

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591645

研究課題名（和文） 脊椎終板の 3 次元微細構造解析：栄養管ナノスケール構造と椎間板生化学特性との関連

研究課題名（英文） Three dimensional microstructure of spinal endplate: relationship between nano-scale structure of nutrition canal and biochemical characteristics of intervertebral disc

研究代表者：井上 望（INOUE NOZOMU）

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：30193600

研究成果の概要（和文）：椎間板変性の重要な原因として終板を通じた椎間板への栄養供給の減少が考えられている。栄養管の狭窄が椎間板変性のひとつの原因と考えられているが栄養管の 3 次元構造は定量的に解明されていない。本研究においては高解像能 CT 撮影装置を用い、正常家兎腰椎終板内の栄養管の 3 次元微細構造を定量的に解析することを目的とした。本研究では、終板に対して垂直に骨髄と椎間板を連結する栄養管に加え、これらを水平方向に連結する栄養管の存在を明らかにした。水平方向連結栄養管は終板内での流体移動に寄与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Decreased lumbar intervertebral disc (IVD) nutrition is a possible cause for IVD degeneration. Narrowing of the nutrition canal possibly leads to IVD degeneration; however, 3D nutrition canal microstructure has not been analyzed in a quantitative manner. This study aimed to characterize the normal 3D microstructure of nutrition canal of the rabbit lumbar vertebral endplate using a high-resolution micro-CT technique. The present study demonstrated a nutrition canal 3D network which consisted of vertical and horizontal canals. This study showed existence of horizontal canals interconnecting the vertical canals. Although the horizontal canal's role is yet to be analyzed, the horizontal canals appear to contribute fluid flows within the endplate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊椎脊髄病学、解剖学、整形外科学、生物・生体工学

## 1. 研究開始当初の背景

腰痛の主要な原因として脊椎椎間板の変性が重要であることが臨床的に認められているが、腰椎椎間板変性の詳細な病因と病態はいまだに十分解明されていない。椎間板変性

の重要な原因として、終板を通じた椎間板への栄養供給の減少が考えられている。走査電子顕微鏡による観察により終板の石灰化に伴う栄養管の狭窄がひとつの原因と考えられているが 3 次元的には解明されていない。

マイクロCTを用いたsand ratの3次元的な栄養管の観察が行われたが定性的な観察に終わっている。研究者代表者らは、ヒト腰椎終板栄養管の3次元微細構造モデルを作成し、終板の骨髄側と椎間板側の栄養管の貫通の3次元可視化に成功した。さらに、研究者代表者が開発した管状構造3次元解析アルゴリズムを用いて栄養管の3次元モデルによる栄養管の3次元定量的解析に成功した。一方、研究者代表者らは家兎椎間板のorgan cultureにおける実験において、終板の骨髄側を骨セメントで封入し終板を通じた椎間板への栄養経路を遮断すると、椎間板のプロテオグリカン量および水分含有量の低下、動的粘弾性の低下が起こることを示した。この知見は終板を通じた椎間板への栄養経路の椎間板の生化学的・力学的特性に与える重要性を示している。しかし、家兎終板の微細構造に関する詳細な情報は無かった。

## 2. 研究の目的

本研究においては、近年開発されたナノスケールCT撮影装置を用い、正常家兎腰椎終板内の栄養管の3次元微細構造を研究代表者が独自に開発した解析法を用いて定量的に解析することを目的とした。またこの解析により、正常家兎腰椎終板内栄養管構造の椎間板レベルによる差、終板内の領域による差を明らかにし、ベースライン情報を提供することを目的とした。

## 3. 研究の方法

家兎腰椎より計50の終板を摘出した。終板より円柱形(直径6 mm)に終板の中心部から椎体/椎間板/椎体を各々含むように得た。マイクロCTスキャナ(SMX-160CTS,島津製作所)を用いた高分解能家兎腰椎終板マイクロCT撮影のための家兎腰椎終板試験片用撮像治具を作成した。この撮像治具は、中心部に33G(直径0.2mm)の試験片固定部兼中心キャリブレーション針を有し、外壁は0.5mmポリプロピレンチューブにより構成される。この撮像治具により、マイクロCTスキャナのX線管に試験片を最大限接近させることを可能にした(図1)。管電圧66 kV,画像形状サイズ512×512,解像度最大1.77 μmの条件下でCT撮影を行った。得られたCT画像を3次元構築ソフトウェア(Mimics, Materialise)を用いて終板の3次元モデルを構築した。終板モデルの空隙部分をセグメンテーションすることにより、栄養管の3次元モデルを構築した。栄養管は、分岐部において個々の栄養管に分離した。個々の栄養管の点群モデル(point-cloud)モデルを作成し、オリジナル解析ソフトウェアにより個々の栄養管の固有ベクトルを求

めた。栄養管の長軸方向に一致する固有ベクトルにより栄養管の3次元配向を定義した。終板モデルより終板表面の点群モデルを作成し、固有ベクトル解析により終板表面に局所座標を設定した。個々の栄養管の3次元配向は、終板の法線方向の主軸との角度で現した。主軸との角度45°を閾値にとり、個々の栄養管を終板表面に対して垂直方向・水平方向に分別した(図2)。個々の栄養管体積と平均直径を垂直方向・水平方向栄養管群の間で統計解析を行った。



図1. 左:マイクロCTスキャナ(SMX-160CTS, 島津製作所) 右:家兎腰椎終板試験片用撮像治具。

## 4. 研究成果

本研究では、家兎腰椎終板内では栄養管が3次元ネットワークを形成していることを始めて明らかにした。栄養管は椎体側から椎間板へ配管する際、終板中心部付近で集積することがわかった。これを基盤栄養管と定義し測定した定量的データに基づいて栄養管を椎体側栄養管・基盤栄養管・椎間板側栄養管に分類した(図3)。また基盤栄養管と接続している分岐栄養管の量を椎体側・椎間板側で比較した。試験片終板内栄養管の各腰椎における平均容積と平均直径は、共に第3腰椎で最小値 $1.82 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ 、 $67.2 \mu\text{m}$ を示した。また、腰椎上部から下部にかけて値が減少していく傾向が見られた。終板の平均容積は、第4腰椎で最小値 $17.2 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ を示し、栄養管容積と同様に腰椎上部で高い値が得られた。測定した容積から算出した終板多孔性は、第3腰椎で最小値8.35%を示し、同様に終板上部で高い値が得られた。分類した栄養管の平均直径および平均容積は、椎体側栄養管の平均直径;  $105.7 \mu\text{m}$ 、平均容積;  $6.9 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ 、椎間板側栄養管の平均直径;  $37.9 \mu\text{m}$ 、平均容積;  $3.3 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ 、基盤栄養管の平均直径;  $174.2 \mu\text{m}$ 、平均容積;  $3.8 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ であった。各栄養管が試験片内栄養管全体に対して占める割合は基盤栄養管が50%に近い値を占めた。椎体側栄養管・椎間板側栄養管の比較では、第1腰椎・第3腰椎・第4腰椎で有意な差が得られ椎間板側栄養管が高い割合を占めた( $p < 0.05$ )

)。

本研究では、家兎腰椎終板内においては椎体骨髄と椎間板を貫通する終板に垂直な栄養管以外に、これらの栄養管を横方向に連結する栄養管の存在が明らかにされた。これらの連結栄養管においては、椎間板直下に存在する比較的径の小さな連結栄養管と、終板中央部に存在する大口径の連結栄養管が別に存在することが分かった。これらの連結栄養管は終板内での流体移動の可能性を示唆しており、椎体骨髄と椎間板を貫通する終板に垂直な栄養管に局所的に閉塞が起きた場合にも栄養分を終板全体に拡散させる機能があると考えられる。本研究では、さらにヘキサブリックスを用いた骨髄側からの浸透による造影マイクロCT撮影により椎間板内プロテオグリカン分布の推定を行ったが、椎間板髄核部内で均等な濃度分布を認め、本実験でも終板内での流体移動の可能性が示唆された。

本研究で得られた知見は、従来考えられてきた骨髄から椎間板への直接的な栄養分移動の他に、連結栄養管構造に基づく終板多層構造により終板内での栄養分水平移動が生じる可能性を示唆した。この終板多層構造は、終板内の局所的な栄養管の閉塞が生じた場合に側副路として機能することが考えられるが、終板内に微小亀裂が生じた場合に栄養分の漏出の危険性も併せ持つ。このような観点から、本研究は椎間板変性の病因・病態解明、診断における終板栄養管微細構造の重要性を明らかにした。

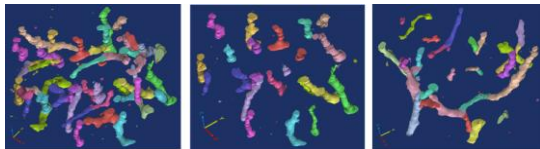


図2. 栄養管の3次元構造。左：個々にセグメンテーション(色別)された栄養管。中央：垂直方向栄養管。右：水平方向栄養管。

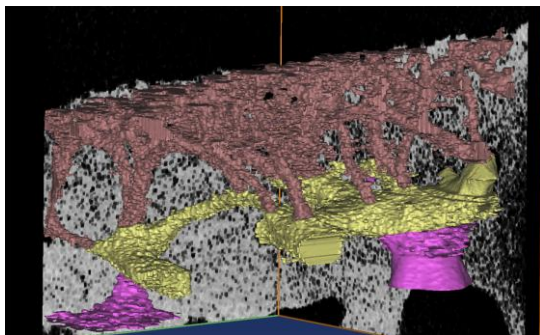


図3. 栄養管の多層構造。上部：椎間板側。下部：骨髄側。茶色栄養管：椎間板側栄養管。黄色栄養管：基盤栄養管。ピンク栄養管：骨髄側栄養管。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① S. Watanabe, N. Inoue, T. Yamaguchi, Y. Hirano, A.A. Espinoza Orias, S. Nishida, Y. Hirose, J. Mizuno. Three-dimensional kinematic analysis of the cervical spine after anterior cervical decompression and fusion at an adjacent level: a preliminary report. *Eur Spine J.*, 査読あり, 21(5) 2012. 946-55. DOI: 10.1007/s00586-011-2090-1
- ② N. Inoue, A.A. Espinoza Orias. Biomechanics of intervertebral disk degeneration. *Orthop Clin North Am.* 査読あり, 42(4):487-99, 2011. DOI: 10.1016/j.ocl.2011.07.001.

〔学会発表〕(計14件)

- ① A.P. Taborek, A.C. Chen, T. Yamaguchi, Q.T. Nguyen, N. Inoue, R.L. Sah, K. Masuda. Static and dynamic compressive characterization of lumbar intervertebral discs of the adult New Zealand white rabbit following in vivo degeneration or ex vivo annular puncture. 40th Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine- (ISSLS), 2013年5月14日, スコッツデール、米国。
- ② W.C. Bae, J. He, I. Shieh, T. Yamaguchi, N. Inoue, K. Masuda. Endplate roughness in human lumbar spines: variations with age, level and region. 40th Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine- (ISSLS), 2013年5月14日, スコッツデール、米国。
- ③ T. Yamaguchi, W.C. Bae, J. He, N. Inoue, A.R. Hargens, J. Lotz, R.L. Sah, H. Asahara, K. Masuda. 15 days microgravity condition induced disc height loss and bone morphological changes of the mouse lumbar spine. 40th Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine- (ISSLS), 2013年5月14日, スコッツデール、米国
- ④ N. Inoue, S. Goto, T. Yamaguchi, A.A. Espinoza Orias, W.C. Bae, K. Masuda. Microstructural analysis of nutrition canal in rabbit lumbar vertebral endplate. 2013 Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 2013年1月27日, サンアントニオ、米国。

- ⑤ T. Yamaguchi, W.C. Bae, J. He, N. Inoue, A. Hargens, J.C. Lotz, R.L. Sah, H. Asahara, K. Masuda. Microgravity during 15 days space flight induced disc height loss and bone morphological changes of the mouse lumbar spine. 2013 Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 2013年1月27日, サンアントニオ、米国.
- ⑥ T. Yamaguchi, A. Phadke, N. Inoue, R. L. Sah, H. Asahara, S. Varghese, K. Masuda. An osteoinductive synthetic graft as an instructive micro-environment for posterolateral fusion. 2013 Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 2013年1月27日, サンアントニオ、米国.
- ⑦ T. Yamaguchi, R. Pichika, T. Fujiwara, M. Lenz, J. He, I. Shieh, H. Asahara, N. Inoue, K. Masuda. Human degenerated nucleus pulposus tissues induce mechanical allodynia and molecular expression in the DRG: the disc xenograft-radiculopathy model. 2013 Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 2013年1月27日, サンアントニオ、米国.
- ⑧ W.C. Bae, J. He, I. Shieh, T. Yamaguchi, N. Inoue, K. Masuda. Endplate roughness in human lumbar spines: variations with age, level and region. 2013 Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 2013年1月27日, サンアントニオ、米国.
- ⑨ 井上望、脊椎のバイオメカニクス、第27回日本整形外科基礎学術集会（招待講演）、2012年10月27日、名古屋.
- ⑩ W. Bae, J. He, T. Yamaguchi, N. Inoue, K. Masuda. Comparison of regions of interest segmented from MRI and histology in a rabbit model of IVD disc degeneration. 2012 Annual Meeting, Orthopaedic Research Society. 2012年2月4日, サンフランシスコ、米国.
- ⑪ T. Yamaguchi, W. Bae, N. Inoue, R. Pichika, M.E. Lenz, G.M. Williams, T. Moseley, K. Masuda K. Quantitative assessment of posterolateral lumbar spinal fusion in the rat using a dynamic  $\mu$ CT technique. International Society for the Study of the Lumbar Spine (ISSLS) 38th Annual Meeting, 2011年6月16日, ヨーテボリ、スウェーデン.
- ⑫ W. Bae, L. Xu, N. Inoue, T. Yamaguchi, G. Bydder, K. Masuda. UTE MRI of lumbar spine endplate: Sensitivity to surface roughness. International Society for the Study of the Lumbar Spine (ISSLS) 38th Annual Meeting, 2011年6月16日, ヨーテボリ、スウェーデン.
- ⑬ S. Goto, T. Yamaguchi, A.A. Espinoza Orias, N. Koizumi, W.C. Bae, K. Masuda, N. Inoue. 3D Microstructure of nutrition canal network in rabbit lumbar vertebral endplate. American Society of Mechanical Engineering 2011 Applied Mechanics and Material Conference. 2011年6月1日. シカゴ、米国.
- ⑭ T. Yamaguchi, W.C. Bae, N. Inoue, D.E. Gregory, E. Cory, R.L. Sah, K. Masuda. Intervertebral disc height measurement: comparison of two-dimensional and three-dimensional methods. 2011 Annual Meeting, Orthopaedic Research Society. 2011年1月15日, ロングビーチ, 米国.

〔図書〕（計1件）

- ① 井上望、寺田国際事務所/先端医療技術研究所. 先端医療シリーズ 44「臨床医のための最新整形外科」. バイオメカニクスからみた椎間板の変性. 2013、4.（印刷中）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 望 (INOUE NOZOMU)  
同志社大学・生命医科学部・教授  
研究者番号：30193600

(2) 研究分担者

小泉 範子 (KOIZUMI NORIKO)  
同志社大学・生命医科学部・教授  
研究者番号：20373087