

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10950

研究課題名(和文) 脊髄後方移動による頸神経伸長の病態：術後C5麻痺の機序解明に向けて

研究課題名(英文) Pathology of the stretched nerve roots due to posterior shift of the cervical cord: a possible mechanism of postoperative delayed paresis of the upper extremities.

研究代表者

根尾 昌志 (Neo, Masashi)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：80311736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：頸椎除圧術後の遅発性上肢麻痺(C5麻痺)の病態解明を目的に、ヒト屍体における頸神経根周囲組織の解剖学的特徴と、ラット頸椎後方除圧モデルにおける頸神経根の病態を調べた。ヒトでは後縦靭帯浅層線維の外側部が神経根の背側に回り込み、袖状に神経根をアンカリングしていた。ラットでは頸髄は術後徐々に後方移動し、それに伴い頸神経前根、特にC6前糸が高度に伸長され、ラットではC5,6支配である三角筋においてMEP潜時が遅延していた。C6前根では静注した色素が神経内膜内に漏出し、BNBを構成する膜蛋白 claudin-1の遺伝子発現も低下し、血液神経関門(BNB)の機能不全が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、頸椎後方除圧術後に生じる脊髄後方移動により、頸神経前根が徐々に伸長され三角筋麻痺を惹起するメカニズムと、伸長された神経根内に生じるBNBの機能不全、浮腫性変化を初めて明らかにした。これらの結果より、今後C5麻痺の予防法を確立していく足掛かりを得た。しかし、諸家のこれまでの研究結果を総合すると、C5麻痺は脊髄後方移動のみならず、手術操作による筋肉の腫脹や脊髄の障害も含め、異なる部位に生じる複数の因子により発症すると考えられるため、その原因究明には今後も多面的アプローチによる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of so called C5 palsy, we performed both a cadaveric research for analyzing anatomical features around the cervical roots and an animal research utilizing a novel experimental rodent model of posterior spinal cord shift after decompression surgery. In the former, the superficial layer of posterior longitudinal ligament (PLL) surrounded the posterior aspect which looked like the stabilizing structure of the cervical root. In the latter, the anterior rootlets were gradually elongated as the cord shifted posteriorly after surgery. Above all, the elongation rate of C6 anterior rootlets were significantly higher than the other rootlets. Parallel to these alterations, the MEP latency of the deltoid (C5,6 innervated) was significantly delayed. In C6 anterior root, leakage of the venously-injected dye in the endoneurium was observed and gene expression of blood-nerve barrier (BNB)-related membrane proteins decreased, indicating impairment of BNB.

研究分野：整形外科学

キーワード：C5麻痺 頸髄後方移動 神経根 神経伸長 ラット 後縦靭帯 血液神経関門

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

圧迫性頸髄症に対する後方除圧術・椎弓形成術は成績も安定し、一般的な手術となっているが、未解決の合併症として術数日後に発症する上肢の遅発性麻痺がある。第5頸神経(C5)支配筋の筋力低下が最も高頻度に認められることから、術後C5麻痺と呼称されている。1960年代より術後C5麻痺に関する報告がみられるにもかかわらず、その原因は未だに解明されていない。発生頻度は約1-24%と比較的高頻度に認められ、その多くは一過性で経過観察により改善が期待できるが、麻痺が残存した例も少なくないため、その予防法・治療法の確立が急がれている。術後C5麻痺の発症原因に関して、いくつかの仮説が提唱されており¹⁻⁵⁾、中でもMRIを用いた臨床研究の結果、頸椎後方除圧術後に脊髄が後方に移動する¹⁾(図1)ことに加え、椎間孔に狭窄があり神経根が牽引され麻痺を惹起するという仮説が有力であった²⁾。しかし近年、予防的に椎間孔拡大術を併用して後方除圧術を行っても、C5麻痺の発生は抑止できなかったとの報告が散見されている⁶⁾。そのため我々は、椎間孔部以外で神経根が周囲にアンカリングされ、脊髄後方移動に伴いアンカー部に伸長ストレスが加わり、C5麻痺発症の原因のひとつになるとの仮説を立てた。

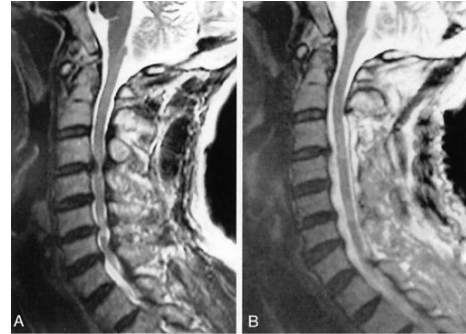


図1 頸椎後方除圧術前(A)術後(B)MRI
術後、脊髄が後方に移動している

C5麻痺の成因に関する過去の報告は、いずれも臨床例の後ろ向き研究あるいは屍体を用いた解剖学的研究であり、牽引された神経根に生じる病態は不明であった。我々はこれまで、末梢神経伸長に伴う神経障害の病態を解明するため、動物モデルを用いた研究を行い^{7,8)}、伸長神経に組織学的に明らかな異常が認められなくても、血液神経関門(Blood Nerve Barrier: BNB)の機能不全が遷延し、神経障害の一因になっている事を報告した⁹⁾。C5麻痺の多くは可逆性の麻痺であることから、神経根に加わる牽引力が麻痺発症の原因ならば、伸長された神経根では末梢神経と同様に、BNBの機能不全による浮腫などの変化⁹⁾が生じているとの仮説を立て、後方アプローチにてラット頸椎椎弓を臨床例と同様に切除するラット頸椎後方除圧モデルを考案した。本モデルにおいて術後、頸髄は経時的に後方に移動することが確認できたが、予備実験では手術操作による頸髄損傷などの合併症を認めた。手術用顕微鏡下にロープロファイルのリユールを用いて椎弓を切除するなど手技を改良した結果、手術操作に起因する合併症をほぼ0%とすることが可能となり、本研究を開始した。

2. 研究の目的

術後C5麻痺の病態解明のため、ヒト解剖用屍体を用いて椎間孔周囲の神経と周囲との関係を肉眼・顕微鏡レベルで解析し、なぜC5に障害が起こりやすいか明らかにすること、またラット頸椎後方除圧モデルを用いて、伸長された頸神経における形態・機能の変化、BNBの機能不全を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト系統解剖用屍体による検討

系統解剖用屍体12体を用い、以下の検討を行った。

肉眼的検討

後方アプローチにて全頸椎の椎弓を切除し硬膜背側を露呈し、両側C3からC8頸神経根周囲の軟部組織を肉眼的に観察した。

組織学的検討

神経根周囲の骨軟部組織を含めた樹脂包埋非脱灰組織標本を作成し、Villanueva Goldner 染色を行い光顕で観察した。

(2) . ラットモデルによる検討

8 週齢の雌 SD ラット (N=26) を用いた。全身麻酔下、実験群は椎弓切除術(C3-7)を施行した(L群、N=17)。対照群は椎弓後面を露呈するまで展開し椎弓は温存した(S群、N=9)。術翌日に歩容をビデオ撮影し、問題なく歩行可能であることを確認し、以下の検討を行った。

頸髄後方移動の定量

術前及び術後 3,10,14 日に第 5,6 腰椎椎間より造影剤 0.5ml を硬膜内に注入し脊髄造影後 CT(CTM)を撮像し、C5 椎体中央レベルにおける頸髄の後方移動量を計測した(L群、N=5)。

頸神経前根の長さ測定

撮像されたCTMのDICOMデータを工業用ソフトウェア(VG Studio,version2.2,Volumegraphics AG,ドイツ)に取り込んだ。造影された部と造影剤欠損部を反転させることで神経根を可視化した3D画像を作成し、両側C5-8神経根前糸をポリラインでトレースし長さを計測した(L群、N=5)。後糸長の測定はトレースが困難であったため断念した。

行動評価

術前及び術後 3,7,10,14 日に von Frey filament を用い両前肢足底を刺激し、疼痛閾値を評価 (L群 S群 各 N=4) した¹⁰⁾。また、小動物用握力計(model 47200、Ugo Basile、イタリア)を用いて、ラット両前肢の握力を測定した(L群:N=8、S群:N=5)。各測定は3回連続で行い平均値を算出した。

電気生理学的評価

術前及び術後 3,7,10,14 日に両側三角筋(ラットでは C5,6 支配¹¹⁾)、上腕三頭筋(ラットでは C7-T1 支配¹²⁾)の経頭蓋運動誘発電位(TcMEP)における潜時を計測した(L群:N=8、S群:N=5)。0.5msec 矩形波にて電気刺激を行い、頻度 1Hz、強度は最大上刺激とした。筋電計は Neuropack S1 MEB 9402 (日本光電、東京)を、電極は刺激側は双極電極(NE-222B、日本光電、東京)を、導出側は針の先端のみが通電する単極電極(NM-030T、日本光電、東京)を用いた。各測定は3回連続で行い平均値を算出した。

血液神経関門機能不全の定性的検討

1N PBSに溶解したfluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran, 分子量70,000; Sigma,合衆国)をラット尾静脈より50mg/kg静注し、30分後に安楽死させ、頸椎を一塊として摘出し、4%パラホルムアルデヒド-1N PBS(pH 7.4)に浸漬固定し、脱灰後頸髄-C6前後根を取り出し、凍結切片を作製し共焦点レーザー顕微鏡(TCS SP8, Leica Microsystems GmbH ドイツ)で観察した(L群S群 各N=3)。

BNB 関連蛋白の遺伝子発現定量

術後 14 日目に、深麻酔下に両側 C5-8 頸神経を露呈し、前根と後根(神経節を含めて)を別々に採取、直ちに RNA を抽出、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。リアルタイム RT-PCR にて BNB のタイト結合を構成する膜蛋白 claudin-1, Zona occluding 1 (ZO-1)¹³⁾の遺伝子発現を定量化し、Ct 法を用いて各神経根間で比較した。内部標準は GAPDH とした(L群 S群 各 N=4)。

4 . 研究成果

(1) ヒト系統解剖用屍体による検討

肉眼的検討

硬膜より各神経根に分岐する部位より外側にかけて、神経根の背側を袖状に覆う密な結合組織よりなる構造物を認めた。肉眼上、この構造物は後縦靭帯(PLL)の浅層線維と連続しており、PLL 浅層線維の外側縁が神経根の背側に回り込んで袖状に神経根をアンカリング

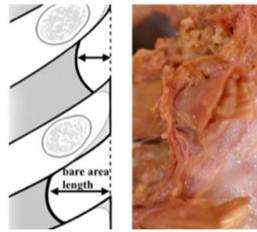


図2 PLLを覆う構造物

する構造であった(図2)。硬膜の神経根分岐部からこの袖状構造物までの距離 (bare area length: BAL)は、尾側の神経根ほど有意に大きくなっていった($p < 0.05$)。左右差についても C4 から C8 について有意な差を認めた($p < 0.05$, 表1)。

組織学的検討

PLL 浅層線維と同様に染色される靭帯様組織が神経根の背側にも認められた(図3)。

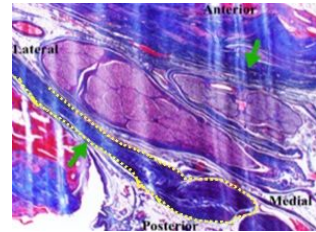


図3 神経根背側の靭帯様組織(白点線)

(2) ラットモデルによる検討

頸髄後方移動の定量

平均椎体-頸髄間距離は、術前が 0.32mm であったが、術後 3, 10, 14 日後にはそれぞれ 0.52mm, 0.74mm, 0.86mm と頸髄は徐々に後方に移動していた ($p = 0.002$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, 図4)。

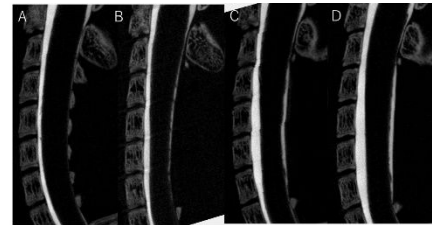


図4 CTM矢状断像(A)術前(B)(C)(D)術後3,10,14日

頸神経前根の長さ測定

頸髄の後方移動に伴い、各頸神経前系は徐々に伸長されていたが、中でも C6 が最も高度に伸長され、術後 3, 14 日では他根前系との間に有意な差を認めた (図5,6)。術後 14 日における各根前系の伸長率は C5:124%、C6:143%、C7:126%、C8:117%であった。

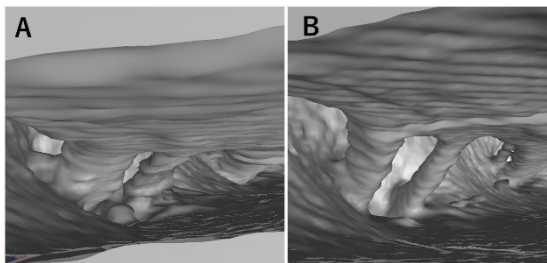
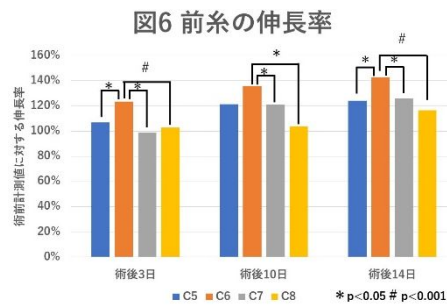


図5 神経根前系の3DCT(R C6)(A)術前(B)術後14日



行動評価

前肢足底疼痛閾値は両群間に差は認められなかったが、握力は術後 14 日で L 群では S 群より有意に握力が低下していた ($p = 0.013$, 図7,8)。

図7 前肢足底疼痛閾値

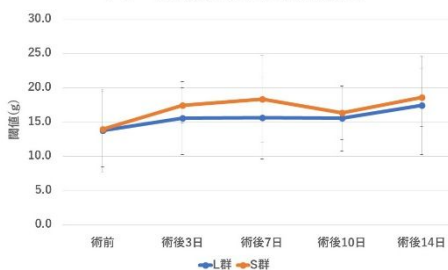
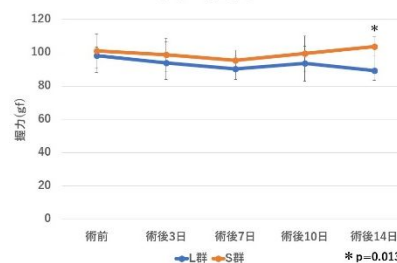
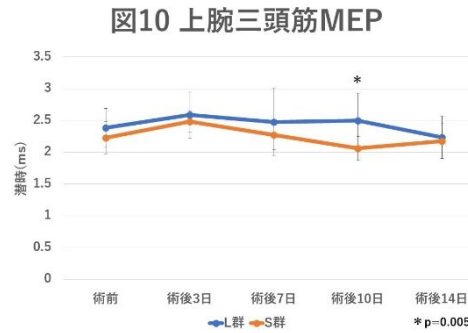
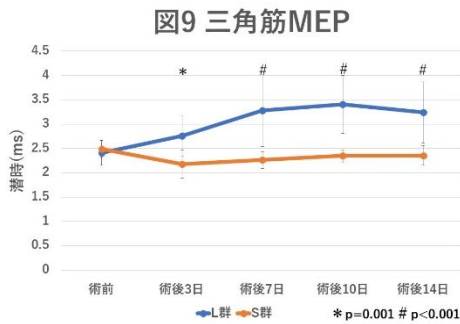


図8 握力



電気生理学的評価

三角筋の TcMEP 潜時は、術後すべての計測時で有意に遅延した ($p = 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$)。上腕三頭筋の TcMEP 潜時は、術後 10 日 ($p = 0.005$) 以外は差を認めなかった(図9,10)。



血液神経関門機能不全の定性的検討

S群では前根、後根共に神経内膜内に色素の漏出は認めなかったが、S群では前根の神経内膜内に色素の漏出を認めた(図11)。

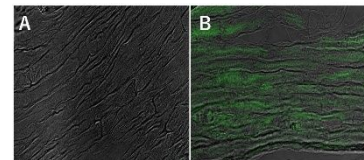


図11 FITC-dextran注入14日後のC6前根長軸 (共焦点レーザー顕微鏡像) A: S群 B: L群

BNB 関連蛋白の遺伝子発現定量

claudin-1 の遺伝子発現は、C6 前根で他の神経根と比較し、発現が減少していたがその差は有意ではなかった。ZO-1 の遺伝子発現は各根共に大きな差は認めなかった(図 12,13)。

図12 前根におけるclaudin-1, ZO-1の遺伝子発現

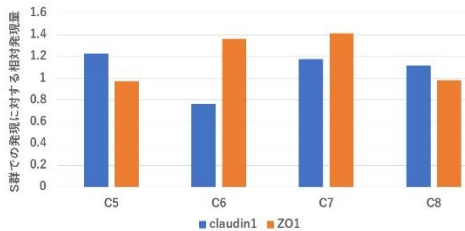
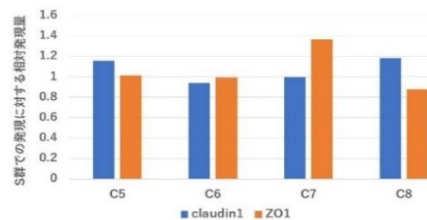


図13 後根におけるclaudin-1, ZO-1の遺伝子発現



引用文献

1. Imagama S, Matsuyama Y, Yukawa Y, et al. C5 palsy after cervical laminoplasty. A multicentre study. J Bone Joint Surg. 92-B, 2010: 393-400.
2. Tsuzuki N, Abe R, Saiki K, et al. Extradural tethering effect as one mechanism of radiculopathy complicating posterior decompression of the cervical spinal cord. Spine. 21, 1996: 203-11.
3. Sakaura H, Hosono N, Mukai Y, et al. C5 palsy after decompression surgery for cervical myelopathy. review of literature. Spine. 28, 2003: 2447-51.
4. Hasegawa K, Homma T, Chiba Y. Upper extremity palsy following cervical decompression surgery results from a transient spinal cord lesion. Spine. 32, 2007: E197-202.
5. Usami Y, Nakaya Y, Hayama S, et al. Impact of multifidus muscle swelling on C5 palsy after cervical laminoplasty. Spine. 45, 2020: E10-7.
6. Liu G, Reyes MR, Riew KD. Why does C5 palsy occur after prophylactic bilateral C4-5 foraminotomy in open-door cervical laminoplasty? A risk factor analysis. A0 Spine. 7, 2017: 696-702.
7. Hirofuji S, Yokota A, Ohno K, et al. Role of sodium channels in recovery of sciatic nerve-stretch injury in rats. Muscle Nerve. 50, 2014: 425-30.
8. Fujino K, Yokota A, Ohno K, et al. Impairment and restoration of the blood-nerve barrier and its correlation with pain following gradual nerve elongation of the rat sciatic nerve. Int J Neurosci. 2020, in press.
9. 長谷川利雄 末梢伸長損傷に関する実験的研究. 日整会誌. 66 巻, 1994:1184 - 93.
10. Hubbard RD, Winkelstein BA. Transient cervical nerve root compression in the rat induces bilateral Forepaw allodynia and spinal glial activation: mechanical factors in painful neck injuries. Spine 30, 2005: 1924-32.
11. Baulac M, Meiniger V. Mononeural organization of the anterior horn with respect to the peripheral nerves in the rat (as studied by the method of retrograde transport of horseradish peroxidase). Rev. Neurol. (Paris), 135, 1979: 789-802.
12. 齋藤正仁 ラット上腕部の筋群を支配する脊髄前角細胞の機能的分布について. 日整会誌. 60 巻, 1986:1167-74.
13. Reinhold AK, Schwade J, Lux TJ, et al. Quantitative and microstructural changes of the blood-nerve barrier in peripheral neuropathy. Front Neurosci. 12, 2018: 936.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yokota A, Usami Y, kino k, Neo M.
2. 発表標題 A novel experimental animal model of delayed palsy after posterior decompression surgery of the cervical spine.
3. 学会等名 2020 Annual meeting of Orthopaedic Research Society (ORS) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Usami, Y, Yokota A, Kondo Y, Neo M.
2. 発表標題 Anatomical Relation of Cervical Posterior Longitudinal Ligament and Root for C5 Palsy.
3. 学会等名 2020 Annual meeting of Orthopaedic Research Society (ORS) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	横田 淳司 (Yokota Atsushi) (10449564)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	近藤 洋一 (Kondo Yoichi) (40284062)	大阪医科大学・医学部・教授 (34401)	