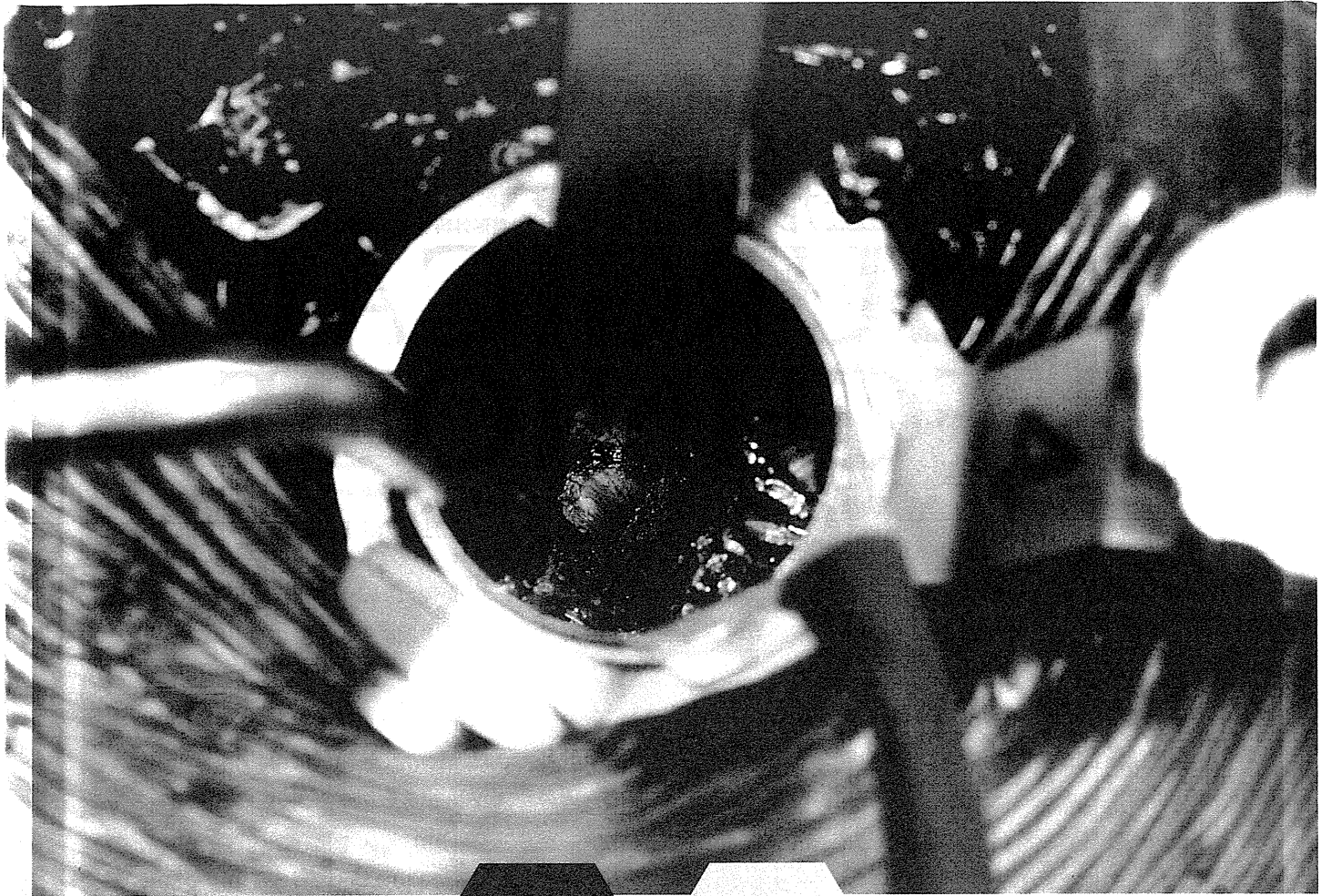


整形外科
整形外科サージカルテクニック
SURGICAL
TECHNIQUE

2011 Vol.1 No.2

MC メディカ出版



Orthopaedic
surgical
technique

脊椎
Spine

seikei-surg.jp
手術動画

変性すべり症に対する Mini-open TLIF

低侵襲脊椎固定のための 傍脊柱筋間アプローチと正中アプローチの併用

種市 洋 Hiroshi Taneichi

獨協医科大学医学部医学科整形外科学准教授
〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町大字北小林880

加藤仲幸 Nakayuki Katoh

獨協医科大学医学部医学科整形外科学

整形外科 Surgical Technique vol.1 no.2 2011 (135) 15

Mini-open TLIF とは

変性すべり症のうち椎間不安定性と脊柱管狭窄症による神経症状を有するものは腰椎除圧固定術の適応となる。腰椎固定術は大きく前方、後側方、後方椎体間固定術に分類できる。後方椎体間固定術のバリエーションとして、TLIF (transforaminal lumbar interbody fusion) は椎間固定の舞台となる椎間板腔へのアクセスを椎間孔部へおくことにより、神経根や馬尾への負担や術中損傷のリスク軽減を目的にLIFのバリエーションとし開発された術式である。現在は腰椎固定術の主たる術式の一つとして広く行われるようになった^{1, 2)}。さらに、TLIFにおける椎間板操作のポータルを片側のみに限定すれば、片側椎間関節機能の温存と神経組織への侵襲をより軽減できる。

一方、腰椎後方固定術の大きな弱点として、いわゆる fusion disease といわれる「腰部の不快感や違和感」や「ハリ感」といった愁訴の残存があげられる。これは傍脊柱筋（最長筋と多裂筋）の広範な剥離と長時間の圧排による疎血や脱神経に基づく術後の筋変性が主因とされている。この後方展開に起因する障害の解決策として傍脊柱筋への侵襲軽減を目的とした種々の低侵襲アプローチが開発されてきた。傍脊柱筋間（筋内）アプローチのための特別なレトラクターを用い、そこから椎弓根スクリュー（PS）刺入や椎体間固定操作を行うものや経皮的PS刺入のためのシステムなどがそれである。

POINT

1 傍脊柱筋間アプローチ

解剖学的な「筋間」を進入する傍脊柱筋間アプローチ (Wiltse)³⁾ では、PS刺入に必要な椎間関節から横突起に最短距離で到達でき、多裂筋を外側まで過度にレトラクトする必要がない。また、左右それぞれのアプローチを別個に行うため、それぞれの展開保持時間が短くなり、筋血流障害を予防できる。また、直視下術野で行うため、いわゆるフリーハンドのPS刺入が可能である。

2 正中アプローチ

正中脊柱管除圧は正中の小展開で実施可能である。また、椎間板操作は、正中と傍脊柱筋アプローチ双方から適宜行える。

3 TLIF —神経に優しい椎体間操作

TLIFでは椎間孔からの椎体間操作を行う。すなわち、椎間孔から導出される exiting root と椎間板を横切る traversing root の間から椎間板にアプローチするため、すべての椎体間操作の際に神経根をレトラクトする必要がほとんどない。

術前評価

症例

50歳（女性）、主婦 L4変性すべり症による脊柱管狭窄症

数年前より時々腰痛が出現した。1年前より、1kmの歩行により左下腿外側の痛みとしびれを感じるようになった。この症状はしゃがんで休むと軽減する。半年ほど前から、台所の立ち仕事をしていても同症状が出現するようになり、歩行可能距離も300m程度になり、近医（整形外科）を受診した。腰部脊柱管狭窄症の診断にて、プロスタグランジン製剤と消炎鎮痛薬の投薬を受けるも著効せず、連続歩行可能距離も100m以下になり当科を紹介された。

初診時、下肢伸展挙上テスト（straight leg raising test）は陰性であったが、Kemp徴候は陽性であった。神経学的には下肢の知覚と筋力はほぼ正常であった。

画像はミエログラフィーでL4/5間の造影柱の陰影欠損を呈している。また、機能写ではL4/5椎間の不安定性が示され、屈曲位ではL4すべりの増強とL4/5椎間の局所後弯を呈している。脊柱管狭窄症では通常、症状のでない臥位で撮像するMRIと異なり、ミエログラフィーは立位での動態撮影が可能であることから、脊柱不安定性や脊柱管狭窄に関してより詳細な術前評価ができる（図1）。

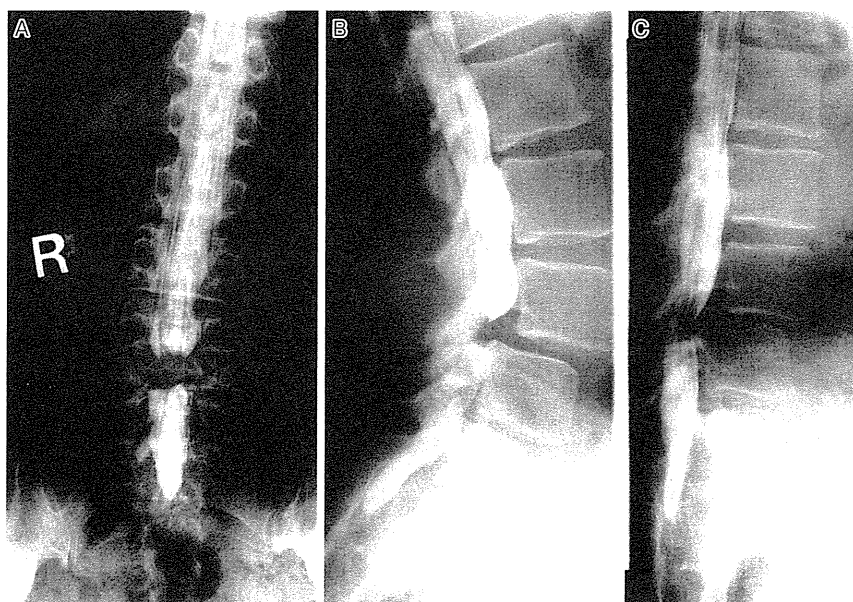


図1 症例の術前画像所見

A：ミエログラフィー正面 B：ミエログラフィー側面 C：ミエログラフィー側面（前屈位）
L4/5レベルで造影柱の陰影欠損がみられる。また、前屈位ではL4すべりが増すとともに局所後弯が生じ、同部位での脊柱不安定性を示している

術後1年のX線所見

術後1年のX線所見を図2に示す。術後1年時、間欠跛行は完全に消失し、腰痛も著明に改善した。L4/5はわずかなすべりの残存はあるが、前弯位で固定されており、椎体間の骨癒合も完成している。

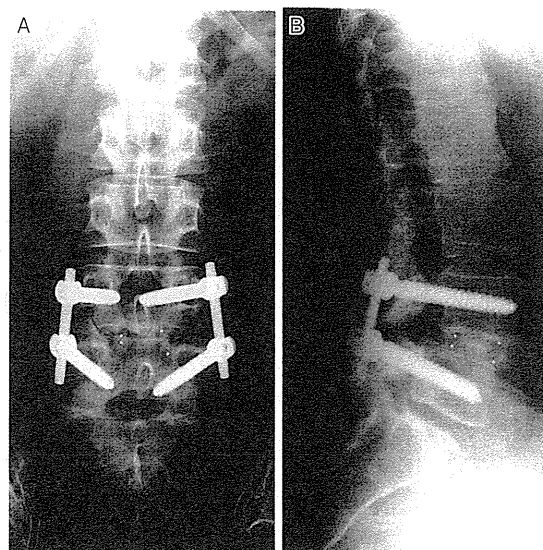
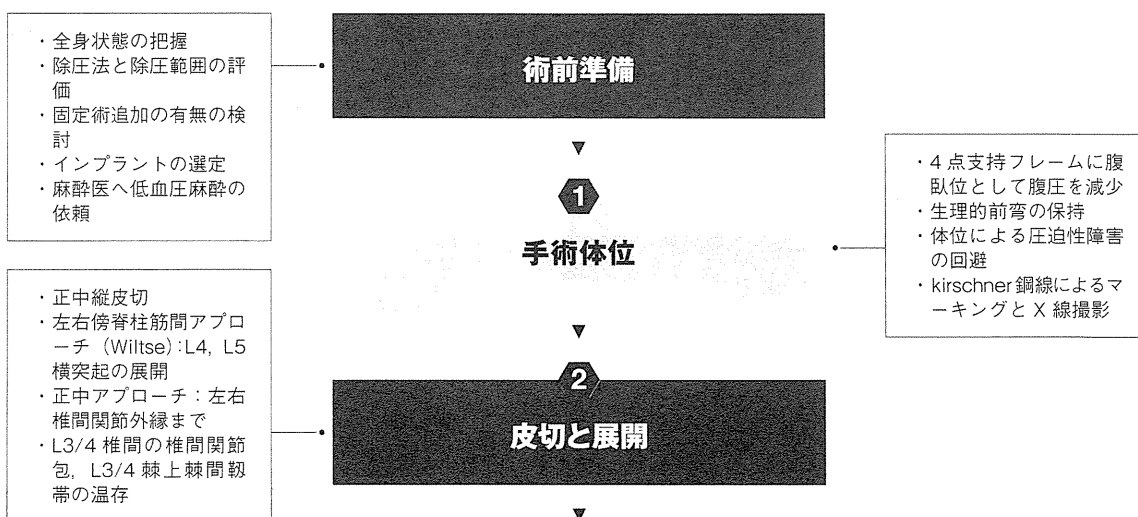


図2 術後1年のX線所見

A：正面 B：側面

手術の実際の流れ（フローチャート）



3

**椎弓根スクリュー設置
(Wiltse アプローチから)**

4

腸骨稜からの移植骨採取

5

神経除圧術:**内側椎間関節切除・片側進入両側除圧**

- (1) L4 椎弓と下関節突起の部分切除
- (2) L5 椎弓上縁切除と黄色靭帯摘出
- (3) L5 上関節突起部分切除と神経根除圧
- (4) 神経除圧の確認



6

椎間板切除と椎体間固定(ケージ設置)

- (1) 片(左)側 L4/5 椎間関節全切除による TLIF 用ポータルの作製
- (2) 椎間板切除
- (3) 椎体間固定母床作製
- (4) 椎体間ケージの設置と椎体間骨移植



7

ロッド設置と椎弓根スクリューとの締結

8

閉創・ドレーン留置

9

術後の注意点と後療法

手術手技 (L4-5 単椎間固定例)

① 手術体位



図3 4点支持フレームを使用した腹臥位

Hallの4点支持フレームに腹臥位とする。4点支持フレームは腹圧上昇による椎骨静脈叢からの出血量増加の予防が目的である。パッドは頭側2点が肋骨弓下端、尾側2点は大転子部とし大腿外側皮神経の圧迫を回避する。頸部が過伸展しないよう上半身は斜面台で支える。股・膝関節を軽度屈曲位として生理的前弯位を保持する。X線コントロール、または、Cアームでマーキングレベルを確認する(図3)。

② 皮切と展開

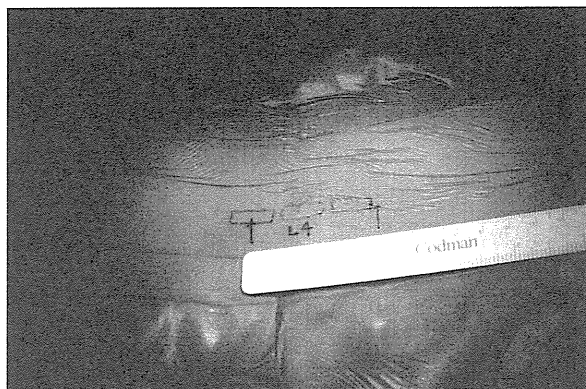


図4 L3 - L5 棘突起上に5～6cm程度の正中縦皮切

L3 - L5 棘突起上に5～6cmの正中縦皮切を加える(図4)。まず、胸腰筋膜(thoracolumbar fascia)を棘突起付着部で切離する。Wiltseアプローチの筋間分離進入部展開を皮下剥離で行うと皮下に滲出液貯留が起きるため、その展開は胸腰筋膜下で行う必要がある(図5)。胸腰筋膜を外側にレトラクトすると脊柱起立筋腱膜(lumbar aponeurosis: LP)が展開される(図6)。棘突起より2～3cm外側でLPを線維方向にメスで縦割すると多裂筋と胸最長筋が展開されるので、この筋間でコブ・エレベーターなどを用いて鈍的に分けながらL4横突起を展開する。その際、筋間を走行する血管をバイポーラーで丁寧に止血しつつ展開を進めることが重要である(図7)。同様に筋間からL5横突起を展開する。展開された筋間は頸椎前方手術用レトラクター(TRIMLINEなど長さの異なるブレードを着脱可能な開創器)で上下方向を、ゲルビー・レトラクターで左右方向を保持する(図8)。

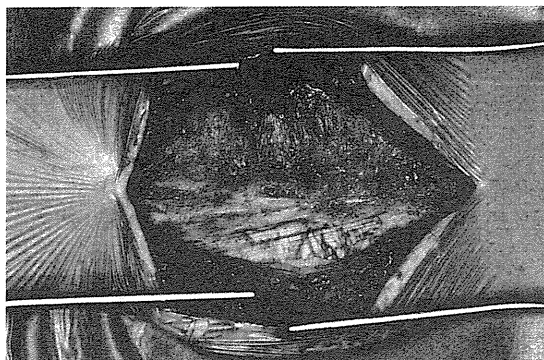


図5 胸腰筋膜を棘突起付着部で切離するとLPが展開される

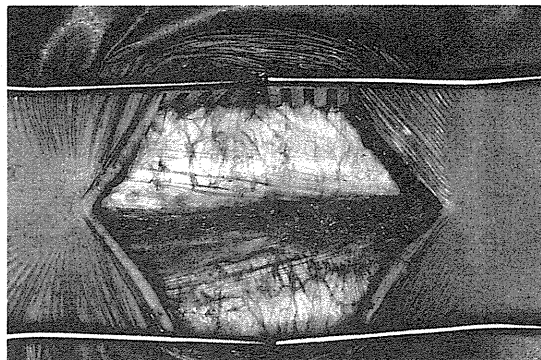


図6 LPが展開されたところ



図7 多裂筋と胸最長筋の筋間からL4横突起が展開されたところ



図8 多裂筋・胸最長筋間が展開されたところ
L4, L5横突起と横突起間膜が直視できる

③ 椎弓根スクリュー設置

刺入点は胸最長筋の近位付着部である副突起と多裂筋の遠位付着部である乳様突起の間である。筆者は椎弓根スクリュー設置の際、X線イメージ（Cアーム）を用いないいわゆる“フリーハンド・テクニック”で行っている。椎弓根スクリュー設置の際のX線イメージは一般に側面透視のみを利用するが、筆者は患者が4点支持フレーム上に腹臥位になった時点で、床面に水平の側面X線を撮影し、それを参照しながら椎弓根スクリューを刺入するようにしている。この操作により、矢状面でのスクリュー角を

正しく設定できる。また、横断面上のスクリュー設置角は外側に25～30°傾ける（図9）。Wiltseアプローチでは、十分なスクリュー刺入角度をとれるので、薄い外側椎弓根壁の穿破リスクを減じることができる。この操作を左右それぞれの筋間アプローチで行う（図10）。左右それぞれのスクリュー刺入時にレトラクターを入れ替えるので、左右の傍脊柱筋圧排時間がそれぞれ短くなり、筋圧排による筋粗血のリスクが少なくなることが本法のメリットである。

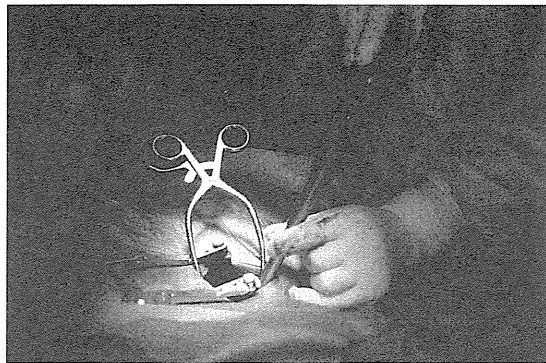


図9 Wiltse アプローチからの椎弓根スクリュー刺入
十分な刺入角度がとれる

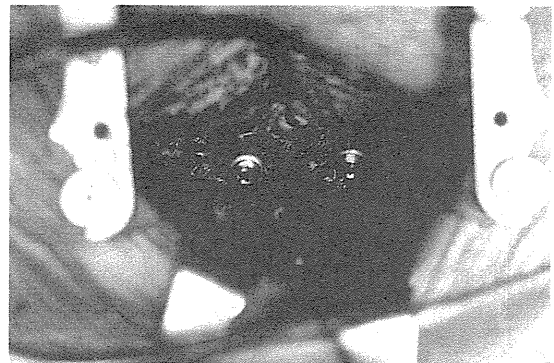
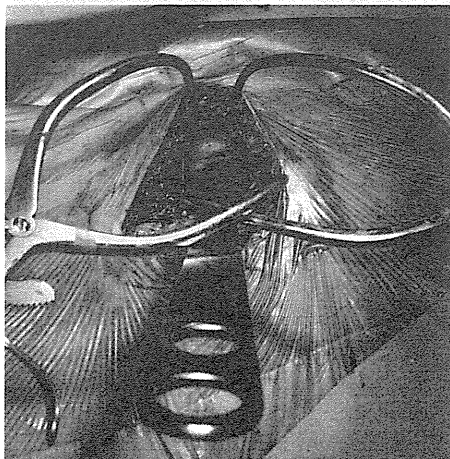


図10 椎弓根スクリューは左右の筋間アプローチから
行われる

4 腸骨稜からの移植骨採取



皮切を下側方に引き、脊柱起立筋の附着部を腸骨稜上面より剥離して移植用海綿骨を採取する。この方法では殿筋附着部を剥離しないため術後採取部痛を軽減できる（図11）。

図11 腸骨稜上面の脊柱起立筋附着部を剥離し、
そこから移植骨を採取する

5 神経除圧術：内側椎間関節切除・片側進入両側除圧

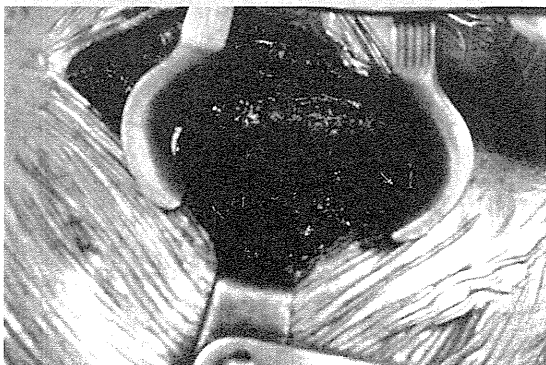


図12 Casper 開創器を用い、片側進入で両側の内側
椎間関節切除を行う

TLIF の椎間板操作を行う側(左側ないし椎間板高の低い側)のLP棘突起附着部とL4棘突起の多裂筋附着部をメスで切離後、コブ・エレベーターで多裂筋を側方によけ、L4/5椎弓間にCasper開創器を設置する。進入側の下関節突起を全切除後、進入反対側のL4椎弓下面を黄色靭帯のL5上関節突起附着部までエアドリルで削る。次に黄色靭帯を全切除してから、進入反対側のL5上関節突起内側部をケリソン鉗子で切除し、外側陥凹の除圧を完了する（図12）。次いで、進入側のL5上関節突起も全切除し、片側進入両側除圧（内側椎間関節切除）とTLIF用ポータル作製のためのアプローチが完了する。

6 椎間板切除と椎体間固定（ケージ設置）

多裂筋・胸最長筋間に開創器を再設置すると、椎間関節全切除部分からL4/5椎間板が直視できる(図13)。ここはL4神経根下方かつL5神経根側方の神経根に干渉しないスペースで片側進入TLIFのアクセスポイントとなる。

L4とL5神経根をそれぞれベンシーツで保護し、後側方線維輪をメスで切除し、TLIFのポータルを作製する(図14)。椎間板内操作を行う際は棘突起スプレッターで椎間板腔を広げておく。変性すべり

症は骨粗鬆症や骨量減少症を有する中高年女性を対象となることが多く、椎弓根スクリュー間に伸延力をかけ椎間開大することはスクリューのゆるみを防止する観点から原則として行わないようにしている。

コブ・エレベーター、髓核鉗子、リングキュレットを用いて徹底的な椎間板切除を行う(図15)。椎間板前方線維輪と後方線維輪それぞれの最外層付近まで徹底した椎間板切除を行うことが重要である。

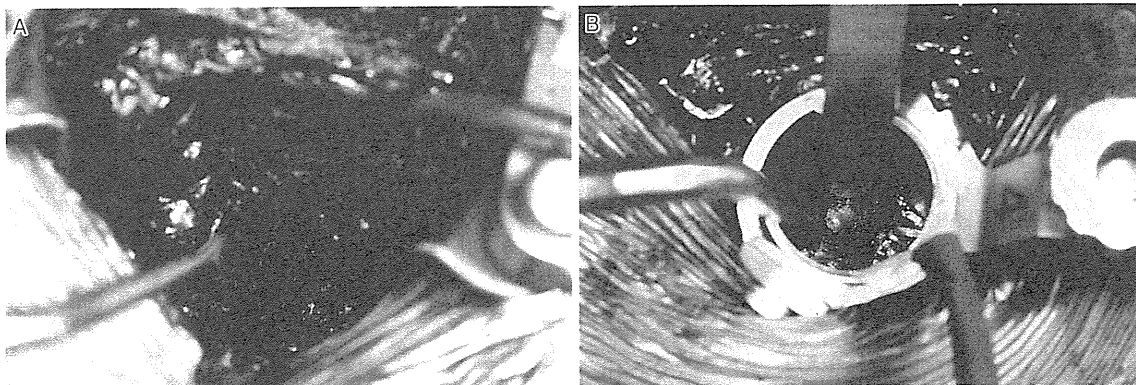


図13 TLIF用ポータルのための後側方線維輪の展開
A：TRIMLINEとゲルビー・レトラクター使用例 B：X-tube使用例
いずれも椎間板内操作のための進入部となる後側方線維輪が展開されている

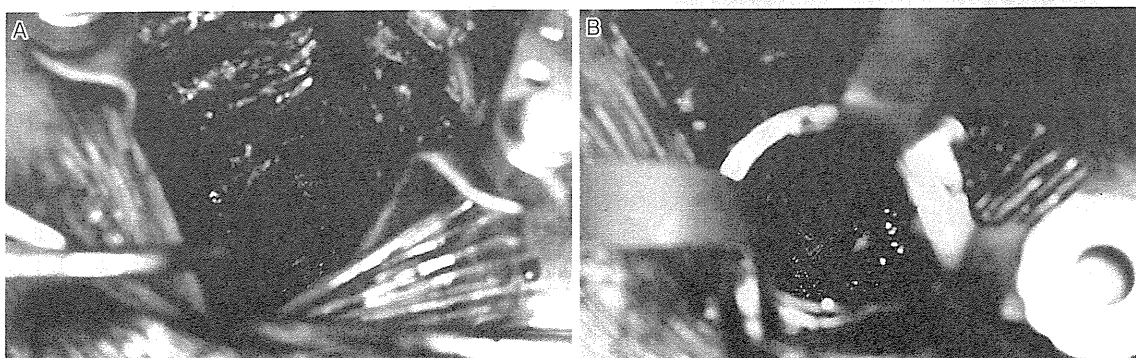


図14A TLIF用ポータル
A：TRIMLINEとゲルビー・レトラクター使用例 B：X-tube使用例
いずれも後側方線維輪を切除し、TLIF用ポータルが作製されている



図 15 リングキュレットや髄核鉗子などを用いて徹底的な椎間板切除を行う

椎体間を広げ、かつ、骨性終板表面をなめらかにするためにディスクスペース・スプレッターを椎間板腔に挿入する (図 16)。椎間板腔に十分量の骨移植を行う (図 17)。

椎間板腔への骨移植は、まず、椎間板前方に行く。次いで移植骨を充填した椎体間ケージを挿入する



図 16 ディスクスペース・スプレッターを挿入し、椎間板を開大し、骨性終板をなめらかにする

ピットフォール

リングキュレットを用いて軟骨終板を切除する際、力を入れすぎると骨性終板を損傷する。骨性終板損傷は術後のケージ沈み込みの原因となるため回避しなければならない。

手術のコツ

軟骨終板を骨性終板から剥離するにはコブ・エレベーターを用い後方から前方に向けゆっくり剥離すると骨性終板を温存した軟骨終板切除がうまくできる。

(図 18A)。まず、進入反対側へ向けて斜めに挿入し (図 18B)、ケージポジショナーでケージ後方部を対側へ送りケージを矢状面方向に一致させる (図 18C)。進入反対側に設置したケージの側方に十分な骨移植を行った後、進入側に 2 個目のケージを設置し椎体間固定操作を完了する (図 18D)。

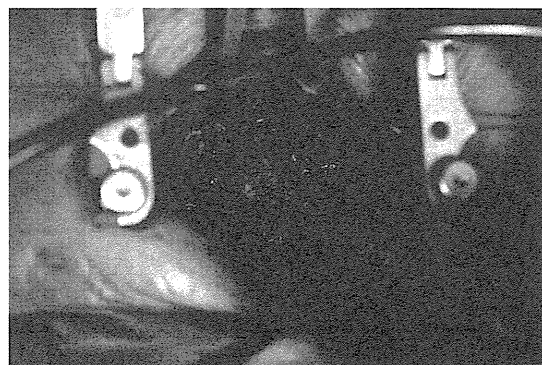


図 17 神経除圧の際に得られた局所骨および腸骨を用い作製した morselized bone chip を移植する

手術のコツ

左右のケージ間に十分な骨移植を行うことが重要で、これにより広いケージ間距離をもった両側 anterior column support と骨癒合に有利な椎体終板中央部への十分な骨移植が達成できる。

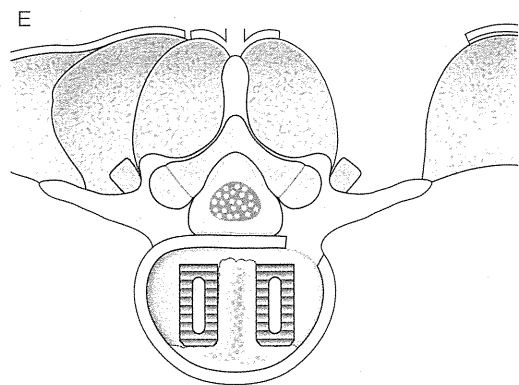
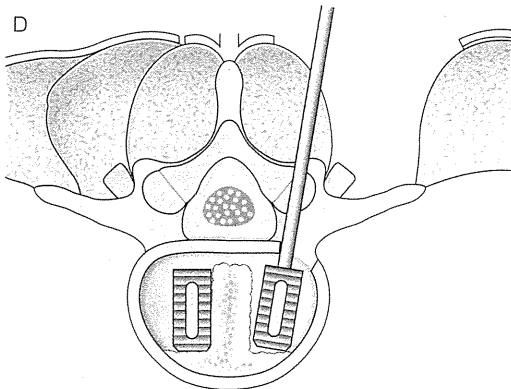
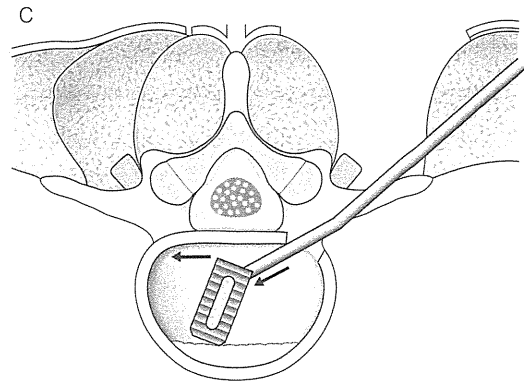
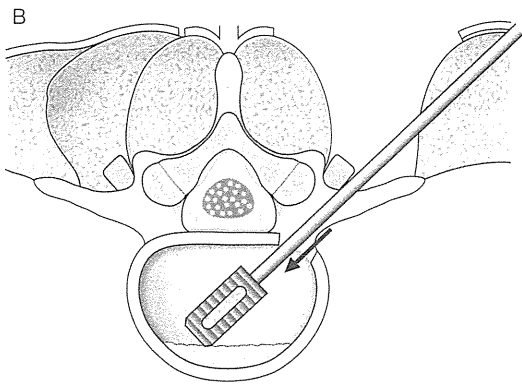
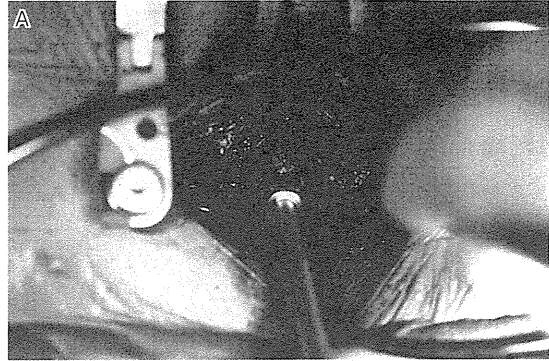


図 18 片側からのケージ設置法

- A: ケージ・ホルダーに取り付けたケージを椎間板腔に挿入する
 B: 進入反対側へのケージ挿入 C: ケージポジショナーでケージの方向を変える
 D: 進入側へのケージ挿入 E: 片側からの左右ケージの設置

7 ロッド設置と椎弓根スクリューとの締結

上下の椎弓根スクリューにロッドを装着し（図19）、スクリュー間に圧縮力を負荷しながら締結する（図20）。これにより前弯形成と移植骨への十分な圧迫力が付加され、インストゥルメンテーションを完了する（図21）。

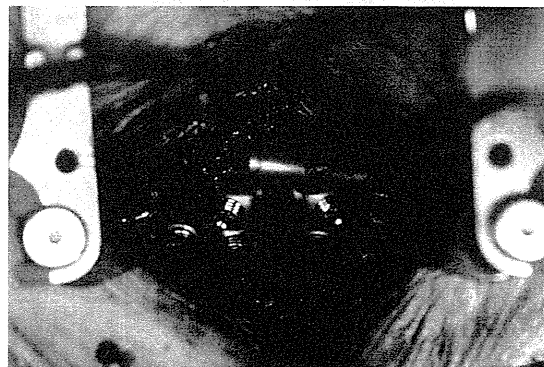


図19 上下の椎弓根スクリュー間へロッドを挿入する

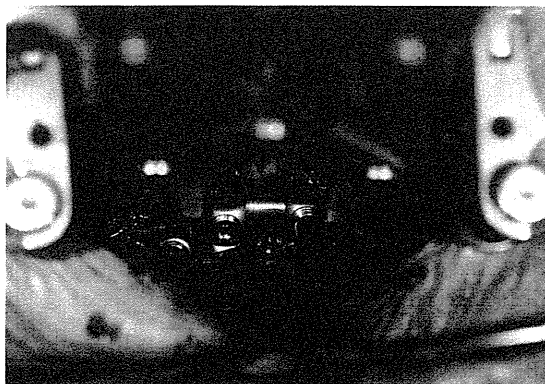


図20 上下の椎弓根スクリュー間に圧縮力を付加しつつ締結する

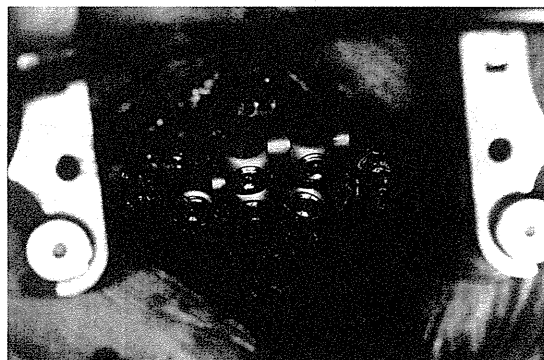


図21 インストゥルメンテーションの完了

8 閉創・ドレーン留置

ドレナージチューブを留置する。本法では術後死腔が小さく、少量の血腫貯留でも下肢痛や神経障害を発生しやすいため確実なドレナージが必須である。LPは左右の切開部を縫合後、内縁を棘突起に縫

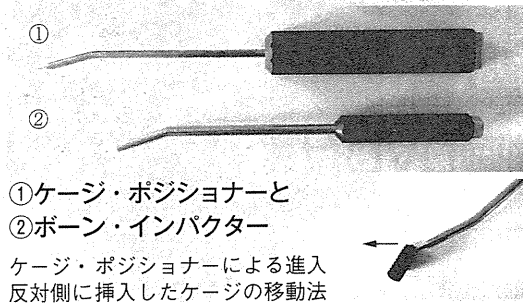
着させる。ついで胸腰筋膜を棘突起に縫着する。本法では皮下を側方に剥離しないので術後皮下の滲出液貯留が生じにくい。

9 術後の注意点と後療法

術後3～4ヵ月間は硬性装具を装着し、安静を保つように指導している。硬性装具装着期間は体幹筋力低下を防止するため、装具を装着したままの腹筋や背筋のisometric運動を行わせる。術後は1～2

ヵ月ごとに外来でX線検査を行い、インプラントや移植骨の状態を観察し、必要に応じた生活指導を行う。スポーツや重労働への復帰は術後6ヵ月をめどに許可する。

こ だわりの手術道具

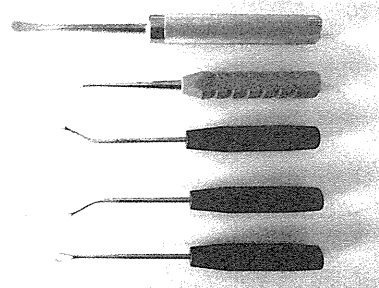


① ケージ・ポジショナーと

② ボーン・インパクト

ケージ・ポジショナーによる進入
反対側に挿入したケージの移動法

軟骨終板剥離用の弱弯コブ・エレベーター
と各種リング・キュレット



O perative Note

手術記録の要点

体位，皮切のレベル，LP 切開部の棘突起からの距離などについて記載する。症例ごとの特徴として，椎間関節の変性度，椎間不安定性の程度，多裂筋の状態などを正確に記載する。次いで椎弓根スクリューの設置に関しては，使用したスクリューの径，長さ，刺入時トルクや刺入に際して椎弓根壁穿破があったかどうか，また，その場合のリカバリーをどのように行ったかなどを各スクリューについて正確に記載する。

脊柱管除圧の記載では，狭窄度，神経組織の癒着，神経圧迫の原因などを，必要に応じ図を利用しながら記録する。椎体間固定に関しては，椎間板切除の程度，椎体終板の状態（骨性終板の破壊の有無など），使用したケージのサイズ，骨移植量，ケージの安定性を記載する。閉創時にドレーンをどの層に留置したか，閉創時の出血や止血の状況などの記載は術後血腫対策に有用である。

文献

- 1) Harms, J. et al. "True spondylolisthesis reduction and monosegmental fusion in spondylolisthesis". The Textbook of Spinal Surgery. 2nd ed. Bridwell, KH. ed. Philadelphia, Lippincot-Raven, 1997, 1337-47.
- 2) Taneichi, H. et al. Unilateral transforaminal lumbar interbody fusion and bilateral anterior-column fixation with

- two Brantigan I/F cages per level : clinical outcomes during a minimum 2-year follow-up period. J Neurosurg Spine. 2006, 4 (3), 198-205.
- 3) Wiltse, LL. et al. New uses and refinements of the paraspinal approach to the lumbar spine. Spine, 1988, 13 (6), 696-706.

研究成果の刊行に関する一覧表

【H21. 4. 1～H24. 3. 31】

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Endo T, Ajiki T, Inoue H, Kikuchi M, Yashiro T, Nakama S, Hoshino Y, Murakami T, Kobayashi E	Early exercise in spinal cord injured rats induces allodynia through TrkB signaling.	Biochem Biophys Res Commun	381(3)	339-344	2009
星野雄一	これからの整形外科診療報酬を考える 運動器リハビリテーションの課題	日本臨床整形外科学会雑誌	34(1)	25-32	2009
星野雄一	高齢者診療にあたっての基礎知識 運動器不安定症	日本医師会雑誌	138特別(2)	32-33	2009
遠藤照頭, 井上泰一, 木村 敦, 安食孝士, 中間季雄, 星野雄一	脊髄損傷ラットにおける補助歩行訓練の効果	運動療法と物理療法	20(1)	74-81	2009
星野雄一	運動器不安定症 (MADS: マーズ) とは	日本医事新報	4443	43-48	2009
岩谷 力, 星野雄一, 伊藤博元, 藤野圭司, 角南義文	運動器リハビリテーションと健康寿命 健康寿命延伸に果たす運動器リハビリテーションの役割	日本整形外科学会雑誌	83(5)	351-356	2009
星野雄一	特論 身体活動と運動器不安定症	日本臨床	67(2)	570-576	2009
中間季雄	筋・筋膜性腰痛	からだの科学	266	21-26	2010
星野雄一, 篠原光正, 星地亜都司, 中間季雄	特発性頸椎後弯症-いわゆる首下がり	J. Spine Res	1	147-153	2010
星野雄一, 星地亜都司, 土肥徳秀, 赤居正美, 飛松好子, 岩谷力	高齢者の運動機能障害評価 運動器障害診断ツール(足腰指数25)の開発	臨床スポーツ医学	27(1)	33-40	2010

星野雄一	超高齢社会とロコモティブシンドローム	関節外科	29	18-23	2010
星野雄一, 星地亜都司, 土肥徳秀, 赤居正美, 飛松好子, 岩谷力	運動器障害による介護リスクの評価ー早期発見診断ツールの開発ー	Modern Physician	30(4)	481-485	2010
星野雄一	サルコペニアと運動器不安定症	Geriatric Medicine	48(2)	185-189	2010
星野雄一	運動器不安定症 (MADS) の診断と治療	整形外科	61(7)	673-677	2010
星野雄一	腰痛診療のストラテジー	からだの科学	266	2-5	2010
中間季雄	腰部脊柱管狭窄症の問題点とその対策 運動療法の問題点とその対策.	整形・災害外科	54	1039-1047	2011
星地亜都司, 星野雄一	運動器病対策の基本戦略 ロコモとマーズ ロコモ診断ツール (足腰指数25と足腰指数5)	Orthopaedics	24(7)	45-50	2011
星野雄一	ロコモティブシンドロームの治療 運動器不安定症 (マーズ) とロコモティブシンドローム	東京都医師会雑誌	64(5)	581-588	2011
星野雄一	ロコモティブシンドローム 運動器科学の新時代 ロコモティブシンドローム 運動器障害診断ツール (足腰指数25) の開発	医学のあゆみ	236(5)	371-376	2011
星野雄一	ロコモティブシンドロームと運動器不安定症 運動器検診の実施による介護予防を目指して ロコモ診断ツールの開発 運動器検診に向けて	日本整形外科学会雑誌	85(1)	12-20	2011



Early exercise in spinal cord injured rats induces allodynia through TrkB signaling

Teruaki Endo^a, Takashi Ajiki^a, Hirokazu Inoue^a, Motoshi Kikuchi^b, Takashi Yashiro^b, Sueo Nakama^a, Yuichi Hoshino^a, Takashi Murakami^c, Eiji Kobayashi^{c,*}

^a Department of Orthopedic Surgery, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan

^b Division of Histology, Department of Anatomy, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan

^c Division of Organ Replacement Research, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2009

Available online 15 February 2009

Keywords:

Spinal cord injury

Assisted stepping exercise

Neuronal regeneration

Neuropathic pain

Allodynia

Brain-derived neurotrophic factor

Tropomyosin-related kinase B

ABSTRACT

Rehabilitation is important for the functional recovery of patients with spinal cord injury. However, neurological events associated with rehabilitation remain unclear. Herein, we investigated neuronal regeneration and exercise following spinal cord injury, and found that assisted stepping exercise of spinal cord injured rats in the inflammatory phase causes allodynia. Sprague–Dawley rats with thoracic spinal cord contusion injury were subjected to assisted stepping exercise 7 days following injury. Exercise promoted microscopic recovery of corticospinal tract neurons, but the paw withdrawal threshold decreased and C-fibers had aberrantly sprouted, suggesting a potential cause of the allodynia. Tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptor for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was expressed on aberrantly sprouted C-fibers. Blocking of BDNF–TrkB signaling markedly suppressed aberrant sprouting and decreased the paw withdrawal threshold. Thus, early rehabilitation for spinal cord injury may cause allodynia with aberrant sprouting of C-fibers through BDNF–TrkB signaling.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Rehabilitation is commonly considered for spinal cord injured patients. In particular, rehabilitation plays a very important role in preventing muscle contraction and joint stiffness in patients with spinal cord injury [1], leading to an improvement in the quality of life of the patient. While it may be impossible for patients to perform voluntary exercise, assisted stepping exercise with partial weight bearing, referred to as “Body Weight Supported Treadmill Training (BWSTT)”, has been investigated in the clinical setting [2]. Indeed, it has been demonstrated that BWSTT can improve the locomotor capacity of spinal transected rats [3]. Our previous studies also showed that assisted stepping exercise yielded beneficial effects in terms of functional recovery in hindlimb transplanted rats [4]. Nonetheless, the significance of such early rehabilitation in patients following spinal cord injury in the inflammatory phase remains unclear, and little is known about the efficiency of early rehabilitation in terms of neurological symptoms.

Herein, we focused on investigating the relationship between early exercise following spinal cord injury and neuronal regeneration, and found that early assisted stepping exercise for spinal cord

injured rats promoted neuronal regeneration but caused allodynia with aberrant sprouting of C-fibers through BDNF–TrkB signaling.

Materials and methods

Rat spinal cord injury model. Adult female Sprague–Dawley (SD) rats were used. All animal experiments in this study were approved by the Animal Ethics Review Board of Jichi Medical University, and were performed in accordance with the Jichi Medical University Guide for Laboratory Animals and followed the principles of laboratory animal care formulated by the National Society for Medical Research.

Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (40 mg/kg). Laminectomy of T9 was performed without disrupting the dura. Following laminectomy, a bilateral contusion injury was reliably created by delivering a 200 kdyn (2.00 N) force directly onto the spinal cord using an Infinite Horizon Impactor (Precision Systems and Instrumentation, MA). Following impaction, rats were maintained in a pathogen-free room under constant environmental control and subjected to twice-daily manual bladder expressions as necessary until urinary function returned.

Assisted stepping exercise for spinal cord injured rats. Spinal cord injured rats were subjected to assisted stepping exercise using the Rodent Robot 3000 (Robomedica, CA) robotic device [3]. This system consists of a motorized treadmill, a pair of robotic arms,

* Corresponding author. Fax: +81 285 44 5365.

E-mail address: ejjikoba@jichi.ac.jp (E. Kobayashi).

and a body weight support system mechanism. The rat steps bipedally in the device, and robotic arms attached to the lower shank of each hindlimb force the hindlimb to move with a normal walking pattern. A body weight support system is used to partially unload the hindlimb and stabilize the rat during stepping.

Rats were divided according to the absence or presence of exercise. The trained group ($n = 12$) was subjected to exercise, performed for 8 weeks from 1 week after the injury, 10 min per day, 5 days per week. The body weight support system supported 75% of the animal's body weight. The treadmill speed was 11 cm/s. Rats belonging to the non-trained group ($n = 11$) were not subjected to exercise.

Locomotor assessment. The functional outcomes were assessed using the Basso, Beattie, and Bresnahan Locomotor Rating Score (BBB score) for rat hindlimb motor function [5]. The assessment was performed every week until 9 weeks following the injury.

Measurement of hind paw withdrawal threshold. The hind paw withdrawal threshold was measured using the von Frey hair test [6]. Rats were placed in a plastic cage with a wire mesh bottom that allowed full access to the paws. The paw was touched with a series of von Frey hairs in ascending order beginning with the lowest hair. The hair was presented perpendicular to the planter surface with sufficient force to cause slight buckling against the paw and held there for 5 s. A withdrawal response was considered valid only if the hind paw was completely removed from the platform. The test was conducted three times using the same hair while the withdrawal response was observed. If a withdrawal response was not observed, the next largest hair in the series was applied in a similar manner. When the paw was withdrawn from a particular hair, the value of that hair in grams was regarded as the withdrawal threshold. The test was performed six times for each hind paw, and the median value of the threshold was calculated for each rat. The test was performed 5 and 9 weeks following the injury.

Histological assessment. The spinal cords were collected 9 weeks following the injury. Rats were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital and perfused intracardially using 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, and fixed at 4 °C for 1 h. The spinal cords were then soaked in 20% sucrose buffer at 4 °C overnight and then in 30% sucrose buffer at 4 °C for 24 h. The spinal cords were embedded in Tissue-Tek® Optimal Cutting Temperature Compound, frozen, and then 6- μ m thick axial sections were cut using a cryostat. To examine the distribution of corticospinal tract neurons at the L1 level, immunostaining using anti-Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase 2 alpha subunit (CaMK2a) antibodies (diluted 1:500, mouse monoclonal; Zymed, CA) was conducted with Alexa Fluor® 488-labeled goat anti-mouse IgG (diluted 1:200; Invitrogen, CA) as secondary antibodies. In an effort to determine whether CaMK2a⁺ fibers represent regenerating fibers, anti-growth associated protein 43 (GAP43) antibodies (diluted 1:1000, rabbit polyclonal; Millipore, MA) were used for double immunostaining, followed by the respective use of secondary antibodies Alexa Fluor® 488-labeled goat anti-mouse IgG (diluted 1:200) and Alexa Fluor® 564-labeled goat anti-rabbit IgG (diluted 1:200; Invitrogen).

To examine the distribution of C-fibers in the dorsal horn at the T1 level, immunostaining using anti-calcitonin-gene-related peptide (CGRP) antibodies (diluted 1:2000, rabbit polyclonal; Biomol, PA) was performed, followed by the use of biotin-labeled goat anti-rabbit IgG as secondary antibodies. The Vectastain Elite ABC kit (Vector, CA) was used to visualize the reaction of horseradish peroxidase (HRP)-labeled reagents with DAB Substrate solution (Vector). To determine the relationship between CGRP⁺ fibers and regenerating fibers, double immunostaining was performed using anti-CGRP (diluted 1:2000) and anti-GAP43 antibodies (diluted 1:10,000, mouse monoclonal; Millipore, MA), coupled with Alexa

Fluor® 488-labeled goat anti-rabbit IgG (diluted 1:200; Invitrogen) and Alexa Fluor® 564-labeled goat anti-mouse IgG (diluted 1:200; Invitrogen) as secondary antibodies, respectively.

To examine expression on GAP43⁺ fibers of the tropomyosin-related kinase B receptor (TrkB), which is a high-affinity receptor for BDNF, anti-TrkB antibodies (diluted 1:100, chicken polyclonal IgY; Promega KK, Japan) were used for the double staining with either anti-CaMK2a or anti-CGRP antibodies, followed by the respective use of secondary antibodies Alexa Fluor® 488-labeled goat anti-mouse IgG (diluted 1:200) for CaMK2a⁺ fibers, Alexa Fluor® 488-labeled goat anti-rabbit IgG (diluted 1:200) for CGRP⁺ fibers, and Cy3-labeled goat anti-chicken IgY (diluted 1:200; Abcam, Japan) for TrkB⁺ fibers.

For all immunostaining procedures, sections were incubated with primary antibodies at 4 °C overnight after blocking non-specific reactions with 1.5% goat serum in phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature for 1 h. After washing with PBS, specimens were incubated with secondary antibodies at room temperature for 1 h.

TrkB inhibitors. To functionally block BDNF, TrkB Fc chimera (R&D systems, MN) and pan Trk antagonist K252a (Biomol) were administered into the injured spinal cord of trained rats. Briefly, 1 week prior to spinal cord injury an intrathecal cannula (0.64-mm outer diameter, 0.3-mm inner diameter; Alzet, CA) was filled with PBS and inserted into the intrathecal space via the intralaminar space between C1 and C2 such that the tip rested above the L1 level. Six days following spinal cord injury (1 day before commencement of the stepping exercise), osmotic minipumps (models 2002; Alzet) were filled with TrkB Fc chimera in PBS (3 μ g/day, $n = 7$), K252a in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) in PBS (2 μ g/day, $n = 7$) or PBS ($n = 7$) and connected to the cannula. Continuous intrathecal infusions and exercise were then performed for 4 weeks.

Statistical analysis. Analysis of the BBB score and hind paw withdrawal thresholds involved the use of SPSS Statistics 17.0 software (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan). The Mann–Whitney U test was used for *post hoc* comparisons between trained and non-trained groups. The Dunnett test was employed for *post hoc* comparisons among the three groups for the TrkB signal blocking. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Assisted stepping exercise in spinal cord injured rats promotes axonal regeneration in the corticospinal tract

Spinal cord injured rats were made to walk without weight bearing on the hindlimb before exercise. The BBB score showed a gradual improvement in every rat, and all rats of the trained group (12) and 9 of the 11 rats of the non-trained group walked with full weight bearing at 9 weeks following the injury. The score of the trained group was slightly larger than that of the non-trained group between 6 and 9 weeks following the injury (data not shown).

To determine whether exercise can potentially improve locomotor capacity, immunostaining against CaMK2a was used for assessment of the corticospinal tract fibers at the L1 level. It is well known that CaMK2a⁺ fibers represent the descending corticospinal tract fibers in the ventral aspect of the dorsal funiculus [7]. Dense CaMK2a⁺ fibers were distributed in the corticospinal tract of normal rats (Fig. 1Aa). CaMK2a⁺ fibers disappeared in the corticospinal tract around 1 week following spinal cord injury (Fig. 1Ab). CaMK2a⁺ fibers in the corticospinal tract then appeared again 9 weeks following the injury, and these were more densely distributed in the trained group (Fig. 1Ad) compared to the non-trained group

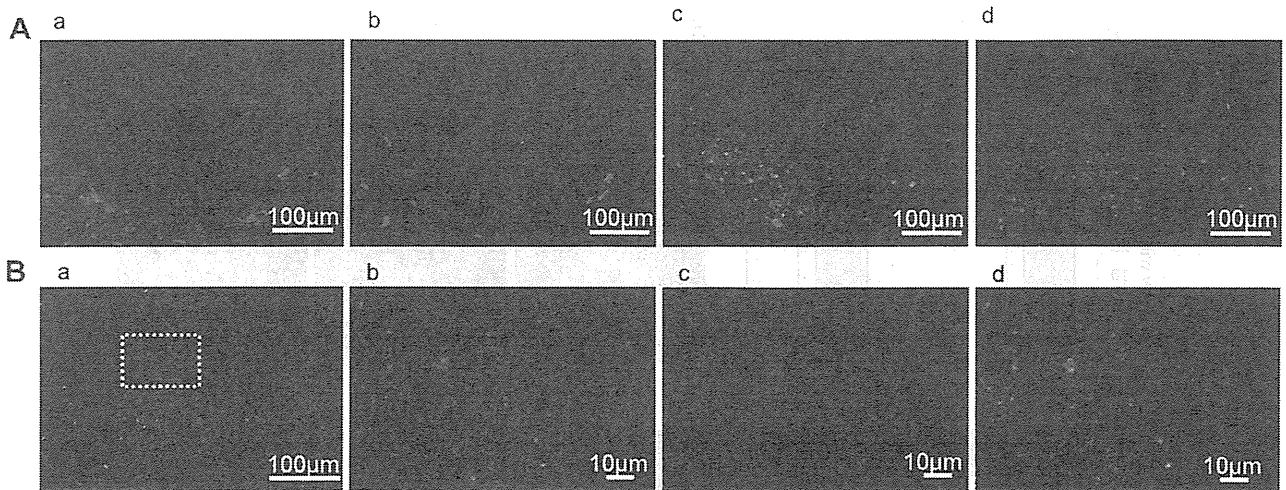


Fig. 1. Immunohistochemical assessment of the motor system of rats subjected to early rehabilitation following spinal cord contusion injury. (A) Distribution of CaMK2a⁺ fibers in the corticospinal tract at the L1 level. In normal rats, CaMK2a⁺ fibers were distributed in the corticospinal tract (a). CaMK2a⁺ fibers almost disappeared at 1 week following the injury (b). CaMK2a⁺ fibers were observed again at 9 weeks following the injury. In comparison to the non-trained group (c), CaMK2a⁺ fibers were more densely distributed in the trained group (d). (B) Poor axonal elongation of the L1 corticospinal tract in trained rats at 9 weeks following the injury. Many CaMK2a⁺ fibers were present in the corticospinal tract (a). High magnification of the dotted box with anti-CaMK2a (b, green) and anti-GAP43 (c, red) antibodies. CaMK2a⁺ fibers were not merged with GAP43⁺ fibers (d).

(Fig. 1Ac). These results suggest that the reappearance of CaMK2a immunoreactivity may be associated with regeneration of corticospinal tract neurons. Thus, to further investigate the possibility that CaMK2a⁺ fibers represent elongated axons, immunoreactivity against GAP43 was examined because GAP43 is a well-known marker for elongated axons. The CaMK2a⁺ fibers did not show immunoreactivity against GAP43 in the same specimens (Fig. 1Ba–d). These results demonstrated that axonal elongation in the corticospinal tract at the L1 level remained poor even after exercise. Thus, assisted stepping exercise may be associated with an increase of CaMK2a⁺ fibers in the corticospinal tract with poor axonal elongation.

Increased axonal sprouting of C-fibers in spinal cord injured rats with assisted stepping exercise

The trained rats began to hop during the training period and avoided making contact with their hindlimbs around 4 weeks following the injury. In contrast, the non-trained rats did not avoid making such contact. These observations suggest that it became painful for trained rats to make contact with their hindlimbs. To assess the degree of pain, the hind paw withdrawal threshold was evaluated using the von Frey hair test. The mean hind paw withdrawal thresholds were 28.5 ± 4.6 g (mean \pm standard error of mean) in the trained group and 60.1 ± 7.6 g in the non-trained group at 5 weeks following the injury. The threshold of the trained group was significantly smaller than that of the non-trained group ($p < 0.01$). At 9 weeks following the injury, the threshold of the trained group (21.9 ± 1.8 g) was also much smaller than that of the non-trained group (60.1 ± 7.6 g) ($p < 0.001$). These results demonstrated that assisted stepping exercise decreased the hind paw withdrawal threshold in spinal cord injured rats, suggesting that the exercise may cause neuropathic pain, especially allodynia.

The cause of allodynia in spinal cord injury may be associated with the altered distribution of C-fibers at the dorsal horn. Therefore, immunostaining against CGRP, known as a marker of C-fibers, was performed at the T1 level. Immunostaining against CGRP showed dense immunoreactivity in Rexed's lamina I and II [8,9] of the dorsal horn in all rats (Fig. 2Ba–c), in which C-fibers are

known to innervate [10]. In the trained group, longitudinal CGRP fibers were present between lamina II and lamina III (Fig. 2Bc). Longitudinal CGRP⁺ fibers were not observed in normal rats (Fig. 2Ba) or in non-trained rats (Fig. 2Bb). Immunoreactivity against GAP43 was present on longitudinal CGRP⁺ fibers (Fig. 2C). These results demonstrated that CGRP⁺ fibers sprouted into lamina III as a result of exercise. Thus, assisted stepping exercise may exacerbate allodynia with aberrant sprouting of C-fibers at the dorsal horn.

Implication of TrkB signaling with aberrant axonal sprouting

It has previously been shown that exercise in spinal cord injured rats restores the level of BDNF in the spinal cord [11]. In order to investigate the association between BDNF and the aberrant sprouting of C-fibers, we performed double immunostaining against CGRP and TrkB, known to be a high-affinity catalytic receptor for BDNF. Immunoreactivity of TrkB was marked on the longitudinal CGRP⁺ fibers (Fig. 3). Therefore, aberrant sprouting of C-fibers may mediate BDNF–TrkB signaling with exercise.

Functional TrkB blocking decreased neuropathic pain associated with aberrant sprouting in spinal cord injured rats with assisted stepping exercise

To investigate a possible causal relationship between the BDNF–TrkB signaling pathway and allodynia, the von Frey hair test was performed again in the presence of TrkB inhibitors. The mean hind paw withdrawal threshold in the PBS group was significantly smaller than that of the TrkB Fc and K252a groups at 5 weeks following the injury (Fig. 4A). CGRP immunostaining also showed that longitudinal immunoreactive fibers in the dorsal horn at the T1 level were only detected in the PBS group, and not in the TrkB Fc and K252a groups (Fig. 4B). These results demonstrated that blocking of BDNF–TrkB signaling provided protection from allodynia and decreased aberrant sprouting of C-fibers in spinal cord injured rats subjected to assisted stepping exercise.

In the relevant experiments, the motor system was assessed with or without TrkB inhibitors for the trained rats. The mean BBB score showed no significant difference among these groups