臼の自然整復例、強直性脊椎炎の合併例、受傷前から頸髄症症状があった症例は除外した。OPLL の診断は単純レントゲン側面像にて明らかに後縦靭