

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791388

研究課題名（和文） 新しい頸髄慢性圧迫モデルを用いた脊髄の可塑性の検討

研究課題名（英文） Spinal plasticity of new chronic cervical cord compression model in rat.

研究代表者

久保田 雅史（KUBOTA MASAHUMI）

福井大学・医学部附属病院・理学療法士

研究者番号：60422672

研究成果の概要（和文）：本研究では、脊髄慢性圧迫に伴う脊髄可塑性を解明するための新しい動物モデルを作成し、その運動及び感覚機能、MR像、脊髄の病理組織学的変化を検索した。我々が作成したモデルラットは慢性的に徐々に頸髄が圧迫され、運動機能障害や感覚障害が脊髄圧迫の開始から遅れて出現しており、ヒト頸髄慢性圧迫病態の特徴が再現できており、今後頸髄症の病態解明に有用なモデルであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we produced a new animal model of chronic cervical compression capable of reproducing the clinical course without laminectomy using rats. This model might reproduce characteristic features of clinical chronic cervical cord compression, including progressive motor and sensory disturbances after a latency and insidious neuronal loss; representing well the chronic compression of cervical spine cord in humans.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：脊髄慢性圧迫、行動学的評価、MR画像、前角細胞、ラット

1. 研究開始当初の背景

頸椎症性脊髄症や後縦靭骨化症などでみられる脊髄の慢性圧迫障害の大きな特徴の一つは脊髄損傷などの急性圧迫とは異なり、脊髄に可塑性がみられるという点である。MR像などの画像診断で脊髄圧迫を有する脊柱管狭窄が見られても無症候性であり、数年か

ら数十年という長い年月をかけて脊髄症状が発症することが多い。脊髄症状の発症には、脊髄への周囲組織による慢性的な機械的圧迫やその結果生じる脊髄内の血流障害が深く関与していると考えられているが、その発症機序は未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、ラットの成長に伴い非常に慢性的に脊髄を圧迫していく脊柱管狭窄モデルを作成し、運動及び感覚機能、MR 像、脊髄の病理組織学的変化を検索した。

3. 研究の方法

脊髄慢性圧迫モデルの作成には、生後 4 週齢の Sprague-Dawley ラット 27 匹を使用した。ネンブタール腹腔麻酔下に第 4 頸椎棘突起を切除後、神経根を損傷しないように椎体腹側にプラスチックプレート（1 mm × 2 mm × 0.5 mm）を設置し、頸椎全周に直径 0.330 mm のポリエチレン糸を締結した。コントロールラット（N=13）では締結後にプレート及びポリエチレン糸を取り除いた。両群ともに気温・湿度を一定にコントロールした部屋で一年間飼育した。モデルラットは成長の過程において、ポリエチレン糸が脊柱管の成長を妨げ徐々に脊髄を圧迫する（図 1）。

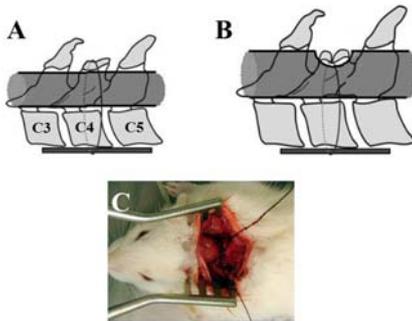


図1

モデル作成 3・6・9・12 カ月後に運動機能評価を Basso, Beattie and Bresnahan locomotor rating scale (BBB スケール) と最大トレッドミル速度で評価し、加えて von Frey filament を用いた感覚機能評価を行った。

また、モデル作成 3・6・12 カ月後に MR 像を撮影し、T₁強調画像から脊髄横断面積を計測、T₂強調画像から髄内輝度変化を客観的に評価するために signal-difference-to-noise ratios (SDNRs) を計算した。

病理組織学的検討では、作成 1 年後のコントロール群とモデル群を使用し、屠殺後一塊摘出した頸椎部を 4 %パラホルムアルデヒドにて固定後、Nissl 染色標本を作成、顕微鏡下に頸髄の変化を観察して、第 4 髄節の前角細胞数を計測した。

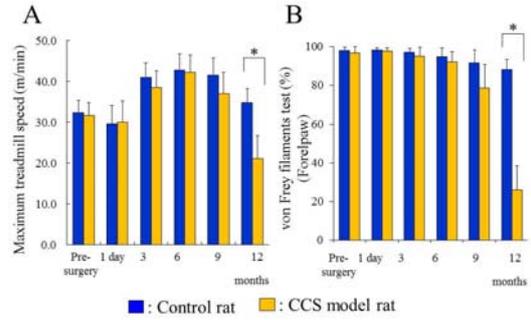


図2

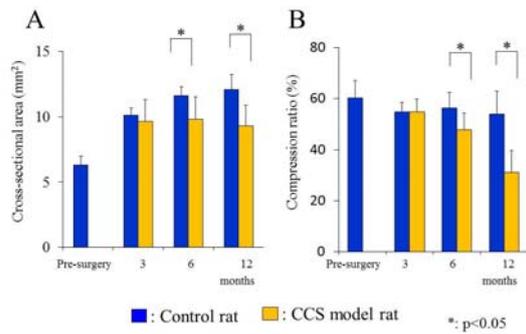


図3

4. 研究成果

(1) モデル作成一年後までの生存率は、コントロールラットとモデルラットでそれぞれ 76.9 % (10/13 匹) と 71.4 % (10/14 匹) であった。成長に伴った体重の変化は二群間で有意な差は認めなかった。

(2) BBB スケールは、モデル作成 9 カ月後までは二群間に有意差は認めなかったが、12 カ月後ではコントロールラット (平均 20.8 ± 0.4 点) に比しモデルラット (17.3 ± 1.6 点) では有意に低下した。

トレッドミル最大速度は 6 カ月後までは二群間で差はなかったが、モデルラットは 9 カ月以降に低下傾向を示し、12 カ月後では有意に低下していた (コントロールラット: 33.3 ± 3.5 m/min、モデルラット: 21.7 ± 4.5 m/min)。感覚検査ではモデル作成 9 カ月後までは二群間に有意な差を認めなかったが、12 カ月後にはモデルラットに感覚鈍麻が発生した (前肢: 26.0 ± 12.6 %、後肢: 21.0 ± 23.8 %)。(図 2)

(3) MR 像ではモデル作成 6 カ月後から脊柱管狭窄に伴う脊髄の扁平化が認められ、脊髄横断面積はモデルラット (9.8 ± 1.7 mm²) がコントロールラット (11.6 ± 0.7 mm²) に比し有意に低下していた。1 年後には、より脊髄圧迫が増強し、脊髄横断面積はコントロールラ

ットの74%にまで低下していた(図3)。T2強調像における髄内輝度変化はモデルラットで作成1年後に70.0%(7/10匹)で認められ、SDNRsはコントロールラットに比して有意に高値を示した。

(4)モデル作成1年後の頸髄の病理組織像ではコントロールと比較してモデルラットではくも膜下腔が狭小化し、明らかに脊髄が周囲組織により全周性に圧迫され扁平化していた。強拡大像では白質で軸索の脱髄や空胞化が顕著にみられ、灰白質の前角は明らかに扁平化し、前角細胞数もコントロールラットに比べて67.1%に減少していた。

最適な頸髄慢性圧迫モデルの条件は、脊髄圧迫開始から症状出現までに潜在的に脊柱管狭窄が進行する期間を有し脊髄の可塑性がみられること、そして発症後は脊髄症状が漸進的に進行していくことである。これまで慢性脊髄圧迫の病態解明には、脊柱管内への腫瘍細胞や特殊樹脂の注入、スクリューによる漸増的な脊髄の圧迫が用いられてきたが、これらのモデルでは圧迫期間が短く脊柱管内への侵襲があることが欠点とされてきた。また、遺伝性骨軟骨異常を有し自然に脊柱管狭窄を生ずるtwy-mouseも慢性脊髄圧迫モデルとして用いられてきたが、上位頸椎で脊髄圧迫を発症する特徴を有し、また全身の骨化がみられるため行動学的評価が困難であった。我々が作成したモデルは、成長に伴い長期間かけて圧迫が進行すること、脊柱管内への侵襲がないこと、そして症状発現前に脊髄圧迫が出現していたことをMR像で確認できたことなどから、ヒトでみられる頸髄症などの慢性脊髄圧迫病態をよりの確に再現できたモデルであると考えられた。

また頸髄のMR像と病理像との比較では、T2強調像で圧迫された脊髄内の高輝度変化がみられた領域で脱髄や前角細胞の減少がみられ、これらの病理組織学的変化が運動や感覚機能の障害に深く関与していると考えられた。

本研究結果より、我々が作成したモデルラットは慢性的に緩徐に頸髄が圧迫され、運動機能障害や感覚障害が脊髄圧迫の開始から遅れて出現しており、ヒト頸髄慢性圧迫病態の特徴が再現できており、今後頸髄症の病態解明に有用なモデルであると考えられた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計3件)

- ① Kubota M, Kobayashi S, Nonoyama T, Shimada S, Takeno K, Miyazaki T, Guerrero AR, Iwamoto H, Baba H. Development of Chronic Cervical Cord Compression Model in Rat: Changes of the Neurological Behaviors, Radiological and Pathological Findings. J Neurotrauma. 査読有, 28(3), 2011, 459-67.
- ② 久保田雅史, 小林 茂, 野々山忠芳, 竹野建一, 宮崎 剛, 馬場久敏: ラット頸髄慢性圧迫モデルにおける最大トレッドミル速度を用いた客観的評価. 日本脊髄障害医学会誌, 査読なし, 23(1)、2010、51-52.
- ③ 久保田雅史, 小林 茂, 野々山忠芳, 竹野建一, 宮崎 剛, 馬場久敏: ラット慢性頸椎脊柱管狭窄モデルにおける脊髄の変化: モデル作成一年後のMR像及び組織学的変化. 日本脊髄障害医学会誌, 査読なし, 2009、22(1)、138-139.

[学会発表](計5件)

- ① 久保田雅史, 小林 茂, 松尾英明, 竹野建一, 宮崎 剛, 馬場久敏: ラット慢性頸髄圧迫モデルにおける病理学的変化. 第45回日本脊髄障害医学会, 2010年10月22日、松本
- ② Kubota M, Kobayashi S, Matsuo H, Miyazaki T, Takeno K, Shimada S, Sasaki S, Baba H. Changes of locomotor function and pathology after chronic compression of the cervical cord in rats. 7th Combined meeting of the orthopaedic research societies, October 17, 2010, Kyoto, Japan,
- ③ Kubota M, Kobayashi S, Matsuo H, Miyazaki T, Takeno K, Shimada S, Sasaki S, Alexander G, Baba H.: Production of Chronic Cervical Spinal Cord Compression Model in Rat. Changes of the Neurological Behaviors, Radiological And Pathological Features with Aging. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS), March 8, 2010, New Orleans, Louisiana.

- ④ 久保田雅史, 小林 茂, 佐々木伸一, 嶋田誠一郎, 松尾英明, 竹野建一, 宮崎 剛, 馬場久敏: ラット慢性頸椎脊柱管狭窄モデルにおけるトレッドミル最大歩行速度の検討. 第44回日本脊髄障害医学会、2009年11月12日、東京
- ⑤ 久保田雅史, 小林 茂, 佐々木伸一, 嶋田誠一郎, 松尾英明, 竹野建一, 宮崎 剛, 岩本久雄, 馬場久敏: ラット頸髄慢性圧迫モデルの解析: 行動学的評価, MR 像, 病理学的検討. 第24回日本整形学会基礎学術集会、2009年11月6日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 雅史 (KUBOTA MASAHUMI)
福井大学・医学部附属病院・理学療法士
研究者番号: 60422672