

Table 2. Correlation Between Increased Signal Intensity on Preoperative T2-MRI and Clinical/Radiological Data*

Clinical/ Radiological Data	Grade of Increased Signal Intensity			p Value**
	Group 0 (none)	Group 1 (light [obscure])	Group 2 (intense [bright])	
No. of cases	28	18	6	□
Preoperative JOA score (pts)	13.9 ± 1.64	11.9 ± 2.95	9.92 ± 1.93	p=0.013 ^a
Postoperative JOA score (pts)	16.1 ± 0.94	15.0 ± 1.21	12.9 ± 1.73	p=0.002 ^b
Neurological recovery rate (%)	75.0 ± 18.9	55.4 ± 16.6	44.3 ± 15.7	p=0.006 ^c
Preoperative transverse area (mm ²)	63.1 ± 13.0	50.3 ± 13.7	37.3 ± 8.02	p=0.021 ^d
Postoperative transverse area (mm ²)	77.2 ± 8.63	66.5 ± 15.1	40.4 ± 9.16	p=0.013 ^e
Morphological restoration rate (%)	18.3 ± 12.2	41.1 ± 51.7	22.0 ± 1.90	p=0.834
No. of PET cases	5	4	4	□
Preoperative SUV	2.42 ± 0.27	2.22 ± 0.41	1.98 ± 0.44	p=0.351
Postoperative SUV	2.16 ± 0.15	2.16 ± 0.19	1.99 ± 0.25	p=0.490

*Data are presented as the mean ± standard deviation. ** Based on Kruskal-Wallis test and the Games-Howell post hoc test. ^a Additional, p=0.191 (Group 0 compared with Group 1), p=0.106 (Group 1 compared with Group 2), and p=0.011 (Group 0 compared Group 2). ^b Additional, p=0.103 (Group 0 compared with Group 1), p=0.061 (Group 1 compared with Group 2), and p=0.022 (Group 0 compared Group 2). ^c Additional, p=0.087 (Group 0 compared with Group 1), p=0.139 (Group 1 compared with Group 2), and p=0.006 (Group 0 compared Group2). ^d Additional, p=0.279 (Group 0 compared with Group 1), p=0.072 (Group 1 compared with Group 2), and p=0.014 (Group 0 compared Group2). ^e Additional, p=0.278 (Group 0 compared with Group 1), p=0.038 (Group 1 compared with Group 2), and p=0.001 (Group 0 compared Group2).

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.

研究成果の刊行に関する一覧表

- 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.
- 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

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.

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.

ラット脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF) の治療効果とその機序に関する研究

門田領* 国府田正雄** 大河昭彦* 橋本将行** 西尾豊*** 高橋和久* 山崎正志*

* : 千葉大学大学院医学研究院整形外科学

** : 千葉県立東金病院整形外科

*** : 金沢病院整形外科

分担研究者 山崎正志 千葉大学大学院医学研究院整形外科学講師

【研究要旨】ラット脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF) の治療効果およびその作用機序について検討したので報告する。**対象と方法:**ラット脊髄不全損傷モデルを作成し、G-CSF 投与群と対照群に分割した。毎週経時的に行動学的評価を術後 6 週まで行った。(急性期実験) ①G-CSF 受容体の存在を確認、②炎症性サイトカインである TNF- α および IL-1 α の mRNA 発現を比較、および IL-1 α を発現している白血球系細胞を検出しその数を比較検討、③アポトーシスに落ちているオリゴデンドロサイトを検出し、その数を比較検討した。(慢性期実験) ④残存白質の割合とオリゴデンドロサイト数を比較検討、⑤行動学的改善の比較検討を行った。**結果と考察:**G-CSF 受容体はニューロンおよびアストロサイトに認められた。急性期においては G-CSF は脊髄術後の炎症性サイトカインの mRNA 発現を抑制し、IL-1 α を発現している白血球系細胞数を減少させた。また、アポトーシスに落ちているオリゴデンドロサイト数を減少させた。慢性期においては G-CSF は損傷脊髄内の白質およびオリゴデンドロサイトの数を多く残存させていた。また、行動学的に G-CSF 群が有意な改善を示した。これらより G-CSF は、急性期に外来性に浸潤してくる白血球系細胞による炎症を抑制する作用を示すことでオリゴデンドロサイトのアポトーシスを軽減し、二次損傷を抑制・機能回復を促進したと考えられた。G-CSF は急性期脊髄損傷の治療薬となる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は白血球系細胞系細胞の栄養因子であるが、近年神経保護作用が報告され (Schabitz, 2003)、我々も脊髄損傷モデルにおける治療効果を報告した (第 20、21 回日本整形外科学会)。脊髄損傷の二次損傷軽減目的で現在臨床的にメチルプレドニゾンが使用されているが、近年その効果に疑問がもたれ、副

作用も無視しがたいため代替薬が必要とされている。今回ラット脊髄損傷モデルにおける G-CSF の治療効果およびその作用機序について検討したので報告する。

B. 研究方法

成雌 SD ラットを全身麻酔下に T8/9 で椎弓切除し、IH injury device (200Kdyne) にて脊髄圧挫不全損傷モデルを作成、動物を

2群に分割した；対照群（溶媒のみ）、G-CSF群（recombinant human G-CSF 15 μ g/kg/day）。薬剤は経静脈的に術当日（術後1時間）から5日間連続投与した。G-CSF投与量は、ヒトへの投与量および脳梗塞モデルへの投与量（Schneider, 2005）を参考にした。

毎週経時的に後肢運動機能評価を術後6週まで行い、屠殺した。これとは別に術後10週の動物で別項目の後肢運動機能評価を行った。組織学的評価は、実験ごとに損傷脊髄を採取し、組織標本を作製した。慢性期実験については行動学的評価に用いた動物より組織標本を作成した。標本作成方法として、損傷部を中心に2mm間隔で頭尾側に6mm遠位まで脊髄横断面での凍結切片を作成した（頭側より順にR6、R4、R2、C2、C4、C6）。観察切片は各実験に応じて決定した。

（急性期実験）

①術後72時間の対照群の損傷脊髄を採取、組織学的検討として免疫二重染色を行い、G-CSF受容体（G-CSFR）の存在を確認した。脊髄内在性細胞であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアに対して各々MAP-2、GFAP、AFP、Iba-1をマーカーとし、G-CSFRと二重陽性になるものを検討した。

②術後12・24・72時間にて脊髄を摘出し、RNAを抽出、Real-time RT PCRにて炎症性サイトカインのmRNAを検出（使用プライマー：Taqman^R Assay-on-demand；IL-1 α 、TNF- α ）、両群間で比較した（n=4）。表記に際し、内因性コントロールにより標準化した後、術後12時間のG-CSF群のデータを基準として各データを対数値表示した。

③術後12時間・24時間にて炎症性サイト

カインを発現している外来性炎症性細胞の割合を調べる目的で、損傷脊髄組織標本の免疫二重染色を行った（n=4、観察切片はR4、C4）。炎症性サイトカインマーカーとしてIL-1 α 、外来性炎症細胞のマーカーとして白血球系細胞を標識するmyeloperoxidase（MPO）を用い、二重陽性細胞数を計測し両群間で比較した。

④術後72時間・1週間にて脊髄を摘出。組織検討として免疫二重染色を行い、オリゴデンドロサイトのアポトーシスにつき評価した（n=4、観察切片はR6、R4、C4、C6）。アポトーシスにいたった細胞のマーカーとしてcaspase-3-active、オリゴデンドロサイトのマーカーとしてadenomatous polyposis coli（APC）を用いて二重陽性細胞数をカウントし、これをAPC陽性細胞数で除した値をオリゴデンドロサイトのアポトーシス率として両群間で比較した。

（慢性期実験）

⑤術後6週の組織にて髄鞘染色（Luxol Fast Blue（LFB）染色）による残存白質の評価を行った（n=10、観察切片はR6、R4、R2、C2、C4、C6）。白質全体の面積に占めるLFB陽性となる面積を正常髄鞘残存率として、両群間で比較した。またその組織中のオリゴデンドロサイト数を調べる目的で同じ動物の隣接切片を用いて免疫染色を行った。オリゴデンドロサイトのマーカーとしてAPCを用い、その数を計測・両群間で比較した。

⑥BBB locomotor scale（Basso, 1995）を用いて損傷直後より術後6週まで各群ラットの後肢運動機能回復を経時的に評価し、両群間で比較した（n=10）。これに加え、別の動物で術後10週のinclined-plane test（Teng,

2002) を行い両群間で比較検討した (n=5)。また、BBB locomotor scale の点数と実験⑤の正常髄鞘残存率の相関関係を求めた。

(使用抗体)

G-CSFR (1:200, Abcam)

MAP-2 (1:400, Chemicon)

GFAP (1:400, Sigma)

APC (1:400, Calbiochem)

Iba-1 (1:400, Wako)

Caspase-3-a (1:400, R&D systems)

IL-1b (1: 200, Serotec)

MPO (prediluted, Abcam)

RNA 抽出には Rneasy RNA isolation kit (Qiagen)、Real-time RT PCR には Model 7500 sequence detector (Applied Biosystems) を用いた。

組織学的検討には、Eclipse E600 (Nikon)、Scion-image (ver.4.0.3, Scion Corporation) を用いた。

統計学的解析には、2 群間の比較に student-t 検定、実験⑤の経時的行動学的評価に repeated-measures ANOVA 検定 (post-hoc として student-t 検定)、BBB locomotor scale と正常髄鞘残存率との相関関係に Pearson の相関関係検定を用いた。

(倫理面での配慮)

実験動物の管理は千葉大学医学部の実験動物扱い規約に準じて行われた。

C. 研究結果

a. G-CSFR の存在

①術後 72 時間の脊髓切片上にて免疫二重染色で G-CSFR の存在を確認した (Fig. 1)。G-CSFR と二重陽性となったのはニューロン (Fig. 1 A-C, 矢頭) およびアストロサイト (Fig. 1 D-F, 矢頭) であった。一方、

オリゴデンドロサイト (Fig. 1 G) およびミクログリア (Fig. 1 H) には G-CSFR は認められなかった。

b. 抗炎症作用

②術後 12、24、72 時間で Real-time RT PCR を行った (Fig. 2)。術後 12 時間で TNF- α (Fig. 2 A)、IL-1 α (Fig. 2 B) と mRNA 発現レベルが G-CSF 群 (Fig. 2 A, B, closed column) で対照群 (Fig. 2 A, B, open column) に対し有意に低減していた ($p>0.05$)。

③術後 12、24 時間の脊髓切片上で IL-1 α と MPO の免疫二重染色を行った (Fig. 3)。IL-1 α と MPO の二重陽性となる細胞が炎症性の白血球系細胞であることを示している (Fig. 3 A-C, 矢頭)。IL-1 α 陽性細胞の $93.5 \pm 1.9\%$ が MPO を発現していた。術後 12、24 時間とも MPO 陽性細胞数に両群間の差は無かった (data not shown)。術後 12、24 時間の両方で、IL-1 α と MPO 二重陽性細胞数は G-CSF 群 (Fig. 3 D, closed column) で対照群 (Fig. 3 D, open column) に対し有意に減少していた ($p>0.01$)。

c. オリゴデンドロサイトに対しての抗アポトーシス作用

④術後 72 時間、1 週間で Caspase-3-a と APC の免疫二重染色を行った (Fig. 4)。Caspase-3-a と APC の二重陽性となる細胞がアポトーシスにいたったオリゴデンドロサイトであることを示している (Fig. 4 A-C, 矢頭)。術後 72 時間でオリゴデンドロサイトのアポトーシス率は G-CSF 群 (Fig. 4 D, closed column) で対照群 (Fig. 4 D, open column) に対し有意に軽減した (Fig. 4 D, R6, R4: $p<0.05$, C6: $p<0.01$)。同様に術後 1 週間でもオリゴデンドロサイトのアポトーシス

率は G-CSF 群 (Fig. 4 E, closed column) で対照群 (Fig. 4 E, open column) に対し有意に軽減した (Fig. 4 E, R6: $p < 0.05$, R4, C4, C6: $p < 0.01$)。

d. 脱髄軽減作用および行動改善

⑤術後 6 週間の切片上で髄鞘染色を行った (Fig. 5 A-E)。G-CSF 群 (Fig. 5 B, D) では対照群 (Fig. 5 A, C) に対して髄鞘が良好に残存していることが確認された。正常髄鞘残存率は G-CSF 群 (Fig. 5 E, closed column) で対照群 (Fig. 5 E, open column) に対し有意に高かった (Fig. 5 E, R6, C6: $p < 0.05$, R4-C4: $p < 0.01$)。また、同じ動物の隣接切片を用いて APC による免疫染色を行ったところ、G-CSF 群 (Fig. 5 F, closed column) では対照群 (Fig. 5 F, open column) に対して APC 陽性細胞数が有意に多く認められた (Fig. 5 F, R6, R4, C6: $p < 0.05$)。

⑥術後 6 週までの後肢運動機能の回復を BBB locomotor scale により経時的に観察した (Fig. 6 A)。G-CSF 群 (Fig. 6 A, closed circle) では対象群 (Fig. 6 A, open circle) に比べて後肢運動機能が有意に回復した (Fig. 6 A, ANOVA $p < 0.05$)。各週の比較では、3 週目以降で有意に G-CSF 群の点数が良好となり、最終平均点数は対象群が 9.7 ± 0.3 点であったのに対し、G-CSF 群 12.8 ± 0.9 点であった (Fig. 6 B, $p < 0.01$)。術後 10 週の Inclined plane test では、対象群が 31.7 ± 4.4 度であったのに対し、G-CSF 群 50.0 ± 2.7 度であった (Fig. 6 B, $p < 0.01$)。また、BBB locomotor scale と正常髄鞘残存率には、正の相関関係が認められた ($r = 0.676$, $p < 0.01$)。

D. 考察

G-CSF の神経保護効果に関しては脳梗塞

モデルでの報告がなされており、メカニズムとしては神経細胞のアポトーシス抑制効果 (Schneider, 2005)、炎症性サイトカインの発現低下 (Gibson, 2005, Komine, 2005) などが考察されている。また、オリゴデンドロサイトのアポトーシスにより脱髄が生じる事が報告されている (Crowe, 1996)。

今回の実験により、脊髄損傷急性期において、G-CSF が炎症性サイトカインの mRNA 産生を抑制し、損傷脊髄に外来性に浸潤してくる白血球系細胞の IL-1 α 産生を抑制するなど、抗炎症作用をもつことが示された。また、G-CSF は脊髄損傷急性期のオリゴデンドロサイトのアポトーシスを抑制することが示された。G-CSFR がオリゴデンドロサイト上に発現していないことより、G-CSF のオリゴデンドロサイトに対しての抗アポトーシス作用は、抗炎症作用による二次的なものか、アストロサイトなど G-CSFR を発現している細胞を介した間接的作用であることが考えられる。また、脊髄損傷慢性期においては G-CSF により、脱髄の軽減と後肢運動機能の改善がもたらされた。過去の研究で我々は、G-CSF 受容体が神経細胞上に発現、G-CSF 投与により急性期の神経細胞死が抑制される事を示した。すなわち、G-CSF の脊髄損傷に対しての効果は、急性期におけるニューロンに対しての直接的な抗アポトーシス作用、オリゴデンドロサイトに対しての間接的な抗アポトーシス作用、抗炎症作用などにより、二次損傷軽減に働き、後肢運動機能の改善に繋がったと考えられる (Fig. 7)。

E. 結論

G-CSF はラット脊髄圧挫損傷モデルで神

経・神経膠細胞に対しての神経保護作用と抗炎症作用を持ち二次損傷軽減に働く。

また、G-CSF は既に臨床認可されている薬剤であり、その点でも今後の臨床応用を検討する上で有利である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 門田領, 国府田正雄, 西尾豊, 大河昭彦, 山崎正志: 脊髄損傷における顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor : G-CSF) の神経保護作用. 日本脊髄障害医学雑誌 20 (1) : 180-181, 2007.

2. 学会発表

1. 門田領, 国府田正雄, 染谷幸男, 大河昭彦, 山崎正志, 守屋秀繁: ラット脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte Colony-Stimulating Factor: G-CSF) の治療効果. 第 21 回日

本整形外科学会基礎学術集会 長崎
平成 18 年 10 月 19-20 日

2. 門田領, 国府田正雄, 橋本将行, 西尾豊, 染谷幸男, 萬納寺誓人, 宮下智大, 大河昭彦, 山崎正志, 守屋秀繁: 脊髄損傷における顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor : G-CSF) の神経保護作用. 第 41 回日本脊髄障害医学会 千葉 平成 18 年 11 月 9-10 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

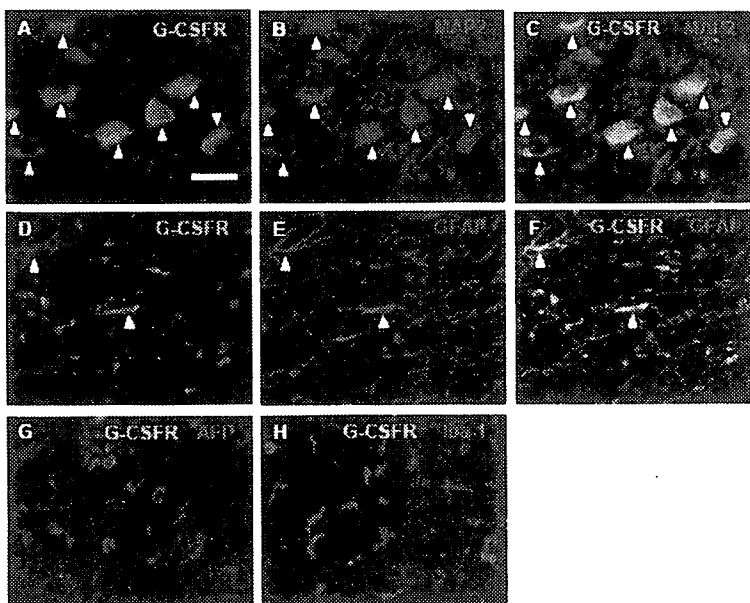


Fig. 1 G-CSFR と細胞特異抗体との免疫二重染色 (術後 72 時間)

A-C : G-CSFR / MAP2 二重染色、D-F : G-CSFR / GFAP 二重染色 ; ニューロンおよびア

ストロサイトに G-CSFR 発現が認められた。G : G-CSFR / AFP 二重染色、H : G-CSFR / Iba-1 二重染色 ; オリゴデンドロサイトおよびミクログリアには G-CSFR 発現が認められなかった。A-F 矢頭は各発現細胞を示す(bar=50 μ m)。

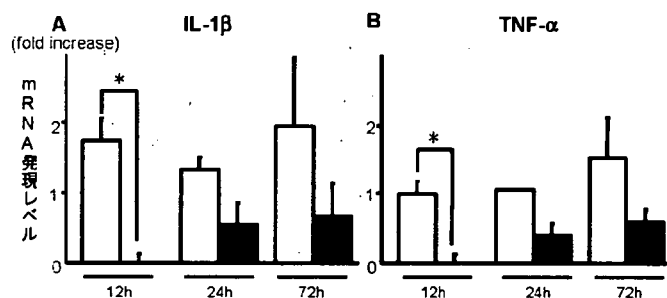


Fig. 2 G-CSF による各炎症性サイトカイン mRNA 発現の変化

A : IL-1b ; 術後 12 時間で G-CSF 群で有意に発現が低下した。B : TNF-a ; 術後 12 時間で G-CSF 群で有意に発現が低下した (open column : 対象群、closed column : G-CSF 群、* : $p < 0.05$ 、bars: \pm S.E.)。

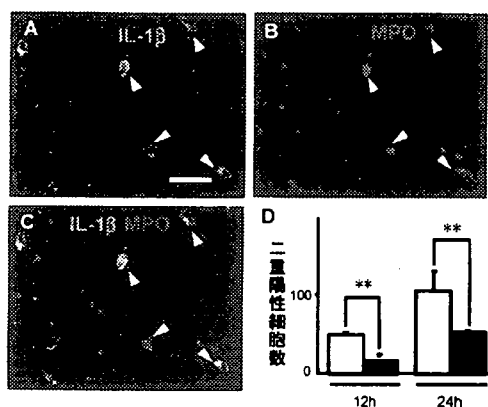


Fig. 3 炎症性好中球数の変化

A-C : IL-1b / MPO 二重染色 ; 術後 24 時間での像。矢頭は各発現細胞を示す(bar=50 μ m)。D : 術後 12、24 時間で G-CSF 群で有意に IL-1b / MPO 二重陽性細胞数が低下した (open column : 対象群、closed column : G-CSF 群、** : $p < 0.01$ 、bars: \pm S.E.)。

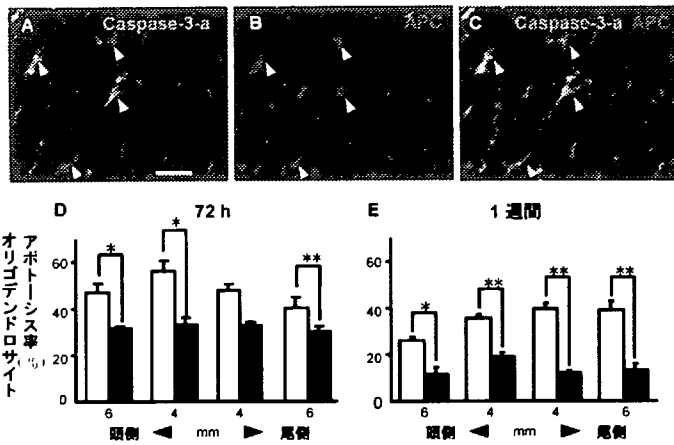


Fig.4. オリゴデンドロサイトアポトーシス率の変化

A-C : Caspase-3-a / APC 二重染色 ; 術後 72 時間での像。矢頭は各発現細胞を示す (bar=50 μ m)。D : 術後 72 時間、1 週間で G-CSF 群で有意にオリゴデンドロサイトアポトーシス率が低下した (open column : 対象群、closed column : G-CSF 群、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、bars: \pm S.E.)。

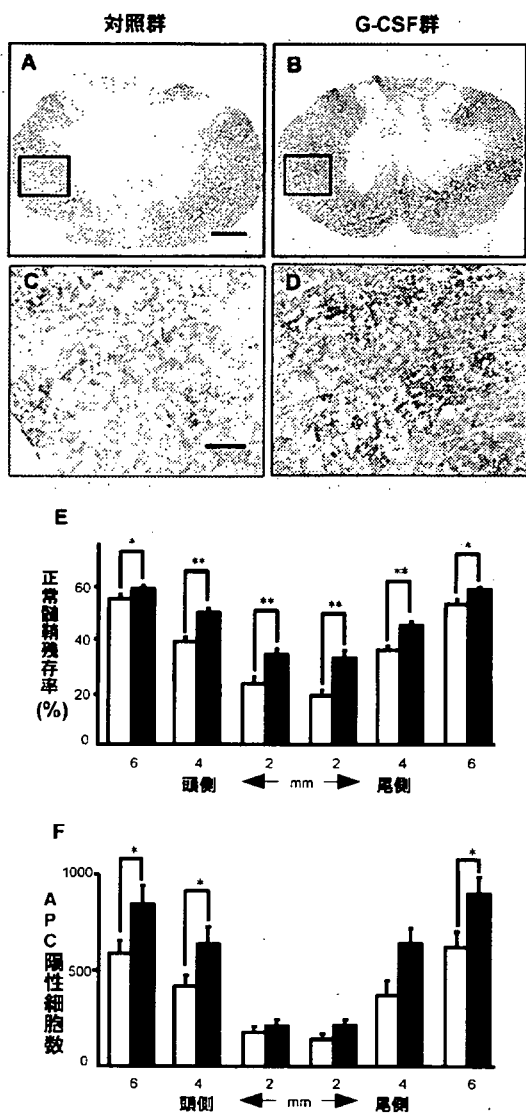


Fig.5

A-D: 髓鞘染色; 術後6週間での像。対象群 (A, C) に対して、G-CSF 群 (B, D) では髓鞘が良好に残存している (bar=500 μ m (A, B), 100 μ m (C, D))。E: G-CSF 群では各切片で有意に正常髓鞘残存率が高かった。F: G-CSF 群では各切片で有意に APC 陽性細胞数が多かった (open column: 対象群、closed column: G-CSF 群、*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、bars: \pm S.E.)。

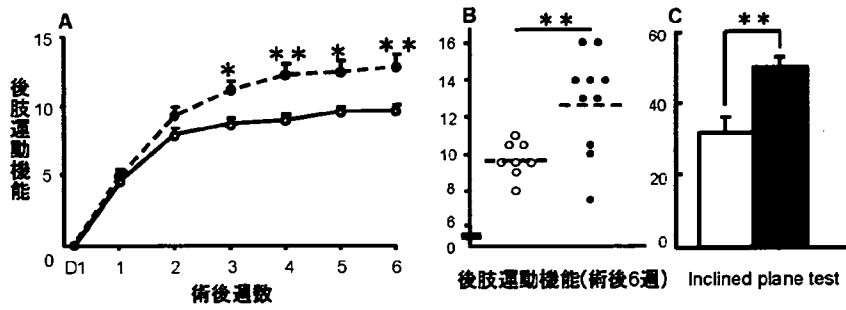


Fig. 6 後肢運動機能評価

A, B: BBB locomotor scale による評価。A: G-CSF 群の後肢運動機能は術後 6 週間の経過で対象群に比べ有意に改善した。B: 受傷後 6 週の時点で 9.7 ± 0.3 点であったのに対し、G-CSF 群 12.8 ± 0.9 点であった (A, B: open circle: 対象群、closed circle: G-CSF 群、ANOVA $p < 0.05$ 、post-hoc: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。C: 術後 10 週の Inclined plane test での評価でも対象群が 31.7 ± 4.4 点であるのに対して、G-CSF 群が 50.0 ± 2.7 点と有意な改善を示した (open column: 対象群、closed column: G-CSF 群、**: $p < 0.01$ 、bars: \pm S.E.)。

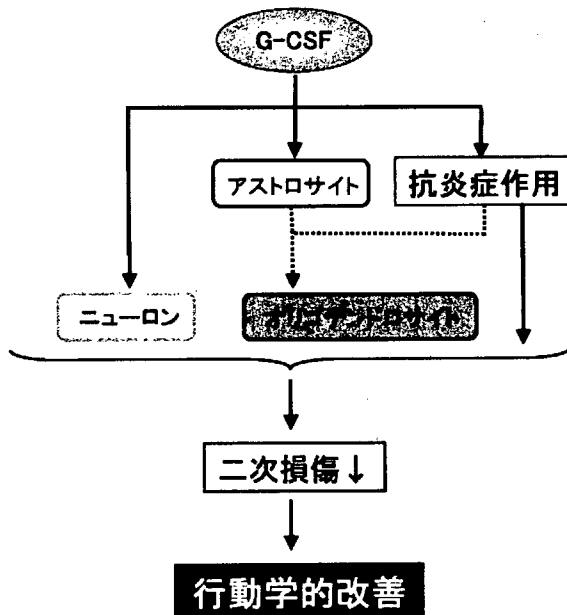


Fig. 7 脊髄損傷における G-CSF の効果

twy mouse および SCI model における
アデノウイルスベクターを用いた BDNF/NT-3 gene transfer の解析

福井大学医学部 器官制御医学講座 整形外科学領域

中嶋秀明、内田研造、犬飼智雄、高村敬晴、彌山峰史、佐藤竜一郎、馬場久敏

研究要旨 急性頸髄損傷モデルおよび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) は上中位頸髄を中心として脊髄副神経内側核に発現していた。BDNF 投与群では、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の減少が抑制されていた。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。逆行性導入は、障害脊髄に対して非侵襲的であり、直接導入と遜色ない導入効率を示し、持続する neurotrophic support のため前角細胞に対して有用な保護効果が得られると考えられ、急性脊髄損傷のみならず、脊髄圧迫障害にも応用可能と思われた。

A. 研究目的

脊髄は慢性に圧迫を受けると、圧迫部を中心に神経細胞は萎縮し、細胞数が減少し、最終的には cell death に陥る。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、特に圧迫部近傍部では BDNF や NT-3 といった神経栄養因子およびその receptor の発現の上昇し、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^{1,2,4-8)}。また、急性脊髄損傷において

も、損傷後の内因性神経栄養因子発現が低い微小環境が、損傷を助長させ再生を困難にしている要因のひとつと報告されている。

このことから、外因性に神経栄養因子を投与することは合理的と考えられるが、その投与方法に関しては極めて多くの議論がある。損傷脊髄内へ直接投与する方法では、高い導入効率を得られる反面、損傷範囲の拡大、機械的炎症反応や necrosis の助長、という重大な影響を蒙りかねないとも考えられる。我々は、急性損傷脊髄および慢性圧迫脊髄に神経栄養因子を非侵襲的に投与する目的で、副神経脊髄核の target organ である胸骨乳突筋から逆行性に adenovirus vector を用いて神経栄養因子遺伝子の導入を行い、頸髄残存ニューロンの生存維持、再生能力の賦活化効果について解析することを目的とした。

B. 研究方法

β -galactosidase, mouse BDNF, NT-3 をそれぞれ組み込んだ非増殖型 adenovirus vector (AdV-LacZ, AdV-BDNF, AdV-NT-3) を COS-TPC 法にて作製、精製した²³。

実験動物には、(1) 急性脊髄損傷：頸髄圧挫損傷モデル (SD rat: 50g/5-min; C4) を作成し、損傷直後に胸骨乳突筋より AdV-BDNF, -LacZ を注入し、経時的 (3 時間~4 週) に評価した。(2) 慢性脊髄圧迫モデル：twy mouse を用い、16 週齢で胸骨乳突筋より AdV-BDNF, -LacZ を注入し、20 週齢で評価した。LacZ 遺伝子の発現を X-gal 染色、残存 neuron の評価として、50 μ 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。抗 BDNF, activated-caspase-3 抗体を用いた免疫染色、immunoblot analysis 及び TUNEL 染色を行った。

C. 結果

1) X-Gal 染色

SD rat, twy マウス、ICR マウス共に、脊髄前角部に陽性細胞が確認された (図 1)。

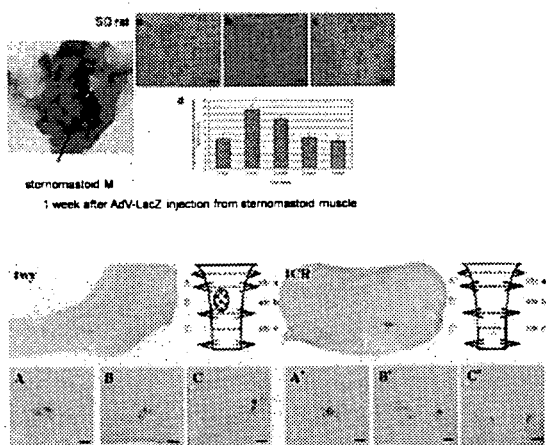


図 1. X-gal staining

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

(i) 急性損傷モデル

BDNF 免疫染色の経時的評価では、LacZ 導入ラットでは認めなかった抗 BDNF 抗体陽性細胞が、BDNF 導入ラットでは脊髄前角部において損傷後 4 週まで観察された (図 2)。immunoblot analysis では、LacZ 導入ラットでは、損傷後 3 日目ではわずかに内因性 BDNF と思われる band を認めるのみであったのに対し、BDNF 導入ラットでは、損傷後 1-2 週をピークに 4 週まで density の強い band を認めた (図 3)。残存ニューロンの評価では、BDNF 導入ラットで control に比べ有意に前角細胞が rescue されており、また細胞体の atrophy も抑制されていた (図 4)。各高位別の残存神経細胞数を調べると、特に損傷近傍部で有意に神経細胞が rescue されていた。また、activate-caspase-3 や TUNEL 染色を用いた apoptosis の評価において、BDNF 導入ラットでは、その抑制効果が確認されました (図 5)。

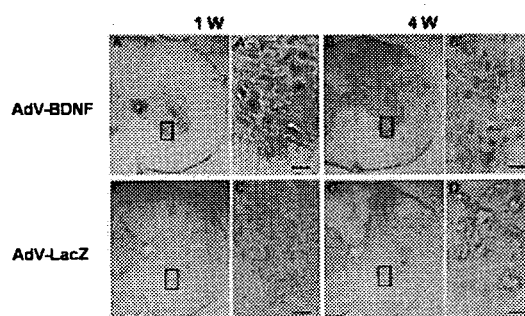


図 2. BDNF 免疫染色

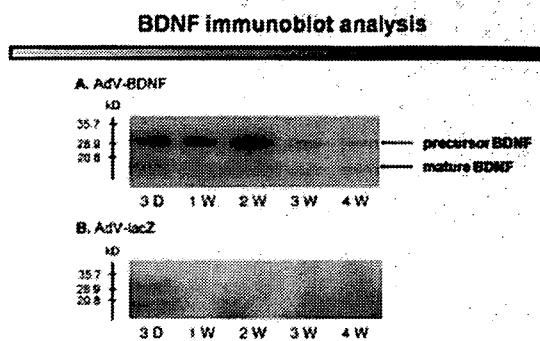


図 3. BDNF immunoblot analysis

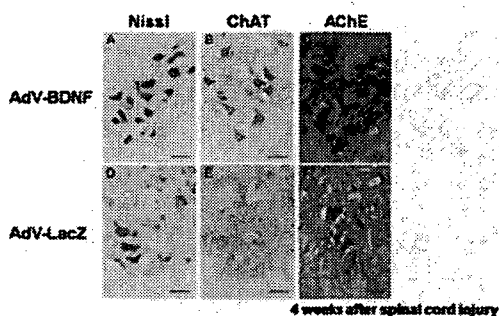


図 4. 残存ニューロンの評価

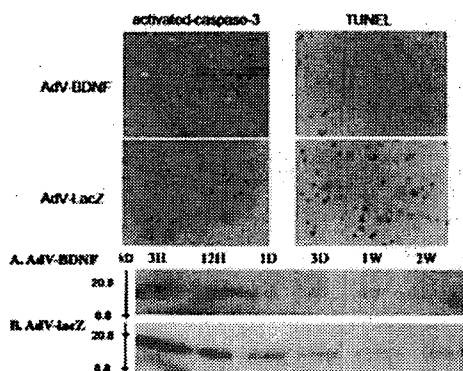


図 5. apoptosis 評価

(ii) 慢性圧迫モデル (twy/twy)

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 6)。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 6)。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 7 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 8)。逆行性色素 HRP を用いて、樹状突起や細胞体面積などを評価したところ、NT-3 導入 twy mouse ではコントロールに比べ、樹状突起の数、長さが有意に大きい値を示した(図 9)。

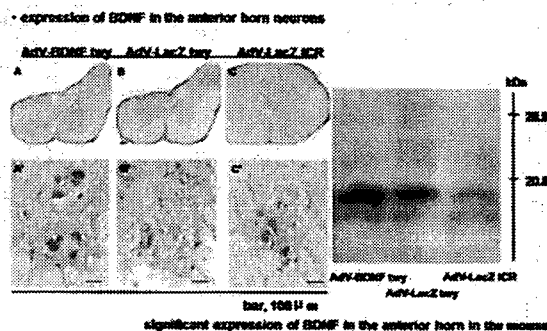


図 6. BDNF immunoreactivity; immunoblot analysis of BDNF

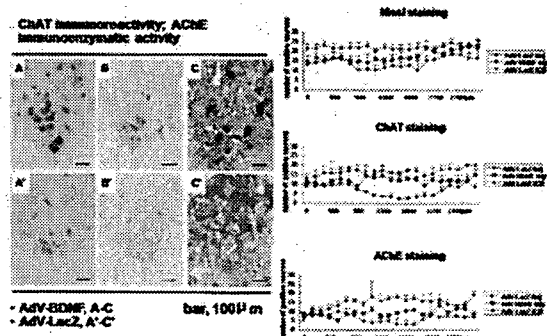


図 7. 残存ニューロンの評価

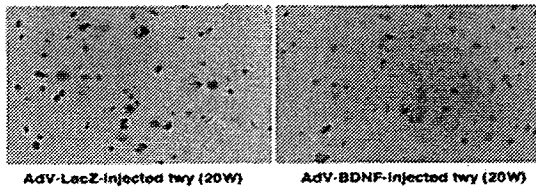


図 8. TUNEL 染色

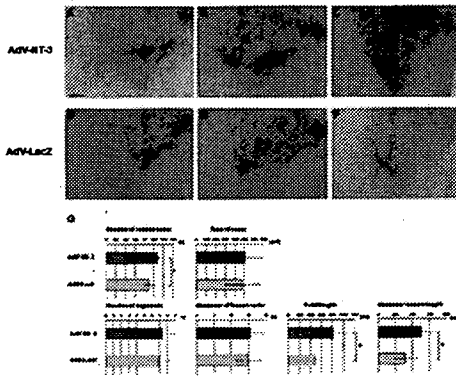


図 9. 逆行性色素 HRP での評価

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ける、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。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^{1,3)}。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³⁾。

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

逆行性導入は、障害脊髄に対して非侵襲的であり、直接導入と遜色ない導入効率を示し、持続する neurotrophic support のため前角細胞に対して有用な保護効果が得られると考えられ、急性脊髄損傷のみならず、脊髄圧迫障害にも応用可能と思われた。

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* 24: 703-712, 2007

- 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* 24: 703-712, 2007

- 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

脊髄の運動速度が脊髄障害に及ぼす影響

分担研究者 加藤 圭彦、 田口 敏彦 山口大学整形外科

研究要旨 三次元有限要素モデルを用いて、頸椎後縦靭帯骨化症における非骨傷性脊髄損傷発生メカニズムの解明を試みた。脊髄に背髄前後径の 20%の準静的圧迫を加えた状態で、脊髄を 5 (deg)前屈させ、屈曲角度は 0.5、5、50 (deg/sec)として、脊髄内の応力を求めた。脊髄の運動速度の増加により脊髄内の応力は上昇したが、速度の増加の程度と応力上昇の程度は必ずしも一致しなかった。脊髄の急速な運動は脊髄損傷の一因となり得るが、pincers mechanism の方が脊髄損傷に及ぼす影響は大きいものと考えられた。

A. 研究目的

非骨傷性脊髄損傷では、骨折や脱臼等による脊髄に対する高度の圧迫が認められないにもかかわらず、脊髄損傷を生じる。脊髄障害の原因として、脊髄に対する圧迫が主要な因子と考えられるが、脊髄自体の運動による応力集中も重要な因子として推察される。特に頸椎後縦靭帯骨化症では軽微な外傷でも脊髄損傷を生じると報告されており、生理的運動の範囲内でも脊髄損傷が生じていると思われる場合もあり、脊髄の運動速度の脊髄損傷の発生に対する関与が推察される。今回、非骨傷性脊髄損傷発生のメカニズム解明を目的として、脊髄の運動速度の違いが脊髄内に生じる応力に及ぼす影響を検討したので報告する。

B. 研究方法

灰白質、白質および軟膜からなる脊髄モデルを 2次元平面上でメッシュ分割し、これをもとに 3次元脊髄モデルをコンピュータ上で作成した。脊髄後方を前後方向に移動しないように固定した状態で、前方から平板上因子により脊髄に脊髄前後径の 20%まで準静的圧迫を加えた。脊髄を 5 (deg)前

屈させ、屈曲角度は 0.5、5、50 (deg/sec)として、脊髄内の応力を求めた。解析には本研究用に作成した 3次元有限要素法プログラムを使用した。

(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、非常に軽度であった。0.5 (deg/sec)では脊髄内の応力は上昇し、5 (deg/sec)では更に応力の上昇が高度であった。50 (deg/sec)では更に応力が上昇したが、5 (deg/sec)から 50 (deg/sec)においては、0.5 (deg/sec)から 5 (deg/sec)ほどの差は見られなかった。

D. 考察

非骨傷性脊髄損傷は過伸展損傷が多く、そのメカニズムとして Taylor らの黄色靭帯のたぐれ込みや Penning らの bony pincers mechanism による脊髄の圧迫が主要因であるとされてきた。しかし、頸椎後縦靭帯骨化症においては、非常に軽微な外傷、つまり生理的運動の範囲内

で生じたと思われる脊髄損傷や症状の急激な増悪を認めることが少なくない。今回、頸椎後縦靭帯骨化症のモデルとして、脊髄前後径の20%準静的圧迫モデルを作成した。本モデルに3種類の運動速度で屈曲させて応力解析を行うと、屈曲速度の増加に伴って脊髄内の応力も上昇した。しかし、屈曲速度の増加の程度と応力上昇の程度は必ずしも一致しなかった。従って、脊髄の急速な運動は脊髄損傷の一因となり得るが、pincers mechanismの方が脊髄損傷に及ぼす影響は大きいものと考えられた。

E. 結論

三次元有限要素モデルを用いて、非骨傷性脊髄損傷発生メカニズムの解明を試みた。脊髄の運動速度の増加により脊髄内の応力は上昇したが、速度の増加の程度と応力上昇の程度は一致しなかった。脊髄の急速な運動は脊髄損傷の一因となり得るが、pincers mechanismの方が脊髄損傷に及ぼす影響は大きいものと考えられた。

F. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

- 1) 脊髄の運動速度が脊髄障害に及ぼす影響
—有限要素法を用いた力学的解析— 加藤圭彦、市原和彦、今城靖明、八道謙太郎、河野俊一、田口敏彦. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会 2007年10月
- 2) 脊髄の運動速度が脊髄障害に及ぼす影響
—有限要素法を用いた力学的解析— 加藤圭彦、市原和彦、今城靖明、田口敏彦. 第34

回日本臨床バイオメカニクス学会 2007年12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

脊椎運動機能障害の日常生活動作への影響に関する研究

分担研究者 米延 策雄 国立病院機構大阪南医療センター副院長

研究要旨 頸椎後縦靭帯骨化症（OPLL）では、骨化靭帯による頸髄圧迫による症状、すなわち頸髄症による障害が大きいため、本症の重症度評価あるいは障害評価は頸髄症の評価となっていた。しかし、本症では頸椎中心に脊柱の運動障害も症候としては頻度が高く、訴えとしても頻度は高い。これらに付いての評価は未だ十分でなく、頸椎運動障害が日常生活動作やQOLに及ぼす影響を調査した。

A. 研究目的

頸椎後縦靭帯骨化症（以下、OPLL）ではその神経症状、すなわち頸部脊髄症に治療の焦点が当てられてきた。しかし、OPLLでは頸椎あるいは脊柱全体の可動障害も頻繁に見られる症状であり、愁訴としてもしばしば聞かれるものである。有効な治療法がないこともあり、これについては十分な調査が成されていない。しかし、脊椎の機能は支持、運動、脊髄保護であり、これらについての評価も今後の治療の方向性を考える意味でも重要であり、脊柱可動制限が日常生活動作やQOLに及ぼす影響を調査した。

B. 研究方法

日常生活動作ならびにQOLについては、新しく開発された日本整形外科学会頸部脊髄症評価質問票により行った。

なお、データは上記質問票開発の際に蓄積されたデータを利用した。頸椎の可動性はエックス線動態撮影から計測した。

対象は頸椎症性脊髄症、頸椎椎間板ヘルニア、ならびに本症であり、また頸部になんらの愁訴のないボランティアを比較対象とした。

（倫理面での配慮）

当該施設のIRBによる審査を受けた後、実施したアンケート調査のデータなどの活用である。

C. 研究結果

データの解析は未だ全ては完了していない。しかし、解析し得た範囲では、OPLLでは他の疾患に比べて頸椎の可動性による日常生活動作の障害が大きく、これに関連してQOLが低下していることが示唆された。

D. 考察

頸椎の可動域は大きく、視覚にたよるヒトにとって、頸椎の可動性は日常生活のほとんどに影響する。現時点でのデータは未確定であるが、頸椎可動域の低下は日常生活動作の多くを障害しており、その障害によるQOLの低下は頸髄症による運動麻痺に比して軽いものではない。

現時点では、頸椎あるいは脊柱靭帯の骨化による脊柱の可動制限を回復することのできる治療法はない。日常診療ではストレッチなど運動性の維持が可能と思われる生活指導などが行われているが、これの有効性は直接には確認されておらず、今後は現在可能な治療法の評価を行うと共に、新しい治療法の開発の必要性があると考えられる。

E. 結論

頸椎後縦靭帯骨化症では頸椎の可動制限ならびにこれによる頸部痛が日常生活動作やQOLを阻害している可能性が示唆され、今後その詳細な分析と共に治療法開発の必要性が示された。

F. 研究発表

2. 学会発表

第37回日本脊椎脊髄病学会応募中

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし。

三次元 CT を用いた頸椎後縦靭帯骨化症の骨化形態に関する研究

分担研究者 川口善治、漆崎亜弥、関 庄二、堀 岳史、木村友厚
富山大学整形外科学

研究要旨

三次元 CT (以下 3D-CT) 像を用いて、OPLL の骨化形態を立体的に把握し、単純 X 線側面像で捉えられる骨化巣の所見との比較検討を行った。OPLL と診断された 54 例を対象とし、頸椎単純 X 線側面像と Multiditector CT による後頭骨から頸椎全体の CT 像を撮像し、比較を行った。3D-CT 像で骨化形態を検討した結果、16 例 (30%) で X 線側面像での分類と 3D-CT 像上の骨化形態が異なった。このうち 9 例 (17%) で、単純 X 線側面像では骨化がみられなかった部位にも 3D-CT 像で骨化の存在が認められた。以上より 3D-CT 像は OPLL の骨化形態を把握する上で単純 X 線像では捉えられない詳細な情報をもたらすことが可能であり、有用な検査法になり得ると考えられた。さらに今後は 3D-CT 像を用いた新たな骨化巣分類の作製を行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症 (以下 OPLL) は、単純 X 線側面像によって、連続型、混合型、分節型、その他型の 4 型に分類されるが、詳細な骨化巣の把握は困難な場合がある。我々は、三次元 CT (以下 3D-CT) 像を用いて、OPLL の骨化形態を立体的に把握し、単純 X 線側面像で捉えられる骨化巣の所見との比較検討を行った。

B. 研究方法

対象は OPLL と診断された 54 例 (男性 35 例、女性 19 例) であり、平均年齢 65.4 歳であった。このうち頸椎の手術を受けている患者は 35 例であった。来院時に全患者で頸椎単純 X 線側面像を撮影し、同日に Multiditector CT による後頭骨から頸椎全体の CT 像を撮像した。OPLL の骨化巣は頸椎単純 X 線像にて連続型、混合型、分節型およびその他型に分類した。Multiditector CT による画像は 0.75mm 厚のスライス幅で撮り、これを用いて 3D 画像を構築した。その後、window 幅を骨条件に合わせ、椎弓を画像から除去し、後方から OPLL の骨化形態を観察した。そこで検者 3 人によって、単純 X 線側面像から得た OPLL の骨化形態と 3D-CT 像から得た所見との比較を行った。次に C2 から C6 椎体および椎間板レベルそれぞれでの骨化巣の領域について、単純 X 線像と 3D-CT 像で比較検討した。さらに 3D-CT 像の骨化領域と MRI 上の脊髄圧迫レベルについても検討を行った。

C. 研究結果

頸椎単純 X 線像では連続型 24 例、混合型 12 例、分節型 16 例、その他型 2 例であった。