

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592151

研究課題名(和文) 神経性間欠跛行を再現する f i c t i v e 実験モデルの開発

研究課題名(英文) Development of an animal model in which neurogenic intermittent claudication is reproduced

研究代表者

熱田 裕司 (Atsuta, Yuji)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：90167924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経性間欠跛行は腰部脊柱管狭窄症の代表的な症状である。本研究の目的は動物において神経性間欠跛行に相当する神経機能異常を再現し、その病態を解明することであった。

腰部脊柱管狭窄のモデル動物において、馬尾の圧迫増強により間欠跛行と同様の知覚神経異常活動反応を認めた。この反応は低酸素負荷を同時負荷すると増強し、高酸素条件では抑制された。また、馬尾の同時賦活によっても増強が認められた。この反応の大小は、知覚神経節細胞の酸素濃度の動態と相関が見られた。よって神経性間欠跛行は慢性圧迫による知覚神経の感作と酸素供給動態の関与が大きいことが示された。

研究成果の概要(英文)：Neurogenic intermittent claudication is a characteristic symptom of lumbar spinal canal stenosis. In the present study, abnormal neuronal activities corresponding to intermittent claudication was reproduced to understand the pathophysiology. Using animal model of lumbar canal stenosis, abnormal sensory activities was increased by compression of cauda equina. This reaction was further increased by hypoxic condition, and decreased by hyper-oxygenic condition. The degree of reaction was related to oxygen supply to dorsal root ganglia. These results indicated that sensory nerve sensitization by chronic compression and dynamics of oxygen supply are major factors of neurogenic intermittent claudication.

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：腰部脊柱管狭窄症 間欠跛行 異所性興奮 馬尾血流 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を反映して、現在最も診療頻度の高い脊椎疾患は腰部脊柱管狭窄症である。腰部脊柱管狭窄症の特徴的徴状として神経性間欠跛行がよく知られている。神経性間欠跛行では直立と歩行運動により次第に下肢の異常感覚が出現し、休息と腰部の屈曲で症状が消退する。このような下肢症状出現の際に馬尾を主体とする神経系にどのような負荷が加わり、またどのように神経機能的異常を引き起こしているかは十分に明らかとはされていない。この大きな理由は、これまでにこの神経性間欠跛行発現の様態を再現する動物モデルが存在せず、病態の解明の障害となっていたためである。臨床的に脊髄造影像から分かるように典型的な腰部脊柱管狭窄症では歩行時に馬尾に対する周囲組織の圧迫が増強していることには異論は無い。Takahashiら(1995)の報告からすると腰部脊柱管狭窄症の患者の馬尾にかかる圧力は歩行時には一定の増大を見る。一方、その値の推移は漸増する下肢症状の推移と直接的な関連は認められない。すなわち、間欠跛行の発症には馬尾圧迫の形態的状況以外に何らかの因子を考慮しなくてはならない。そこで下肢症状に直接関わる因子として注目されてきたのが馬尾の循環動態である。佐藤ら(2001)やManakaら(2003)らは腰部脊柱管狭窄症患者のMRI 静脈像の解析から、間欠跛行出現には腰部静脈系のうっ滞が関わっていることを強く示唆した。我々は腰部脊柱管狭窄症を再現した動物モデルにおいて、馬尾静脈のうっ滞を人工的に負荷し、下肢異常感覚の起源となる知覚神経系の異所性興奮を繰り返し再現できることを報告した(Ikawa,Atsutaら、2005)。すなわち、腰部脊柱管狭窄症の間欠跛行出現には血行動態変化が直接的な関連があることが実証された。このように循環動態変化が実際に生じているかどうかを検証するためには、臨床的な状況と合致した実験モデルの確立が必要であった。

2. 研究の目的

腰部脊柱管狭窄症の特徴的な症状である神経性間欠跛行の病態は未だ十分に明らかとなっていない。その病態解明のため、さらには保存療法の主体となる薬物治療の効果を検証するためには神経性間欠跛行の神経機序を十分に再現したと言える動物モデルの確立が不可欠である。本研究の目的は神経性間欠跛行の臨床症状の特性をふまえた動物モデルを提案し、その妥当性を検証することである。最終目的は臨床的な神経性間欠跛行を再現できる実験モデルを確立することである。そのことによって腰部脊柱管狭窄症の病態解明に役立てるのみならず、保存的および手術的治療の意義を科学的に検証することが可能となるからである。臨床的には間欠跛行は歩行により症状が発現するが、解

析のためには実際に動物を歩行させることはできないので、除脳および非麻酔条件かつ筋弛緩剤で非動下に間欠跛行の特徴を再現する fictive モデルをデザインする。次の 5 項目をクリアすることにより腰部脊柱管狭窄症の神経性間欠跛行と同等の神経機序再現が可能となる。

(1) 発症要因としての腰部脊柱管狭窄を生じさせること。

これは規定サイズのシリコン片を脊柱管内に挿入することで行う。処置後 7 日間程度で発症することを確認している。

(2) 間欠跛行を惹起する機転を負荷できること。

腰部脊柱管狭窄症患者が起立する際に生ずる狭窄部位での馬尾圧迫の増強をマニピュレータで負荷することができる。また、歩行の際に生ずる下肢神経活動の増強を坐骨神経に加えた電気刺激で人工的に負荷する。

(3) 発生する下肢異常感覚を客観的にとらえること。

これは動物の知覚神経から異常感覚の起源となる逆行性の発火活動を末梢知覚神経から電気生理学的に導出・記録することで可能となり、その程度も数量化できる。

(4) 腰部脊柱管狭窄症モデルでのみ症状発現パターンが再現できること。

すなわち、馬尾圧迫と電気刺激負荷を開始してから臨床症状と同様にある程度の時間を経過してから発火活動が増強し、負荷の停止とともに発火活動が軽減する現症を認め、さらにそれが繰り返し再現されることである。一方、腰部脊柱管狭窄を有しない健常動物では同様の現象は生じないことを確認する。

(5) 本モデルで発現する異常神経活動と関わる神経循環変化を特定できること。

このために症状発現に関わる馬尾圧迫と神経刺激負荷の際の馬尾組織酸素濃度を計測する予定である。これは馬尾血流の障害が間欠跛行の起源となる神経の異常興奮の要因と推定されているため、それを本モデルで実際に証明する必要があるためである。

3. 研究の方法

(1) 発症要因としての腰部脊柱管狭窄を生じさせること。これは規定サイズのシリコン片を腰部硬膜外腔に挿入することで行う。処置後 7 日間程度で発症することを確認している。

(2) 間欠跛行を惹起する機転を負荷できること。腰部脊柱管狭窄症患者が起立する際に生ずる狭窄部位での馬尾圧迫の増強を電動マニピュレータで再現する。また歩行の際に生ずる下肢神経活動の増強を坐骨神経に加えた電気刺激で人工的に負荷することができる。

(3) 発生する下肢異常感覚を客観的にとらえること。これは動物の知覚神経から異常感覚の起源となる逆行性の発火活動を末梢知覚神経から電気生理学的に導出・記録するこ

とで可能となり、その活動程度も数量化できる。

(4) 腰部脊柱管狭窄症モデルでのみ症状発現パターンが再現できること。すなわち、馬尾圧迫と電気刺激負荷を開始してから臨床症状と同様にある程度の時間を経過してから発火活動が増強し、負荷の停止とともに発火活動が軽減する現象を認め、さらにそれが繰り返し再現されることである。一方、腰部脊柱管狭窄を有しない健常動物では同様の現象は生じないことを確認する。

実験には体重 $200 \pm 10\text{g}$ の雄 Wistar ラット 40 匹を用いる。ハロセン吸入麻酔下に無菌的手法で腰椎を露出し、L3/4 馬尾レベルの硬膜外背側に $1 \times 2 \times 4\text{mm}$ のシリコン片を挿入する。これを腰部脊柱管狭窄症の発症機転とし、創閉鎖後動物を 7 日間飼育して解析に用いる。20 匹にこの処置を行い腰部脊柱管狭窄群とし、20 匹はシリコンを挿入しない対照群とする。動物をハロセン麻酔下に人工呼吸管理とし、塩酸スキサメトニウムで非動化の上で局所凍結法による除脳処置を加える。動物の頭部と脊椎を固定し、一側後肢を展開してパラフィンプール内で切断した腓腹神経中枢端より神経活動を導出する。次いで脊椎に予め挿入したシリコンの一部を露出しておく。測定側後肢の坐骨神経近傍には刺激用針電極を装着する。これらの処置後ハロセンは停止して無麻酔とする。導出した神経活動は電気的カウンターにて処理しスパイク頻度 (spikes/sec) で連続表示する。同時に電気信号はデータレコーダの磁気テープに収録する。

計測に際しては先ず安静時活動を観察した後、電動マニピュレータ(購入申請)を用いてシリコンを精密に 0.5mm 脊椎腹側へ向かって押し進めることにより硬膜管に 60 秒間圧迫を加え神経活動の変化を観察する。この試験を 5 分間の間隔をおいて 3 回繰り返して再現性を確認した後、次に硬膜管圧迫と同時に坐骨神経に電気刺激 (30Hz , 0.1ms , 10mA) を同時負荷して神経活動の変化を解析する。予めシリコンを挿入しなかった対照動物においては腰部脊柱管狭窄群と同様の腰椎レベルで馬尾を露出して同様の検討を行う。腰部脊柱管狭窄群の何%の動物において、健常動物とは全く異なる神経活動の反応が認められるか。その変化パターンは共通しているか、硬膜管の圧迫により下肢異常感覚の起源となる知覚神経の異常活動が遅発性に増強してゆき圧迫解除により消退する様式が認められるが注目点である。このことは腰部脊柱管狭窄症患者の脊髓造影にて従来観察されているように、腰部伸展によって狭窄が増強することが症状発現の要因であることと一致するためである。そしてその変化様式は坐骨神経の電気刺激によってより顕著となることは、歩行負荷が増強因子として間欠跛行に関わることを説明することになる。臨

床症状と同様に一連の反応が繰り返し再現されることも確認する。

初年度に確立した神経性間欠跛行モデルをもとに以下の研究を順に行う。

まず人工呼吸の吸気を 100%酸素に変換した上でシリコンによる馬尾圧迫の反応を観察し、酸素を投与しなかった場合の反応との違いを観察する。逆に人工呼吸器を停止した窒息負荷を同時に加えた場合の反応の変化も同様に観察する。このことによって、馬尾の酸素供給、すなわち生体内では循環動態が神経性間欠跛行の出現にどのように関与するかと明らかとすることができる。

次に、本モデルで発現する異常神経活動と関わる神経環境変化変化を特定するための実験を行う。このために症状発現に関わる馬尾圧迫と神経刺激負荷の際の馬尾組織酸素濃度を計測する。このために腰部脊柱管狭窄動物の馬尾に先端が 20 ミクロンの針型酸素プローブを刺入し、新しい手法である蛍光消失時間式の酸素濃度計にて組織酸素濃度を測定する。同様に馬尾を内包する硬膜管内でも酸素濃度を計測し、狭窄部での圧迫負荷がいかなる影響を及ぼすかを解析する。このような解析は次のような臨床的特徴を説明することになる。すなわち神経性間欠跛行は起立・歩行で下肢異常感覚が増強し座位で症状軽減する動的な症状発現様態が特徴的である。前屈姿勢での歩行や自転車では下肢症状は出現しないため、直立姿勢における狭窄部位の馬尾圧迫増強が馬尾の循環動態に影響し、酸素濃度低下が下肢知覚神経活動の異常を誘発するということである。

最終年度については薬物の影響を解析する。現状では腰部脊柱管狭窄症の保存的加療として有効性が実験的に実証された薬剤は殆ど無い。腰部脊柱管狭窄症患者数はきわめて多いことから、多くの製薬会社も新薬開発に乗り出しているが、薬物の効果を実証するための実験モデルが確立されていなかったことが未だに問題となっている。本研究はこの問題を解決できることから本実験系は腰部脊柱管狭窄症の病態解明、さらに保存療法としての薬物治療を評価するにあたってきわめて有用なモデルと考えられる。現在すでに市販されているプロスタグランジン製剤、セロトニン受容体拮抗薬など局所循環動態に影響しうる薬物について評価を行い、薬物治療の臨床的意義を明確としたい。さらに挿入されていたシリコンを抜去することにより除圧術が及ぼす影響も解析することができる。

4. 研究成果

本研究の目的は神経性間欠跛行の臨床症状の特性をふまえた動物モデルを提案し、その妥当性を検証することである。前年度において神経性間欠跛行と判定できる現象を再現するため、異常感覚の指標となる腓腹神経の逆行性活動電位を記録できるシステムを

構築した。そして臨床で見られる馬尾圧迫の増強とともに間欠跛行ときわめて類似したパターンの神経活動を誘発し、神経性間欠跛行の神経機序を再現したと判断した。本年度においては、この現象をもとに、神経性間欠跛行の機序の解明を進めた。特に馬尾圧迫の増強における馬尾血流動態の関与について注目した。本年度はラット 54 匹の追加実験を行った。シリコン片 (2x1x4mm) を第 3/4 腰椎レベルの硬膜外腔に挿入して 1 週間経過した腰部脊柱管狭窄症モデルを用いた。尾側の馬尾血流変化をレーザードップラー装置あるいは酸素濃度で計測すると、シリコンの圧迫の際に低下することが確認できた。発火閾値を検討すると、酸素濃度値自体よりも低下する速度ならびに酸素不足量の関与が大きかった。馬尾血流の動態の関与をさらに解析するため、シリコン圧迫の際に低酸素を同時に負荷すると、神経活動の変化が有意に増大した。一方、高酸素を同時に負荷した場合には、神経活動の変化が有意に抑制されることも改めて確認できた。

これらのことから、間欠跛行の発現には馬尾血流を介した酸素供給の要素が大きく関わっていることが推察できた。知覚神経の異常活動の起源となる部位と血流動態の関係であり、異所性発火の発現部位は狭窄部の馬尾軸索と後根神経節の可能性があり、いずれの部位も発火の起源と考えられた。また、神経性間欠跛行時に生ずる運動系の神経機能変化も確認でき、間欠跛行の病態への関与が強く推察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. 熱田裕司 神経性間欠跛行を再現する fictive 実験モデル 旭川医科大学研究フォーラム 11 : 66-67 2011

2. 小林徹也、青野貴吉、神保静夫、熱田裕司 Roussouly 分類を用いた矢状面アライメントと脊柱変形の前向き調査 Journal of spine research 3(3) : 338 2012

3. 青野貴吉、小林徹也、熱田裕司、神保静夫、村田宗平、松野丈夫 腰椎疾患に対する MRI 分類と脊髄造影との比較検討 北海道整形災害外科学会雑誌 54(2) : 311 2013

4. 青野貴吉、小林徹也、熱田裕司、神保静夫、伊藤 浩、松野丈夫 新規に発生した腰椎変性すべりにおける X 線学的検討 北海道整形災害外科学会雑誌 54(2) : 149-153 2013

[学会発表](計 3 件)

1. 青野貴吉、小林徹也、熱田裕司、神保静夫、松野丈夫 腰部脊柱管狭窄症における MRI 分類と脊髄造影との比較検討 第 122 回北海道整形災害外科学会 2012 年 1 月 札幌市

2. 神保静夫、小林徹也、熱田裕司、伊藤 浩 間歇性跛行を主訴とし診断まで 3 年を要した大動脈炎症候群の 1 例 第 124 回北海道整形災害外科学会 2013 年 1 月 札幌市

3. Chiba H, Kobayashi T, Atsuta Y, Ito H, Sugisawa H, Sugawara T. Relationship between trunk function and spinal defromity among aging cohort. 2nd world congress on controversies, debates & consensus in bone, muscle & joint diseases Nov 21-24, 2013, Brussels, Belgium

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
熱田 裕司 (ATSUTA, Yuji)
旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 90167924

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :