

告している，神経合併症は手術で重篤な合併症のひとつであり，回避すべく何らかの対策が必要である．術中脊髄機能モニタリングは神経合併症を最低限にするために非常に有用である．最近の報告では，モニタリングの Multimodality が推奨され，その成績も良好である．とりわけ Br (E) -MsEP は運動路を監視することができ，さらに SSEP や D-wave に比較し感度が良いモニタリング法である．ただし Br (E) -MsEP の成績の報告は多いものの，報告によってどのような波形の変化を有意とするかまちまちであり，未だ統一されたアラームポイント（警告基準）はないことが問題となっている．

そこで，日本脊椎脊髄病学会脊髄モニタリング委員会により 2007 年～2009 年までの True Positive であった 48 例を検討し，振幅の 70%低下を MEP のアラームポイントと定めた．このアラームポイントの妥当性を検証するために，日本脊椎脊髄病学会脊髄モニタリングワーキンググループ関連施設 16 施設を対象として多施設前向き研究を行った．

## B. 研究方法

対象と方法，2010 年 4 月～2013 年 4 月に後縦靭帯骨化症，脊髄腫瘍，側弯症手術を行い，術中モニタリングを行った．振幅の 70%低下を MEP のアラームポイントとした．アンケートを各施設に送付し，1 年間におけるモニタリング症例を前向きに調査・集計した．全 16 施設からアンケートを回収し，モニタリング総数 1333 例が集計された．検討項目は，1:モニタリングの種類，2:疾患名及びその数，3:施行した各モニタリングの刺激条件，導出筋・筋数，4:合併症，5:波形変化があった症例と False negative となった症例の疾患名，術式，導出部位・筋数，術前・術後の徒手筋力テスト (MMT)，術後感覚障害の有無，術後麻痺の期間，術中・術後波形とした．

## C. 結果

対象疾患は 1333 例中，脊髄腫瘍 456 例と側弯症 430

例，OPLL 427 例であった．難治性疾患である胸椎 OPLL は 149 例 (11.1%) であった．1333 例中 True positive は 55 例，false positive は 101 例，False negative は 3 例にあった．術中にモニタリング波形の変動があり，最終波形までに回復したリカバリー症例を要検討例とした．モニタリングの精度は感度 95%，特異度 92%，陽性的中率 35%，陰性的中率 99%，偽陽性率 8%，偽陰性率 5% であった．モニタリングで警告され，術後麻痺が出現した True positive 症例は髄内腫瘍が多く 55 例中 15 例 (26%)，髄外腫瘍は 15 例 (26%)，胸椎 OPLL は 11 例 (19%)，頸椎 OPLL は 4 例 (7%) であった．

術後麻痺症例が 1 カ月未満の一過性で回復したのは波形消失した 12 例であった．また 3 か月以上回復しない麻痺は術中波形変化をコントロール振幅より 80%低下が 3 例，90%低下が 2 例，消失が 7 例であった．振幅低下の程度と麻痺期間は関連しなかった．さらに麻痺の程度を徒手筋力テストの低下分とすると，MMT1 段階低下の軽微な麻痺では最終波形振幅が 54%しか低下しなかった False negative 例があったが，また最終波形振幅が 52%しか低下しなかったが，MMT2 段階低下した髄内腫瘍例が 1 例あった．それ以外の MMT2 段階以上低下した重度の麻痺では全ての症例は振幅 70%以下に低下していた．モニタリングで警告され，最終波形が回復したレスキュー症例では術後麻痺例はなかった．この 65 例のレスキュー症例こそモニタリングの使用意義があったと考えた．

## D. 考察

脊椎・脊髄手術を行なう際，特に脊髄腫瘍摘出術・後縦靭帯骨化症手術・側弯症矯正術などでは神経合併症のリスクが高く，術後運動、感覚障害などを最小限に防ぐ安全な処置が望まれる．脊髄モニタリングの重要性を説く論文は数多く報告されており，その中でも Br-MsEP は最も鋭敏なモニタリングとして位置づけられている．Br-MsEP のアラームポイントは振幅 50%低下、潜時の 10%延長とするものや，振幅 80%低下

(Langeloo DD et al., SPINE 26, 2001), 波形消失 (Sala F et al., Eur Spine J 16, 2007), 波形形態変化 (Quinones HA et al., Neurosurgery 56, 2005) とするものなど定まったものはなく, 対象症例も多岐にわたっている。

本研究では振幅 70% の低下をアラームポイントとし, 感度 95%, 特異度 92% と良好な成績が得られた。False negative 例は振幅 54% と 52% だけ低下した髄内腫瘍の症例であった。False negative 例からは髄節障害と脊髄障害または髄内腫瘍手術でアラームポイントが異なる可能性が示され, 今後は疾患ごとに分けて詳細に調査を行う必要も感じられた。

## E. 結論

OPLL, 脊髄腫瘍, 脊柱側弯症の難治例に対する術中脊髄モニタリングの新しい Br-MsEP のアラームポイントを振幅の 70% 減少とした。この新しい基準により多施設前向き研究を行い, 安全で有用なアラームポイントと考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Sho Kobayashi, Yukihiro Matsuyama, Kenichi Shinomiya, Shigenori Kawabata, Muneharu Andou, Tukasa Kanchiku, Takanori Saitou, Masahito Takahashi, Zenya Ito, Akio Muramoto, Yasushi Fujiwara, Kazunobu Kida, Kei Yamamoto, Kanichiro Wada, Naoya Yamamoto, Kazuhiko Satomi, Toshikazu Tani. A new alarm point of transcranial electrical stimulation motor evoked potentials for intraoperative spinal cord monitoring: a prospective multicenter study from the Spinal Cord Monitoring Working Group of the Japanese Society for Spine Surgery and Related Reserch. J Neurosurg Spine. 2013. (in press)

小林祥、松山幸弘、四宮謙一、川端茂徳、安藤宗治、寒竹司、齊藤貴徳、高橋雅人、伊藤全哉、村本明生、藤原靖、木田和伸、山田圭、和田簡一朗、山本直也、

里見和彦、谷俊一：術中脊髄モニタリングのアラームポイント 日本脊椎脊髄病学会モニタリング委員会による多施設前向き研究. 脊髄機能診断学. 34(1). 85-89. 2013

小林祥、松山幸弘、四宮謙一、安藤宗治、里見和彦、谷俊一：後縦靭帯骨化症における術中脊髄モニタリング 日本脊椎脊髄病学会モニタリング委員会調査. 脊椎脊髄ジャーナル. 26(3). 197-201. 2013.

小林祥、長谷川智彦、安田達也、大和雄、戸川大輔、木村竜希、田仲飛鳥、川村茂之、松山幸弘：Double-train 経頭蓋電気刺激による術中脊髄機能モニタリング. 脊髄機能診断学. 34(1). 90-93. 2013

木村竜希、小林祥、長谷川智彦、安田達也、大和雄、戸川大輔、田仲飛鳥、川村茂之、松山幸弘：Double-train 経頭蓋電気刺激における至適 train 間隔. 脊髄機能診断学. 34(1). 94-97. 2013

## 2. 学会発表

小林祥、松山幸弘、四宮謙一、川端茂徳、安藤宗治、寒竹司、齊藤貴徳、高橋雅人、伊藤全哉、村本明生、藤原靖、木田和伸、山田圭、和田簡一朗、山本直也、里見和彦、谷俊一：術中脊髄モニタリングのアラームポイント, 第 35 回脊髄機能診断研究会 (2013. 2. 3) 東京

松山幸弘、小林祥、四宮謙一、川端茂徳、安藤宗治、寒竹司、齊藤貴徳、高橋雅人、伊藤全哉、村本明生、藤原靖、木田和伸、山田圭、和田簡一朗、山本直也、里見和彦、谷俊一：多施設前向き研究による術中脊髄モニタリング (Br (E)-MsEP), 第 42 回日本脊椎脊髄病学会 (2013. 4. 25~4. 27) 沖縄

小林祥、松山幸弘、四宮謙一、川端茂徳、安藤宗治、寒竹司、齊藤貴徳、高橋雅人、伊藤全哉、村本明生、藤原靖、木田和伸、山田圭、和田簡一朗、山本直也、里見和彦、谷俊一：術後麻痺を回避することができた

術中脊髄モニタリング, 第 42 回日本脊椎脊髄病学会  
(2013. 4. 25~4. 27) 沖縄

藤原靖、小林祥、松山幸弘、四宮謙一、川端茂徳、安藤宗治、寒竹司、齊藤貴徳、高橋雅人、伊藤全哉、村本明生、木田和伸、山田圭、和田簡一朗、山本直也、里見和彦、谷俊一：脊髄内腫瘍における術中脊髄モニタリング新アラームポイント「振幅 70%以上低下」の有用性 -日本脊椎脊髄病学会多施設研究-, 第 42 回日本脊椎脊髄病学会 (2013. 4. 25~4. 27) 沖縄

伊藤全哉、松山幸弘、四宮謙一、川端茂徳、安藤宗治、寒竹司、齊藤貴徳、高橋雅人、伊藤全哉、村本明生、木田和伸、山田圭、小林祥、藤原靖、和田簡一朗、山本直也、里見和彦、谷俊一：胸椎 OPLL 手術における脊髄モニタリングの多施設前向き研究-後ろ向き研究と比較して-, 第 42 回日本脊椎脊髄病学会 (2013. 4. 25~4. 27) 沖縄

市川美智華、小林祥、木村竜希、馬秀幸、安田達也、大和雄、長谷川智彦、戸川大輔、松山幸弘:Double-train 経頭蓋電気刺激による術中脊髄モニタリング波形の従来法との前向き比較  
第 42 回日本脊椎脊髄病学会 (2013. 4. 25~4. 27) 沖縄

木村竜希、小林祥、市川美智華、有馬秀幸、安田達也、大和雄、長谷川智彦、戸川大輔、松山幸弘:Double-train 経頭蓋電気刺激による術中脊髄モニタリング波形の従来法と至適トレイン間隔  
第 42 回日本脊椎脊髄病学会 (2013. 4. 25~4. 27) 沖縄

小林祥、松山幸弘、四宮謙一、川端茂徳、安藤宗治、寒竹司、齊藤貴徳、高橋雅人、伊藤全哉、村本明生、藤原靖、木田和伸、山田圭、和田簡一朗、山本直也、里見和彦、谷俊一：多施設前向き研究による術中脊髄モニタリング(Br-MsEP)のアラームポイント, 第 86 回日本整形外科学会 (2013. 5. 23~5. 26) 広島

Kei Yamada, Sho Kobayashi, Yukihiro Matsuyama,  
Kenichi Sinomiya, Shigenori Kawabata, Muneharu

Ando, Tsukasa Kanchiku, Takanori Saito, Masahito Takahashi, Zenya Ito, Akio Muramoto, Yasushi Fujiwara, Kazunobu, Kida, Naoya Yamamoto, Kazuhiko Satomi, Toshikazu Tani. Evaluation of the Alarm Criteria of Transcranial Electrical Stimulation Muscle Evoked Potential in Scoliosis Surgery: Multi-Institution Survey by the Monitoring Committee of the Japanese Society for Spine Surgery and Related Research. A prospective multicenter study. 20<sup>th</sup> International Meeting on Advanced Spine techniques (2013. 7. 10~7. 13) Vancouver

Sho Kobayashi, Yukihiro Matsuyama, Kenichi Sinomiya, Shigenori Kawabata, Muneharu Ando, Tsukasa Kanchiku, Takanori Saito, Masahito Takahashi, Zenya Ito, Akio Muramoto, Yasushi Fujiwara, Kazunobu, Kida, Naoya Yamamoto, Kazuhiko Satomi, Toshikazu Tani. Routine Use of Intraoperative Spinal Cord Monitoring is Necessary during Spinal Osteotomy for Adult Spinal Deformity. Scoliosis Research Society 48th Annual Meeting (2013. 9. 18~21) Lyon

#### 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

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究

研究分担者 今釜 史郎 名古屋大学整形外科講師  
研究協力者 伊藤 全哉 名古屋大学整形外科特任助教  
研究協力者 安藤 圭 名古屋大学整形外科病院助教

研究要旨 後縦靱帯骨化症（OPLL）の中でも割合の少ない胸椎 OPLL の手術成績を多施設、前向きに調査し評価した。後方除圧固定術後、一定の症状回復は得られたものの、術後運動麻痺や感染など合併症も問題であった。脊髄の除圧が良い方が手術成績も良い可能性があるが手術侵襲が大きくなる問題がある。至適な治療法確立にはさらなる研究が必要である。

A. 研究目的

後縦靱帯骨化症（OPLL）の中でも割合の少ない胸椎 OPLL の手術成績を多施設、前向きに調査し評価する。

B. 研究方法

脊髄圧迫に伴う脊髄症状を呈し手術に至った胸椎 OPLL 患者の症状、理学所見、画像所見を集積し、術後成績を評価して、胸椎 OPLL に対する最適な手術方法を検討する。参加施設においては胸椎 OPLL 手術決定時に症例を登録し、必要な検査などを施行後、手術後の症状経過についても最低 2 年間経過観察し、手術成績、合併症、脊髄症状や運動麻痺の回復程度を評価する。

（倫理面での配慮）

患者データ使用にあたっては患者および家族の同意を得ており、データの扱いに関しても個人情報の遵守に努めている。

C. 研究結果

2011 年 11 月～2013 年 6 月までに登録された症例は 35 例（男性 19 名、女性 16 名）で平均年齢 54 歳、BMI 30 であった。手術

既往として頸椎椎弓形成術を 8 例に、胸椎除圧術を 5 例に、腰椎固定術を 1 例に施行されていた。糖尿病の合併は 10 例（43%）であった。術前症状は下肢不全麻痺、体幹しびれ、下肢痛、下肢しびれなどで、臥位での下肢症状悪化症例もみられた。術式は胸椎後方除圧固定術 19 例、後方固定術 6 例、後方除圧術 1 例で、後方侵入脊髄前方除圧術 2 例、前方除圧固定術 1 例などであった。術後麻痺悪化なし 21 例であったが、麻痺悪化（一過性含む）に 14 例に認め、このうち 3 例は追加手術を要した。この運動麻痺の回復に要した期間は平均 2.7 ヶ月であった。手術成績判定基準である JOA スコアは術前平均 4.5 点が退院時 5.0 への改善にとどまっていたが、術後 1 年では 7.8 点まで更に改善していた。術中超音波所見で後方脊髄除圧時、脊髄が完全に除圧された群と脊髄前方にやや圧迫が残存した群の手術成績を比較すると、有意差はないものの完全除圧群で JOA スコアが良好な傾向を認めた。各術式間では手術成績に有意な差はなく、いずれも術後改善を示した。

#### D. 考察

胸椎 OPLL に対しては implant を用いた後  
方除圧固定術が行われることが多いが、そ  
の他の術式も同様の術後回復を示していた。  
一方、術後運動麻痺を 40%に認め、いずれ  
も未だ十分な手術法とは言えない。脊髄を  
前方後方とも完全に除圧した方が手術成績  
が良い傾向を認めたが、手術侵襲が大き  
くなり患者にかかる負担が大きくなる。本  
研究では各術式の手術数が少なく更に今後  
の検討を要する。

#### E. 結論

胸椎 OPLL の手術症例を、多施設前向きに  
35 例登録し、術前の症状、画像変化、術後  
経過を検討した。理想的には脊髄を完全に  
除圧することが望ましいが手術侵襲の問題  
があり、術前症状や骨化形態に応じ術式を  
選択する必要も示唆される。更なる研究で  
術式選択に関する知見を得る必要がある。

#### 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

Predictive Factors for a Poor Surgical  
Outcome With Thoracic Ossification of  
the Ligamentum Flavum by Multivariate  
Analysis: A Multicenter Study.

Ando K, Imagama S, Ito Z, Hirano K,  
Muramoto A, Kato F, Yukawa Y, Kawakami  
N, Sato K, Matsubara Y, Kanemura T,  
Matsuyama Y, Ishiguro N.

Spine (Phila Pa 1976). 2013 in press

胸椎 OPLL 手術における Br(E)-MsEP の  
有用性 術後麻痺を防ぐ key point.  
伊藤 全哉, 今釜 史郎, 安藤 圭, 平  
野 健一, 田内 亮吏, 村本 明生, 松  
井 寛樹, 松本 智宏, 鶴飼 淳一, 小  
林 和克, 新城 龍一, 中島 宏彰, 八  
木 秀樹, 飛田 哲朗, 石黒 直樹 脊  
髄機能診断学 34(1):182-187. 2013

##### 2. 学会発表

胸椎後縦靭帯骨化症に対する後方除圧  
矯正固定術 —術後麻痺回避の対策—  
今釜史郎, 伊藤全哉, 安藤圭, 田内亮吏,  
村本明生, 松井寛樹, 松本智宏, 平野健  
一, 若尾典充, 松山幸弘, 石黒直樹  
第 86 回日本整形外科学会 (広島) 2013.

胸椎後縦靭帯骨化症後方手術後骨化形  
態の画像経過—術前頭尾側骨化不連続  
部分は癒合する—

安藤圭, 今釜史郎, 伊藤全哉, 田内亮吏,  
村本明生, 松井寛樹, 松本智宏, 石黒直  
樹 第 86 回日本整形外科学会 (広島)  
2013.

胸椎後縦靭帯骨化症に対する後方手術  
～後方除圧矯正固定術と後方侵入脊髄  
前方除圧術。今釜史郎, 伊藤全哉, 安藤  
圭, 田内亮吏, 村本明生, 松井寛樹, 松本  
智宏, 小林和克, 鶴飼淳一, 新城龍一, 中  
島宏彰, 平野健一, 松山幸弘, 石黒直樹  
第 42 回日本脊椎脊髄病学会 (沖縄)  
2013

胸椎後縦靭帯骨化症後方手術後骨化形  
態の画像経過—術前頭尾側骨化不連続

部分は癒合する一。安藤圭, 今釜史郎, 伊藤全哉, 田内亮吏, 村本明生, 松井寛樹, 松本智宏, 鷓飼淳一, 小林和克, 新城龍一, 中島宏彰, 八木秀樹, 飛田哲朗, 松山幸弘, 石黒直樹 第42回日本脊椎脊髄病学会(沖縄)2013

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

頰椎後縦靱帯骨化症における狭窄部位よりみた特徴。伊藤研悠, 湯川泰紹, 伊藤圭吾, 町野正明, 中島宏彰, 神原俊輔, 今釜史郎, 加藤文彦, 石黒直樹 第42回日本脊椎脊髄病学会(沖縄)2013.

胸椎 OPLL 手術における脊髄モニタリングの多施設前向き研究-後ろ向き研究と比較して- 伊藤 全哉, 松山幸弘, 四宮謙一, 川端茂徳, 安藤宗治, 齋藤貴徳, 山本直也, 山田圭, 寒竹司, 谷口慎一郎, 木田和伸, 藤原靖, 和田簡一郎, 小林祥, 里見和彦, 谷俊一, 日本脊椎脊髄病学会脊髄モニタリングワーキンググループ 第42回日本脊椎脊髄病学会(沖縄)2013

後縦靱帯骨化症の治療 胸椎後縦靱帯骨化症後方固定術後骨化形態の画像経過 術前頭尾側骨化不連続部分は癒合する。 安藤圭, 今釜史郎, 伊藤全哉, 小林和克, 村本明生, 石黒直樹 第121回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会(名古屋)2013

#### 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

胸部 CT 受験者からみた胸椎後縦靭帯骨化症の有病率

研究分担者 森 幹士 滋賀医科大学整形外科講師  
西澤和也 滋賀医科大学整形外科助教

研究要旨 脊椎後縦靭帯骨化症（以下 OPLL）の有病率、特に胸椎のそれについての詳細な報告はあまりなされていない。本研究では、当院で施行済みの胸部 CT 検査結果を用いてこの有病率を調査した。3013 名中、1.9%に OPLL が認められた。胸椎 OPLL は女性に有意に多く、胸椎 OPLL を認めたものは body mass index が有意に高かった。胸椎 OPLL の高位分布は T3/4 にピークを持つ上・中位胸椎に多い傾向を示し、下位胸椎には少なかった。胸椎 OPLL の CT 独自の分類策定や、脊柱管占拠率や骨化形態などと臨床症状との相関についての調査が今後の課題である。

A. 研究目的

胸椎後縦靭帯骨化症（以下 OPLL）の有病率に関する詳細な報告はなされていない。既報の胸椎 OPLL の有病率は、胸椎もしくは胸部単純レントゲン（以下 Xp）による評価でありコンピューター断層撮影（CT）を用いたものはない。しかし、胸椎では、その解剖学的な位置関係から Xp のみでは脊柱靭帯骨化の診断には限界がある。本研究の目的は、OPLL の描出に優れる CT を用いて、その有病率を詳細に調査することである。

B. 研究方法

当院にて呼吸器疾患、またはその疑いのために施行された胸部 CT 検査のうち、15 歳以下の小児、脊椎手術の既往が有るもの、全胸椎の評価が不可能であるものを除く連続症例を対象とした。胸部 CT 撮影データをソフトウェア（AquariusNet Viewer, TeraRecon, Inc., CA）を用いて骨条件に変換し、OPLL の有無や罹患形態、罹患高位などについて調査した。CT による OPLL の形態分類には確立されたものがなく、既報の

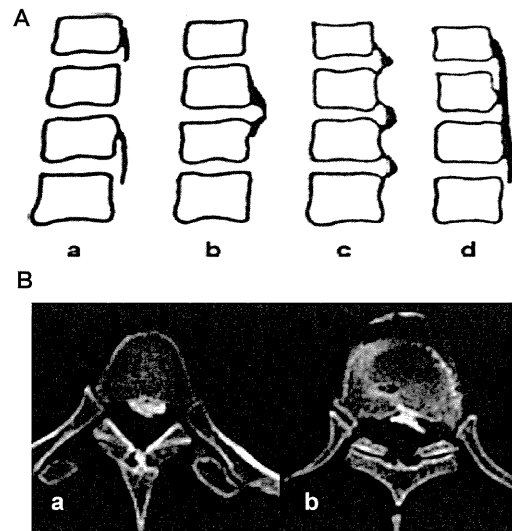


図 1. 後縦靭帯骨化の矢状断 (A) および水平断 (B) での形態分類

A: (a) linear type; (b) beaked type; (c) continuous waveform type; (d) continuous cylindrical type. Mixed type is defined as a combination of 2 or more different types. B: (a) central type; (b) lateral deviated type

分類を使用した（図 1A, B）。OPLL は厚さ 3mm 以上の骨化とし、椎間板レベルに限局する hard disc type は除外した。胸椎 OPLL の罹患高位については、これまでは椎体レベルのみで評価されてきたが、胸椎 OPLL は

図 1A(b)の様に椎間板レベルの病変が、椎体レベルの骨化と同等、または以上に臨床重要となる場合があると考え、本調査では胸椎の椎体レベルに加え、椎間板レベルを加えた 23 レベルで罹患高位を評価した。また、年齢や性別、body mass index (以下 BMI)なども併せて調査した。

(倫理面での配慮)

本研究は当施設の倫理委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

3013 名 (男性 1752 名、女性 1261 名、平均年齢 65 歳) についての調査が可能であった。OPLL は、男性 18 名 (男性の 1.0%)、女性 38 名 (女性の 3.0%) の計 56 名 (全体の 1.9%) に認められた (表 1)。

その高位別分布は T3/4 にピークを持ち、上位から中位胸椎に多く、下位胸椎には少ない傾向を示した (図 2)。骨化形態については、矢状断分類では linear が最多であった (表 2)。水平断分類では、central type

表 1. 胸椎後縦靭帯骨化症の有無での特徴

	OPLL					
	male		female		total	
	+	-	+	-	+	-
Number	18	1734	38	1223	56	2957
Age (mean±SD) (yr)	74 ± 8.3	66 ± 14	64 ± 10	64 ± 15	68 ± 11	65 ± 14
p	0.0004		0.75		0.083	
BMI (mean±SD) (kg/m <sup>2</sup> )	24 ± 3.0	22 ± 3.4	23 ± 4.2	22 ± 3.6	24 ± 3.9	22 ± 3.5
p	0.013		0.059		0.0076	

表 2. 胸椎後縦靭帯骨化症 CT 矢状断分類の頻度

Type of ossification	Number of ossification level (n)		
	male	female	total
linear	7	14	21
beaked	3	3	6
continuous waveform	2	5	7
continuous cylindrical	2	10	12
mixed	4	6	10

が 42 例、lateral deviated type が 14 例であった。

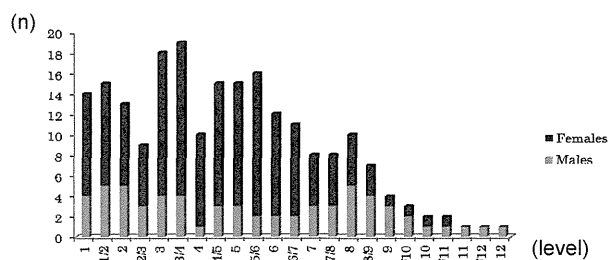


図 2. 胸椎後縦靭帯骨化症の罹患高位分布

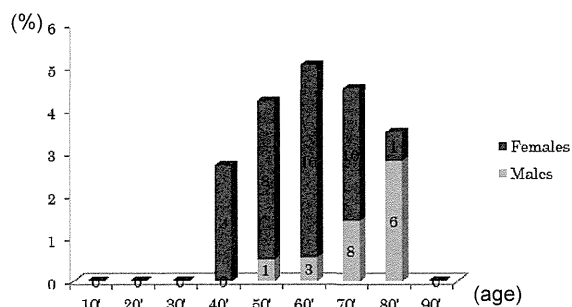


図 3. 胸椎後縦靭帯骨化症の年代別発生頻度

胸椎 OPLL の年代別発生頻度をみると、60 歳台がそのピークであり、本調査では 40 歳以下の症例は確認できなかった (図 3)。

男性胸椎 OPLL を認めたものは、認めないものに比べ有意に高齢であった。また、胸椎 OPLL を認めたものの BMI は有意に高値であった (表 1)。

胸椎に OPLL を認めた男性の 67%、女性の 61%には胸椎黄色靭帯骨化症 (以下 OLF) の合併を認めた。

### D. 考察

我々の渉猟しえた限りでは、CT による胸椎 OPLL の有病率を明らかにしたのは本研究が初めてである。胸椎 OPLL に関する疫学調査は、頸椎 OPLL のそれと比べ明らかに少ない。これまでの胸椎 OPLL の有病率は、胸髄症患者や頸椎 OPLL 患者、整形外科外来受診者を対象として算出されたものが多く、頸椎 OPLL の約 15%程度と報告されてきた。



我々の渉猟し得た限りでは、一般人口を対象とした調査は2編のみである。Onoらは、広島および長崎の原爆被爆者を対象とした8610例の胸部Xp側面の読影により、胸椎OPLLの有病率は、男性は0.25%、女性は0.74%（全体では0.56%）と報告している。Ohtsukaらは、1058名の健常人胸椎側面Xpでの調査を行い、胸椎OPLLの有病率は男性0.9%、女性0.6%（全体では0.8%）と報告している。これらを踏まえ、Ohtsukaらは胸椎OPLLの有病率は1%以下であり、頸椎OPLLのその約3分の1であると結論付けた（表3）。

表3. 既報の胸椎後縦靭帯骨化症の有病率

Authors/reported year	Country	Sample size	Target	Mean age (range) (years)	Modality	Prevalence (%)
Ono et al./1982	Japan	8610	GP	NA (30<)	Lateral chest radiographs	Males: 0.25, Females: 0.74, total: 0.56
Ohtsuka et al./1996	Japan	1058	GP	62.8 (50-80<)	Lateral thoracic spine radiographs	Males: 0.9, Females: 0.6
Mori et al./ (present study)	Japan	3013	P	65 (16-97)	Chest CT*	Males: 1.0, Females: 3.0, total: 1.9

本調査での胸椎OPLLの有病率は約2%であり、従来の報告の約2倍であった。これは、既報の胸椎OPLLの有病率はXpを用い、本調査ではCTを用いたものであり、CTの高い骨病変描出能力がもたらした結果と考えられる。

これまでは、胸椎OPLLの好発部位はT6とされてきたが、本調査ではそれよりも頭側のT3/4にピークを認めた。これは、既報のXpを用いた評価では上位胸椎は肩などに隠れてしまうため、正しくOPLLの有無が評価できなかったからではないかと考えられる。これらは、CTの持つ解剖学的な部位を問わず発揮される高い骨病変描出能のもたらした結果と言え、CTは胸椎靭帯骨化症の評価に最適なモダリティーであると言える。これまでに関連が示唆されてきたように、

胸椎OPLLを認めるものは有意に高いBMIを有していた。高BMIが胸椎OPLL発生に与える影響などの調査が必要である。

本調査の手法は被験者に新たな被爆を課すことなく調査が可能である利点がある。さらに、整形外科ではなく、他科受診者を対象とすることで、被験者選択のバイアスを軽減できたと考えている。一方で、本研究の限界としては、対象が呼吸器疾患またはその疑い患者であり、一般人口を対象としたものではないことに加え、胸部疾患と胸椎靭帯骨化症との関連が不明であること、胸椎OPLLの骨化形態などと臨床症状との関連についての調査ができなかったこと、CT独自の胸椎OPLLの分類が策定できなかったこと、重度の麻痺をきたすような大きな胸椎OPLL患者は過小評価された可能性があることなどが挙げられる。

これらを今後の研究課題としたい。

## E. 結論

胸部疾患、またはその疑い患者を対象としたCTにより算出された胸椎OPLLの有病率は、男性1.0%、女性3.0%、全体では1.9%であった。その好発レベルはT3/4であり、上位から中位胸椎に多く認められ、下位胸椎にはほとんど認められなかった。胸椎OPLLの6割強に胸椎OLFを合併していた。

## 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

- Mori K, Imai S, Kasahara T, Nishizawa K, Mimura T, Matsusue Y. Prevalence, distribution and morphology of thoracic

ossification of the posterior longitudinal ligament in Japanese: results of CT-based cross-sectional study. *Spine* (in press)

- Mori K, Kasahara T, Mimura T, Nishizawa K, Murakami Y, Matsusue Y, Imai S. Prevalence, distribution and morphology of thoracic ossification of the yellow ligament in Japanese: results of CT-based cross-sectional study. *Spine* 2013; 38(19): E1216-1222.
- Karasugi T, Nakajima M, Ikari K; Genetic Study Group of Investigation Committee on Ossification of the Spinal Ligaments, Tsuji T, Matsumoto M, Chiba K, Uchida K, Kawaguchi Y, Mizuta H, Ogata N, Iwasaki M, Maeda S, Numasawa T, Abumi K, Kato T, Ozawa H, Taguchi T, Kaito T, Neo M, Yamazaki M, Tadokoro N, Yoshida M, Nakahara S, Endo K, Imagama S, Demura S, Sato K, Seichi A, Ichimura S, Watanabe M, Watanabe K, Nakamura Y, Mori K, Baba H, Toyama Y, Ikegawa S. A genome-wide sib-pair linkage analysis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Metab* 2013; 31(2): 136-43.

## 2. 学会発表

- 森 幹士. 後縦靭帯骨化症・黄色靭帯骨化症 滋賀県難病相談・支援センター医療講演会 草津市 2013, 2, 14

- 森 幹士. 胸部CT受験者から見た胸椎黄色靭帯骨化症の疫学 第39回 脊椎外科を学ぶ会 話題提供 大阪市 2013, 3, 16
- Kanji Mori, Shinji Imai, Kazuya Nishizawa, Junichi Nishikawa, Yoshitaka Matsusue. Prevalence, distribution and morphology of ossification of the yellow ligament and posterior longitudinal ligament of thoracic spine in Japanese. English Poster Session 第42回日本脊椎脊髄病学会 那覇市 2013, 4, 25-27.
- 森 幹士、笠原俊幸、西澤和也、西川淳一、今井晋二、松末吉隆. 当院胸部CT受験者からみた胸椎黄色靭帯骨化症の有病率. 第86回日本整形外科学会総会 広島市 2013, 5, 23-25.
- 森 幹士. 胸椎 OPLL はどれくらい、どこにあるのか? 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業【脊柱靭帯骨化症に関する調査研究】平成25年度第2回班会議 東京 2013, 11, 30.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得  
該当するものなし。
2. 実用新案登録  
該当するものなし。
3. その他  
該当するものなし。

## VI. 基礎研究

## 脊柱靱帯骨化における間葉系幹細胞の役割の解明

研究分担者 石橋 恭之 弘前大学大学院医学研究科整形外科学講座教授

研究要旨：間葉系幹細胞は骨・脂肪・軟骨や靱帯に分化する組織幹細胞で、ヒトの様々な組織から同定されている。近年脊柱靱帯から間葉系幹細胞が分離・同定され、靱帯の骨化・肥厚への関与が注目されている。我々は間葉系幹細胞が靱帯の骨化に関与しているとの仮説を基に、脊柱靱帯由来間葉系幹細胞の特性および骨化靱帯における局在を検討した。その結果、骨化症患者由来間葉系幹細胞は高い骨分化能を有し、かつ骨化関連遺伝子の発現も有意に高値であった。また骨化前線と骨化部近傍の靱帯実質部に間葉系幹細胞マーカーが強く発現していることが明らかになった。

### A. 研究目的

ヒト脊柱靱帯に存在する間葉系幹細胞 mesenchymal stem cells (MSCs)の特性および骨化靱帯における局在を検討することで、靱帯骨化において幹細胞が果たす役割を解明し、脊柱靱帯骨化症の病因解明を行うこと。

### B. 研究方法

#### 1. 脊柱靱帯由来 MSCs の特性解析

##### ①細胞培養とMSCsの選別

脊柱靱帯骨化症患者8例(骨化症群)および非骨化症患者8例(対照群)から術中に黄色靱帯を採取し、過去の文献に従い<sup>1)</sup> コラゲナーゼで処理しMSCsを単離した。得られた細胞からFluorescence-activated cell sorterを用いて、MSCsに特徴的な細胞表面マーカーであるCD34陰性、CD105陽性を満たす細胞を選別し実験に用いた。

②骨・脂肪・軟骨分化能および各分化関連遺伝子発現の検討

骨・脂肪・軟骨誘導培地で培養し、それぞれへの分化能を骨化症群と対照群で比較・検討した。骨・脂肪誘導培養後、組織特異的染色であるAlizarin Red S染色(骨組織)、Oil Red O染色(脂肪組織)を行い、それぞれの吸光度を計測することで定量的に評価を行った。骨分化能に関しては培養中のALP活性を評価した。軟骨誘導はペレット培養にて行い、軟骨ペレットの重量と最大径を計測した。ペレット切片のAlcian Blue染色を行い、染色される軟骨基質面積の割合を定量的に評価した。また各誘導中の骨・脂肪・軟骨関連遺伝子発現を検討した。

#### 2. 免疫組織染色による骨化靱帯におけるMSCsの局在

脊柱靱帯骨化症患者の骨化した胸椎黄色靱帯組織(骨化症群)と非脊柱靱帯骨化症患者の胸椎黄色靱帯組織(対照群)を使用した。二重蛍光染色法を用いて免疫組織学的検討を行った。一次抗体は、MSCs表面マーカー

(CD73、CD90およびCD105)、血管内皮細胞表面マーカー (CD31) と血管周皮細胞表面マーカー ( $\alpha$ -SMA) を使用した。表面マーカーCD73/CD90、CD73/CD105、CD90/CD105、CD73/CD31、CD73/CD31、CD105/CD31、CD73/ $\alpha$ -SMA、CD73/ $\alpha$ -SMA、およびCD105/ $\alpha$ -SMAの組み合わせで染色した後、靭帯組織において血管領域 (特に内皮細胞層と周皮細胞領域)、および靭帯実質部、そして骨化靭帯組織の骨化前線領域でのMSCs表面マーカーの発現を蛍光顕微鏡にて検討した。また、MSCsの遊走に関するSDF-1、CXCR4の発現を検討した。

(倫理面での配慮)

本研究は弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得ている。被検者に対する十分なインフォームドコンセントを経て、書面による同意を得た。

## C. 研究結果

### 1. 脊柱靭帯由来 MSCs の特性解析

骨分化誘導において、骨化症群では対照群と比較し石灰化を認めるコロニーを多数認めた。Alizarin Red S 染色の吸光度を計測すると、対照群  $1.89 \pm 0.93$ 、骨化症群  $13.1 \pm 3.95$  で骨化症群は有意に骨分化能が高かった。ALP 活性は誘導開始時には両群間に差を認めないが、誘導後 7 日、14 日では骨化症群で有意に高値であった。脂肪分化誘導では、Oil Red O 染色で両群とも脂肪滴の形成を認め、その吸光度は対照群  $0.30 \pm 0.06$ 、骨化症群  $0.27 \pm 0.07$  で有意差を認めなかった。軟骨分化誘導ではペレットの重量は対照群

$0.49 \pm 0.09$ mg、骨化症群  $0.43 \pm 0.05$ mg、最大径は対照群  $0.97 \pm 0.07$ mm、骨化症群  $0.99 \pm 0.06$ mm であり、いずれも有意差を認めなかった。Alcian Blue 染色で染色される面積の割合は、対照群  $42.7 \pm 3.7\%$ 、骨化症群  $38.6 \pm 6.2\%$  で有意差を認めなかった。骨・脂肪・軟骨分化関連遺伝子発現は、骨分化関連遺伝子である BMP2、Runx2、ALP が骨化症群で高値であった。脂肪分化関連遺伝子である PPAR $\gamma$ 2 と LPL、軟骨分化関連遺伝子である Sox9、COL2A1、COL10A1 の発現には有意差を認めなかった。

### 2. 脊柱靭帯における MSCs の局在

二重免疫蛍光染色法による MSCs 表面マーカー発現の検討では、靭帯組織内部の血管および靭帯組織を囲む血管の周囲に MSCs 表面マーカーCD73/CD90、CD73/CD105 および CD90/CD105 の全ての発現を認めた。さらに、血管組織内では、血管内皮細胞表面マーカーCD31 陽性の細胞では MSCs 表面マーカーの発現を認めなかった。一方、血管周皮細胞領域では血管周皮細胞表面マーカー  $\alpha$ -SMA 陽性の細胞は MSCs 表面マーカーの発現を認めた。また、靭帯実質部でも全ての MSCs 表面マーカーが発現した線維芽細胞様細胞が観察された。MSCs 表面マーカー陽性細胞の出現率は、非骨化黄色靭帯より骨化黄色靭帯で有意に高かった。多数の軟骨細胞が存在する骨化前線の周辺でも同様に、全ての MSCs 表面マーカーを発現する軟骨芽細胞様細胞が観察された。MSCs の遊走に関する SDF-1、CXCR4 が、骨化黄色靭帯では非骨化靭帯と比較し強く発現していた。

## D. 考察

脊柱靱帯骨化症の病因として遺伝子、内分泌、環境因子などが報告されているが、いまだ解明されていない点が多い<sup>2)</sup>。また異所性骨化の起源となる細胞は不明であった。間葉系幹細胞は生体内で組織修復に関与するとされる一方、進行性骨化性線維異形成症<sup>3)</sup>、熱傷後の異所性骨化<sup>4)</sup>、大動脈弁石灰化<sup>5)</sup>といった異所性骨化への関与が報告されている。脊椎疾患との関連として、黄色靱帯に存在する MSCs が黄色靱帯肥厚症の病因に関係している可能性が報告されている<sup>6)</sup>。

今回の我々の結果から、MSCs は非骨化黄色靱帯より骨化黄色靱帯の血管周皮細胞において多く認められた。さらに、骨化靱帯組織では MSCs は血管周皮領域だけでなく、靱帯実質部および骨化前線周辺でも多数認められたこと、MSCs 遊走関連因子の発現が高値であったことから、血管組織から MSCs が遊走し骨化に関与した可能性もある。また、MSCs の特性解析では、骨化症群で骨分化能、ALP 活性、骨過関連遺伝子発現が高値であったことから、MSCs の特性の違いが脊柱靱帯骨化の病態に関与している可能性がある。

今後は脊柱靱帯骨化症の病態における MSCs の役割をより詳細に解明するため、動物モデルで生体内での MSCs の動態を検討する。さらに、MSCs の特性の違いをもたらす因子および遊走、骨分化のメカニズムを解析することで、新たな検査・治療法の開発につながることを期待される。

## E. 結論

骨化脊柱靱帯での MSCs の局在は血管周

皮細胞領域、靱帯実質部、骨化前線領域であった。非骨化靱帯と比較し MSCs マーカーの強い発現を認めた。また脊柱靱帯骨化症患者では MSCs がより高い骨分化能を有していた。今後、脊柱靱帯における MSCs の詳細な働きを解析することにより、脊柱靱帯骨化の病態解明につながると考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Chin S, Furukawa KI, Ono A et al.; Immunohistochemical localization of mesenchymal stem cells in ossified human spinal ligaments. *Biochem Biophys Res Commun.* 436 (2013) 698-704.
- 2) 小野睦, 浅利享, 陳俊輔 他.; 脊柱靱帯骨化における間葉系幹細胞の役割. *脊椎脊髄ジャーナル.* 26(3) (2013) 163-168

### 2. 学会発表

- 1) 陳俊輔 他.; 脊柱靱帯骨化症における間葉系幹細胞の局在および制御因子発現の免疫組織化学的検討. 日整会基礎, 2013
- 2) 原田義史 他.; 頰椎後縦靱帯骨化症患者由来間葉系幹細胞の骨分化能に関連する因子の検討. 日整会基礎, 2013

## G. 文献

- 1) Asari T et al.; *Biochem Biophys Res Commun.* 2012
- 2) Furukawa KI.; *Pharmacol Ther.* 2008
- 3) Medici D et al.; *Nat Med* 2010
- 4) Nelson ER et al.; *J Burn Care Res* 2012
- 5) Chen JH et al.; *Am J Pathol* 2009
- 6) Chen YT et al.; *Spine.* 2011

後縦靭帯骨化症の疾患特異的タンパク質による創薬研究

研究分担者 永田 見生 久留米大学学長

研究要旨 後縦靭帯骨化症の創薬を目的とし、プロテオミクス研究を行ってきた。血清中には、健常者と比較し有意に減少しているタンパク質があり、そのノックアウトマウスを作製した結果、後縦靭帯骨化症の発症と強い類似性が明確となり、このタンパク質の立体構造から幹細胞を靭帯組織に誘導するタンパク質をドッキングすることで、靭帯骨化をブロックし、靭帯組織を再建する製剤を開発する。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症の治療製剤を開発するために、組織と血清のプロテオミクスを実施し、疾患特異的タンパク質の遺伝子改変マウスを作製し、後縦靭帯骨化症の病理学的な相関性を調べ、創薬のターゲットとなるタンパク質を発見することを目的とする。

B. 研究方法

後縦靭帯骨化症患者の血清は、LC-MS-MSを用いて、健常者血清を比較し、約3万個のピークを検証し、統計学的に有意なピークをHPLCによる精製後、アミノ酸配列の決定、同定、立体構造解析を行った。靭帯骨化組織は、可視化後、高感度の二次元電気泳動法により、全スポットの解析を行い、健常者の靭帯組織、骨組織との統計学的検証後、LC-MS-MSにてタンパク質の同定を行い、立体構造を解析した。

（倫理面での配慮）

久留米大学倫理委員会の承認を得、患者への説明、同意を得られた患者の血液採血、組織摘出（福井大学、弘前大学）後、タンパク質の変性を留め、医薬品の承認審査を考え、FDAバリデーションの機器を整備し、個人識別情報管理システムを使用した。

C. 研究結果

血清プロテオミクスからは、健常者と比較し、有意に減少、欠損しているタンパク質があった。後縦靭帯骨化症の分類別による検証を行った結果、連続型が分裂型よりタンパク質が低値を示していた。このタンパク質を抑制したノックアウトマウスを作製した。このマウスの特徴は、誕生から3週齢以降、徐々に体重が増加し、3D-CTより体脂肪、皮下脂肪、内臓脂肪の面積と体積が高値を示した。30週齢以降、頸椎靭帯骨化、腰椎靭帯骨化を確認し、歩行障害、運動機能障害が明確となり、血糖値、尿糖値の高値を確認し、糖尿病性の網膜症の併発も確認された（論文投稿中）。

組織からは後縦靭帯骨化症、健常者靭帯組織に共通した靭帯特異的なタンパク質を抽出し、幹細胞に導入した結果、靭帯組織に分科し、2013年 Stem Cells Development に発表した。

D. 考察

血清中から後縦靭帯骨化症に有意に減少、欠損しているタンパク質の立体構造解析において、中央部に分子エネルギーの安

定したホールが確認された。我々は、そこに組織のプロテオミクスから同定した靭帯のタンパク質をドッキングさせることを実施し、JRA（日本中央競馬会）との共同研究を行い、競走馬の屈腱炎に注射製剤を提供し、腱の治療を行い、走行時間を発症前のタイムに戻し、運動機能を回復させることを実施している。

#### E. 結論

我々は、後縦靭帯骨化症の薬効として、靭帯骨化を予防し、且つ、靭帯組織を再建する製剤を開発する。非臨床研究にて、競走馬の屈腱炎を治療しながら、競走馬の遺伝的な明確性とドーピングという厳格な体制のなかに有り、走行時間という運動機能が明確な動物を使い、安全性評価試験を実施している。患者個別化幹細胞から *in vitro* での靭帯組織に薬物の化合物を試験することで、臨床試験へのリスクを削減し、製薬企業への橋渡しを確実なものとする。

#### 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. Proline/Arginine-Rich End Leucine-Rich Repeat Protein Converts Stem Cells to Ligament Tissue and Zn(II) Influences Its Nuclear Expression. Michiyo Tsuru, Takashi Soejima, Naoto Shiba, Kimiko Kimura, Kimiaki Sato, Yoshiaki Toyama, and Kensei Nagata. *Stem Cells and Development*, 22, 14, 2013.
2. A genome-wide sib-pair linkage analysis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Karasugi T, Nakajima M, Ikari K, Tsuji T, Matsumoto M, Chiba M, Uchida K, Kawaguchi Y,

Mizuta H, Ogata N, Iwasaki M, Maeda S, Numasawa T, Abumi K, Kato T, Ozawa H, Taguchi T, Kaito T, Neo M, Yamazaki M, Tadokoro N, Yoshida M, Nakahara S, Endo K, Imagama S, Demura S, Sato K, Seichi A, Ichimura S, Watanabe M, Watanabe K, Nakamura Y, Mori K, Baba H, Toyama Y, Ikegawa S. *J Bone Miner Metab*, 31, 136-143, 2013.

3. Phase II study of personalized peptide vaccination for refractory bone and soft tissue sarcoma patients. Takahashi R, Ishibashi Y, Hiraoka K, Matsueda S, Kawano K, Kawahara A, Kage M, Oshima K, Yamanaka R, Shichijyo S, Shirouzu K, Itoh K, Sasada T. *Cancer Sci*, 10, 1111, 2013.
4. Regeneration of ring-shaped lateral meniscus after partial resection of discoid meniscus with anterior cruciate ligament reconstruction. Soejima T, Kanazawa T, Tabuchi K, Noguchi K, Inoue T, Murakami H. *International Journal of Surgery Case Reports*, 4(12), 1093-1096, 2013.
5. Hypersensitivity to Suture Anchors. Goto M, Mitsui Y, Tanesue R, Okawa T, Higuchi F, Shiba N. *Case Reports in Orthopedics*, 932167, 2013.
6. The modified massive cuff stitch: functional and structural outcome in massive cuff tears. Gotoh M, Mitsui Y, Yoshimitsu K, Nakama K, Okawa T, Higuchi F, Nagata K. *J Orthop Surg Res*, 8, 26, 2013.
7. Increased matrix metalloproteinase-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*, 21, 1807-1812, 2013.
8. Usefulness of multi-channels in intraoperative spinal cord monitoring: multi-center study by the monitoring committee of the Japanese Society for Spine Surgery and related research. Ito Z,



- Matsuyama Y, Shinomiya K, Ando M, Kawabata S, Kanchiku T, Saito T, Takahashi M, Taniguchi S, Yamamoto N, Yamada K, Kida K, Fujiwara Y, Kobayashi S, Satomi K, Tani T. Eur Spine J, 22, 1891-1896, 2013.
9. Cycling exercise to resist electrically stimulated antagonist increases oxygen uptake in males: Pilot study. Matsuse H, Shiba N, Takano Y, Yamada S, Ohshima H, Tagawa Y. J Rehabil Res Dev, 50(4), 545-554, 2013.
  10. Rapid collapse of the humeral head after arthroscopic rotator cuff repair. Goto M, Gotoh M, Mitsui Y, Okawa T, Higuchi F, Nagata K. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, Dec 4, 2013.
  11. Ganglion cyst in the supraspinous fossa: Arthroscopically undetectable cases. Shimokobe H, Gotoh M, Mitsui Y, Yoshikawa E, Kume S, Okawa T, Higuchi F, Nagata K, Shiba N. The Kurume Medical Journal, 60(1), 21-24, 2013.
2. 学会発表
1. 腰椎変性側彎症の治療成績. 脇岡徹, 佐藤公昭, 山田圭, 永田見生, 志波直人, 福田啓治, 荻野美佐. The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine(1881-3526) 50 巻 5 号 Page376(2013.05).
  2. 破格筋により生じた腓骨筋腱障害の1例. 野口幸志, 副島崇, 金澤知之進, 田渕幸祐, 永田見生, 志波直人. 日本足の外科学会雑誌 34 巻 1 号 Page261-265(2013.05).
  3. 陸上選手に生じた巨大な腓骨筋腱滑車による腓骨筋腱障害の1例. 野口幸志, 副島崇, 金澤知之進, 田渕幸祐, 永田見生. JOSKAS(1884-8842) 38 巻 2 号 Page370-371(2013.04).
4. 次世代走査型電子顕微鏡(FIB/SEM tomography)を用いた、ラット棘上筋腱正常付着部/腱板縫合後腱骨間の三次元超微形態構造解析. 金澤知之進, 後藤昌史, 太田啓介, 中村桂一郎, 志波直人, 永田見生. 日本整形外科学会雑誌(0021-5325) 87 巻 8 号 PageS1496(2013.08).
  5. ラット棘上筋腱損傷モデルにおけるコルチコステロイドの影響 腱骨間治癒について. 金澤知之進, 後藤昌史, 中村秀裕, 柴田英哲, 中村桂一郎, 志波直人, 永田見生. 日本整形外科学会雑誌(0021-5325) 87 巻 8 号 PageS1494(2013.08).
  6. 化膿性脊椎炎に対するリネゾリドとダプトマイシンの治療効果の比較検討. 山田圭, 佐藤公昭, 吉松弘喜, 猿渡敦子, 佐々木威治, 井手洋平, 永田見生, 志波直人. 日本骨・関節感染症学会プログラム・抄録集 36 回 Page65(2013.07).
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)
1. 特許取得  
平行線維性結合組織の製造方法 国際出願番号: PCT/JP2013/56867: 津留美智代、永田見生、出願人: 津留美智代、永田見生: 出願日: 2013/3/12
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他

慢性圧迫脊髄における疼痛発現に関する基礎的研究

—*twy* chimeric mouse を用いて—

竹浦直人 内田研造 中嶋秀明

渡邊修司 吉田 藍 馬場久敏

研究分担者 内田研造 福井大学整形外科准教授

研究要旨： 慢性圧迫脊髄モデルである *twy/twy* マウスにおける blood-spinal cord barrier を介した骨髄由来 macrophage の動態および慢性疼痛が生じる機序について検討した。CAG-EGFP マウス骨髄細胞（単核球）を *twy/twy* マウスに移植し、GFP/*twy* キメラマウスを作成し、blood-spinal cord barrier の透過性変化を評価した。圧迫が中等度（脊柱管残余面積 70%）以下になると血液脊髄関門の透過性が亢進した。圧迫程度に応じて、骨髄由来 macrophage と考えられる CD11b 陽性細胞の、MAPK ファミリー（p38, Erk1/2）陽性細胞の脊髄後角での発現割合が増加した。中等度脊髄圧迫以降において、blood-spinal cord barrier の透過性亢進が疼痛発現の機序に関与していると考えられた。

A. 研究目的

頸椎後縦靭帯骨化症や頸椎症性脊髄症といった慢性圧迫脊髄では、疼痛や痺れの治療に難渋する症例が少なくない。慢性疼痛外来患者の 4 割、後縦靭帯骨化症患者の約 6 割に神経障害性疼痛の訴えがあり、諸家の報告でも圧迫性頸髄症患者の治療は難渋することが報告されている。

しかし、慢性圧迫脊髄における慢性疼痛や痺れが生じる病態メカニズムについてはまだ明らかではない。

脊髄損傷における研究では、中枢神経における免疫担当細胞といわれている microglia が注目されており、microglia は様々な刺激で活性化し、macrophage のような貪食作用や、サイトカイン放出より、

損傷脊髄の微小環境に影響をおよぼすと報告されている。さらに、神経障害性疼痛の原因細胞としても注目されている。

また、脊髄損傷モデルでは、blood-spinal cord barrier の破綻が報告されているが、慢性圧迫モデルにおいては詳細な研究報告は少ない。本研究では、慢性圧迫脊髄における blood-spinal cord barrier の透過性変化を評価するために、CAG-EGFP マウス骨髄細胞（単核球）を移植したキメラマウスを作製し、脊髄における blood-spinal cord barrier の透過性変化と microglia/macrophage の動態について検討することを目的とした。

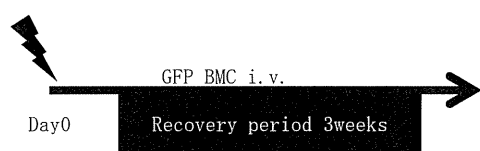
B. 研究方法

後環軸膜に経時的に石灰沈着が生じる脊

髓慢性圧迫モデル (*twy/twy*) を用いた。

CT で脊髄残余面積を評価した ICR マウス 12 週齢 (コントロール群)、*twy* マウス 12 週 (軽度圧迫群)、18 週 (中等度圧迫群) および 24 週齢 (高度圧迫群) の脊髄圧迫部位・脊髄後角について評価した。脊髄凍結薄切標本を用いて免疫染色を行い、Western blot 法や cell count により定量化を行った。

脊髄損傷と同様に慢性圧迫脊髄においても blood-spinal cord barrier の透過性が変化し、疼痛・痺れの持続に関与しているのではないかと予想した。CAG-EGFP マウスの大腿骨および脛骨から骨髓を採取し、GFP 陽性の骨髓由来単核球細胞を精製した。9Gy で radiation 処理 2・3 日後の *twy/twy* マウスに、精製した骨髓細胞を尾静注し、chimeric mouse を作成し、脊髄由来の microglia と血液由来の macrophage との区別ができるようにした。種々の論文を参考に、図のようなプロトコールで作成した。



- ① 9 週、15 週のマウスに 9Gy を照射
- ② 24 時間後に GFP 陽性細胞を尾静注
- ③ 3 週後に脊髄を取り出し観察する

評価項目として、(1) 圧迫脊髄後角の GFP 陽性細胞の発現変化を評価し、(2) microglia/macrophage のマーカーである CD11b 陽性細胞と関係性を評価し、(3) 疼痛発現に関与していると報告されている MAPK ファミリーである p38 および Erk1/2 陽性細胞との相関を評価した。

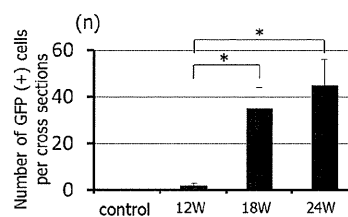
胞との相関を評価した。

(倫理面での配慮)

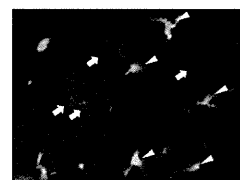
実験動物に対する処置などの際の取り扱い方法、除痛処置については、学内の委員会に了承済みである。

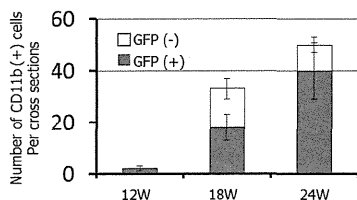
### C. 研究結果

(1) ICR マウスおよび 12 週齢の GFP/*twy* キメラマウスでは脊髄周囲に GFP 陽性細胞がみられるのみであり、脊髄内にはほとんど発現しなかった。18 週齢および 24 週齢の GFP/*twy* キメラマウス脊髄内には GFP 陽性細胞、つまり骨髓単核球由来と考えられる macrophage がみられ、慢性圧迫脊髄において、圧迫が高度になるに従い、blood-spinal cord barrier の透過性が亢進していることが示唆された。

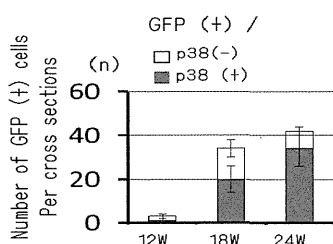


(2) GFP/*twy* キメラマウス 18 週齢および 24 週齢の脊髄後角において、GFP 陽性細胞 (骨髓単核球由来と考えられる macrophage) と merge する microglia/macrophage のマーカーである CD11b の発現を認め、その割合は圧迫が高度である方が高かった。





(3) 同様に MAPK である p38 陽性細胞および Erk1/2 陽性細胞の発現を認め、その割合は p38 優位に経時的に増加していた。



#### D. 考察

脊髄損傷後の慢性疼痛においては、早期の反応として **microglia** の関与が報告されており、慢性脊髄圧迫による神経障害性疼痛においても、**microglia** や **astrocyte** の活性が関与していると考えられる。先行研究では、慢性脊髄圧迫後角に疼痛に関連する神経ペプチド・タンパクである **substance P** や **c-fos**, **CGRP** の経時的な発現変化を確認しており、慢性疼痛の発現に関与するといわれている MAPK ファミリーである **p38** や **JNK**, **Erk1/2** の脊髄後角での経時的な発現変化を確認している。**p38** は主に **microglia/macrophage** のマーカーである **OX42 (CD11b)** 陽性細胞と **merge** し、**JNK** は **astrocyte** のマーカーである **GFAP** 陽性細胞と **merge** した。このことから、慢性脊髄圧迫脊髄に疼痛が生じる機序のひとつとして、**microglia/macrophage**, **astrocyte** が関与している可能性が考えられる。

また、慢性疼痛の研究では、**blood-brain**

**barrier** や **blood-spinal cord barrier** の透過性変化について多くの報告があり、脊髄損傷における **blood-spinal cord barrier** 透過性亢進についての報告も散見される。私たちの教室での先行研究でも脊髄損傷モデルマウスにおいて、損傷後の **blood-spinal cord barrier** の透過性亢進を確認している。

慢性脊髄圧迫性頸髄症における **blood-spinal cord barrier** の透過性が変化している可能性を示唆する報告もみられ、GFP 陽性骨髄（単核球）を移植した **chimeric mouse** を用いた本研究においても、慢性脊髄圧迫における、特に中等度圧迫以降で **blood-spinal cord barrier** の透過性が亢進している可能性が示唆された。

本研究においては、経時的な変化として、GFP 陽性細胞と **merge** する **p38** 陽性細胞や **CD11b** 陽性細胞の割合が増加しており、慢性脊髄圧迫において慢性疼痛が持続する機序として、骨髄由来の **macrophage** の分化・誘導が関与している可能性が示唆されたが、結論に至るには未だ詳細な検討が必要と考えられる。

#### E. 結論

慢性脊髄圧迫において、中等度圧迫以降で **blood-spinal cord barrier** の透過性が亢進している可能性があり、慢性脊髄圧迫性頸髄症における慢性疼痛の機序として骨髄単核球由来のマクロファージが関与している可能性がある。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載