

の解明に繋がった。

E. 結論

我々は、世界で初めて、靭帯組織の作製に成功した。この組織を使い、OPLLの靭帯骨化のメカニズムを追求することで、医薬品開発の迅速化が期待される。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Calcific tendonitis of the rotator cuff: an unusual case. Mitsui Y, Gotoh M, Tanesue R, Shirachi I, Shibata H, Nakama K, Okawa T, Higuchi F, Nagata K. *Case Rep Orthop*. 2012;2012:806769. Mar 24.
2. Screening for Fabry disease in patients with left ventricular hypertrophy. Mawatari K, Yasukawa H, Oba T, Nagata T, Togawa T, Tsukimura T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Sugi Y, Sakuraba H, Imaizumi T. *Int J Cardiol*. 2012 Nov 17.
3. Increased matrix metalloprotease-3 gene expression in ruptured rotator cuff tendons is associated with postoperative tendon retear. Gotoh M, Mitsui Y, Shibata H, Yamada T, Shirachi I, Nakama K, Okawa T, Higuchi F, Nagata K. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012 Sep 22.
4. Inducement of semitendinosus tendon regeneration to the pes anserinus after its harvest for anterior

cruciate ligament reconstruction-A new inducer grafting technique. Murakami H, Soejima T, Inoue T, Kanazawa T, Noguchi K, Katouda M, Tabuchi K, Noyama M, Yasunaga H, Nagata K. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol*. 2012 May 20;4(1)

5. Gene expression analysis of rheumatoid arthritis synovial lining regions by cDNA microarray combined with laser microdissection: up-regulation of inflammation-associated STAT1, IRF1, CXCL9, CXCL10, and CCL5. Yoshida S, Arakawa F, Higuchi F, Ishibashi Y, Goto M, Sugita Y, Nomura Y, Niino D, Shimizu K, Aoki R, Hashikawa K, Kimura Y, Yasuda K, Tashiro K, Kuhara S, Nagata K, Ohshima K. *Scand J Rheumatol*. 2012 May;41(3):170-9.
6. Role of the hyaluronan-producing tenosynovium in preventing adhesion formation during healing of flexor tendon injuries. Yagi M, Mitsui Y, Gotoh M, Sato N, Yoshida K, Nagata K. *Hand Surg*. 2012;17(1):13-7.

2. 学会発表

1. シンポジウム会長招演 津留美智代、志波直人、永田見生 第45回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2012年7月14日 東京国際フォーラム
2. 教育講演 永田見生 第45回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2012年7月15日 東京国際フォーラム
3. 大きな骨欠損を伴う大腿骨顆部開放骨

折に対し Bank Bone を用いて修復した
1 症例(原著論文) 本多弘一(久留米大学 医学部整形外科学講座), 白濱正博,
吉田史郎, 森啓介, 永田見生 久留米
医学会 雑誌 (0368-5810)75 巻 3-4
Page134-138, 2012.04.

4. 【80 歳以上の脊椎疾患の治療戦略】 80 歳以上の頸髄症における治療戦略(原著論文/特集) 山田圭(久留米大学 医学部整形外科), 佐藤公昭, 密川守, 吉松弘喜, 吉田龍弘, 佐々木威治, 猿渡敦子, 永田見生 Journal of Spine Research(1884-7137)3 巻 5 号 Page756-760, 2012.05.
5. 【80 歳以上の脊椎疾患の治療戦略】 超高齢者における頸部外傷の検討(原著論文/特集)吉松弘喜(久留米大学 整形外科), 吉田健治, 山下寿, 石岡久和, 山田圭, 密川守, 佐藤公昭, 永田見生 Journal of Spine Research(1884-7137)3 巻 5 号 Page729-732, 2012.05.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

発見者 津留美智代、永田見生。特願
2012-064340 申請者 永田見生、津
留美智代。 癌転移マーカー及び癌転
移の診断方法。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

慢性圧迫脊髄(*twy/twy*)における脊髄内 activated microglia/macrophage の
極性変化と生理学的意義

中嶋秀明 内田研造 平井貴之 Alexander Rodriguez Guerrero
渡邊修司 竹浦直人 吉田藍 馬場久敏
福井大学医学部 器官制御医学講座 整形外科領域
研究分担者 内田 研造 福井大学整形外科准教授

研究要旨 慢性脊髄圧迫モデル (*twy/twy*) における microglia/macrophage の動態について検討した。圧迫程度に応じて、resting microglia が活性化することにより、activate microglia/macrophage の分画が増加した。さらに、この分画を詳細に検討すると、組織障害性に働く M1 type (iNOS, CD16/32)、組織修復に働く M2 type (arginase-1, CD206)のいずれも増加していたが、M2 type が優位である状態が維持されていた。また、arginase-1 陽性細胞は、神経栄養因子発現や phagocytic activity など組織修復・神経保護効果を発揮していた。これらの慢性圧迫脊髄に特徴的な neuroinflammation が、神経細胞の生存や破綻に関与していると考えられた。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症や頸椎性脊髄症といった慢性圧迫脊髄では急性脊髄損傷とは異なり、脊髄の圧迫が高度であっても症状は軽度であることがしばしばみられる。これらから慢性圧迫脊髄は急性脊髄損傷とは異なり、組織構造の破綻にも関わらず機能を維持する機構が存在することが推測される。急性脊髄損傷では二次性変化に macrophage の関与が大きく、近年の研究では、炎症反応惹起による組織障害性をもつ(M1 type macrophage)一方で、血管新生や組織修復、glial scar の resolution などの組織再生にも関与(M2 type macrophage)していることが報告されている。しかしながら慢性圧迫脊髄における macrophage の動態はまだ明らかではなく、これらの解明が前述した疾患の病態改善につながると考え、本研究では慢性圧迫脊髄における activated

microglia/macrophage の動態とその生理学的意義について検討することを目的とした。

B. 研究方法

後環軸膜に経時的に石灰沈着が生じる脊髄慢性圧迫モデル (*twy/twy*; 12 週、18 週、24 週)を用いた。まず最初に、CT にて脊柱管残余面積を評価した。

評価項目は、①microglia/macrophage のマーカーである CD11b 陽性細胞および Nissl 染色の分布、②圧迫程度に応じた macrophage/microglia の動態を flowcytometry を用いて評価、③組織障害性 macrophage (M1 type: 1 次抗体に iNOS, CD16/32)および組織再生 macrophage (M2 type: 1 次抗体に Arginase-1, CD206)の発現の変化(免疫染色および flow cytometry)、④ iNOS もしくは arginase-1 陽性細胞と神経栄養因子 (BDNF, NGF)、貪食作用 (Max-2)発

現の関係、④immunoblot analysis による Th1 cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-6), Th2 cytokines (IL-4, IL-10, IL-13), 神経栄養因子(BDNF, NGF), 貪食作用 (Mac-2)の発現解析とした。
(倫理面での配慮)

実験動物に対する処置などの際の取り扱い方法、除痛処置については、学内の委員会に了承済みである。

C. 研究結果

12, 18, 24 週年齢の twy mouse の CT 評価では、ある程度の個体差はあるものの、経時的に残存脊柱管面積が減少していた。

圧迫に応じて CD4 陽性の helper T 細胞の発現はみられた一方、MPO 陽性の好中球発現は免疫染色でも assay でもみられず、慢性圧迫脊髄では急脊髄損傷とは全く異なる neuroinflammatory reaction の存在が考えられた。

Nissle 染色陽性の neuron と、CD11b 陽性の microglia/macrophage の経時的な変化の検討では、圧迫が高度になるにつれて、neuron は減少し、microglia/macrophage が特に前角、前索部で増加していた。

経時的に増加している CD11b 陽性細胞である microglia/macrophage に関し、flow cytometry を行うと、12 週の圧迫がほとんどない状態では、ほとんどが resting microglia として存在していたが、圧迫が高度になるにつれて、CD45 positive の activate microglia もしくは macrophage と考えられる分画の方に移動していた (図 1)。

さらにこの activated microglia/macrophage の分画について検討すると、圧迫が高度な状態であっても、arginase-1 や CD206 陽性の M2 type が、iNOS や CD16/32 陽性の M1

type よりも優位な状態が維持されていた。

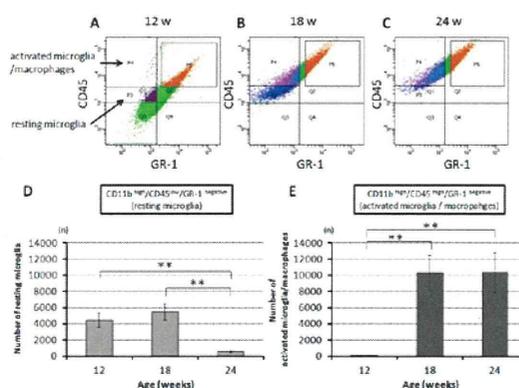


図 1.

免疫染色では、圧迫に応じて M1 type, M2 type のいずれの細胞も増加していたが、cell count の結果では、いずれの時点でも M2 type の発現が有意であり、M1 と M2 の比率は、M1 の占める割合が圧迫に伴い増加するが、M2 が優位な状態が維持されていた (図 2)。

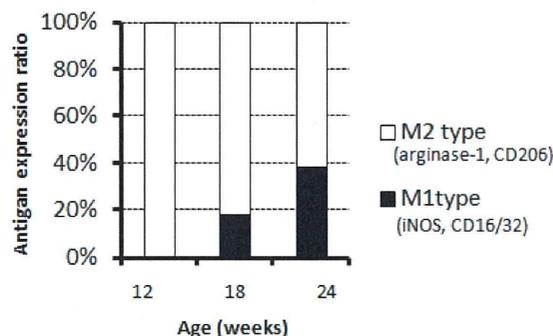


図 2.

神経栄養因子発現や、Mac-2 で評価した phagocytic activity と、M1, M2 type activated microglia/macrophage の関係を調べると、神経栄養因子は圧迫が高度になるにつれて発現が増加し、それらは arginase-1 陽性細胞とは merge したが、iNOS 陽性細胞とは merge せず、M2 type activated microglia/macrophage が神経栄養因子の source になっていると考

えられた。また、M2 type は圧迫が高度になるにつれて、phagocytic activity が増加していた。

Western blotting の結果では、圧迫が高度になるにつれて、M1 type を誘導する TNF- α 、IL-6 といった Th1 cytokine は上昇していたが、M2 type を誘導する IL-4, IL-10, IL-13 もまた 24 週でやや減少するものの、発現が上昇していた。また、神経栄養因子や phagocytic activity は増加していた (図 3)。

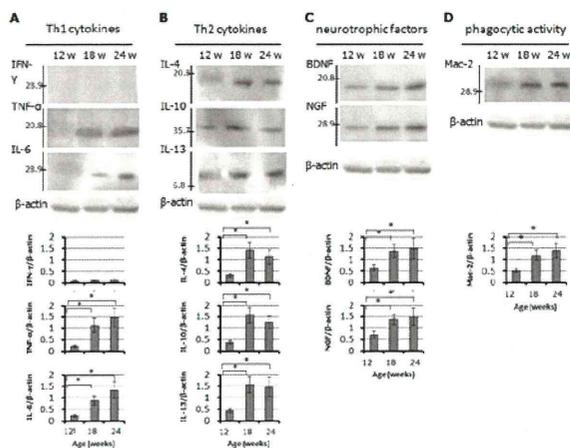


図 3.

D. 考察

急性脊髄損傷においては、損傷後 1-3 日目の急性期において M1 および M2 type macrophage の発現は上昇し、損傷後 1 週以降では特に M1 type macrophage の発現が有意な状態になることが報告されている。急性脊髄損傷では、損傷後、血行性に遊走してきた macrophage が、好中球などからの炎症性サイトカインの影響を受けて主に M1 type macrophage として働いていると考えられるが、慢性圧迫では、血行性に macrophage が遊走してくることは少ないとも考えられる。今回の慢性圧迫脊髄の結果では、慢性圧迫脊髄では、圧迫が高度になるにつれて

M1 type の発現が増加はするものの、M2 type の発現が維持されており、これが慢性圧迫脊髄の神経細胞の生存・維持に関与しているものと考えられた。脊髄が慢性に圧迫を受けると、脊髄内の resting microglia は増加・活性化し、圧迫が高度な状態であってもこれらの多くが M2 type として存在しており、神経栄養因子発現や phagocytic activity など組織修復・神経保護効果を発揮することが、慢性圧迫脊髄の機能を維持するひとつの機序であると考えられた。M1 type の発現がさらに増加すると不可逆的な変化が現われると考えられる (図 4)。

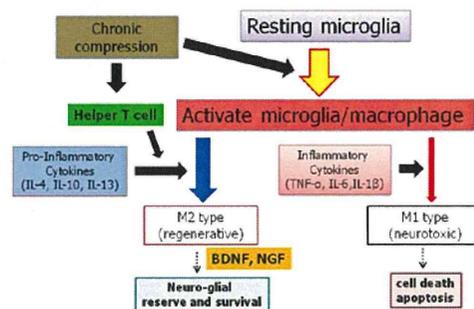


図 4.

E. 結論

慢性圧迫脊髄では、組織修復に働く M2 type macrophage が、neurotoxic に働く M1 macrophage より有意に発現していた。慢性圧迫脊髄における神経細胞の生存・維持に、macrophage の subtype の変化が関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Uchida K, Nakajima H, Okazawa H, Kimura H, Kudo T, Watanabe S, Yoshida A, Baba H. Clinical significance of MRI/¹⁸F-FDG PET fusion imaging of the

- spinal cord in patients with cervical compressive myelopathy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 39:1528-1537, 2012
- ② Uchida K, Nakajima H, Hirai T, Yayama T, Chen K, Guerrero AR, Johnson WE, Baba H. The Retrograde Delivery of Adenovirus Vector Carrying the Gene for Brain-Derived Neurotrophic Factor Protects Neurons and Oligodendrocytes From Apoptosis in the Chronically Compressed Spinal Cord of twy/twy Mice. *Spine (Phila Pa 1976)* 37:2125-2135, 2012
- ③ Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Nakamura M, Johnson WE, Baba H. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation* 9:40, 2012
- ④ Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, Long G, Wright KT, Johnson WE, Baba H. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 29:1614-1625, 2012.
- ⑤ Cai HX, Yayama T, Uchida K, Nakajima H, Sugita D, Guerrero AR, Yoshida A, Baba H. Cyclic tensile strain facilitates the ossification of ligamentum flavum through β -catenin signaling pathway: in vitro analysis. *Spine (Phila Pa 1976)* 37:E639-646, 2012
2. 学会発表
- ① 平井貴之, 内田研造, 中嶋秀明, 渡邊修司, Alexander Guerrero, 馬場久敏. 慢性脊髄圧迫モデル (twy/twy)を用いた骨髄由来マクロファージの極性変化に関する組織学的検討. 第41回日本脊椎脊髄病学会, *J.Spine RES.* 3: 276, 2012
- ② 中嶋秀明, 内田研造, 彌山峰史, 渡邊修司, 杉田大輔, 竹浦直人, 吉田藍, 馬場久敏. 頰椎後縦靭帯骨化症の長期手術成績に影響を与える因子. 第41回日本脊椎脊髄病学会, *J.Spine RES.* 3: 487, 2012
- ③ 平井貴之, 内田研造, 中嶋秀明, 渡邊修司, Alexander Guerrero, 馬場久敏. 慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy)における macrophage の分化・誘導についての検討. 第85回日本整形外科学会学術総会, *日整会誌* 86 (3): S541, 2012
- ④ 内田研造, 中嶋秀明, 竹浦直人, 吉田藍, 坂本拓己, 馬場久敏. 圧迫性頰髄症に対する 3D-MRI/18FDG-PET 融合画像を用いた頰髄グルコース代謝量の解析. 第85回日本整形外科学会学術総会, *日整会誌* 86 (3): S598, 2012
- ⑤ Sugita D, Yayama T, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Yoshida A, Takeura N, Baba H. Cyclic tensile strain induces hypertrophy of chondrocytes and differentiation of osteoblasts, in vitro study of cultured cells derived from patient with cervical OPLL. 40th Annual Meeting of the Cervical Spine Research Society, 2012

後縦靭帯骨化症患者の骨代謝動態の検討 -血清 Sclerostin/Dkk-1 濃度との関連について-

研究分担者 柏井将文 藤森孝人 長本行隆 海渡貴司 岩崎幹季 吉川秀樹
大阪大学整形外科

研究要旨 近年発見された骨形成の Key protein である Sclerostin は Wnt signal antagonists の一つであり、Wnt antagonists と OPLL の病態との関係は不明である。今回、我々は血清中の Wnt antagonists を測定し、OPLL 患者の骨代謝動態について検討した。

A. 研究目的

血清中の Wnt antagonists (Sclerostin / Dkk-1) 濃度を OPLL 患者および対象患者で測定し、OPLL の病態との関連について検討すること。

B. 研究方法

OPLL 患者 78 名 (平均年齢 66 歳 男性 52 例・女性 26 例) と年齢・性別をマッチさせた対象患者 39 例を対象とした。患者血清より ELISA 法で血清 Sclerostin・Dkk-1 を測定し、OPLL 群と対象群での比較検討を行った。OPLL 患者ではその他の骨代謝マーカーとの関連についても調査し、Xp/CT より得られた OPLL の局在や骨化椎体数との関連についても検討した。

(倫理面での配慮)

Case-control study として本学の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

OPLL 群では対照群に比して有意に血清 Sclerostin が高値を示した (OPLL 群; 64.0, SD39.3 pmol/L、対照群; 44.9, SD17.7 pmol/L, $p < 0.005$) 一方、Dkk-1 値は有意に低値を示した。特に男性において加齢に伴い有意に血清 Sclerostin 値は上昇した。

OPLL の局在・骨化椎体数と Sclerostin 値との相関は認めなかった。

D. 考察

Sclerostin は全身での進行性の骨形成による高身長・合指症・脳神経麻痺を病態の中心とする硬結性骨化症や Van Buchem 病の原因遺伝子 SOST がコードする蛋白で、骨細胞により特異的に分泌される。糖質コルチコイド投与による骨形成低下やメカニカルストレスに反応しての骨形成増加は、Sclerostin を介して調整されていることが明らかとなり、Sclerostin は骨形成において中心的な役割を果たしていることが近年明らかとなった。OPLL 患者は概して全身の骨量が高く、全身的な骨化傾向を有することが知られている。ゆえに FOP や硬結性骨化症と同様に OPLL 患者では持続的に Sclerostin 値が低いことが予想された。しかしながら、本件検討の結果は正反対の結果で、OPLL 患者においては、血中の骨形成抑制蛋白 Sclerostin 分泌が亢進していた。この結果より OPLL 患者では骨化した病変や全身の骨量増加に応じて骨化を抑制しようとする systemic negative feedback の存在が示唆された。

E. 結論

OPLL 患者においては、骨形成抑制蛋白 Sclerostin 分泌が亢進していた。血清 Sclerostin 値は今後の骨化進展を予想するバイオマーカーとなる可能性がある。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishii M, Iwasaki M, Hosono N, et al. Deep surgical site infection after spinal surgery with instrumentation – Investigation of degenerative thoracolumbar disorders and osteoporotic vertebral collapse cases, a multi-center study-. *J Spine Res* 3: 144-148, 2012
 2. Fujimori T, Iwasaki M, Okuda S, et al. Three-dimensional measurement of growth of ossification of the posterior longitudinal ligament. *J Neurosurg: Spine* 16: 289-295, 2012
 3. Morita M, Miyauchi A, Okuda S, et al. Intraspinal epidermoid tumor of the cauda equina region. Seven cases and a review of the literature. *J Spinal Disord Tech* 25: 292-298, 2012
 4. Fujimori T, Iwasaki M, Nagamoto Y, et al. Three-dimensional measurement of intervertebral range of motion in ossification of the posterior longitudinal ligament: Are there mobile segments in the continuous Type? *J Neurosurg: Spine* 17: 74-81, 2012
 5. Oshima K, Sakaura H, Iwasaki M, et al. Subclinical Chronic Atlanto-Occipital Rotatory Fixation: A Case Report. *JBJS Case Connector* 2 (3): e41 1-3, 2012
 6. Nagamoto Y, Ishii T, Iwasaki M, et al. Three-dimensional motion of the uncovertebral joint during head rotation. *J Neurosurg: Spine* 17: 327-333, 2012
- ### 2. 学会発表
1. Nagamoto Y, Sugiura T, Fujimori T, et al. In vivo three-dimensional kinematic change of the cervical spine after laminoplasty for cervical spondylotic myelopathy. *Eurospine, SpineWeek 2012* (Amsterdam, The Netherlands, May 31, 2012)
 2. Fujimori T, Iwasaki M, Nagamoto Y, et al. Surgical outcomes of massive OPLL with over 60% occupying ratio. 40th Annual meeting of the Cervical Spine Research Society (Chicago, IL, Dec 6-8, 2012)
 3. 奥田真也、小田剛紀、山崎良二ほか。頸椎神経根症に対するアプローチ—持続硬膜外チュービングの有効性—。第41回日本脊椎脊髄病学会（平成24年4月 久留米）
 4. 前野考史、奥田真也、白 隆光ほか。高齢者における頸椎椎弓形成術の手術成績—70歳未満の手術成績との比較。第41回日本脊椎脊髄病学会（平成24年4月 久留米）
 5. 長本行隆、藤森孝人、柏井将文ほか。

脊椎由来の慢性疼痛に対するプレガバリンの使用経験. 第 41 回日本脊椎脊髄病学会 (平成 24 年 4 月 久留米)

6. 岩崎幹季、藤森孝人、長本行隆ほか.
重度頰椎 OPLL の手術成績と今後の課題.
第 119 回中部整形外科災害外科学会 (平成 24 年 10 月福井市)
7. 岩崎幹季、藤森孝人、柏井将文ほか.
占拠率 60%以上の重度頰椎後縦靱帯骨化症に対する術式選択. 第 71 回日本脳神経外科学会 (平成 24 年 10 月大阪市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脊柱靭帯骨化における基質変性と骨芽細胞の誘導

福井大学医学部器官制御医学講座整形外科学領域

彌山峰史、内田研造、杉田大輔、中嶋秀明、吉田 藍、渡邊修司、坂本拓己、
本定和也、山岸淳嗣、馬場久敏

研究要旨

胸椎黄色靭帯骨化症の骨化靭帯組織および靭帯由来の培養細胞に対して、骨芽細胞の分化誘導をもたらす因子について検討した。骨化前線の石灰化軟骨層には小血管を伴う未分化な間葉系細胞が島状に集簇しており、その辺縁の一部から骨化を生じていた。この間葉系細胞は IL-6、IL-17、VEGF といったサイトカインや成長因子の発現が陽性であり、骨芽細胞分化や骨形成過程が亢進されていることが示唆された。また培養靭帯細胞の観察では、骨形成とともに骨吸収に作用するサイトカインの発現量が上昇しており、骨化巣における骨形成と吸収の代謝回転が存在することが考えられた。骨化靭帯では骨吸収に対して骨形成に作用するサイトカイン、成長因子、転写因子などの発現が亢進した状態にあると考えられた。

A. 研究目的

脊柱靭帯骨化では内軟骨性骨化により骨化巣を形成し、骨化巣と靭帯組織の移行部には骨化前線が存在する^{1,2)}。骨化前線の形態は、骨化巣の大きさや広がりに応じて多様性が高く、骨化前線部の細胞分化には種々の成長因子、転写因子が関与することが指摘されている³⁾。我々のこれまでの検討では、Runx2 や Osterix といった転写因子や Wnt/ β -catenin signaling などが骨化前線における細胞成熟に関与しており、さらには外的要因によってこれらの因子が過剰発現することを観察した^{4,5)}。しかし、骨芽細胞の分化誘導については、その起源や調節因子など、いまだ不明な点が多く残されている。

今回の検討では、骨芽細胞の成熟に関連して靭帯内に生じる組織学的変化、および培養骨化靭帯細胞におけるサイトカインの

発現量の違いについて観察することを目的とした。

B. 研究方法

胸椎黄色靭帯骨化症（OLF）に対する手術時に採取した骨化靭帯 7 例（OLF 群：男性 4 例、女性 3 例、手術時平均 67.1 歳）を対象とした。採取した黄色靭帯は骨組織を切除した後に細切し、explant 法にて細胞を遊走させ、3 継代培養したのちに実験を行った。

サイトカインおよび成長因子の計測は MultiPlex Suspension Array system を用いて行い、細胞融解は Cell Lysis Kit (BIO-RAD)、profiling panel は Bio-PlexTM Pro (BIO-RAD) を使用した。測定したサイトカイン、成長因子は合計 27 項目であり、各因子の定量化を行った。

また骨化靭帯の一部は脱灰固定して薄切

ついて免疫組織化学染色を行った。

比較対象には非骨化黄色靭帯 5 例 (NON-OLF 群: 男性 3 例、女性 2 例、手術時平均 69.1 歳) を用いた。

(倫理面での配慮)

本研究を遂行するにあたり、研究対象者の人権擁護を最大限に配慮し、研究内容が苦痛を伴うものではなく、社会的不利益を蒙るものではなく、危険性を完全に排除し、疾患の病態解析のみが目的であることを説明及び同意を得ている。

C. 研究結果

層状構造を呈する骨化前線では、石灰化軟骨層の骨化巣近傍部において間葉系細胞の集簇を認めた。この間葉系細胞は小血管を伴って島状に増生しており、その辺縁の一部から骨化を生じていた (図 1)。このような変化は骨化巣の大きさに応じて顕著となっていた。

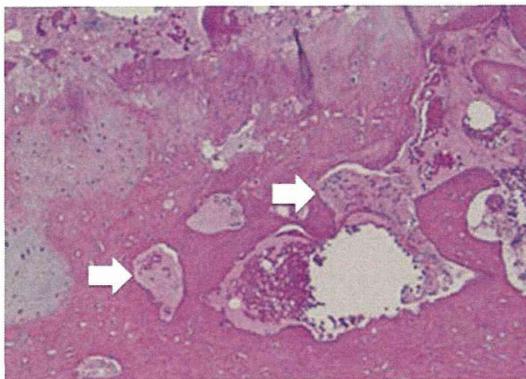


図 1: 骨化前線部の HE 染色
間葉系細胞の島状集簇を認め、その辺縁から骨化を生じている。

間葉系細胞および小血管周囲の未分化な細胞では、免疫染色において VEGF、PDGF などの成長因子、IL-1、IL-6、IL-17 などのサイトカインの発現が陽性であった (図 2)。

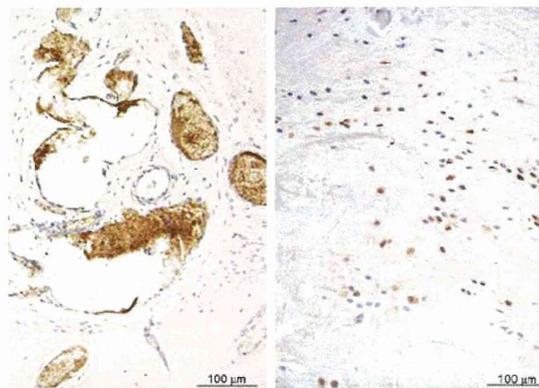


図 2: 免疫染色 (左: IL-17、右: VEGF)
間葉系細胞、小血管周囲の未分化な細胞に陽性である。

培養靭帯細胞におけるサスペンションアレイの結果では、OLF 群では IL-1、IL-2、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、IL-15、IL-17、MIP-1、PDGF、VEGF の 11 項目において有意に発現量が高値であった (図 3)。各因子の発現量を NON-OLF 群と比較すると、特に p 値が低かった IL-6 は 4.6 倍、VEGF は 3.1 倍、PDGF は 2.0 倍、IL-17 は 1.9 倍を呈していた。

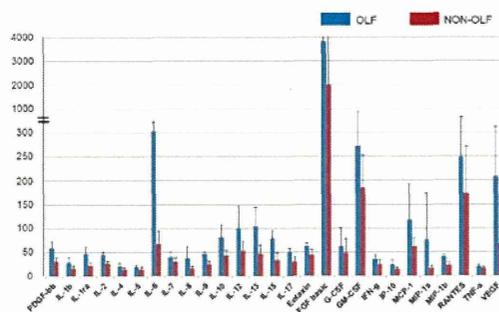


図 3: サスペンションアレイによるサイトカイン、成長因子の発現量

D. 考察

靭帯線維の層から骨化層へと移行する間の領域には線維軟骨層、石灰化前線、石灰化軟骨層からなる骨化前線が存在する。線維軟骨層には主に前増殖期の軟骨細胞、石

灰化前線周囲には前肥大軟骨細胞、石灰化軟骨層には肥大軟骨細胞が存在し、このような形態学的変化は内軟骨性骨化に準じている。特に、骨化層近傍の石灰化軟骨層には間葉系細胞が島状に集簇しており、この辺縁から骨化が形成、伸展していくと考えられる。また、内軟骨性骨化では組織学的に新生血管の増生がみられ、その誘導因子としてVEGF、PDGFなどの関与が指摘されている⁶⁾。骨化前線でみると骨化層近傍に顕著に新生血管が形成されており、血管誘導は骨化形成に必須の変化であり、さらには成長因子の発現亢進によって骨化進展が促進すると考えられた。

骨組織においては骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収の骨代謝回転が存在する。脊柱靭帯骨化においてはWnt/ β -catenin signaling やBMP-Runx2 signaling といった骨芽細胞分化を誘導する因子の発現が上昇しており、骨芽細胞の分化が過剰に促進されていると考えられる。骨吸収に関しては、骨芽細胞や破骨細胞の分化を抑制、亢進に作用するサイトカイン・ケモカインの両者が発現しており、骨化層において骨吸収過程も作用していることが示唆されるが、骨化靭帯においては骨芽細胞分化の亢進、破骨細胞分化の抑制がより強く作用していると考えられた。

E. 結論

胸椎黄色靭帯骨化症の骨化進展において、骨形成と骨吸収の代謝バランスが存在すると考えられるが、成長因子やサイトカインの発現の変化によって骨芽細胞の分化が過剰に亢進し、骨化進展に至ることが示唆された。

F. 健康危険情報
総括研究報告書にまとめて記載。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記することなし。

発表論文、参考論文

- 1) Hashizume Y: Pathological studies on the ossification of the posterior longitudinal ligament (opll). *Pathol Jpn* 1980, 30: 255-273.
- 2) Tsuzuki N, Imai T, Hotta Y: Histopathological findings of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine and their significance. *J, Jpn Orthop Associ* 1981, 55: 387-397.
- 3) Inamasu J, Guiot BH, Sachs DC: Ossification of the posterior longitudinal ligament: an update on its biology, epidemiology, and natural history. *Neurosurgery* 2006, 58: 1027-1039.
- 4) Uchida K, Yayama T, Cai H, et al: Ossification process involving the human thoracic ligamentum flavum: role of transcription factors. *Arthritis Res Ther* 2011, 13: R144.
- 5) Cai HX, Yayama T, Uchida K, et al: Cyclic tensile strain facilitates the ossification of ligamentum flavum through β -catenin signaling pathway. *In vitro Analysis. Spine* 2011, 15: 639-646.
- 6) Stempel J, Fritsch H, Pfaller K, et al: Development of articular cartilage and the metaphyseal growth plate: the localization of TRAP cells, VEGF, and endostatin. *J Anat* 2011, 218: 608-618.

後縦靭帯骨化症に対するメタボローム解析に関する研究

研究分担者 辻崇 北里研究所病院整形外科
千葉一裕 北里研究所病院整形外科
岩波明生 慶應義塾大学整形外科
中村雅也 慶應義塾大学整形外科
松本守雄 慶應義塾大学整形外科
戸山芳昭 慶應義塾大学整形外科

研究要旨 後縦靭帯骨化症患者 10 例および非後縦靭帯骨化症患者 10 例を対象とし、血漿 20 検体をキャピラリー電気泳動-質量分析計および液体クロマトグラフィー-質量分析計を用いて測定し、質量電荷比、泳動時間、保持時間を得た。データベースの登録された物質を対象として解析を行った結果、287（キャピラリー電気泳動-質量分析計 172, 液体クロマトグラフィー-質量分析計 115）のピークが検出され候補化合物名が付与された。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症に関する病態は未だ不明である。本研究の目的は、後縦靭帯骨化症患者の血漿に含まれる代謝産物についてメタボローム解析を行い、その特色を明らかにすることである。

B. 研究方法

後縦靭帯骨化症患者 10 例および非後縦靭帯骨化症患者 10 例を対象とした。上記患者より採血を行い、血漿を分離した。ついで血漿 20 検体をキャピラリー電気泳動-質量分析計および液体クロマトグラフィー-質量分析計を用いて測定し、質量電荷比、泳動時間、保持時間を得た。検出されたピークに対して、代謝物質データベースに登録された物質との照合、検索を行った。

（倫理面での配慮）

人権の擁護には個人情報の保護が必要であり、検体は匿名化して用いる。また、採血

検体採取の際には十分な説明の後に同意を得た。

C. 研究結果

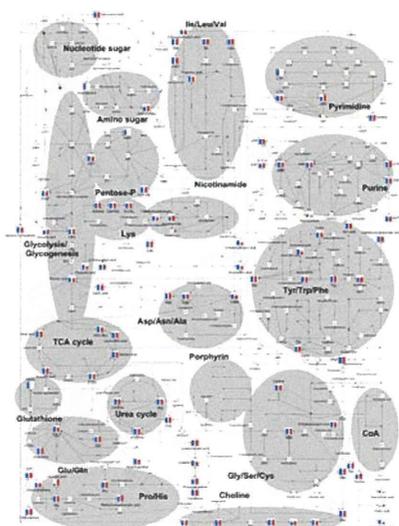
データベースの登録された物質を対象として解析を行った結果、287（キャピラリー電気泳動-質量分析計 172, 液体クロマトグラフィー-質量分析計 115）のピークが検出され候補化合物名が付与された。（図 1）

後縦靭帯骨化と非後縦靭帯骨化症の 2 群で有意差 ($p < 0.05$) の認められた物質が 28 物質、後縦靭帯骨化症においてのみ検出された物質が 5 物質、後縦靭帯骨化症においてのみ検出されなかった物質が 3 物質認められた。

D. 考察

メタボロームとは細胞や体液中に存在する低分子代謝産物のセットを意味する。疾

患者をホメオスタシスの破綻と捉えると、疾患の特異性を代謝物質の変化によって特徴つけられることが期待される。また、ゲノム (DNA)、トランスクリプトーム (mRNA)、プロテオーム (タンパク質) などの研究対象と比較して、対象物質数が少ない、低分子である、表現型に近いといった特色があり、解析が容易で直接の原因を検索しやすいといった利点が存在する。本研究は後縦靭帯骨化症に対する初めてのメタボローム解析であり、新規バイオマーカーや病態説明の有用な情報になり得ると考えられる。



(図1) 主要代謝経路図上の代謝物質の関連 青；後縦靭帯骨化症 赤；非後縦靭帯骨化症

E. 結論

後縦靭帯骨化症患者およびコントロールの血漿を用いてメタボローム解析を行い、287 物質のピークを検出して候補化合物を同定した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

辻崇 千葉一裕 岩波明生 中村雅也
松本守雄 戸山芳昭 後縦靭帯骨化症に対するメタボローム解析. 脊柱靭帯骨化症に対する調査研究 平成24年度第2回班会議 2012.

H. 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

VII. 画像・電気生理・コンピューター解析

頚椎後縦靭帯骨化症における骨化巣の3次元解析に関する研究

研究分担者 遠藤直人 新潟大学整形外科教授
平野徹 新潟大学整形外科 新潟大学病院准教授
和泉智博 新潟中央病院/大学院生
勝見敬一 新潟大学整形外科医員/大学院生

研究要旨 我が国の特定疾患の1つである頚椎後縦靭帯骨化症(以下OPLL)は進行すると四肢麻痺を引き起こす重篤な疾患である。OPLL患者の頚椎CTのDICOMデータを使用して3次元モデルを作成し、骨化巣を抽出し、OPLLの3次元形態評価と体積算出を行い、治療法別の経年的変化の定量的な評価、増大部位の解析、骨化巣増大の危険因子の解析を行った。この解析により症例ごとに骨化巣の増加率や増大部位が予測可能となり、術式および除圧範囲の選択に重要な情報を提供できる可能性がある。

A. 研究目的

術前や術後、保存的治療中のOPLL患者の頚椎CTのDICOMデータを使用して3次元モデルを作成し、骨化巣を抽出することで、今までには行われていなかった3次元的な評価を可能にすること。

B. 研究方法

OPLLの保存的治療例および手術治療例において約1年毎にCTを撮影し、DICOMデータを収集している。CTは0.5~1.0mmスライスとしている。このデータを基に、画像解析ソフトを用いて骨化巣を抽出して3次元モデルを作成し、形態の経時的変化を観察し、体積を定量的に評価して年毎の体積増加量や増加率を治療法別に算出した。また、既に報告のある骨化巣増大に影響を与える様々な危険因子を検討した。さらに骨化巣を重ね合わせることで経時的な骨化巣の増大部位を解析した。

(倫理面での配慮)

当院の倫理委員会より承認されており、患者に説明書にて説明し、書面による同意を得た上でCTデータを収集している。

C. 研究結果

除圧術・固定術・保存治療と比較すると、固定術では骨化巣の年毎の増加率が明らかに低かった。また、椎弓形成術後の症例における多重解析では、術前の可動域と骨化巣の増加率には明らかな相関は認めず、術後の頚椎の可動域や年齢と骨化巣の増加率には高い相関を認めた。またC2レベルでの骨化巣の重ね合わせの解析では、様々な増大形態を呈しており、増大部分が特定できずただらに増大する「ただら型」、頭側を中心に増大していく「頭側型」、全体が増大する「全体型」といった増大形態に大きく分別できた。

D. 考察

本研究の椎弓形成術後の3次元解析に

より頸椎可動域が骨化巣増大に関係していることがこれまでに明らかになっている。今回は多重解析を行い、術前の可動域よりは術後の頸椎の可動域が大きいことに加えて年齢が若いことは骨化巣の体積増加率と相関が高く、骨化巣増大の危険因子であると考えられ、術後経過観察中の患者に対しての脊髄症の再発に注意を必要とする因子であることが示唆された。頸椎の可動域を制限する固定術で増加率が少ないことも、骨化巣増大における可動域の重要性をサポートする結果と考えられる。また、骨化巣の重ね合わせによる解析も進めている。形が特徴的である C2 レベルのみでの解析では、様々な増大形態を認めた。増大形態によっては C2 レベルでの再除圧を必要とする可能性を示唆していた。今後は骨化巣全体の増大部位についても解析を進めて明らかにしていきたい。

E. 結論

骨化巣の増大は、術後の頸椎の可動域と年齢と相関があり、危険因子と考えられる。今後はこの危険因子を考慮しての術式選択や骨化巣の増大部位を考慮しての除圧範囲の選択が治療成績の向上に寄与する可能性がある。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

・頸椎後縦靭帯骨化症における体積増加の危険因子は何か？2012年日本脊椎脊髄病学会で発表

・頸椎後縦靭帯骨化症における体積増加の危険因子. 2012年京都鴨川研究会で発表

・頸椎後縦靭帯骨化症に対する後方除圧固定術. 2012年第21回日本脊椎instrumentation学会で発表

・頸椎後縦靭帯骨化症術後の骨化巣に対する3次元画像解析

～椎弓形成術と後方除圧固定術の比較～. 2012年第21回日本脊椎instrumentation学会で発表

・What are the risk factors for volume progression in cervical OPLL after laminoplasty? : 3-dimensional analysis of a novel measuring method using computed tomography. 2012年CSRSで発表

・3次元画像解析による術前後ROMがOPLL体積増加に与える影響. 2012年第2回班会議で発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

頸髄症における有限要素法を用いた髄内応力分布に関する研究 ー第3報ー
高橋康平、小澤浩司、相澤俊美、坂元尚哉*、嶺岸由佳**、佐藤正明**、井樋栄二
(分担研究者 小澤浩司)

東北大学大学院医学系研究科整形外科学分野

*川崎医療福祉大学医療技術学部臨床工学科

**東北大学大学院医工学研究科医工学専攻

研究要旨 頸髄症患者のMRIでは、通常最も圧迫の強い部分に一致して髄内T2高輝度領域がみられる。本研究では、頸髄症において髄内高輝度が存在する高位と存在しない高位で脊髄内の応力を解析し、髄内高輝度をきたす応力の閾値を求めた。さらに髄内高輝度を示した高位の除圧術後の髄内応力を検討した。その結果、頸髄症において髄内T2高輝度領域を示す椎間で他の椎間に比べ最も高い髄内応力がみられた。その応力のカットオフ値は2.30kPaであった。除圧により髄内応力は減少した。髄内応力が神経変性や脊髄症状の発症に大きな影響をおよぼしていた。

A. 研究目的

頸髄症とは頸椎の加齢性変形による脊柱管の狭窄のために、脊髄症状が生じる症候群である。しかし、無症候性の頸髄圧迫は7.6%-26%存在するとされ、頸髄の圧迫が認められても必ずしも発症するわけではない。

これまで頸髄症の成因について数多くの研究がなされてきた。多くの動物実験で、圧迫により脊髄の病理学的変化が生じることが証明されている。その機序として、繰り返される微小外傷や循環障害が組織の変性につながるという仮説が提示されてきた。しかし、機械的圧迫が直接、組織障害に及ぼす影響については不明な点が多い。

Ozawaらはウサギを用いた脊髄片側圧迫モデルにおける変性の分布が、有限要素法により求めた髄内応力分布と相関することを報告した(J Neurotrauma 21: 944 2004)。しかし、神経症状を示す患者において、脊髄内応力と神経変性、症状な関係について

述べた論文はない。

頸髄症患者のMRIでは、しばしば最も圧迫の強い部分に一致して髄内T2高輝度領域がみられる。これは、脊髄組織の変性を反映しているものと思われる。本研究では、頸髄症において髄内高輝度が存在する高位と存在しない高位で脊髄内の応力を解析し、髄内高輝度をきたす髄内応力の閾値を求めた。さらに髄内高輝度をきたした高位の除圧術後の髄内応力を検討した。

B. 対象

対象患者は、1施設で黒川法による頸椎椎弓形成術が行われた連続した33例(男性21例、女性12例)であり、前向き試験として計画された他研究での対象患者の一部とした。患者の年齢は 62.1 ± 11.0 歳(mean \pm S.D.)、(95% confidence interval; 66.0-58.2 years)であった。いずれの症例もC3-4、C4-5、C5-6のいずれかの1椎間に

髄内 T2 高輝度領域が存在した。T2 高輝度を示した椎間は C3-4 が 6 例、C4-5 が 13 例、C5-6 が 14 例であった。髄内 T2 高輝度領域が存在する 33 椎間を高輝度椎間、その他の 66 椎間を等輝度椎間とした。

コントロール群として、脊髄症以外の疾患で頸椎 MRI が撮影された連続した 30 例（男性 18 例、女性 12 例）、平均年齢 62.1 ± 13.0 (mean ± S.D.) , (95% confidence interval; 66.9-57.3 years) の 90 椎間を検討し、対照椎間とした。対照椎間群では髄内高輝度は認められなかった。

C. 研究方法

1. MRIT2 矢状断像から各椎間の圧迫による脊髄の変形を脊髄前後径率として計測して以下の式により求めた。

脊髄前後径率 (%) = 当該高位脊髄前後径 / C2 高位脊髄前後径 × 100

2. MRIT2 矢状断像の有限要素法解析

対象患者の MRIT2 強調正中矢状断像をもとに C2-7 にかけて脊髄前縁と後縁をスプライン曲線に近似し、脊髄矢状断形状を抽出した。有限要素法 (FEM) ソフト (Ansys Ver. 11) を用いて、C2 と C7 の頭尾側端を直線で結んだモデルをそれぞれの脊髄モデルになるよう強制変位を与え、弾性解析を行い、髄内の応力を解析した。材料定数は動物実験をもとに灰白質、白質の初期弾性率を 5 kPa, Poisson's ratio を 0.49 とした。応力は Meses 相当応力により評価した (図 1)。

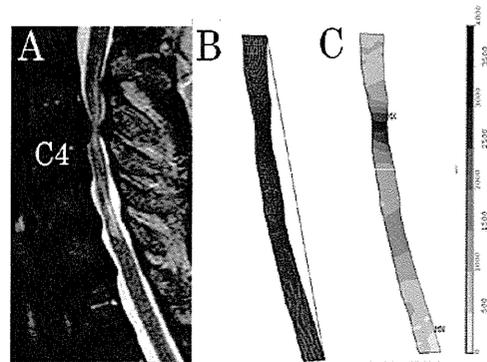


図 1 A. MRIT2 強調正中矢状断像
B. 変形図
C. 応力分布図

それぞれの症例の C3 椎体中央から C4 椎体中央までを C3-4 椎間、C4 から C5 椎体中央までを C4-5 椎間、C5 から C6 椎体中央までを C5-6 椎間とし、それぞれの椎間における最大応力を椎間応力と定義した。

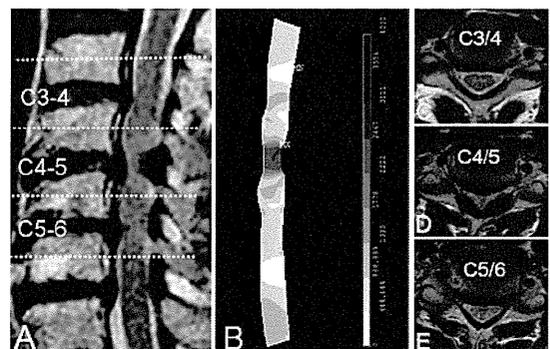


図 2 症例 65 歳女性

C4-5 に強い脊髄変形と T2 高輝度領域がみられる。椎間応力は C3-4:1.6 kPa、C4-5:3.7 kPa、C5-6 :1.8 kPa である。

3. 検討項目

①高輝度椎間群、等輝度椎間群、対照椎間群で脊髄前後径率、髄内応力を比較した。

(Turkey-Krammr の HSD 検定)

②高輝度椎間群 33 椎間と等輝度椎間群 66 椎間について ROC 分析を行い、T2 高輝度を

示す椎間の髓内応力の閾値を求めた。

③ 術前と術後での高輝度椎間における椎間応力の変化を検討した (paired-t 検定)。いずれも統計ソフト (JMP Pro 9.0.0) を使用した。値は mean±SD で表し、有意水準を 5% とした。

C. 研究結果

① 33 例中 31 例で、高輝度椎間の脊髓前後径率は等輝度椎間の脊髓前後径率に比べて低かった。脊髓前後径率の平均は、高輝度椎間群で $56.3 \pm 15.8\%$ 、等輝度椎間群で $79.0 \pm 15.7\%$ 、対照椎間群で $86.5 \pm 9.4\%$ であり、いずれの群間にも有意差を認めた (図 3)。

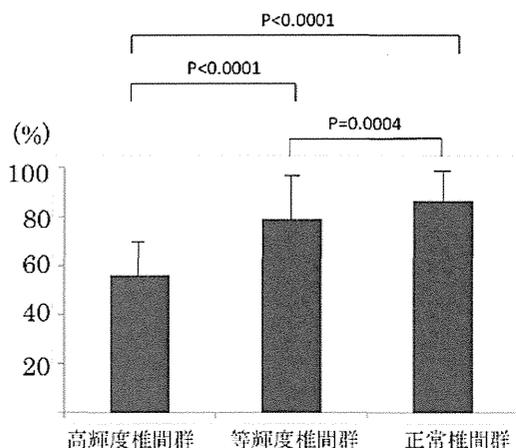


図 3 脊髓前後径率

すべての症例で高輝度椎間高位と最大椎間応力高位が一致した。椎間応力の平均は、高輝度椎間群で $3.16 \pm 0.86\text{kPa}$ 、等輝度椎間群で $1.81 \pm 0.72\text{kPa}$ 、対照椎間群で $1.01 \pm 0.37\text{kPa}$ であり、いずれの群間にも有意差を認めた ($p < 0.0001$) (図 4)。

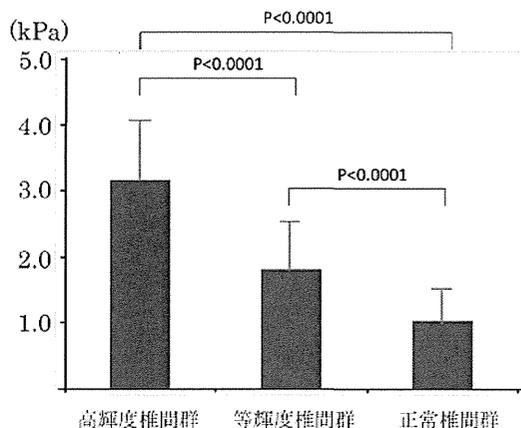


図 4 椎間応力

脊髓前後径率と椎間応力の間には負の相関関係がみられた。 ($r = -0.69$, $p < 0.0001$)

また、椎間応力は、以下の二次式により表され (いずれの項も $p < 0.001$)、前後径率が 71% 以下のとき、椎間応力は著しく増大した。

(図 5)

椎間応力 (kPa) = $4.76943 - 0.03804 \times$ 脊髓前後径率 (%) + $0.00055 \times$ [脊髓前後径率 (%) - 70.9294]²

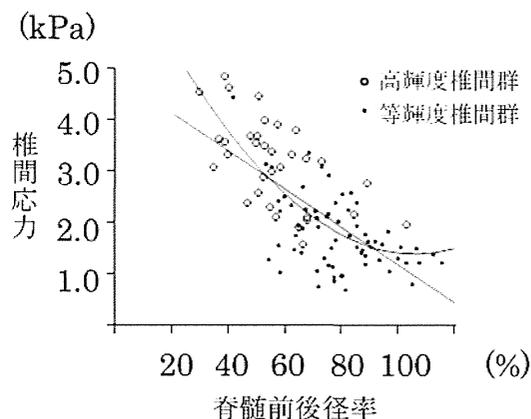


図 5 脊髓前後径率と椎間応力

② T2 高輝度を示す髓内応力 ROC 曲線を示す (図 6)。曲線下面積は 0.89 であり、責任