

さらに1週齢の頭蓋冠における BrdU 免疫染色で骨芽細胞増殖能も低下していた。

ノックアウトマウスの解析から、Cthrc1 は骨芽細胞性骨形成を刺激することで生後骨量を調節する役割があると考えた。そこで、骨芽細胞において Cthrc1 を過剰発現する Colla1-Cthrc1 トランスジェニックマウスを作製した。ノックアウトマウスと同様、骨格形成に明らかな異常は認められなかったが、2か月齢トランスジェニックマウスでは骨形成能亢進に伴う骨量、骨梁数、骨芽細胞数の増加を認め(図3)、1週齢の頭蓋冠における BrdU 免疫染色においても骨芽細胞増殖能の亢進を認めた。

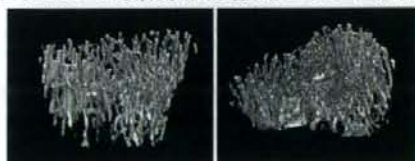


図3 野生型 トランスジェニック

これらのマウスの解析から Cthrc1 は骨芽細胞増殖を伴う骨形成能を刺激して骨量を増加させる働きがあると推測した。

In vitro における Cthrc1 の機能をノックアウトマウス、及びトランスジェニックマウスから採取した初代骨芽細胞と骨髄細胞を用いて解析した。頭蓋冠から採取した初代骨芽細胞を用いた BrdU アッセイと骨芽細胞特異的マーカー遺伝子の発現解析、そして骨髄細胞を用いたコロニー形成単位アッセイを行ったところ、Cthrc1 は骨芽細胞の増殖、分化を刺激することがわかった。

OPLL においては後縦靭帯の骨化部位に一致して、Cthrc1 の発現が認められた(図4)。



図4

D. 考察

in vitro および in vivo の解析から Cthrc1 が骨芽細胞の増殖、分化を促進することにより骨量を増加させる機能があることが明らかとなり、骨粗鬆症などの骨疾患に関与している事が示唆された。

E. 結論

Cthrc1 は骨芽細胞増殖を刺激し、骨芽細胞性骨形成能を高めて生後骨量を調節するという重要な役割があることが推察された。また、後縦靭帯の骨化においても作用していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kimura H, Kwan KM, Zhang Z, Deng JM, Darnay BG, Behringer RR, Nakamura T, de Crombrugge B, Akiyama H. Cthrc1 is a positive regulator of osteoblastic bone formation. PLoS ONE. 2008 Sep 9;3(9):e3174.

2. 学会発表

木村浩明など: 遺伝子 HA4 は骨芽細胞性骨形成を促進することにより生後骨量を増加させる。第23回日本整形外科学会基礎学術集会。日本整形外科学会雑誌 82(8), S974

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

3. 0T MRI/18FDG-PET fusion neuroimaging を用いた脊髄ニューロン代謝の新しい画像解析

研究分担者 内田 研造¹⁾、中嶋 秀明¹⁾、土田龍郎²⁾、木村浩彦²⁾、
工藤 崇³⁾、岡沢秀彦³⁾、馬場久敏¹⁾

¹⁾ 福井大学医学部整形外科、²⁾ 同大学放射線科、³⁾ 高エネルギー研究センター

研究要旨 FDG-PET 画像より得られた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、治療成績について大きな示唆を与えるものであると考えられる。頸髄 FDG-PET 画像の正確な高位設定、脊髄実質評価のより詳細な評価を行う目的で、頸髄 FDG-PET 画像と、MRI 画像の融合画像を作成する新たな技術の可能性について検討を行った。いずれの方向にも 0.4-0.8mm スライスの画像が得られる 3T MRI より作成した 3D MRI を用いることで、正確な融合画像を得ることが可能であった。この技術を用いることで、術前の責任高位決定、術後改善予測、髄内輝度変化の評価などの脊髄実質のより詳細な評価を行うことが出来ることが期待され得ると考えられた。

A. 研究目的

頸椎後縦靭帯骨化症や頸椎症性脊髄症における脊髄症発症のメカニズムや、術後治療成績に影響をあたえる因子については、未だ不明な点が存在する。Flouro-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。我々はこれまでに高分解能 PET を用いて脊髄実質の組織代謝の側面から、頸髄グルコース代謝量を計測し、その臨床意義について報告してきた^{1),2)}。術前の頸髄グルコース代謝量は

その脊髄症状の重篤度（術前 JOA スコア）、臨床症状改善率に相関し、術後の頸髄グルコース代謝量は正常化した。¹⁸FDG-PET により求めた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、治療成績について大きな示唆を与えるものであると考えられる。

頸髄 FDG-PET 画像における正確な頸髄高位決定が行えると、責任高位の予測や脊髄実質のより詳細な評価に繋がると考えられる。今回新たな技術として、3T MRI を用い、頸髄¹⁸FDG-PET 画像と MRI 画像の融合を試みることとした。

B. 研究方法

対象は、myelopathy 症状を伴い手術加療を行った頸椎後縦靭帯骨化症および頸椎症性脊髄症手術症例のうち、頸髄 MRI にて髄内輝度変化を伴った症例で、本研究の同意を得た 8 例（男性 4 例、女性 4 例、平均年齢 61 歳）とした。術前に頸髄 ^{18}F -FDG-PET および 3T MRI 撮影を施行した。

(i) PET

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

(^{18}F -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。

(ii) MRI

MRI 装置は、高分解能での撮像が可能な 3T (Signa HDx, GE) を使用した。この画像を用い、任意方向のスライス厚 0.4-0.8mm の画像が得られる 3D MRI 画像を作成した。

(iii) 融合(fusion)画像作成

融合画像作成ソフトウェアは、AJS 社製 Dr View/LINUX を使用した。得られた ^{18}F -FDG-PET 画像と同スライスでの 3D MRI スライス画像をソフトウェア上で作成した。位置合わせ

は小脳扁桃、頸髄、咽頭などをランドマークとし、手動で PET 画像と MRI 画像を視覚的に一致させた。頸髄 MRI 画像上で横径 10.3 mm の関心領域 (ROI: range of interst) を設定し、同部位の頸髄 PET 画像にて、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 [standerized 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。

C. 結果

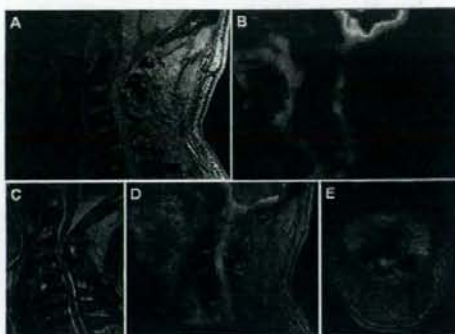
代表症例を提示する。

(症例 1)

57 歳男性、頸椎症性脊髄症、JOA score 11/17。MRI T2 強調画像上 C3-4 高位での高度な圧迫、髄内輝度変化を呈している。

3T MRI sagittal 像にて ROI を設定し (A)、同高位での ROI をソフトウェアを用いて ^{18}F -FDG-PET 画像上に描出し (B)、それぞれの SUV を測定した。

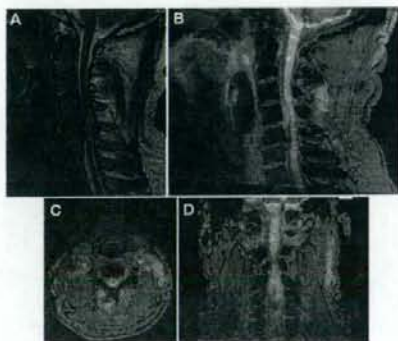
かなり高度な圧迫で、MRI mid sagittal 像では、残余脊髄の描出も困難な症例であるが、fusion 画像において C3-4 高位の髄内輝度変化部位とその周辺領域に、SUV 2.56 の高信号領域を認めた (D, E)。



症例 1. A. 3T MRI (ROI 設定), B. FDG-PET (画像 A と同位置にソフトウェア上で ROI 設定), C. MRI T2 強調画像, D. fusion 画像(sagittal), E. fusion 画像(axial)

(症例 2)

68 歳男性、頸椎後縦靭帯骨化症、JOA score 10/17。MRI T2 強調画像上、C4-6 に連続型 OPLL を認め、C4 から C5-6 高位に線上および円形の髄内輝度変化を認めた (A)。3T MRI で撮影した頸髄 MRI 画像を用いて、3D MRI 画像を作成し、3 次元方向で位置合わせを行い fusion 画像を作成した (B-D)。本症例では、髄内輝度変化と一致した SUV の亢進はみられなかった。



症例 2. A. MRI T2 強調画像, B. fusion 画像 (sagittal), C. fusion 画像(axial), D. fusion

画像(coronal)

(症例 3)

54 歳女性、頸椎症性脊髓症、JOA score 12/17。MRI T2 強調画像上、C4-5 高位に髄内輝度変化を認めた。fusion 画像では、髄内輝度変化部位と一致した SUV 2.78 の高信号領域を認めた。症例 1 のような、髄内輝度変化部位周辺にまで拡がる SUV 亢進までは認められなかった。



症例 3. A. MRI T2 強調画像, B. fusion 画像 (sagittal)

D. 考察

3T MRI 画像と ^{18}F FDG-PET 画像の融合を行う条件設定を考慮する際、当初は fusion 画像の作成のために、MRI T2 強調画像や diffusion 画像の使用を試みたが、これらの画像はスライス厚が大きく (約 4.5mm 厚)、FDG-PET 画像との正確な fusion 画像が得られにくいことが preliminary な研究によって判明した。そこで、高分解能での撮像が可能な 3T MRI から作成した 3D MRI 画像 (いずれの方向にも 0.4-0.8mm 厚での画像が得られる) を用いることとした。3D MRI 画像

は、脊髓の状態を評価する点においては、T1, T2 強調画像には劣るが、この画像を用いることで正確な fusion 画像を得ることが可能であった。

頸髄 FDG-PET の有用性はこれまで報告してきたが、FDG-PET 画像のみでは正確な高位決定ができなかったために、頸髄グルコース代謝量変化と頸髄圧迫高位との関係、髄内輝度変化との関係、責任病巣決定の可能性などについては詳細な検討は行えなかった。今回 fusion 画像を得ることで、頸髄 FDG-PET の詳細な高位決定が可能であること、脊髓圧迫や脊柱管狭窄が強い症例でも正確な評価が可能であることがわかった。髄内輝度変化についての臨床的意義については様々の論議が存在するが、除圧後の治療成績に影響をあたえる一因子であると考えられている。しかしながら、今回の検討では、髄内輝度変化部位に一致した頸髄グルコース代謝量は必ずしも一定の傾向は示しておらず、今後の検討課題であると考えられた。問題点としては、撮像時間が FDG-PET と MRI がそれぞれ 30 分は要するため、患者負担や一定姿勢の困難な患者での体動によるアーチファクトなどが挙げられた。今後、術後の画像評価も含め、さらに症例を増やし、頸髄 FDG-PET による慢性圧迫脊髓症における脊髓実質評価の可能性、有用性についてさらなる検討が必要である。

E. 結論

高分解能 PET 画像と 3T MRI で作成した 3D MRI 画像を融合させることで、頸髄 FDG-PET 画像の正確な高位設定を行うことが可能であった。今後この技術を用い、脊髓実質のより詳細な評価を行うことが出来ることが期待される。

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.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

頸椎後縦靭帯骨化症の中期手術成績～前方手術と後方手術の前向き比較～
に関する研究

研究分担者 四宮 謙一 東京医科歯科大学医歯学総合研究科整形外科分野教授

研究要旨 頸椎 OPLL に対する前方除圧固定術 (ADF) と椎弓形成術 (LAMP) の術後 5 年の臨床成績を prospective に比較した。当院で頸椎 OPLL による頸髄症患者に対して 1996, 1998, 2000, 2002 年は LAMP を、1997, 1999, 2001, 2003 年は ADF を施行した。対象は ADF 群 16 例、LAMP 群 22 例。術後 5 年の C-JOA スコア改善率は ADF 群 74%、LAMP 群 50% で、ADF 群が LAMP 群より成績良好であった。術後の頸椎後彎化は ADF 群ではなかったが、LAMP 群で 46% に認められた。術後の骨化伸展は ADF 群ではなかったが、LAMP 群で 45.5% に認められた。最大骨化占拠率 50% 以上の OPLL では、ADF 群が LAMP 群より成績良好であった。

A. 研究目的

頸椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) に対する手術的治療として前方除圧固定術 (ADF) および椎弓形成術 (LAMP) が広く行われている。頸椎 OPLL は前方からの脊髄圧迫により生じる圧迫生頸髄症であり手術法として前方法が合理的と思われるが、後方法でも満足できる結果が得られるとの報告も多い。しかし、これまで頸椎 OPLL に対する ADF と LAMP の治療成績を prospective に比較した報告はなかった。我々はこれらの術式を 1 施設で prospective に施行し、術後 5 年での臨床成績を比較した。

B. 研究方法

頸椎 OPLL による頸髄症患者に対して 1996, 1998, 2000, 2002 年は LAMP (正中縦割+観音開き式: 宮崎法) を、1997, 1999, 2001, 2003 年は ADF (骨化浮上術+自家骨移植+頸椎プレート使用) を施行した。5 年間直接追跡調査できた ADF 群 16 例、LAMP 群 22 例を対象とした。検討項目は、手術成績として C-JOA スコアと C-JOA スコア改善率

を計測し、画像評価として術前最大骨化占拠率、頸椎アライメント (C2-7 前彎角)、術後 5 年時の骨化伸展の有無について単純レントゲンで評価した。

(倫理面での配慮)

研究は通常の診療行為の中で行われた。術前に LAMP・ADF 両術式の説明と今までの報告に基づいた手術成績・合併症などの診療情報を十分に行い、同意が得られたものを研究対象とした。

C. 研究結果

C-JOA スコアは、術後 2 年まで両群間に違いを認めなかったが、3 年以降統計学的有意差を認め、ADF 群の方が LAMP 群より成績良好であった。改善率でも、同様に術後 2 年までは両群間に違いを認めなかったが、3 年以降統計学的有意差を認め、ADF 群の方が LAMP 群より改善率が勝っていた。術後 5 年の C-JOA スコア改善率は ADF 群 74%、LAMP 群 50% であった。頸椎前彎角が術後に 5 度以上進行したものを術後後彎化と定義し、調査したところ LAMP 群では 10 例 46%

に後弯化を認めた。ADF 群では 1 例も認めなかった。このうち LAMP 群の中で後弯化あり群となし群で JOA スコアを比較したところ、両群間に有意差を認めなかった。OPLL の術後骨化進展は、LAMP 群では 10 例 46% に認めた。ADF 群では 1 例も認めなかった。このうち LAMP 群の中で骨化進展あり群となし群で JOA スコアを比較したところ、両群間に有意差を認めなかったが、あり群では 3・4 年以降低下する傾向にあった。骨化占拠率と JOA 改善率の関係を調べるため、占拠率 50%以上と 50%未満の 2 群に分け、それぞれの JOA スコアを比較した。50%未満の群では両群間に違いはないものの、50%以上の群では 4 年以降 ADF の方が成績良好であった。

D. 考察

これまで頸椎 OPLL に対する ADF と LAMP の治療成績は、retrospective に比較した報告だけであり prospective に比較した報告はなかった。今回、我々が初めて前向き比較研究を行った。その結果、中期手術成績では ADF の方が優れていることがわかった。LAMP 術後後弯化は以前より指摘されており、頻度は 8-70%と幅が広い。本研究でも LAMP 群 46%に後弯化を認めたが、手術成績と直接関連はなかった。術後骨化進展は、LAMP 術後のほうが ADF 術後より多い報告がある。本研究でも ADF 群に骨化進展はなく LAMP 群 46%に認めた。手術成績に統計学的有意差はなかったが、術後骨化進展があるものは低下していく傾向にあり、長期成績では差が出てくるかもしれない。LAMP などの後方手術の適応限界として骨化占拠率 50-60%と報告がある。本研究でも、50%以上の群では LAMP の方が ADF より成績不良であった。

E. 結論

我々の行った頸椎後縦靭帯骨化症に対する手術治療の前向き比較研究の結果、最大骨化占拠率 50%以上の頸椎 OPLL に対する手術治療では、ADF が LAMP より中期成績が良好であった。

F. 研究発表

1.論文発表

なし。

2.学会発表

1) 坂井頭一郎、高橋誠、新井嘉容、川端茂徳、加藤剛、鳥越一郎、平井高志、大川淳、四宮謙一 頸椎後縦靭帯骨化症の中期手術成績～前方手術と後方手術の前向き比較研究～ 第 57 回東日本整形災害外科学会 2008.9.13 東京

2) Sakai K, Takahashi M, Arai Y, Kawabata S, Kato T, Torigoe I, Hirai T, Shinomiya K, Okawa A. 5-year Follow-up Evaluation of Surgical Treatment for Cervical Myelopathy Caused by Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament ~ Prospective Controlled Study; Anterior Decompression and Fusion versus Laminoplasty ~ . The 37th Annual Meeting of Cervical Research Society, Austin, TX, USA, 2008.12.5.

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。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

OPLL 発症機序におけるメカニカルストレスおよび PGE2/EP4 経路の役割

研究分担者 山本 謙吾 東京医科大学整形外科主任教授
小坂 泰一, 山藤 崇 東京医科大学整形外科

研究要旨 メカニカルストレスの OPLL 発症機序における役割を PGE2/EP4 経路に注目して検討した。OPLL 細胞、非 OPLL 細胞を培養細胞伸展装置でメカニカルストレスを加えつつ 24 時間培養、培養液中の PGE2 濃度を測定した。PGE2 およびプロスタノイド受容体 EP4agonist を OPLL 細胞、非 OPLL 細胞に添加し転写因子 Sox9 をパラメーターとして mRNA レベルで検討した。培養液中には OPLL 群で平均 75nM (range 45-81)、非 OPLL 群で平均 68nM (range 51-73) の PGE2 が検出された。PGE2 投与では Sox9 は OPLL 群で 100nM をピークに、EP4agonist 投与では 1 μ M をピークにそれぞれ上昇した。メカニカルストレスが PGE2/EP4 経路を介し OPLL 発症機序に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

メカニカルストレスが脊柱靭帯骨化症(以下 OPLL)の重要な因子であることが示唆されているがその具体的な機序はいまだ明らかでない。近年内軟骨性骨化の過程で LIPUS などの微細な機械的刺激による PGE2 の上昇が近年報告されている。我々は OPLL の局所因子の一つであるメカニカルストレスが超低濃度の PGE2 の産生を惹起し EP4 受容体を介して骨化傾向を促進させるとの仮説をたてこれを検討した。

B. 研究方法

I 術中に摘出した OPLL 患者 5 例、非 OPLL 患者 3 例の脊柱靭帯組織より、outgrowth 法により靭帯細胞を単離し、10%FBS 添加し DMEN 培地中で 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂にて継代培養し

6 代目の細胞を使用した。

II OPLL 細胞、非 OPLL 細胞を培養細胞伸展装置(STREX)使用下で 24 時間培養、培養液中の PGE2 を ELISA 法 (Cayman) で測定した。

III 1pM ~10 μ M の PGE2 およびプロスタノイド受容体 EP4agonist を OPLL 細胞、非 OPLL 細胞に添加した。total RNA を採取、転写因子 Sox9 をパラメーターとして real time PCR を用いて mRNA レベルで検討した。

(倫理面での配慮)

人権の擁護には個人情報保護が必要であり、検体は匿名化して用いる。また、今回は手術の際に切除した組織から検体を取り出す為、手術時に発生する手術自体の危険性以外に、新たに発生する危険性は無い旨を十分説明した。

C. 研究結果

培養液中の PGE2 濃度は OPLL 群で平均 75nM(range 45-81)、非 OPLL 群で平均 68nM(range 51-73)であった。

PGE2 投与では Sox9 は OPLL 群で 100nM をピークに上昇した。EP4agonist 投与では 1 μ M をピークに上昇した。非 OPLL 群ではいずれも明らかな変化は認められなかった。

D. 考察

間葉系組織の軟骨への分化・増殖における PGE2/EP4 経路の影響については、EP4agonist による BMP2 の骨誘導活性の促進 (Takaoka et al.:Bone28;290-294,2001)、PGE2/EP4 を介する軟骨細胞の増殖促進 (Brochhausen et al.:Arthritis Res Ther v.8(R78);2006)などが報告されている。これらの知見を踏まえて OPLL 発症機序における低濃度 PGE2 の役割に注目した。OPLL 組織において転写因子 Sox9 は増殖軟骨細胞、間葉系細胞で発現することが当研究班平成 19 年報告書にて報告されている。よって今回の研究で、メカニカルストレスが OPLL 細胞において低濃度の PGE2 の産生を惹起すること、また低濃度の PGE2 および EP4agonist が OPLL 細胞の Sox9 を mRNA レベルで上昇させることにより、メカニカルストレスが PGE2/EP4 経路を介して間葉系細胞の軟骨細胞への分化・増殖に関与している可能性があると考えた。

E. 結論

メカニカルストレスが PGE2/EP4 経路を介し OPLL 発症機序に関与する可能性が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

頚椎 OPLL の全脊椎アライメントと平衡機能に関する研究

研究分担者 遠藤健司、鈴木秀和、山本謙吾 東京医科大学大学整形外科

研究要旨 わが国の脊椎損傷の中で 6.5%が OPLL を伴っており、骨傷のない脊椎損傷の 26~38%で OPLL の合併を伴うと報告されている。頚椎 OPLL 患者の平衡機能を研究することで、転倒予防ができたならば脊椎損傷を減少することができると考えた。本研究で、全脊椎アライメントの特徴、重心動揺計を使用した平衡機能について検討したところ、頚椎 OPLL の転倒の背景には痙性障害に加えて、体幹前方傾斜、深部知覚障害による平衡機能障害が加わり、より転倒しやすい状態となっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

転倒によって脊椎損傷となる頚椎 OPLL 患者は多いが、頚椎 OPLL 患者の平衡機能を研究することで、転倒予防ができたならば脊椎損傷を減少することができると考えた。本研究で、全脊椎アライメントの特徴、重心動揺計を使用した平衡機能について検討した。

B. 研究方法

全脊椎矢状面アライメントについて、平成18年以降当院で手術加療した頚椎症性脊髄症81例(男性 52 人、女性 29 人:平均年齢 59.0 歳)、頚椎 OPLL 30 例(男性 22 人、女性 8 人:平均年齢 58.0 歳)で、体幹の前傾について(JB)腰椎の前彎、骨盤傾斜(LLA)、骨盤の傾斜(PA)を全脊椎側面X線を立位で撮影して計測した(図1)。また、そのうちの SCM13 例、OPLL 8 例については、重心動揺計による平衡機能の計測を行い開眼・閉眼での総軌跡長、総面積、ベクトル、ロンベルグ率等を測定した。OPLL、CSMは、年齢、JOAスコアで

明らかな差を認めなかった。

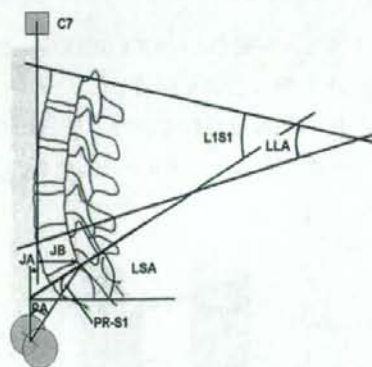


図1:脊椎アライメントの計測

C. 研究結果

OPLLとCSMの全脊椎アライメントを比較すると、JB 78 ± 57.8 、 20.9 ± 38.1 cm、LLA 17.5 ± 20.4 、 24.2 ± 10.9 度、PA 20.4 ± 6.2 、 20.4 ± 7.8 度であり、OPLL で体幹は前傾し、腰椎前彎が減少していた(図2)。

また、OPLLとCSMの平衡機能に関しては、ロンベルグ率 2.1 ± 0.8 、 1.7 ± 0.6 、全軌跡長 156.4 ± 24.3 、 87.6 ± 31.8 cm、外周面積

6.7±5.9、6.3±4.8 cm²でOPLLでロンベルグ率が高く、全軌跡長も長かった。

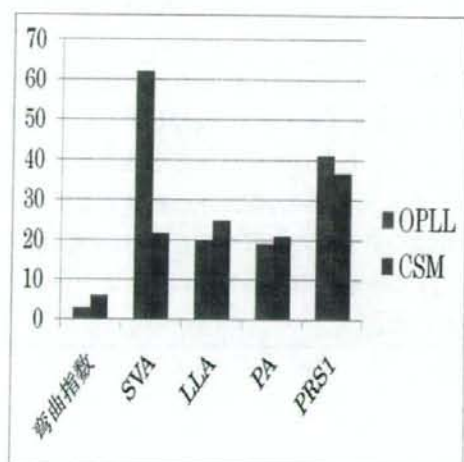


図2:脊椎アライメント

また、下肢JOAスコアの重症度によってロンベルグ率の差異を調査したところ、歩行障害が比較的軽度な群でOPLLとCSMでロンベルグ率の重症度に変化があった(図3)。

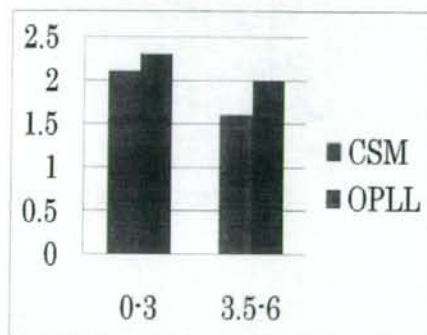


図3:ロンベルグ率と頸椎JOA(下肢)スコア

D. 考察

近年、運動器不安定症という概念が述べられており、「高齢化により、バランス能力および

移動歩行能力の低下が生じ、閉じこもり、転倒リスクが高まった状態」と定義されている。しかし頸髄症、OPLLに対するバランス異常、平衡機能に関する研究は少ない。後縦靭帯骨化症(OPLL):外傷は、予後不良因子(OPLLガイドライン 2005)であり、15/156 (9.6%)は、外傷で悪化(Matsunaga S et al. 2008 Spine)であるという報告もある。

我々は、頸椎OPLL患者の平衡機能を研究することで、転倒予防ができればならばOPLL患者の転倒による脊髄損傷の発生を減少することができると考えた。本研究で、全脊椎アライメントの特徴、重心動揺計を使用した平衡機能について検討したところ、頸椎OPLLの転倒の背景には痙性障害に加えて、体幹前方傾斜が大きいことが示された。これは、通常加齢現象によって腰椎前弯の減少傾向、骨盤後方傾斜、体幹の前方傾斜は生じてくることが知られているが、OPLL患者の場合、通常の頸髄症に比べて全身骨化傾向があるために、全脊椎での姿勢代償性に乏しく、頸椎のアライメント異常を胸椎や腰椎で代償できずにいる状態であることが考えられる。また、重心動揺計では、外周面積は、全体的な平衡障害の程度、軌跡長は、固有受容器の直立制御性、ベクトルはX軸でおもに迷路障害をY軸で抗重力筋の活動異常を示すと言われている。ロンベルグ率は視覚入力、後索路、中枢障害の程度を表すことができる。今回の結果では、OPLLでは、JOAスコアで歩行がある程度できる状態では、ロンベルグ率は高くなり閉眼時の立位不安定が高くなる。このことは夕方や夜など視覚情報が低下した状態では、深部知覚障害による平衡機能障害が加わり、より転倒しや

すい状態となっている可能性が示唆された。

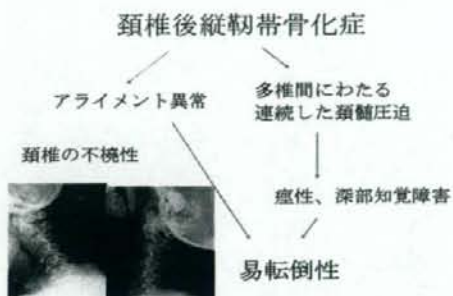


図4:頸椎OPLLと転倒の関係

E. 結論

頸椎OPLLの転倒の背景には痙性障害に加えて、体幹前方傾斜、深部知覚障害、脊椎不撓性による平衡機能障害が加わり、転倒しやすい状態となっている可能性が示唆された。今後、平衡障害発症のメカニズムについて詳細な研究が必要である。

F. 研究発表

学会発表

遠藤健司、鈴木秀和、山本謙吾ほか：第

160回東京医科大学医学会総会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

脊柱支持組織における AGEs-RAGE complex の分子生物学的作用に関する研究

研究分担者 永田 見生 久留米大学整形外科教授

研究要旨 AGEs は靭帯や軟骨といった細胞の turn over が遅い組織に蓄積されやすい。脊柱支持組織では、脊柱靭帯と椎間板組織に多く蓄積される事が報告されている。我々は脊柱靭帯については AGEs-RAGE complex 作用により靭帯骨化を促す可能性を報告し、さらに昨年は、RAGE 発現が種々の条件にて増強される事を報告した。今回は炎症性サイトカインである IL-1 により RAGE 発現がどのように変化するかをウシの椎間板組織にて検討した。

A. 研究目的

我々は、H18 年に終末糖化産物である AGEs とその受容体である RAGE が結合する事により靭帯骨化を促す可能性があることを発表した。さらに H19 年には、靭帯細胞に機械的伸張刺激を与えることにより、局所における RAGE 発現が増強される事を発表した。このことから、種々の条件により局所における RAGE 発現量の違いが生じ、このことが個人における靭帯骨化発現の有無の違いや、特定部位に骨化が発現する原因になっているのではと考えた。そこで、今回は RAGE 発現がどのような条件にて増強されるかを、脊柱支持組織で AGEs-RAGE complex を認める椎間板細胞を用いて検討した。

B. 研究方法

(1)ウシ椎間板髄核組織を単層培養し、炎症性サイトカインである IL-1 β で刺激する。その後リアルタイム PCR を用いて RAGE 遺伝子の発現量を検討した。さらに培養細胞に抗 RAGE 抗体を用いて免疫染色を行い、刺激による RAGE の発現量をビジュアル的に比較検討した。

(2)発現した RAGE が AGEs-RAGE complex を形成し、本当に分子生物学的作用を働いているのかを検討するため、IL-1 β 刺激に AGEs 刺激を追加し、椎間板細胞からの Aggrecan 発現量をリアルタイム PCR を用いて検討した。

(倫理面での配慮)

食肉用ウシの尾部をいただき実験を行なったため、倫理面の問題は無いものと考えます。

C. 研究結果

(1) IL-1 β 刺激2日目には PCR にて有意に RAGE 発現量が増加していた。また免疫染色にても RAGE 発現が有意に増加している事が確認された。

(2) PCR において、AGEs 単独刺激に比べて、IL-1 β 刺激を加えた方が、有意に Aggrecan 発現量を減少させた。さらに、RAGE ブロッカーを投与することにより、減少した RAGE 発現量は回復した。

D. 考察

今回の研究から、ウシ椎間板細胞に発現する RAGE は、炎症環境によりその発現量が増

強される事が確認できた。また発現増強した RAGE は、確かに AGEs-RAGE complex を形成し、分子生物的働きを有していることが確認できた。

以前から脊柱靭帯骨化は機械的伸展刺激で発現が増強すると報告されている。今回の我々の研究から、機械的刺激のみならず、炎症環境によっても局所の RAGE 発現が増強される可能性が示唆されたことから、頸椎や胸椎の伸張ストレスの大きい部位に機械的刺激による慢性炎症が発症し、そのことが局所の RAGE 発現量を増強させ、結果として靭帯骨化発現が促進されるという可能性が考えられた。

E. 結論

(1)ウシ椎間板培養細胞において、IL-1 β 刺激により、RAGE 発現量が遺伝子および蛋白レベルにおいて増強される事が確認できた。

(2)発現増強された RAGE は、AGEs-RAGE complex をつくり、確かに生理活性を有していることが確認できた。

(3)炎症性環境により RAGE 発現が増強し、靭帯骨化が促進される可能性が示唆され、今後更なる研究が必要である。

F. 研究発表

1.論文発表

現在投稿中

2.学会発表

第23回日本整形外科学会基礎学術集会

55th Orthopaedic Research Society annual Meeting (発表予定)

第38回日本脊椎脊髄病学会 (発表予定)

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

頸椎椎弓形成術後の C5 麻痺予防に関する臨床的研究

研究分担者 安井夏生 徳島大学大学院 HBS 研究部運動機能外科学教授

研究要旨 正中縦割法による頸椎椎弓形成術後の C5 麻痺発生と側溝の位置を検討した。側溝位置が外側の群では 21 例中 5 例に発生し、内側の群では発生しなかった。術前後の MRI で前者の脊髄後方移動距離が大きかったが、脊髄の拡大量は差がなかった。以上より、C5 麻痺の発生は脊髄後方移動距離と関連し、側溝の位置を内側にすることにより予防できる可能性がある。

A. 研究目的

頸椎椎弓形成術後の C5 麻痺の原因には脊髄前角障害、神経根牽引などが挙げられ、対策も foraminotomy、ステロイド投与などが報告されているが結論は出ていない。我々は正中縦割法を用い側溝を椎弓から椎間関節への変曲点におき、外側狭窄の強い症例には foraminotomy を追加してきた。C5 麻痺への対策として、側溝を脊柱管幅に合わせて広くした(W 群)ところ C5 麻痺の頻度が増加し、脊髄幅を指標に狭くした(N 群)ところ発生頻度が低下した。そこで、側溝の位置と C5 麻痺の関係について画像診断を中心に検討した。

B. 研究方法

圧迫性頸髄症に対して行った C4 椎弓を含む頸椎椎弓形成術を対象とし、フィルムレス環境で同様に画像計測ができる症例(W 群 21 例、N 群 16 例)を解析した。C5 麻痺は、術後 1 日から 14 日の間に発生した MMT 1 以上の低下とした。脊髄症状は日整会頸髄症治療判定基準(JOA スコア)で評価し、画像解析は頸椎単純側面像では頸椎前彎度、T2 強調 MRI 像では C4 椎体高位での術前脊髄幅、術前後の脊髄後方移

動距離、CT 像では脊柱管幅、側溝幅を計測した。術式の変更にあたっては十分なインフォームドコンセントを行った。

C. 研究結果

JOA スコアの改善率は両群とも 65%であった。C5 麻痺は W 群 21 例中 5 例に発生し N 群にはなかった(χ^2 乗検定、 $p < 0.05$)。Foraminotomy は W 群の 13 例に行い N 群には行わなかったが、W 群の 1 例で C5 麻痺が発生した。脊髄幅は両群とも平均 13.9mm、側溝幅は W 群 21.2mm、N 群 15.3mm であった。脊髄後方移動距離は、脊髄前縁、後縁いずれも W 群で有意に大きかったが($p < 0.01$)、脊髄前後径拡大量には差がなかった。頸椎前彎に差はなかった。

D. 考察

幅広い除圧では脊髄後方移動距離が大きくなり、C5 麻痺が増加した可能性がある。側溝幅を狭くした際の問題は、除圧後の脊髄後方移動距離の低下による脊髄症改善不良であるが、今回の研究では JOA スコアの改善率には差はない。しかし、今後症例を重ねて検討していく必要がある。

E. 結論

除圧幅を狭めることにより C5 麻痺が抑制できる可能性がある

F. 研究発表

1.論文発表 投稿中

2.学会発表

第 81 回日本整形外科学会学術総会

第 47 回 International Spinal Cord Society

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

慢性圧迫下脊髄 (*twy/twy* mice) における TNF- α の発現と
オリゴデンドロサイト細胞死の免疫組織化学的検討

研究分担者 犬飼智雄 内田研造 中嶋秀明 彌山峰史 馬場久敏
福井大学医学部整形外科

研究要旨

慢性圧迫下脊髄 (*twy/twy* mice) を用い圧迫程度に応じた灰白質・白質の免疫組織化学的評価を行い、tumor necrosis factor (TNF)- α の発現とオリゴデンドロサイト細胞死に注目し検討した。灰白質の neuron は、中等度圧迫で TUNEL 陽性細胞数がピークとなり、高度圧迫ではすでに細胞数が減少しているのに対し、白質のオリゴデンドロサイトでは圧迫の程度に応じて TUNEL 陽性細胞数が経時的に増加していた。高度圧迫群では抗オリゴデンドロサイト抗体との蛍光二重染色で activate-caspase-3, TNF receptor 1, 2 (TNFR1, TNFR2) および TNF α が各々強発現していた。オリゴデンドロサイト細胞死において様々な signal transduction 経路が報告されているが、本研究では、新たにそのひとつとして TNF α family の関与が示唆された。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症や頸椎症性脊髄症に代表される慢性圧迫性脊髄症では、圧迫の程度に応じて脊髄が変性、壊死に陥ると報告されている。しかしながら、圧迫が高度で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みることがある。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* mouse) 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

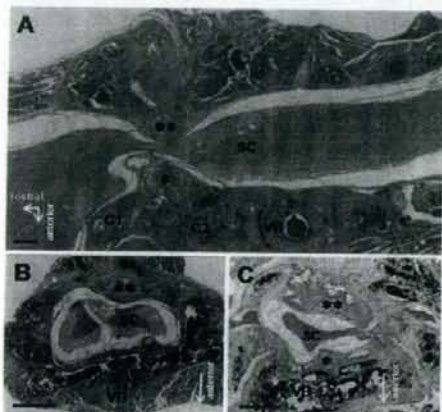
際に、神経細胞およびグリア細胞自身が神経栄養因子を強発現し、神経細胞、特に前角ニューロンの生存維持に関与していることを報告してきた¹⁻³⁾。

慢性脊髄圧迫における神経細胞死に apoptosis が関与していると報告されているが、急性脊髄圧迫との相違などその病態については未だ不明な点が多い。本研究では、慢性脊髄圧迫モデル (*twy/twy*) における apoptosis の病態について、圧迫程度に応じた灰白質・白質の免疫組織化学的評価を、特に tumor necrosis factor (TNF)- α の関連性に注目し検討することを目的とした。

B. 研究方法

実験動物には 24 週齢 *twy* mouse (n=34) を

用いた。twy mouse は後環軸膜に石灰化が自然発生し、石灰化の増大により様々な程



度の脊髄圧迫が生じる慢性脊髄圧迫モデルである (図 1)。

図 1 twy mouse: A;24W sagittal,

B;中等度圧迫,C;高度圧迫

*、**は石灰化部,

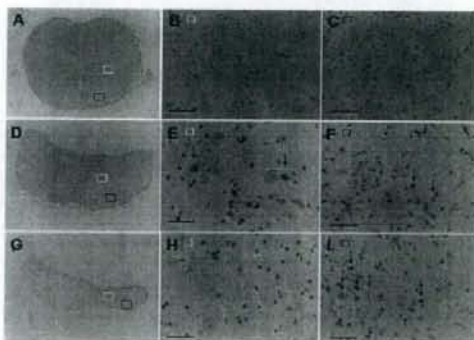
SC:spinal cord, VB:vertebral body

ネンプタール腹腔内麻酔下に脊髄を摘出し、その最圧迫部位での脊髄残余面積 (transverse remnant area of the spinal cord; TRAS, 以下 TRAS) を外部圧迫の指標として用いた。同週齢の ICR mouse をコントロールとした (n=11)。圧迫の程度に応じて 2 群間に分け、50%から 70%の TRAS を中等度圧迫群 (n=17)、50%以下の TRAS を高度圧迫群 (n=17) と分類した。麻酔下に摘出した脊髄 (C0-C6 level) は、パラフィン包埋し、4 μ m の連続切片を作成した。免疫組織化学的評価として TUNEL 染色を行い、脊髄圧迫部およびその頭尾側における TUNEL 陽性細胞の局在評価、cell count を行った (n=8)。また TUNEL 陽性細胞を同定するため、25 μ m 凍結切片を用いて蛍光二重染色を行った。細胞標識マーカー (抗 NeuN,

oligodendrocyte (RIP), GFAP, OX-42 抗体) をそれぞれ一次抗体に用いた TUNEL 染色との蛍光二重染色 (n=8)、および抗 activated-caspase-3, TNF receptor 1, 2 (以下 TNFR1, TNFR2)、TNF α 抗体を一次抗体に用いた各細胞標識マーカーとの蛍光二重染色 (n=8) を行った。発現蛋白の半定量評価のため TNF- α , TNFR1, TNFR2, active-caspase-3 の western blotting (WB) を行った (n=6)。さらに apoptosis 細胞を同定するため透過電顕で観察した (n=4)。

C. 結果

コントロールの ICR マウスでは灰白質、白質ともに TUNEL 陽性細胞 (以下陽性細胞) は確認されなかった (図 2 A, B, C)。twy の中等度圧迫においては前角部を中心に陽性細胞が散見され、側索、後索においても陽性細胞が散見された (図 2 D, E, F)。高度圧迫においては前角部で陽性細胞は減少しており、後索、側索では中等度に比べて陽性細胞



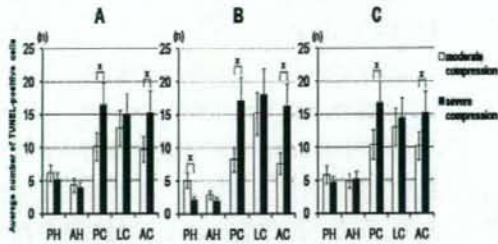
胞が増加していた (図 2 G, H, I)。

灰白質 白質

図 2 TUNEL staining (A-C: ICR, D-F: 中等度圧迫 twy, G-I: 高度圧迫 twy)

矢印は陽性細胞を指している。

次に、陽性細胞の cell count を行い、圧



迫部吻側、圧迫部、圧迫部尾側に分けてグラフ化した (図3)。

図3 TUNEL陽性細胞の分布 (A;圧迫部吻側, B;圧迫部, C;圧迫部尾側) PH;後角, AH;後角 PC;後索, LC;側索, AC;前索、*P<0.05

圧迫部では、圧迫が中等度から高度になるにつれて、白質での陽性細胞数が増加し、特に後索と前索では有意差があった。それに対し、灰白質では、中等度に認められた陽性細胞が、高度圧迫では減少していた。これは後角部で有意差があった。また圧迫部吻側、尾側においても陽性細胞が認められた。白質においては陽性細胞が増加していたが、灰白質では、有意差がなかった。最圧迫部の twy mouse の透過電顕像において (図4)、核クロマチンの凝集があるにもかかわらず、細胞内小器官の変化がほとんどない apoptosis の過程にある細胞を同定した。

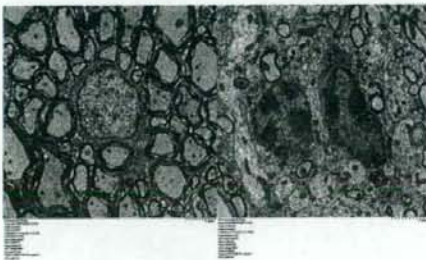
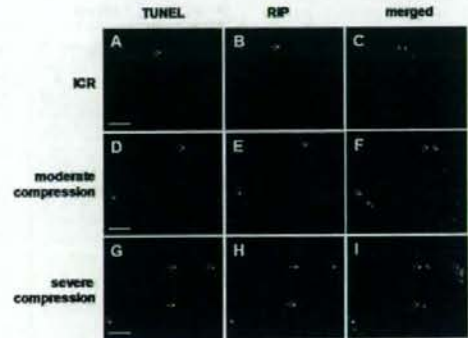


図4 電子顕微鏡像
左側: ICR, 右側: 高度圧迫 twy

TUNEL と RIP の蛍光二重染色において白質での陽性細胞は主に oligodendrocyte で



観察され、圧迫に応じて二重染色陽性細胞が増加していた (図5)。

図5 TUNEL/RIP 蛍光二重染色

高度圧迫群において RIP との蛍光二重染色で activate-caspase-3, TNFR1, TNFR2, TNF α が各々発現していることを確認した (図6)。

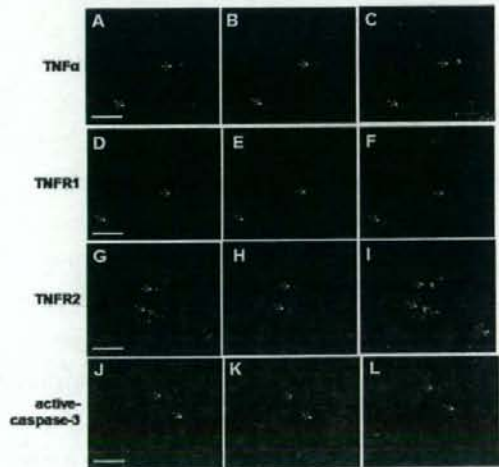


図6
RIP/TNF, TNFR1, TNFR2, active-caspase-3