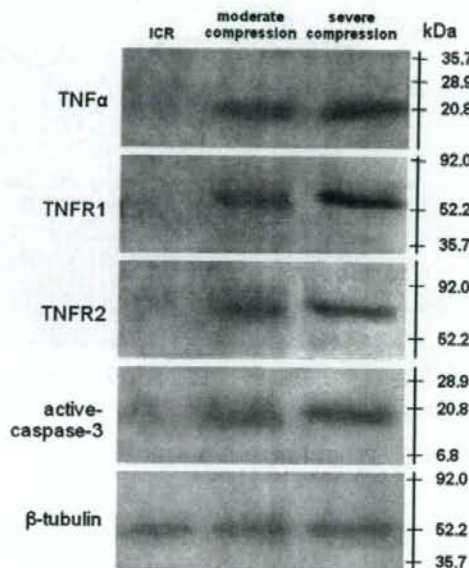


蛍光 2 重染色 (高度圧迫 twy)

Western Blotting では、コントロールと比較し twy mouse では明らかに density の



濃い band が認められ、高度圧迫 twy でより有意であった (図 7)。

図 7 Western blotting

β-tubulin はコントロールとして用いた。

D. 考察

我々はこれまで脊髄残余面積が 70%以下になると神経細胞 (Nissl 染色陽性) がコントロールと比べて明らかに減少することや、圧迫の程度に応じて白質での脱髄や Wallerian 変性が増加することを報告してきた¹⁻³⁾。今回の検討では、圧迫部位を中心に TUNEL 陽性細胞が認められたが、白質と灰白質では TUNEL 陽性細胞の発現様式が異なることが明らかとなった。つまり、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 oligodendrocyte 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。我々は残存 neuron が神経栄養因子を強発現し、樹状突起を伸ばすことを報告しており⁴⁾、圧迫を受けた neuron は比較的早期の段階で apoptosis に陥るものの、残存 neuron は生存する neuron と相互に interaction し、その機能を維持しているものと考察した。運動機能については、本研究の結果より、圧迫に応じて apoptosis に陥る oligodendrocyte の生存維持がより重要な factor であると考えられた。

我々はこれまで、内因性神経栄養因子の不足による微小環境の変化が、apoptosis を招くひとつの要因と捉え、twy mouse に対し、神経栄養因子 (BDNF, NT-3) を外因性に投与することによって、その神経保護効果、賦活化効果を報告してきた⁵⁾が、apoptosis における signal transduction の機序は不明のままであった。現在、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 TNFα family の関与が示唆された。

E. 結論

今回の研究結果より慢性圧迫脊髄の apoptosis 抑制の新たな strategy として、抗 TNFα 抗体の外因性投与による apoptosis の trigger の抑制、それに応じた神経細胞生存維持効果が期待され得るかもしれない。

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) 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 neurotrophic factors. *J Neurol.* 245: 781-93, 1998
 - 4) 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
 - 5) 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
- F. 研究発表
・論文発表
- 1) Baba, H., Maezawa, Y., Imura, S., Kawahara, N., Nakahashi, K., Tomita, K. Quantitative analysis of the spinal cord motoneuron under chronic compression: an experimental observation in the mouse. *J Neurol.* 243; 109-16, 1996
 - 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) 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 neurotrophic factors. *J Neurol.* 245: 781-93, 1998
- G. 知的財産権の出願・登録状況

特記することなし。

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

頸椎後縦靭帯骨化症の脊髄症状発現における静的および動的因子の関与

- 無症候例から見た解析 -

研究分担者 山崎正志 千葉大学大学院医学研究院整形外科学准教授
山崎正志 藤由崇之 川辺純子 遠藤友規 古矢丈雄 林浩一 国府田正雄
大河昭彦 高橋和久 千葉大学大学院医学研究院整形外科学

研究要旨 頸椎後縦靭帯骨化症における脊髄障害の病態を無症候例から検討し、頸椎後方除圧固定術の有効性を考察した。脊髄症状を呈さない頸椎後縦靭帯骨化症例 27 例を対象とし、X 線像にて骨化形態、骨化占拠率、脊髄最大圧迫高位での椎間可動域を解析した。骨化形態は連続型 17 例、混合型 7 例、分節型 3 例であった。連続型の骨化占拠率(平均 42.5%)は、分節型(平均 27.7%)より大きかった($P < 0.05$)。連続型の可動域(平均 2.4 度)は、混合型および分節型の可動域(平均 4.9 度および 9.7 度)より小さかった($P < 0.05$)。椎間可動域と骨化占拠率の間には負の相関があった($r = -0.49$, $p < 0.01$)。今回の結果から、静的因子に比して動的因子がより大きく脊髄症状の発症に関与していると推察された。後方除圧固定術は、動的因子をノックアウトすることにより脊髄障害を軽減させる、理にかなった術式である。

A. 研究目的

頸椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) に対する手術治療は、前方法と後方法に大別される。解剖学的な見地からは、頸椎 OPLL は骨化により脊髄が前方から圧迫されている病態であり、骨化を直接的に前方から切除し脊髄の除圧を図る前方法が優れていると考えられる。しかし、長範囲にわたる脊髄圧迫が存在する場合や高齢者などでは、前方法を選択することはしばしば困難である。一方、後方法の標準的な術式である頸椎椎弓形成術は、脊髄を後方にシフトさせることにより間接的な脊髄除圧を

図る術式であり、適応さえ選べば、前方法に引けをとらない改善が期待できる。

当科の頸椎 OPLL に対する術式選択は、原則として、除圧固定の範囲にかかわらず前方除圧固定術を第一選択としている[1]。3 椎間以上の除圧固定では、腓骨を移植骨として用い術後のハローベスト装着を必要とする。しかし、近年は術後のハローベスト装着を受け入れる患者が少なく、後方法を選択する例が多くなっているのが現状である。

これまでの研究で我々は、1994 年から 2004 年までの 10 年間に頸椎椎弓形成術を施行した

頸椎 OPLL 症例 40 例を解析した。改善率 40% 未満を成績不良例とし、成績不良因子として「脊髓最大圧迫高位における局所椎間不安定性」の存在を報告した[1]。この結果をもとに我々は、局所椎間不安定性を有する頸椎 OPLL 症例に対しては、椎弓形成術に椎弓根または外側塊スクリューをアンカーとする後方固定を追加し、現在までのところ良好な成績を得ている[2]。本年度の研究では、頸椎 OPLL における脊髓障害の病態を無症候例から検討し、頸椎後方除圧固定術の有効性を考察した。

B. 研究方法

2000 年 4 月から 2007 年 3 月までの期間に当科を受診し、1 年以上外来通院にて経過観察可能であった無症候性の頸椎 OPLL 例 27 例を対象とした。対象とした患者は脊髓症状を一切有さず、交通事故・肩こり・睡眠時無呼吸症候群の検査で頸椎単純 X 線撮影を受けた際に、OPLL が偶然発見された。単純 X 線頸椎側面像にて OPLL の骨化形態、骨化占拠率、残余脊柱管径を解析した (図 1A)。

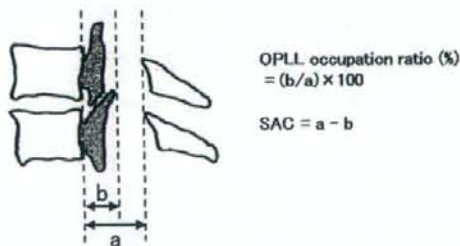


図1A 骨化占拠率および残余脊柱管径

頸椎前後屈像にて脊髓最大圧迫高位での椎間可動域を評価した (図 1B) [1]。また、MRI では T2 強調矢状断像にて脊髓内の高輝度変化の有無を評価した。検定は、Mann-Whitney U,

Fisher's exact probability, Pearson's correlation 検定を用い、有意水準 5% 未満を有意差ありとした。

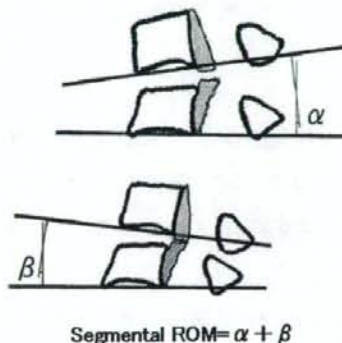


図 1B 脊髓最大圧迫高位での椎間可動域

C. 研究結果

当科外来での平均観察期間は 4 年 11 か月であり、性別は男性 11 例、女性 16 例、平均年齢は 63.3 歳であった。骨化形態は、連続型 17 例、混合型 7 例、分節型 3 例であり、連続型が多く存在した ($P < 0.05$)。骨化占拠率は平均 39.8% であり、骨化形態別にみると連続型 42.5%、混合型 39.4%、分節型 27.7% であった。連続型の骨化占拠率は分節型より大きかった ($P < 0.05$)。最大圧迫高位での椎間可動域は平均 3.8 度であった。骨化形態別にみると連続型 2.4 度、混合型 4.9 度、分節型 9.7 度であり、連続型の可動域は、混合型および分節型の可動域より小さかった ($P < 0.05$)。

骨化占拠率が 50% を超え、残余脊柱管径が 6mm 未満の症例が 3 例存在した (症例 1)。3 例とも連続型であり、最大圧迫高位での椎間可動域はそれぞれ 3, 1, 0 度 (平均 1.3 度) であった。椎間可動域と骨化占拠率の間には負の相関があった ($r = -0.49, p < 0.01$) (図 2)。

MRI 評価は無症候のため全例撮影することはできず、撮影できたのは27名中18名であった。T2 強調矢状断像での脊髓内高輝度変化を呈した症例は1例も存在しなかった。

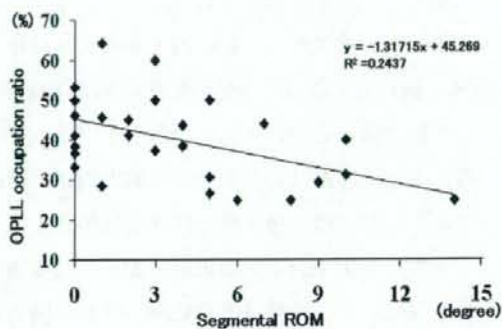


図2 椎間可動域と骨化占拠率の相関

【症例1】骨化占拠率が50%を超えるにもかかわらず脊髄症状を呈さない例。

C2-C5 連続型 OPLL で、脊髓最大圧迫高位は C4/5。骨化占拠率は64%で残余脊柱管径は3mm。C4/5 での椎間可動域は1度 (図3A)。T2 強調 MRI では、C3/4 から C4/5 にかけて前方からの脊髄圧迫が存在するが、脊髓に高輝度変化は生じていない (図3B)。本例では、静的圧迫因子は顕著であるが、動的因子の関与がほとんどないため、脊髄症状を発症しなかったと考えられる。



図3A 症例1 頸椎前後屈像

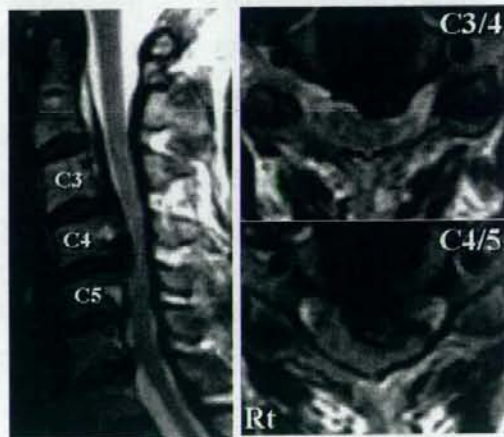


図3B 症例1 T2強調MRI

D. 考察

これまでの報告で、頸椎 OPLL における脊髄障害増悪因子は静的因子と動的因子に大別されている [3-9]。このうちの静的因子としては、骨化占拠率、骨化形態および残余脊柱管径が論じられている。Matsunaga らの報告では、247 例の OPLL 例のうち残余脊柱管径が 6mm 未満の 21 例では全例が脊髄症状を呈していた [7]。Iwasaki らは骨化占拠率 60% 以上の例および山型の骨化を有する例では、椎弓形成術の術後成績が不良であると報告した [3]。Tani らは骨化占拠率 50%

以上の例では、前方除圧固定術の成績が椎弓形成術に比して良好であるとしている[5]。また、著者らはK-line（第2頸椎と第7頸椎脊柱管中点を結んだ線）を提唱し、K-line（-）例（OPLLがK-lineを超える例）では、椎弓形成術後の脊髄除圧に限界があることを術中エコーにて証明した[9]。

上記の静的因子に加え、最近の報告では脊柱の動き、すなわち動的因子が、特に脊柱管がOPLLで高度に占拠されている例では脊髄症状の発症、増悪に関与するとされている。Matsunagaらは、残余脊柱管径6mm以上14mm未満の症例における頸椎全可動域(C1-C7ROM)と脊髄症状の有無の関係を調べたところ、脊髄症状を認める群の全可動域は脊髄症状を認めない群より有意に大きかったと報告した[7]。Ogawaらは頸椎OPLLに対する椎弓形成術の長期成績を調査し、分節型骨化で同時に頸椎可動域(C2-C7ROM)が大きい例では術後成績が不良であったとしている[8]。我々も、脊髄最大圧迫高位で局所椎間不安定性を有する症例では、椎弓形成術の術後成績が不良であることを報告した[1]。

今回我々は、大きな骨化が存在するにもかかわらず脊髄症状を呈さないOPLL例に着目して、その特徴を解析した。その結果、頸椎の可動性が高度に制限されている例では、たとえ大きな骨化が存在していても、脊髄症状を呈しにくいことが明らかとなった。特に、骨化占拠率が50%を超える無症候例が27例中3例に存在した。その特徴として骨化形態は全例が連続型であり、最大圧迫高位での椎間可動域は平均1.3度と椎間可動性は極めて小さかった。すなわち、動的因子が小さければ、静的因子単独による脊髄障

害発症のリスクは低く、動的因子が脊髄症発症に大きく関与していることが考えられた。静的因子と動的因子は密接に関連しているものの、本研究から、動的因子が、より大きく脊髄障害に関与していると考えられた。

本研究の結果から、動的因子を有する頸椎OPLL例に対しては、脊髄の除圧に加えて固定を行う前方除圧固定術を第一選択とすべきと考える。もし、高齢などの理由で、前方固定を選択できない例では、頸椎椎弓形成術に後方インストゥルメンテーション固定を追加する頸椎後方除圧固定術が、脊髄障害の発症・増悪に関わる重要な因子である動的因子を排除するという意味から、推奨すべき術式と考える。

E. 結論

頸椎OPLL無症候例の解析から、動的因子がより大きく脊髄障害の発症・増悪に関与していることが明らかとなった。後方除圧固定術は、動的因子をロックアウトすることにより脊髄障害を軽減させる、理にかなった術式である。

参考文献

1. Masaki Y, Yamazaki M, Okawa A, Aramomi M, Hashimoto M, Koda M, Mochizuki M, Moriya H: An analysis of factors causing poor surgical outcome in patients with cervical myelopathy due to ossification of the posterior longitudinal ligament: anterior decompression with spinal fusion versus laminoplasty. *J. Spinal Disord. Tech.* 20: 7-13, 2007.
2. 山崎正志, 大河昭彦, 染谷幸男, 藤由崇之,

- 川辺純子, 遠藤友規, 古矢丈雄, 国府田正雄, 守屋秀繁: 頰椎後縦靭帯骨化症に対する後方除圧固定術(後方インストゥルメンテーション固定併用椎弓形成術)の中短期成績. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班 平成18年度研究報告書, pp139-145, 2007.
3. Iwasaki M, Okuda S, Miyauchi A, Sakaura H, Mukai Y, Yonenobu K, Yoshikawa H: Surgical strategy for cervical myelopathy due to ossification of the posterior longitudinal ligament: Part 1: Clinical results and limitations of laminoplasty. *Spine* 32: 647-653, 2007.
 4. Iwasaki M, Okuda S, Miyauchi A, Sakaura H, Mukai Y, Yonenobu K, Yoshikawa H: Surgical strategy for cervical myelopathy due to ossification of the posterior longitudinal ligament: Part 2: Advantages of anterior decompression and fusion over laminoplasty. *Spine* 32: 654-660, 2007.
 5. Tani T, Ushida T, Ishida K, Lai H, Noguchi T, Yamamoto H: Relative safety of anterior microsurgical decompression versus laminoplasty for cervical myelopathy with a massive ossified posterior longitudinal ligament. *Spine* 27: 2491-2498, 2002.
 6. Matsunaga S, Sakou T, Hayashi K, Ishidou Y, Hirotsu M, Komiya S: Trauma-induced myelopathy in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *J Neurosurg* 97: 172-175, 2002.
 7. Matsunaga S, Kukita M, Hayashi K, Shinkura R, Koriyama C, Sakou T, Komiya S: Pathogenesis of myelopathy in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *J Neurosurg* 96: 168-172, 2002.
 8. Ogawa Y, Chiba K, Matsumoto M, Nakamura M, Takaishi H, Hirabayashi H, Nishiwaki Y, Toyama Y: Long-term results after expansive open-door laminoplasty for the segmental-type of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine: a comparison with nonsegmental-type lesions. *J Neurosurg Spine* 3: 198-204, 2005.
 9. Fujiyoshi T, Yamazaki M, Kawabe J, Endo T, Furuya T, Koda M, Okawa A, Takahashi K, Konishi H: A new concept for making decisions regarding the surgical approach for cervical ossification of the posterior longitudinal ligament: the K-line. *Spine* 33: E990-E993, 2008.
- F. 研究発表
論文発表
1. Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Takeshita K, Seichi A, Nakamura K, Arimizu J, Fujibayashi S, Hirabayashi S, Hirano T, Iwasaki M, Kaneoka K, Kawaguchi Y, Ijiri K, Maeda T, Matsuyama Y, Mikami Y, Murakami H, Nagashima H, Nagata K, Nakahara S, Nohara Y, Oka S, Sakamoto K, Saruhashi Y, Sasao Y, Shimizu K, Taguchi T, Takahashi M, Tanaka Y, Tani T,

- Tokuhashi Y, Uchida K, Yamamoto K, Yamazaki M, Yokoyama T, Yoshida M, Nishiwaki Y: Surgical results and related factors for ossification of posterior longitudinal ligament of the thoracic spine: a multi-institutional retrospective study. *Spine*. 33:1034-1041, 2008.
2. Aramomi M, Masaki M, Koshizuka S, Kadota R, Okawa A, Koda M, Yamazaki M: Anterior pedicle screw fixation for multilevel cervical corpectomy and spinal fusion: technical note. *Acta Neurochir (Wien)*. 150: 572-582, 2008.
 3. Ogasawara A, Nakajimal A, Nakajimal F, Goto K, Yamazaki M: Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Bone* 43: 832-839, 2008.
 4. Fujiyoshi T, Yamazaki M, Kawabe J, Endo T, Furuya T, Koda M, Okawa A, Takahashi K, Konishi H: A new concept for making decisions regarding the surgical approach for cervical ossification of the posterior longitudinal ligament: the K-line. *Spine* 33: E990-E993, 2008.
 5. Someya Y, Koda M, Dezawa M, Kadota T, Hashimoto M, Kamada T, Nishio Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okawa A, Yoshinaga K, Yamazaki M: Transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cell reduces cystic cavity, promotes axonal regeneration/sparing and functional recovery after contusion injury of adult rat spinal cord. *J Neurosurg Spine* 9: 600-610, 2008.
 6. Koda M, Someya Y, Nishio Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okawa A, Murata A, Yamazaki M: Brain-derived neurotrophic factor suppresses anoikis-induced death of Schwann cells. *Neurosci Lett*. 444:143-147, 2008.
 7. Nishio Y, Koda M, Hashimoto M, Kamada T, Koshizuka S, Yoshinaga K, Onodera S, Nishihira J, Okawa A, Yamazaki M: Deletion of macrophage migration inhibitory factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Acta Neuropathol.* (in press)
 8. Mochizuki M, Aiba A, Hashimoto M, Fujiyoshi T, Yamazaki M: Cervical Myelopathy in Patients with Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. *J Neurosurg Spine*. (in press)
 9. Miyashita T, Yamazaki M, Yamashita T, et al: Wnt-Ryk signaling mediates axon growth inhibition and limits functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. (in press)
 10. 山崎正志: 最新原著レビュー: 胸椎後縦靱帯骨化症に対する術式別の手術成績, 特に後方除圧固定術の適応について. *整形外科* 59: 435-438, 2008.

11. 古矢文雄, 橋本将行, 国府田正雄, 大河昭彦, 山崎正志: ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける骨髄間質細胞(BMSC)移植とRhoキナーゼ阻害薬の併用による治療効果. 日脊障医誌 21: 106-107, 2008.
 12. 川辺純子, 国府田正雄, 門田領, 大河昭彦, 山崎正志: ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける顆粒球コロニー刺激因子の血管系に対する作用. 日脊障医誌 21: 112-113, 2008.
 13. 遠藤友規, 山崎正志, 大河昭彦, 門田領, 萬納寺誓人, 宮下智大, 川辺純子, 林浩一, 藤由崇之: 三次元画像構築が可能であるフリーソフトの脊椎外科における有用性. 日脊障医誌 21: 124-125, 2008.
 14. 遠藤友規, 山崎正志, 大河昭彦, 門田領, 萬納寺誓人, 宮下智大, 川辺純子, 林浩一, 藤由崇之: 慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)と頸椎症性脊髄症の合併例に対する手術経験. 日脊障医誌 21: 154-155, 2008.
 15. 林浩一, 山崎正志, 大河昭彦, 門田領, 宮下智大, 遠藤友規: 頸椎椎弓形成術後に局所後弯が増強し歩行不能となった1例. 日脊障医誌 21: 152-153, 2008.
 16. 藤由崇之, 山崎正志, 大河昭彦, 門田領, 萬納寺誓人, 宮下智大, 川辺純子, 林浩一: 無症状の頸椎後縦靭帯骨化症例の検討. 日脊障医誌 21: 156-157, 2008.
 17. 山崎正志: 特集: 整形外科ナビゲーション支援手術「頸椎・胸椎手術における3次元実体模型の有用性, 術前手術シミュレーションおよび術中ナビゲーション」. J MIOS 49: 25-34, 2008.
 18. 山崎正志: 胸椎後縦靭帯骨化症に対する治療方針. マルホ整形外科セミナー放送内容集第188集. pp7-10, 2008.
- 学会発表
1. Fujiyoshi, T., Yamazaki, M., Okawa, A., Kawabe, J., Hayashi, K., Endo, T., Takahashi, K.: Analysis of factors for the development of myelopathy in patients with cervical OPLL: static factor versus dynamic factor. 24th Annual Meeting, Cervical Spine Research Society European Section/Spine Week 2008. May 26-27, 2008, Geneva
 2. Kawabe, J., Koda, M., Hashimoto, M., Kadota, R., Mannoji, C., Miyashita, T., Fujiyoshi, T., Okawa, A., Yamazaki, M., Takahashi, K.: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) exerts neuroprotective effect via promoting angiogenesis after spinal cord injury in rats. Annual Meeting, EuroSpine/Spine Week 2008. May 26-27, 2008, Geneva
 3. Endo, T., Yamazaki, M., Okawa, A., Kawabe, J., Hayashi, K., Fujiyoshi, T., Furuya, T., Takahashi, K., Yanagawa, N.: The usefulness and reliability of a high functional open source DICOM software in spine surgery. 24th Annual Meeting, Cervical Spine Research Society European Section/Spine Week 2008. May 26-27, 2008, Geneva
 4. Fujiyoshi, T., Yamazaki, M., Okawa, A., Kawabe, J., Furuya, T., Endo, T., Hayashi,

- K., Takahashi, K.: Analysis of factors for the development of myelopathy in patients with cervical OPLL: static factor versus dynamic factor. 36th Annual Meeting, Cervical Spine Research Society. December 4-6, 2008, Austin
5. Kawabe, J., Koda, M., Hashimoto, M., Kadota, R., Fujiyoshi, T., Okawa, A., Yamazaki, M., Takahashi, K.: Granulocyte colony-stimulating factor promotes angiogenesis and displays neuroprotective effects after spinal cord injury in rats. 36th Annual Meeting, Cervical Spine Research Society. December 4-6, 2008, Austin
 6. 藤由崇之, 山崎正志, 大河昭彦, 門田領, 萬納寺誓人, 宮下智大, 川辺純子, 林浩一, 遠藤友規, 古矢丈雄, 高橋和久: 頸椎後縦靭帯骨化症例における脊髄障害の病態, 無症候例から見た解析. 第37回日本脊椎脊髄病学会 日脊会誌 19:241, 2008
 7. 川辺純子, 国府田正雄, 門田領, 橋本将行, 萬納寺誓人, 宮下智大, 藤由崇之, 古矢丈雄, 遠藤友規, 林浩一, 大河昭彦, 山崎正志, 高橋和久: ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける顆粒球コロニー刺激因子の血管系に対する効果. 第37回日本脊椎脊髄病学会 日脊会誌 19:93, 2008
 8. 川辺純子, 国府田正雄, 橋本将行, 藤由崇之, 林浩一, 遠藤友規, 古矢丈雄, 大河昭彦, 山崎正志, 高橋和久: ラット脊髄圧挫損傷慢性期における細胞外マトリックス分解促進による瘢痕抑制効果. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 日整会誌 82(8): S917, 2008
 9. 古矢丈雄, 橋本将行, 国府田正雄, 村田淳, 大河昭彦, 山崎正志, 高橋和久: ラット脊髄圧挫損傷モデルにおけるグリア前駆細胞由来アストロサイト移植の検討. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 日整会誌 82(8): S1052, 2008
 10. 遠藤友規, 国府田正雄, 田村裕, 大河昭彦, 山崎正志, 高橋和久: コンピューター上にて合成を行ったペプチド医薬によるEGFR阻害効果. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 日整会誌 82(8): S1058, 2008
 11. 藤由崇之, 久保武一, 山崎正志, 大河昭彦, 国府田正雄, 橋本将行, 川辺純子, 古矢丈雄, 山口淳, 山下俊英, 高橋和久: Interferon gamma (IFN \cdot)の脊髄損傷治療効果. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 日整会誌 82(8): S1215, 2008
 12. 鈴木利直, 藤由崇之, 久保武一, 山崎正志, 大河昭彦, 国府田正雄, 橋本将行, 川辺純子, 古矢丈雄, 山口淳, 高橋和久: IFN \cdot 刺激による astrocyte への影響. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 日整会誌 82(8): S1215, 2008
 13. 古矢丈雄, 橋本将行, 国府田正雄, 村田淳, 大河昭彦, 山崎正志, 出澤真理, 松瀬大, 田畑泰彦, 高橋和久: ラット脊髄圧挫損傷モデルにおけるbFGF徐放ゼラチンハイドロゲル移植の検討. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 日整会誌 82(8): S1220, 2008
 14. 藤由崇之, 山崎正志, 大河昭彦, 川辺純子,

- 古矢丈雄, 林浩一, 遠藤友規, 高橋和久: 頸椎後縦靭帯骨化症に対する後方除圧固定術は、なぜ有効か? 第17回日本脊椎インストゥルメンテーション学会 抄録集 p. 174-5
15. 新初正明, 政木豊, 門田領, 大河昭彦, 山崎正志: 前方椎弓根スクリュー刺入角度の検討. 第17回日本脊椎インストゥルメンテーション学会 抄録集 p. 182-3
16. 門田領, 新初正明, 政木豊, 大河昭彦, 山崎正志: 前方椎弓根スクリュー刺入に関する解剖学的検討. 第17回日本脊椎インストゥルメンテーション学会 抄録集 p. 186-7
17. 遠藤友規, 山崎正志, 大河昭彦, 川辺純子, 林浩一, 藤由崇之, 古矢丈雄, 梁川範幸, 高橋和久: 三次元画像構築が可能であるフリーソフトウエアの脊椎外科における有用性と信頼性. 第17回日本脊椎インストゥルメンテーション学会 抄録集 p. 244-5
18. 林浩一, 橋本将行, 国府田正雄, 大河昭彦, 山崎正志: ラット脊髄損傷に対するシロスタゾール投与の有用性の検討. 第43回日本脊髄障害医学会 抄録集 p118
19. 藤由崇之, 山崎正志, 大河昭彦, 国府田正雄, 橋本将行, 久保武一: インターフェロンガンマの脊髄損傷治療効果. 第43回日本脊髄障害医学会 抄録集 p118
20. 川辺純子, 国府田正雄, 橋本将行, 大河昭彦, 山崎正志, 高橋和久: ラット脊髄圧挫損傷慢性期における細胞外基質分解促進によるグリア瘢痕抑制効果. 第43回日本脊髄障害医学会 抄録集 p119
21. 古矢丈雄, 橋本将行, 国府田正雄, 村田淳, 出澤真理, 山崎正志: ラット脊髄圧挫損傷モデルにおけるbFGF徐放ゼラチンハイドロゲル移植の検討. 第43回日本脊髄障害医学会 抄録集 p120
22. 国府田正雄, 橋本将行, 古矢丈雄, 林浩一, 大河昭彦, 山崎正志: 脊髄圧挫損傷モデルに対するconstraint-induced movement therapyの検討. 第43回日本脊髄障害医学会 抄録集 p121
23. 遠藤友規, 田村裕, 国府田正雄, 山崎正志, 大河昭彦, 川辺純子: コンピューター上で合成したペプチド医薬によるEGFR阻害効果. 第43回日本脊髄障害医学会 抄録集 p122
24. 国府田正雄, 川辺純子, 藤由崇之, 遠藤友規, 大河昭彦, 山崎正志: 急性期脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子の神経保護効果: 臨床試験第一報. 第43回日本脊髄障害医学会 抄録集 p147
- G. 知的財産権の出願・登録状況
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

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

DNA マイクロアレイを用いた周期的牽引負荷に対する
脊髄ニューロンの神経栄養因子遺伝子解析

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

研究要旨

機械的ストレスに対する脊髄神経細胞の応答を観察する目的で、ラット初代脊髄培養細胞を用いて、周期的牽引負荷に対する形態学的、免疫組織化学的变化を *in vitro* で観察した。最大牽引 12%、1 回/秒のストレス条件での経時的変化では、ストレス開始後 6 時間で神経細胞数の減少、24 時間では細胞膨化など一部壊死性変化細胞体内空胞出現、樹状突起の破壊を認めた。また同時期に LDH 放出量は増加し、細胞損傷が確認された。牽引ストレスによる経時的な変化に対する神経栄養関連遺伝子発現の signal の変動は、損傷直後一過性に上昇する遺伝子群、その上昇を維持する群、ストレスに反応しない遺伝子群に大きく分けられ、機械刺激による細胞内 Ca の上昇や、ニューロン自身の発現によるものと考えられた。RT-PCR ではストレス開始後 6 時間で NGF, BDNF, p75NTR, GDNF の発現の増加、および免疫組織学的にもその変化が確認された。脊髄へメカニカルストレスは、膜損傷、軸索損傷、ニューロン伝達障害、異なった転写因子の発現、グリアの神経栄養因子関連産生を生じさせると考えられるが、ニューロンは遺伝子パターンを変化させ、その生存維持にตอบสนองしていると推察された。

A. 研究目的

脊柱管内臓器である脊髄では、常に脊柱運動により力学的影響に曝されており、脊柱伸展、屈曲の際に長軸方向への移動および脊髄内に緊張帯が生じると考えられている。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 irreversible な変化が生じると考えられる。

これまでの動物実験において圧迫、伸展などの力学的刺激に対する生理学的、病理

組織学的についての報告は散見されるが¹⁻⁴⁾、モデルが多彩であり、その条件設定が統一されていないこと、また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変化が生じているため、単独での生物学的活性を知ることは不可能である。

細胞への *in vitro* での牽引ストレス実験は、以前より、骨芽細胞、髄核細胞、靭帯細胞などに対して応用されており、その刺激による蛋白発現、シグナル伝達につい

て明らかにされてきているが、機械刺激に脆弱とされるニューロンに対してはその報告はいまだ少ない。今回、培養脊髄神経細胞を用いてメカニカルストレスに対する形態学的観察および神経栄養因子に関する遺伝子発現を解析した。

B. 研究方法

細胞の機械的ストレスには、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 FX-3000TM-Flexercell Strain Unit (Flexercell International)を使用した(図1)。培養脊髄細胞は妊娠 Sprague-Dawley (SD)ラットの胎生15日目の胎仔より採取し、コラーゲンIV処理した専用の6穴プレートに播種し、3日間培養後、5%CO₂ incubator内で機械的ストレスを加えた。機械的ストレスは1秒間伸展/弛緩(最大12%牽引)を継続的に加えた。刺激開始後、経時的に(0, 2, 6, 12, 24, 36hr)細胞形態、細胞カウント、LDH放出量を測定した。遺伝子解析はRNA抽出後、GeneChip Rat Genome 230 2.0 (Affymetrix社)により、クラスタリング解析、Gene ontology 頻度解析、Pathway解析を行った後、特定の目的遺伝子に対してはPT-PCRを行い発現量を解析し、各細胞マーカーによる二重免疫染色を行なった。

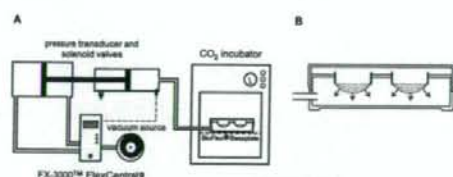


図1 A; FX3000 Flexercell strain unit B;陰圧により、細胞に牽引負荷をかけることができる。

C. 結果

評価したラット初代脊髄培養のNeN(神経細胞マーカー)陽性率は約71%であった。ストレス開始後6時間で細胞数(神経細胞)の減少、24時間では細胞膨化など一部壊死性変化細胞体内空胞出現、樹状突起の破壊も認めた(図2)。ストレス開始後約6時間で神経細胞(Live cell)は半減し、また同時期にLDH放出量は急増した(図3)。各ポイントにおいての遺伝子発現データを正規化し、フィルタリングにより、23506のプロブセットを抽出、発現率2以上、発現差200以上をみたすものを、ストレスにより変動あり、とし、3421のプロブセットを更に抽出した。遺伝子発現パターンにより1)ストレスにより発現の変化がないもの、2)発現時間により徐々にsignal値が上昇するもの、3)早期より発現のsignal値が高値となっているものに分割された。Pathway解析では有意に変動していた主なものは、MAPK signaling、Glutathion metabolism、TGF-beta signaling、Cell adhesion molecules、ECM-receptor interaction、

PPAR signaling, Wnt signaling, D-glutamine metabolism などであった。形態学的変化と相関して NGF, BDNF, GDNF, trkB, p75NTR, Caspase9 mRNA の有意な上昇を認めた。BDNF/trkB は比較的高値を維持する一方で、他の遺伝子は一過性的変化であった (図4)。それらの蛋白の局在は NeuN 陽性細胞に一致し、免疫活性の増加を確認し得た。



図2 位相差顕微鏡によるストレス開始後の神経細胞の経時的変化 A: 0hr, B: 6hr, C: 24hr

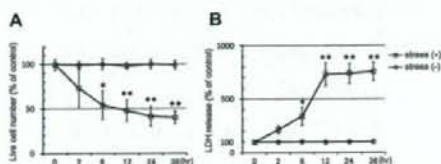


図3 ストレス開始後のA:神経細胞数 (Live cell) とB: LDH放出量

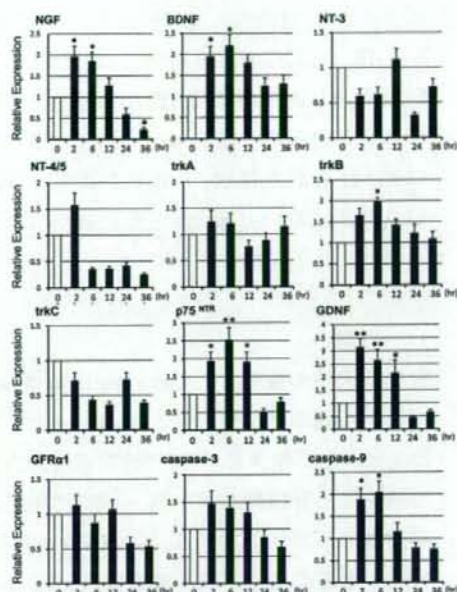


図4 ストレス開始後の神経栄養関連遺伝子の mRNA 発現の経時的変化

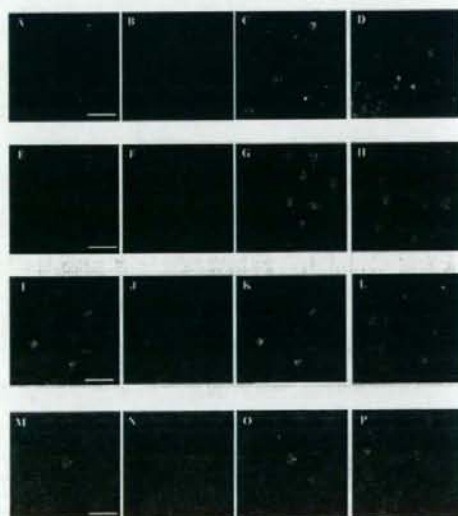


図5 共焦点レーザー顕微鏡によるストレス開始後(6時間)の神経細胞(NeuN)におけ

る NGF (C), BDNF (G), p75NTR (K), GDNF (O) の局在。A, E, I, M は 6 時間後 NeuN の局在、B (NGF), F (BDNF), J (p75NTR), N (GDNF) は 6 時間ストレス後の各蛋白による局在、C, G, K, O は merge された細胞、D, H, L, P は各々の蛋白 0 時間において merge された細胞 (コントロール) をしめす。

D. 考察

脊髄の物性の変化としては、約 10% の伸長で髄内に緊張体が生じると White and Panjabi らが報告し⁵⁾、脊髄誘発電位の振幅の減少は、脊髄長さが 10% - 17% で生じると報告されている。一方、in vitro の観察では、過去の報告では、軸索損傷、細胞死の観察目的での実験系が多く NG 細胞

(108-15)、PC12 などの cell line を用いての非生理的な、損傷実験が報告されている。今回の実験では、初代脊髄細胞を用いて、様々の条件による予備実験を行い、最大牽引 12% と、生理的条件に近い形での、遺伝子発現変化を観察した。牽引ストレスによる経時的な変化に対する neurotrophin 遺伝子発現の signal の変動は、損傷直後一過性に上昇する遺伝子群、その上昇を維持する群、ストレスに反応しない遺伝子群に大きく分けられ、機械刺激による細胞内 Ca の上昇や、ニューロン自身の発現によるものと考えられた。脊髄へメカニカルストレスは、膜損傷、軸索損傷、ニューロン伝達障害、異なった転写因子の発現、グリアの神経栄養因子関連産生を生じさせると考えられるが、ニューロンは遺伝子パターンを変化させ、その生存維持に应答していると推察された。

E. 結論

脊髄へメカニカルストレスは、膜損傷、軸索損傷、ニューロン伝達障害、異なった転写因子の発現、グリアの神経栄養因子関連産生を生じさせると考えられるが、ニューロンは遺伝子パターンを変化させ、その生存維持に应答していると推察された。

F. 研究発表・論文発表

- 1) Uchida K, Nakajima H, Takamura T, Furukawa S, Kobayashi S, Yayama T, Baba H. Gene expression profiles of neurotrophic factors in rat cultured spinal cord cells under cyclic tensile stress. *Spine* 24; 2596-2604, 2008

G. 知的財産権の出願・登録状況 特記することなし。

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: 109-16.
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: 222-9.

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 NeuroI* 1998; 245: 781-93.
4. Uchida K, Baba H, Furukawa S, et al. Increased expression of neurotrophins and their receptors in the mechanically compressed spinal cord of the spinal hyperostotic mouse (*twy/twy*). *Acta Neuropathol* 2003; 106: 29-36.
5. Panjabi MM, White AA IIIrd. Physical properties and functional biomechanics of the spine: the spinal cord. In: White AA IIIrd, Panjabi MM, eds. *Clinical Biomechanics of the Spine*. 2nd edition. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1996: 67-71.

脊髄に運動速度が脊髄障害に及ぼす影響に関する研究

研究分担者 加藤 圭彦 山口大学整形外科

田口 敏彦 山口大学整形外科教授

研究要旨 頸椎後縦靭帯骨化症においては、軽微な外傷で発症あるいは症状が増悪することが知られている。従って、脊髄に対する圧迫のみでなく、脊髄自体の運動による応力集中も脊髄障害の一因子として推察される。そこで、静的圧迫下における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について有限要素法を用いて力学的に検討した。その結果、運動により脊髄内の応力は上昇し、また運動速度の上昇とともに応力も上昇し、脊髄障害における動的因子の重要性が示された。従って、脊髄の急速な運動は脊髄障害の一因子となりうると考えられた。

A. 研究目的

頸椎後縦靭帯骨化症（以下 OPLL）においては、骨傷を伴わない軽微な外傷で発症あるいは症状が増悪することが知られており、過伸展が生じない場合でも発症することがある。従って、脊髄に対する圧迫のみでなく、脊髄自体の運動による応力集中も脊髄障害の一因子として推察される。今回、脊髄の運動速度と脊髄障害の関係に注目し、静的圧迫下における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力学的に検討した。

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二次元平面上でメッシュ分割し、これをもとに三次元有限要素脊髄モデルをコンピュータ上で作成した。脊髄後方を後方から拘束した状態で、前方から圧迫を加えた。圧迫の形式は、OPLL を想定し、平板上因子により静的に加え、圧迫の程度は脊髄前後径の 20% とした。分節型 OPLL を想定し、脊髄の第 1 から 3 層および、第 5, 6

層に静的圧迫を加え、第 4 層には圧迫を加えないこととした。屈曲角度は 5[deg]、屈曲速度は、0.5[deg/sec]、5[deg/sec]、50[deg/sec]の 3 種類とした。解析には本実験用に作成した非線形粘弾性 20 節点三次元有限要素法プログラムを使用した。

（倫理面での配慮）

本研究はコンピュータ・シミュレーションであり、特に倫理面での配慮は必要ないものと考えられる。

C. 研究結果

的圧迫下での脊髄内の応力は比較的軽度であった。低速度での応力上昇は軽度であったが、中速度では応力上昇が高度となり、高速度では更に応力の上昇がみられた。

D. 考察

髄障害の原因として圧迫因子とともに動的因子の関与が重要であると推察される。脊髄に強い圧迫が加わったと考えにくい程度の軽度の外傷によって症状が発症あるいは増悪症例に遭遇することもあり、特に

OPLL では、非常に軽微な外傷で悪化することが報告されている。そこで、今回われわれは、脊髄に対する圧迫では無く、脊髄自体の運動速度が脊髄障害に与える影響に注目し、静的圧迫下にある脊髄を屈曲・伸展させることにより、脊髄内に生じる応力を求めた。OPLL における軽微な外力を再現するため、以下の条件設定を行った。①平板上に静的圧迫を加えた。②文節型 OPLL を再現するため圧迫因子に非連続部を作成し、同部を可動部とした。③黄色靭帯の影響を除外するため、屈曲とした。④軽微な外傷を想定し、一椎間の可動域を 5[deg]とした。⑤生理的運動と外傷を比較するため 3 種類の屈曲速度(0.5[deg/sec]、5[deg/sec]、50[deg/sec])でシミュレーションした。

その結果、運動により脊髄内の応力は上昇し、また速度の上昇とともに応力も上昇し、脊髄障害における動的因子の重要性が示された。従って、脊髄の急速な運動は脊髄障害の一因子となりうると考えられた。

E. 結論

三次元有限要素法モデルを使用して、非骨症性脊髄損傷発生メカニズムの解明を試みた。脊髄の運動速度の上昇とともに脊髄内の応力分布は上昇した。急速な脊髄の運動は脊髄損傷の一因子となり得ると考えられた。

F. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

有限要素法を用いた脊髄の運動速度が脊髄障害に及ぼす影響の力学的解析。加藤圭

彦、片岡秀雄、寒竹司、今城靖明、市原和彦、田口敏彦。第111回中部日本整形外科災害外科学会 2008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

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

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

三次元 CT を用いた頸椎後縦靭帯骨化症の骨化形態と MRI による脊髄圧迫
病変の関連についての検討

Relationship between the ossified lesions evaluated by 3D-CT and spinal
cord compression in patients with OPLL

研究分担者	川口善治	富山大学医学部整形外科臨床准教授
	関 庄二	富山大学医学部整形外科助教
	浅沼 由美子	富山大学医学部整形外科助教
	堀 岳史	富山大学医学部整形外科
	木村友厚	富山大学医学部整形外科教授

研究要旨 術前症例または保存的加療を選択した OPLL 患者 30 例（男性 18 例、女性 12 例、平均年齢 65.1 歳）を対象として、MRI において脊髄圧迫病変と、3D-CT による OPLL の骨化形態の関連について分析した。その結果、骨化途絶部位の辺縁で MRI 上の脊髄圧迫を認める例が 24 例存在した。その他の 6 例では、骨化中央の最も盛り上がった部位で脊髄圧迫が起っていた。以上より OPLL における脊髄症の発症は骨化辺縁による脊髄圧迫が主たる要因である可能性があり、このことは治療を考える上でも重要な治験と考えられた。

A. 研究目的

三次元 CT（以下 3D-CT）を使用し頸椎後縦靭帯骨化症（以下 OPLL）の骨化巣を評価したところ、単純 X 線側面像で捉えられない骨化形態の詳細が描出可能であることがわかった。すなわち、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ことや、単純 X 線像で骨化巣が連続していると判断された領域に 3D-CT 像で骨化の途絶が観察された。そこで今回は術前に撮像した MRI において脊髄圧迫病変と、3D-CT による OPLL の骨化形態の関連について分析し、OPLL における 3D-CT 撮像の意義を検討することを目的とした。

B. 研究方法

術前症例または保存的加療を選択した OPLL 患者 30 例（男性 18 例、女性 12 例、平均年齢 65.1 歳）を対象とした。来院時に全患者

で神経症状の有無を調べた。同日に頸椎単純 X 線 2 方向の撮影と Multidetector CT による後頭骨から頸椎全体の CT の撮像を行った。その後頸椎 MRI 尖状断像、水平断像を撮像した。頸椎における OPLL の骨化巣は、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。Multidetector 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。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。3D-CT による骨化形態は以下の基準で分類した。平坦型：骨化巣が椎体および椎間板レベルに平坦に広がる特徴があるもの、不整形型：骨化巣が椎体中央部で抜けているものや、先端が 2 つに分かれているもの、限局型：椎体後縁にのみ骨化巣が存在するもの。さらに脊髄の圧迫の有無を頸椎 MRI T2 強調像を用いて調べた。MRI 上各椎体、椎間レベルで reserve space が消失し、脊髄の