

遺伝性骨軟骨異常マウス(twyマウス)を用いた慢性脊髄圧迫病変の形態学的研究－脊髄の慢性圧迫状態における練り歯磨き現象－

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 前澤, 靖久 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8466

遺伝性骨軟骨異常マウス(twy マウス)を用いた 慢性脊髄圧迫病変の形態学的研究

—脊髄の慢性圧迫状態における練り歯磨き現象—

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

前 澤 靖 久

脊髄は慢性圧迫に対しては強い耐久性を示し、柔軟性を有するものと一般に考えられている。しかし、脊髄が慢性圧迫に対して、実際にどのように振る舞っているのかについては殆ど知られていない。今回、脊柱靭帯骨化症の自然発症モデルである遺伝性骨軟骨異常マウス (twy マウス) を用い、慢性圧迫に対する脊髄機能の柔軟性を神経細胞レベルで検討した。第2, 3頸髄後根間の石灰化巣により、後方から徐々に圧迫を受ける twy マウスの脊髄に着目し、第1頸髄最吻側部から第3頸髄に至る脊髄の連続横断切片を作製した。これらを二つに分け、一方はニッスル染色を行い圧迫形態とその脊髄細胞構築学的変化を観察し、さらに前角細胞の局在分布について検討した。また他方は、胸骨乳突筋内に西洋ワサビ過酸化酵素 (horseradish peroxidase, HRP) を注入することにより上位頸髄にある運動ニューロン群を逆行性に標識し、圧迫による前角細胞の局在分布の変化を観察した。第1頸髄最吻側部から第3頸髄に存在する総前角細胞数と圧迫の強さとの相関をみると、圧迫が強くなるに伴いS字状曲線的に前角細胞数が減少することが明らかとなった。すなわち、脊髄残余面積が70%以下になると前角細胞数の減少がはじまり、脊髄残余面積が50%以下になると前角細胞数は一定の値に達するものと考えられた。これは臨床的に知られている脊髄機能再生の臨界点とよく一致した。また、第1頸髄から第3頸髄までの脊髄を第1頸髄前根、第2, 3頸髄後根出現中央部で区切りそれぞれ最吻側部、吻側部、圧迫部、尾側部にわけると、脊髄残余面積が70%未満50%以上の圧迫で圧迫部の前角細胞数は、正常対照群 233 ± 14.1 個 ($n=10$) に対し 112 ± 63.0 個 ($n=11$) と有意に減少した ($p<0.05$)。同時に最吻側部に存在する前角細胞数は、正常対照群 52.4 ± 6.98 個 ($n=10$) に対し 76.4 ± 14.7 個 ($n=11$) と有意に増加した ($p<0.05$)。さらに、脊髄残余面積が50%以下では圧迫部 51.3 ± 26.3 個 ($n=8$)、最吻側部 93.0 ± 16.8 個 ($n=8$) とその増加が著明となった ($p<0.05$)。脊髄の細胞構築学的検討では脊髄残余面積が70%までの圧迫では層構造に乱れは発生しないが、H字形の灰白質の変形を認めた。さらに、脊髄残余面積が70%以下の圧迫では、Rexedの第I, II, III, IV層が圧迫部で縮小消失し、その吻側部で逆に増大した。さらに、脊髄残余面積が50%以下の圧迫では、グリア細胞の増加に伴って圧迫部の層構造が不明瞭となった。HRPで逆行性に機能的に標識された副神経脊髄核の細胞柱も、圧迫により吻側に持ち上げられたように、一連の連絡を保ちながら分布の偏位を認めた。この脊髄の“練り歯磨き”様の柔軟性が、慢性圧迫状態において脊髄横断面の形の変化が大きいにもかかわらず、機能的な障害が起りにくい、即ち、慢性圧迫状態における脊髄の耐久性をもたらす柔軟な現象であると結論した。

key words spinal cord, horseradish peroxidase, twy mouse, motoneuron, cytoarchitecture

脊髄は、慢性圧迫に対しどれだけ耐えられるのか？

われわれは、日常診療において頸椎症性脊髄症、後縦靭帯骨化症、脊髄腫瘍などにおいて、当然、急性圧迫では不可逆的な転帰をとるほどに脊髄が慢性的に強く圧迫されているにもかかわらず症状が軽度であったり、除圧術のあとにきわめて良好な回復を示したりする症例をしばしば経験し、脊髄の持つ慢性圧迫に対する耐久力とその機能の良好な回復性には驚かされる。一般に、これら脊髄機能と computed tomographic myelogram (CTM) や magnetic resonance image (MRI) などを用いた脊髄の横断画像で得られる横断面積や、Ono¹⁾らの脊髄扁平率 (前後

径/横径 $\times 100\%$, anteroposterior compression ratio) などの各種パラメーターとは比較的良好に相関することが知られている²⁾。

一般に、ヒト脊髄が慢性的に圧迫される場合、臨床症状が出現する臨界点は、CTM上脊髄横断面積 $45-50\text{mm}^2$ (正常脊髄横断面積比 67%)、また手術により脊髄の機能回復の期待される最小面積は $30-35.7\text{mm}^2$ (約 50%) であり、 $25-30\text{mm}^2$ 以下は脊髄萎縮を呈し脊髄機能の不可逆性を意味すると考えられている^{3,4)}。また剖検例におけるホルマリン固定標本で、脊髄横断面積が 40mm^2 以下になると病理学的組織変化が著しくなり、脊髄の不可逆性変化が発生するものと考えられている^{5,6)}。すなわ

平成5年7月9日受付, 平成5年8月20日受理

Abbreviations: CTM, computed tomographic myelogram; HRP, horseradish peroxidase; MRI, magnetic resonance image; TMB, tetramethylbenzidine; WGA-HRP, wheat germ agglutinin conjugated with HRP

ち、脊髄はある程度までの圧迫であれば除圧手術にて脊髄機能の回復が期待される、という脊髄機能の可塑性を有するものと考えられる。

著者は、慢性的な漸増圧迫に対して柔軟性や可逆性を有する脊髄が、どのように立ち振る舞っているのかを観察する目的で、多発性脊柱管狭窄症の自然発症モデルである *twy* マウスを用いて、圧迫部の吻尾側を含む脊髄の横断連続切片を作成し、脊髄前角細胞の分布を3次元的に観察した。また同時に運動ニューロンの機能を評価するために、支配筋に西洋ワサビ過酸化酵素 (horseradish peroxidase, HRP) を注入することにより、脊髄前角細胞を逆行性に染色し細胞柱として観察した。これらの実験をもとに、慢性的に圧迫状態におかれた脊髄が示す様態を形態学的に追及する事を本研究の目的とした。また慢性圧迫下にある脊髄がいかにかその機能を維持するのか、即ち、脊髄の可塑性についても研究を行った。

材料および方法

1. 実験材料

Twy マウス⁷⁾は、1978年実験動物中央研究所(神奈川県川崎市)においてICR系マウスから近交系を作出する目的で兄妹交配を行った第8代目に、体型が小さく、脊柱彎曲を示し、前・後肢の末梢関節が拘縮し、つま先立ち歩行とも表現すべき異常な歩行をするマウスとして吉村幸夫氏によって発見された動物である。この異常な形質は、常染色体劣性遺伝子によって支配されていることが推定され、この遺伝子を *tiptoe walking Yoshimura* (遺伝子記号: *twy*) と名付け、マウスは *twy* マウスと命名された。外見上の異常は出生から離乳までは発見が困難であるが、3週齢より指趾関節の拘縮を認めるようになり、徐々につま先立ち歩行が明らかとなり、20週齢でほぼ四肢関節の骨性強直が完成する。脊椎にも骨性強直を生じ、また唯一の多発性脊柱管狭窄症の自然発症モデルとして注目されている(図1)。

対象には生後4, 5, 6, 7, 8カ月の *twy* マウスを各10匹ずつ、合計50匹を用いた(体重19~32g)。*twy* マウスは生後8週までは母系であるICR系とほぼ同一の体重増加を示すが、それ以降の体重増加は停止し、14~16週で体重減少が認められるようになる。今回対象とした生後4カ月以降の *twy* マウスの体長に差は少なく、正常対照群には、レントゲン撮影にて成長の停止した生後4カ月以降の *twy* マウスと同一体格を有する6週齢の雌ICRマウス5匹10脊髄側を用いた(体重28.3±1.93g)。

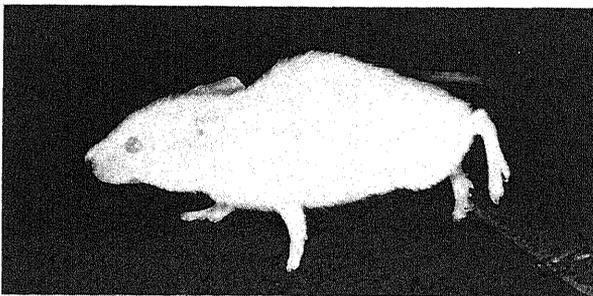


Fig.1. Appearance of A *twy* mouse (*tiptoe walking Yoshimura mouse*). It walks on tiptoe because of the ankylosed limbs.

II. 麻 酔

ネプタール(大日本新薬, 大阪)の腹腔内注射(0.05mg/g体重)を用いた。薬剤注射後10分程で麻酔状態となり、通常は60分を経過すると麻酔から覚醒した状態となった。

III. 実験方法

上記の全身麻酔下に、前頸部から前胸部を正中切開し両側の胸鎖乳突筋を露出した。手術用顕微鏡視下に胸骨乳突筋と鎖骨乳突筋を同定、両筋間に存在する支配神経を損傷しないように鈍的に剝離展開した。浅層に存在する胸骨乳突筋のみに選択的にHRP[®]を注入した。HRPはトリス緩衝液(pH8.0)にて2%に溶解した小麦胚芽凝集素結合西洋ワサビ過酸化酵素(wheat germ agglutinin conjugated with horseradish peroxidase, WGA-HRP)(東洋紡, 敦賀)を用い、マイクロシリンジで約1 μ lを筋腹のほぼ中央部に筋肉外に漏出ないように注入した。その後、HRP溶液の筋肉外への漏出を防ぐために、注入直後フィブリン糊(ティシール[®])(イノムAG, Vienna, オーストリア)で筋周囲を覆った。

HRP注入後36時間生存させた後、再麻酔下に開胸して右心耳を切開し、左心室より8%ホルマリン-0.1Mリン酸緩衝液(pH7.3)200mlで全身灌流固定を行い、さらに10%蔗糖-0.1Mリン酸緩衝液(pH7.3)200mlを灌流させた。灌流後直ちに、延髄から第5頸髄までの脊髄を手術用顕微鏡下に摘出した。摘出した組織は30%蔗糖-0.1Mリン酸緩衝液(pH7.3)に4℃で72時間浸潤後、50 μ mの連続横断凍結切片を作製した。切片は2シリーズに分けプレパラートに貼り室温空気乾燥後、一方はクレシルバイオレットによるニッスル染色を、他方はMesulam¹⁰⁾の方法に従ってテトラメチルベンチジン(tetramethyl benzidine, TMB)によりHRP陽性細胞を青黒色に発色させ、ニュートラルレッドによる対比染色を行った。

1. 脊髄圧迫形態の観察

最大圧迫部の脊髄横断面積を脊髄圧迫のパラメーターとして用いた。ニッスル標本を各切片毎に顕微鏡描画装置にて50倍に拡大描画し、X-Yデジタイザー(グラディメイトSQ-3000)(オスコン社, 東京)でその面積を求めた。個体差および切片染色時の収縮などの誤差を補正するために、最大圧迫部の脊髄横断面積と第1頸髄前根出現部の脊髄横断面積の比を求め、正常対照群の値を100としてその百分率を求め、脊髄残余面積(%)とした。

2. ニッスル標本の評価

1) 脊髄灰白質の細胞構築学的層構造の観察

灰白質の細胞構築学的層構造を観察し、圧迫の方向および程度による層構造の変化を観察した。

2) 脊髄前角細胞の観察

北村ら¹¹⁾のラット頸髄前角細胞群の分類に準じて核小体の明瞭な脊髄前角細胞を観察し、錐体交叉(第1頸髄最物側部)から第3頸髄節にいたる脊髄前角細胞の数を算出した。

3) 脊髄前角細胞の部位別分布

Twy マウスの脊髄の圧迫は上位頸椎で著明であり、3週齢で両側の頸椎後頭関節部と環椎軸椎椎弓間の後環軸膜に毛細血管の新生を伴った線維性結合織の軽度の増生を背側に認めるようになり、6週齢ではそれらの変化が全例に観察されるようになる。さらに、両側の頸椎後頭関節部に形成される石灰化を伴った腫瘍は延髄頸髄移行部を圧迫する事はないが、後環軸膜に発生する腫瘍により、脊髄は第1, 2頸椎椎弓間の後方か

ら、すなわち第2頸髄後根と第3頸髄後根の間で加齢とともに後方より著明な圧迫を受けることになる(図2)。そこで6週齢以降に全例において後環軸膜に形成される腫瘤に注目し、錐体交叉から第3頸髄までを第2、3頸髄後根中央部で区切り、さらに、マウスでは第1頸髄後根は欠損しているため、第1頸髄前根出現部位で4つに区切り、圧迫部とその吻・尾側の前角細胞数の動向について観察した。連続切片でそれぞれの前根・後根を各切片で観察しその中央部を前根・後根出現部と評価した。

3. HRP 標本の評価

1) HRP 陽性細胞の観察

光学顕微鏡を用い、圧迫による脊髄前角細胞体および樹状突起の広がりを観察した。

2) HRP 陽性細胞の分布

脊髄横断面での局在を中心管を原点に置きY軸を中心管と正中裂を結ぶ線に置き、これと直交するX軸を求め、顕微鏡描画装置にて100倍に拡大した後、グラフ用紙にプロットしてそれぞれの前角細胞を座標として記録した(図3)。さらに、X座標でみられる HRP 陽性細胞数の変化を、錐体交叉から第3頸髄に至る全ての連続切片を1枚ずつ再構築した上で立体的に観察した。

4. 統計処理

得られたデータは平均値±標準偏差で表した。

脊髄面積と前角細胞総数との相関関係については、脊髄面積(X)と各前角細胞総数の正常値(625±43.6個)に対する%のProbit変換値(Y)について分析を行った。また相関の有意性の検定は、Pearsonの相関係数(r)についておこなった。

脊髄面積と前角細胞数の分布に関する各群間の有意差の検定には、Bartlett検定により分散の均一性を検定したのち、一元配置分散分析法またはKruskal-Wallisの一元配置分散分析法およびそれぞれScheffé法またはHollander-Wolfe法による多重比較をおこなった。なお、いずれも危険率5%以下を統計学的に有意と判定した。

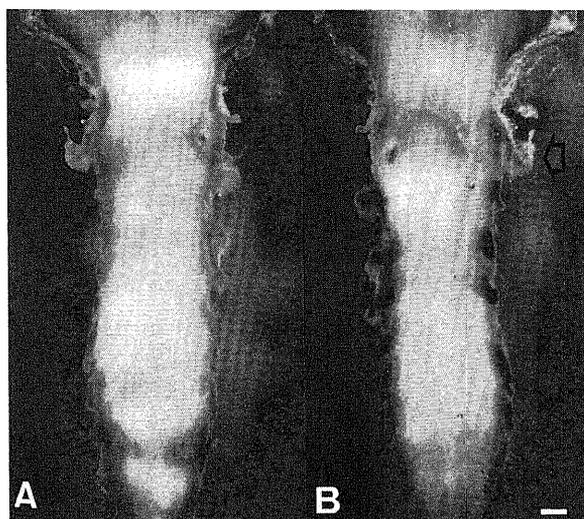


Fig. 2. Photographs of the cervical spinal cord of twy mouse. (A) Ventral view. (B) Dorsal view. A twy mouse has a marked posterior compression of the spinal cord between C2 and C3 level. Open black arrow indicates the C2 dorsal spinal root. Scale bar indicate 1 mm.

成 績

I. 脊髄の圧迫形態

Twyマウスの頸髄圧迫の形態を最大圧迫部の横断面で分類すると、一侧の後側方圧迫を認めたものは33匹、側方圧迫は8匹、正中圧迫は7匹、両側の後側方圧迫は2匹であり、多彩な圧迫形態が存在することが分かった(図4)。しかし、椎間板の骨性架橋による純粋な前方圧迫のみを示す動物はなかった。また、ICRマウス5匹には全く脊髄圧迫はみられなかった。そこで、一侧の後側方圧迫群のうち第2、3頸髄後根間のみ圧迫の存在する25匹につき以下の検討を加えた。

II. 圧迫形態と脊髄の細胞構築学的検討

1. 軽度圧迫例(脊髄残余面積79.6%の圧迫をうけていたもの)

細胞構築の各層構造は保たれ、H字形の灰白質は圧迫側で後角幅の増大、前角の鈍化を認め、非圧迫側で逆に後角幅の減少、前角の鋭化を認めた(図5B)。

2. 中等度圧迫例(脊髄残余面積51.0%の圧迫をうけていたもの)

H字形の灰白質は圧迫側で後角幅の増大、前角の鈍化は著明となり、圧迫部の吻側でRexed¹²⁾の第Ⅲ、Ⅳ層の厚みの拡大を認め、最大圧迫部では第Ⅰ、Ⅱ層の縮小消失を認めた(図5C)。

3. 高度圧迫例(脊髄残余面積25.5%の圧迫をうけていたもの)

圧迫部の吻側のみならず尾側でも、第Ⅲ、Ⅳ層の厚みの拡大を認めたが、圧迫部では層構造は確認できなかった。また、圧迫側では全体にグリア細胞の増殖または灰白質の線維化が生じたため、層構造が不明瞭となった(図5D)。

III. ニッスル染色標本

対象とした25匹の脊髄圧迫形態は一侧の後側方圧迫例であり、脊髄横断面において圧迫優位側を圧迫側、他方を非圧迫側に分けて前角細胞数を算出した。

1. 圧迫の程度と前角細胞総数

正常対照群において、錐体交叉から第3頸髄に存在する一侧の前角細胞総数は625±43.6(n=10)個であった。最大圧迫部位の脊髄残余面積(X)と各総前角細胞数の正常値に対する%の

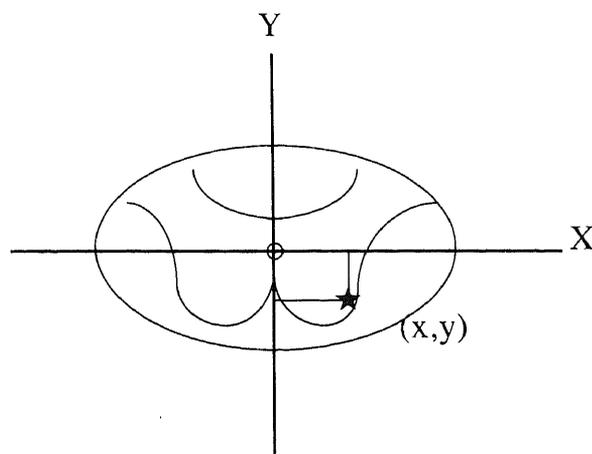


Fig. 3. Motoneuron position measured by the vertical and horizontal coordinates of the HRP-labeled cell bodies.

Probit 変換値 (Y) について分析を行うと、圧迫側は $Y=0.022X+4.48$, $r=0.765$ ($p<0.05$), 非圧迫側は $Y=0.0121X+5.09$, $r=0.639$ ($p<0.05$) であった。最大圧迫部位における脊髄面積の減少と前角細胞数の減少との間には有意な相関が認められ、圧迫に伴い前角細胞総数はS字曲線的に減少するものと考えられた(図6)。すなわち、脊髄残余面積が70%以下になると前角細胞数の減少がはじまり、脊髄残余面積が50%以下になると前角細胞数は一定の値に達するものと推察した。

2. 圧迫部とその物側・尾側部の前角細胞数

圧迫の程度を最大圧迫部位の脊髄残余面積で以下の3群に分類した。グループ1:軽度圧迫群,脊髄残余面積が70%以上($n=6$),グループ2:中等度圧迫群,脊髄残余面積が70%未満50%以上($n=11$),グループ3:重度圧迫群,脊髄残余面積が50%未満($n=8$)にわけ圧迫側,非圧迫側について観察した。

1) 圧迫側

i. 錐体交叉と第1頸髄前根間(圧迫部の最吻側部)

正常対照群は前角細胞数が 52.4 ± 6.98 個に対し,グループ1: 59.0 ± 8.65 個,グループ2: 76.4 ± 14.7 個,グループ3: 93.0 ± 16.8 個と70%以下の圧迫状態では,前角細胞数が有意に増加した(図7A)。

ii. 第1頸髄前根と第2頸髄後根間(圧迫の物側部)

正常対照群は前角細胞数が 234 ± 28.5 個に対し,グループ1: 198 ± 25.2 個,グループ2: 158 ± 30.1 個,グループ3: 136 ± 28.6 個と70%以下の圧迫状態では,前角細胞数が有意に

減少した(図7B)。

iii. 第2頸髄後根と第3頸髄後根間(圧迫部)

正常対照群は前角細胞数が 233 ± 14.1 個に対し,グループ1: 212 ± 23.3 個,グループ2: 112 ± 63.0 個,グループ3: 51.3 ± 26.3 個と70%以下の圧迫状態では,前角細胞数が有意に減少した(図7C)。

iv. 第3頸髄後根から第3頸髄節まで(圧迫の尾側部)

正常対照群は前角細胞数が 106 ± 12.9 個に対し,グループ1: 121 ± 5.72 個,グループ2: 97.6 ± 23.6 個,グループ3: 93.0 ± 24.4 個と,前角細胞数がほぼ一定値を呈した(図7D)。

2) 非圧迫側

i. 錐体交叉と第1頸髄前根間(圧迫部の最吻側部)

正常対照群は前角細胞数が 52.4 ± 6.98 個に対し,グループ1: 55.5 ± 5.61 個,グループ2: 68.7 ± 13.3 個,グループ3: 90.9 ± 7.40 個と70%以下の圧迫状態では,前角細胞数が有意に増加した(図8A)。

ii. 第1頸髄前根と第2頸髄後根間(圧迫の物側部)

正常対照群は前角細胞数が 234 ± 28.5 個に対し,グループ1: 185 ± 30.0 個,グループ2: 168 ± 19.8 個,グループ3: 159 ± 30.2 個と70%以下の圧迫状態では,前角細胞数が有意に減少した(図8B)。

iii. 第2頸髄後根と第3頸髄後根間(圧迫部)

正常対照群は前角細胞数が 233 ± 14.1 個に対し,グループ1: 204 ± 31.6 個,グループ2: 156 ± 47.5 個,グループ3:

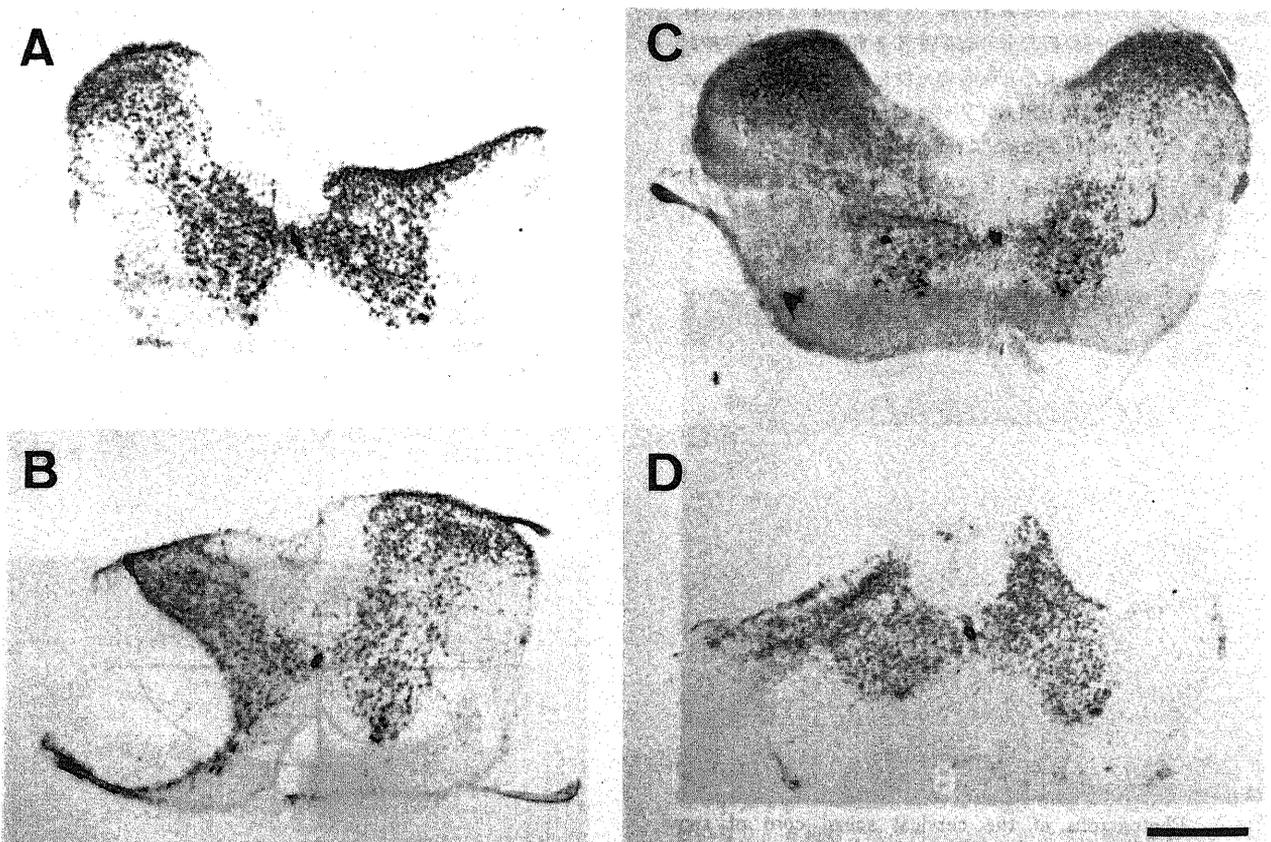
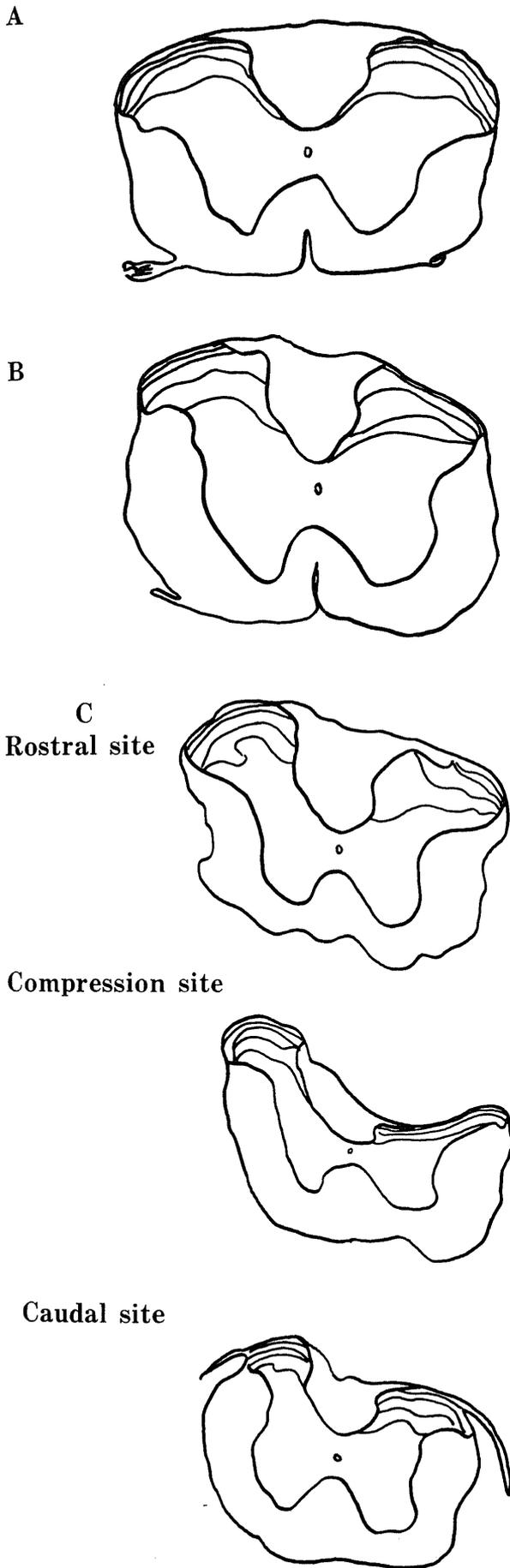


Fig. 4. Photomicrographs of cross section through the C2-C3 segment of a twy mouse at the compressed area. Cresyl violet stain. (A) Posterolateral compression (one side) (33 cases), (B) Lateral compression (8 cases), (C) Posteromedial compression (7 cases), (D) Posterolateral compression (both sides) (2 cases). Scale bar indicate 100 μ m.



76.4±30.0 個と 70% 以下の圧迫状態では、前角細胞数が有意に減少した (図 8C).

iv. 第 3 頸髄後根から第 3 頸髄髄節まで (圧迫の尾側部)

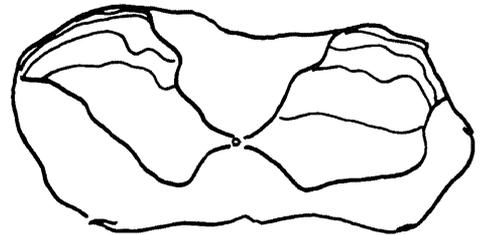
正常対照群は前角細胞数が 106±12.9 個に対し、グループ 1 : 113±6.45 個、グループ 2 : 91.0±18.5 個、グループ 3 : 89.4±18.7 個と、前角細胞数がほぼ一定値を呈した (図 8D).

IV. HRP 標本

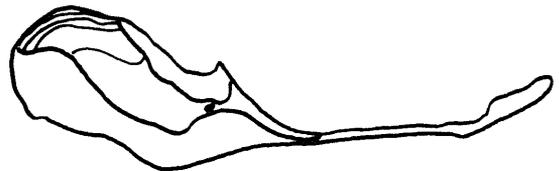
1. 正常対照群 (ICR マウス) の胸骨乳突筋に HRP を注入した場合の HRP 標本

今回 HRP で標識された副神経脊髄核は、第 1 頸髄最物側の高さ (下オリーブ核が消失する高さで錐体交叉が認められる) で前角内側縁に沿う第 1 群にはじめて出現し、尾側にいくにつれて第 1 群が発達するとともに、HRP 陽性細胞は前角やや深部に位置するようになり第 2 群を形成し、第 3 頸髄では内側細胞柱は消失した (図 9A)。これに代わって、第 2 頸髄後根糸出現レベルでは前角の外側部の第 6 群に認められるようになり、第

D
Rostral site



Compression site



Caudal site

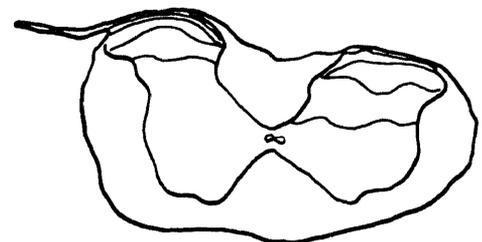


Fig. 5. Schematic diagrams of serial cross section through the C2-C3 segment showing changes in cytoarchitectonic structure. (A) Control, (B) Slight compression (TRAS=79.6%), (C) Moderate compression (TRAS=51.0%), (D) Severe compression (TRAS=25.5%). TRAS (%)=transverse remnant area of the spinal cord.

2 頸髄後根中央部で内側核から外側核へと移行する外側細胞柱として認められた(図 9B)。この脊髄前角の内側から外側への細胞分布の移行部は、ちょうど脊髄圧迫部に相当した。

2. 圧迫と HRP 陽性細胞数

正常対照群における第 1 頸髄から第 3 頸髄に存在する HRP 陽性細胞総数は 120 ± 8.0 個 ($n=10$) であった。これに対し、twy マウスの第 1 頸髄から第 3 頸髄に存在する圧迫側の HRP 陽性細胞数は、ニッスル染色標本で観察した前角細胞数と同様に減少した。すなわち、HRP 陽性細胞総数は脊髄残余面積が

70% 以下になると減少しはじめ、50% 以下では一定値に達するものと考えられた。一方、非圧迫側においては圧迫側と同様、圧迫とともに HRP 陽性細胞総数が減少するが、なかには 50% 以下となっても細胞数が保たれるものも見られた(図 10)。

3. 圧迫と HRP 陽性細胞の分布

副神経脊髄核として HRP 陽性細胞を 3 次的に細胞柱として観察すると、脊髄残余面積 70% 以下の圧迫例で第 6 群に属する外側細胞群の出現がより物側部に認められるようになり、

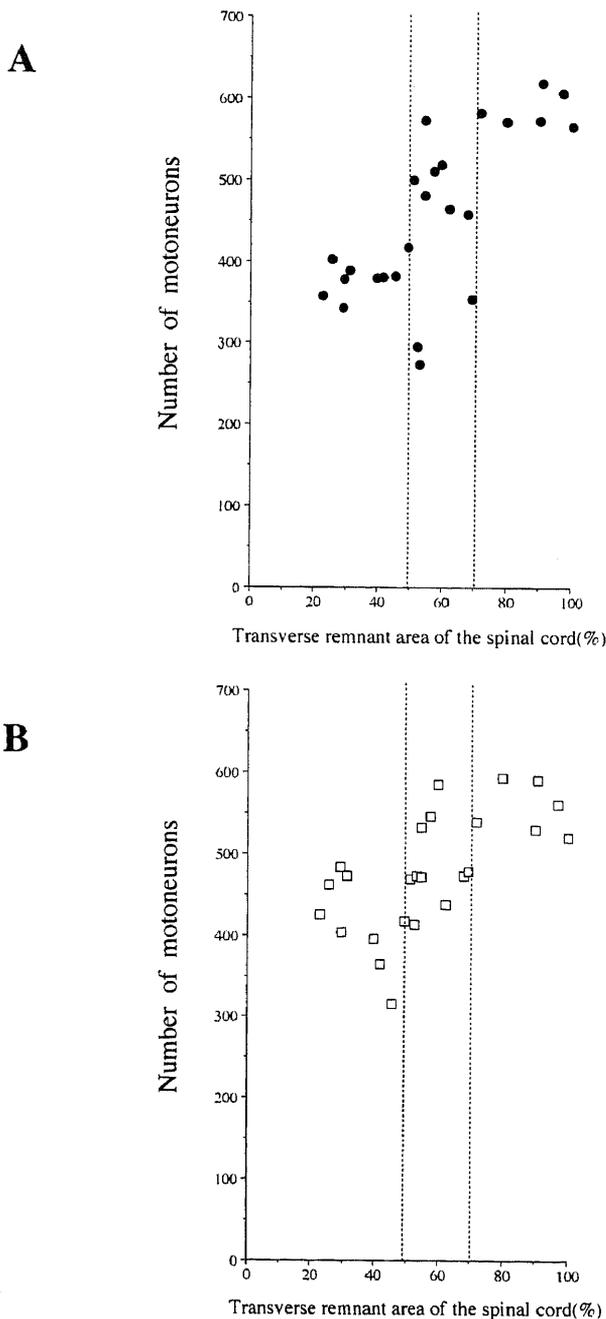


Fig. 6. Relationship between transverse remnant area of the spinal cord (%) and the number of motoneurons. Significant correlation between TRAS (%) and number of motoneurons after Probit transformation was observed. (A) Compression side: $Y=0.02X+4.48$, $r=0.765$ ($p<0.05$). (B) Non-compression side: $Y=0.121X+5.09$, $r=0.639$ ($p<0.05$).

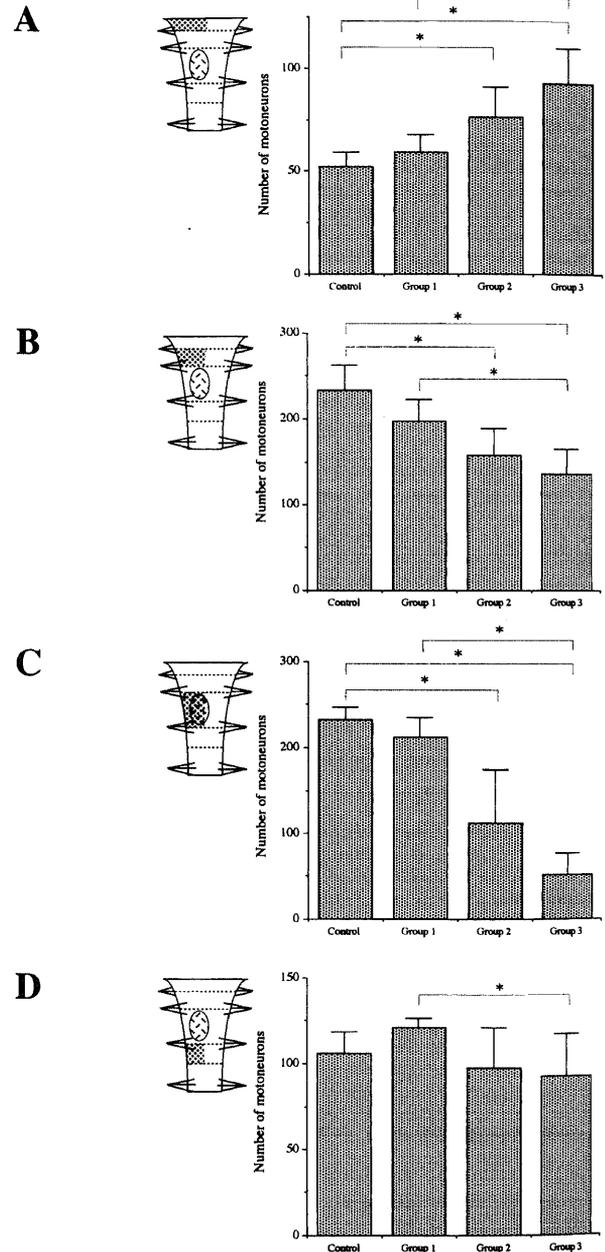


Fig. 7. Number of motoneurons in the compression side. Values are given as the mean \pm SD. Spinal cord from C1 to C3 were divided into four segments. A, most rostral site (rostral region from C1 ventral root); B, rostral site (between C1 ventral root and C2 dorsal root); C, compression site (between C2 dorsal root and C3 dorsal root); D, caudal site (caudal site from C3 dorsal root). *, $p<0.05$ by ANOVA and Scheffé's post hoc tests or by Kruskal-Wallis' ANOVA and Hollander-Wolfe's post hoc tests.

また吻側部での内側群に存在する陽性細胞の増加も認められた。すなわち圧迫により内外側の前角細胞が吻側部へ押し上げられたような偏位を示した(図11)。さらに、脊髄残余面積50%以下の圧迫例では、圧迫部において陽性細胞が消失した。

考 察

種々の脊髄の慢性圧迫実験モデルを用いた脊髄の病理組織学的検討や脊髄の血行動態学的研究、また電気生理学的検討などにより、脊髄の機能的回復性や可逆性について、圧迫と臨床症状の相関という観点から様々な意見が議論されてきた。よく用いられる脊髄の漸増慢性圧迫実験モデルには、2重金属螺子

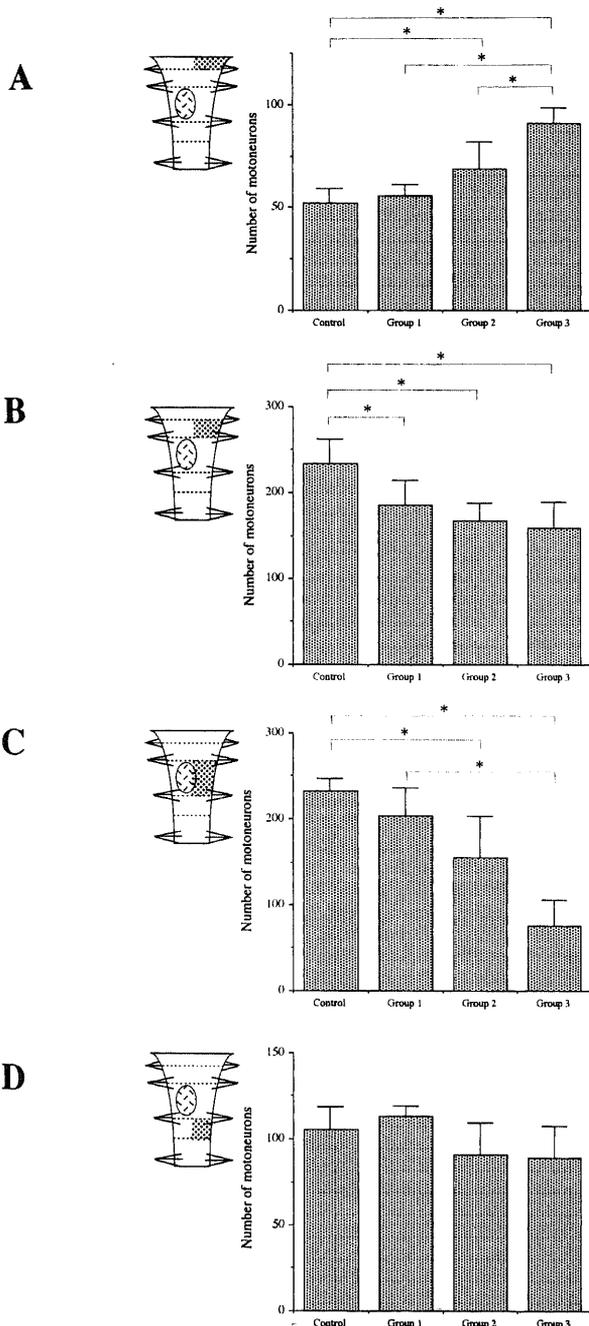


Fig. 8. Number of motoneurons in non-compression side. Refer to the footnotes of Fig. 7.

による頸髄の前方圧迫モデル¹³や硬膜外に接種された腫瘍の発育による脊髄圧迫モデル¹⁴⁻¹⁶などがあり、最近では黄色靭帯内に骨形成因子 BMP (bone morphogenetic protein) を挿入し黄色靭帯骨化を発生させたもの¹⁷や、新生仔ラット頭蓋冠の脊柱管内移植による後方からの脊髄慢性圧迫モデル¹⁸、硬膜外腔に漸次水分を吸収し大きくなる物質 (methyl cellulose-polyacrylonitrile compound) を設置するモデル¹⁹、なども使われている。しかし、いずれも人為的操作が必要であり本来の脊髄の慢性圧迫状態を理想的には反映していない。これまで剖検例以外に脊髄の慢性圧迫状態についてより生理的に観察する手段はなかった。今回用いた遺伝性骨軟骨異常マウス (twy マウス) は、唯一何ら人為的操作を必要としない脊柱靭帯骨化症の自然発症モデルとして知られ、脊髄の慢性圧迫状態をより生理的に観察することが可能となった。

一方、ヒト脊髄の圧迫に関するものでは、CTM や MRI などの脊髄の横断画像から得られる横断面積や、Ono ら¹¹の脊髄扁平率などの各種パラメーターと臨床症状との相関をもとにした研究が散見される。しかし、いずれも3次元的なネットワークを有する脊髄の機能を一脊髄横断面で論じており、これまで脊髄の慢性圧迫状態について3次元的に詳細なる観察を行った報告はない。本実験では twy マウスの脊髄前角細胞に注目し、完全な連続横断切片を作製することにより、また特定の筋肉を支配する前角細胞柱を標識することにより、慢性圧迫による前角細胞の3次元的な局在分布の変化を観察することが可能となっ

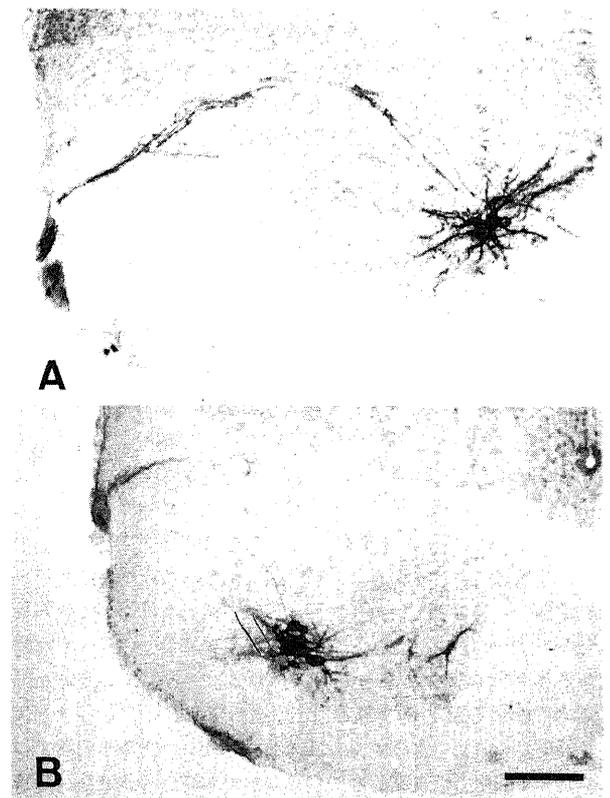


Fig. 9. Photomicrographs of cross section through the C2-C3 segment showing HRP-labeled accessory neurons. (A) Dorsomedial group (Nucleus G2 of Kitamura). (B) Dorsolateral group (Nucleus G6 of Kitamura). TMB-HRP method with a neutral-red counterstain. Scale bar indicate 50 μ m.

た。

本研究では、慢性圧迫が及ぼす細胞構築学^{20)~22)}上の変化として、脊髄残余面積が70%までの圧迫では、片側性の後方圧迫を吸収するように圧迫側において前角の鈍化および前角幅と後角幅の増大が発生し、逆に非圧迫側では前角の鋭化と幅の縮小を認めた。これは圧迫側に比べ非圧迫側において前角細胞の配列の変化が著明である事を示し、圧迫に対し脊髄に発生する contre coup 現象²³⁾の一つと考えられた。すなわち、軽度圧迫例においては圧迫側より非圧迫側の影響が大きいと考えられる。脊髄残余面積が70%以下の中等度および高度圧迫例では、圧迫部において Rexed¹⁹⁾の I, II, III, IV層に相当する後角の各層の面積の狭小化とその物尾側部での拡大化を認めるようにな

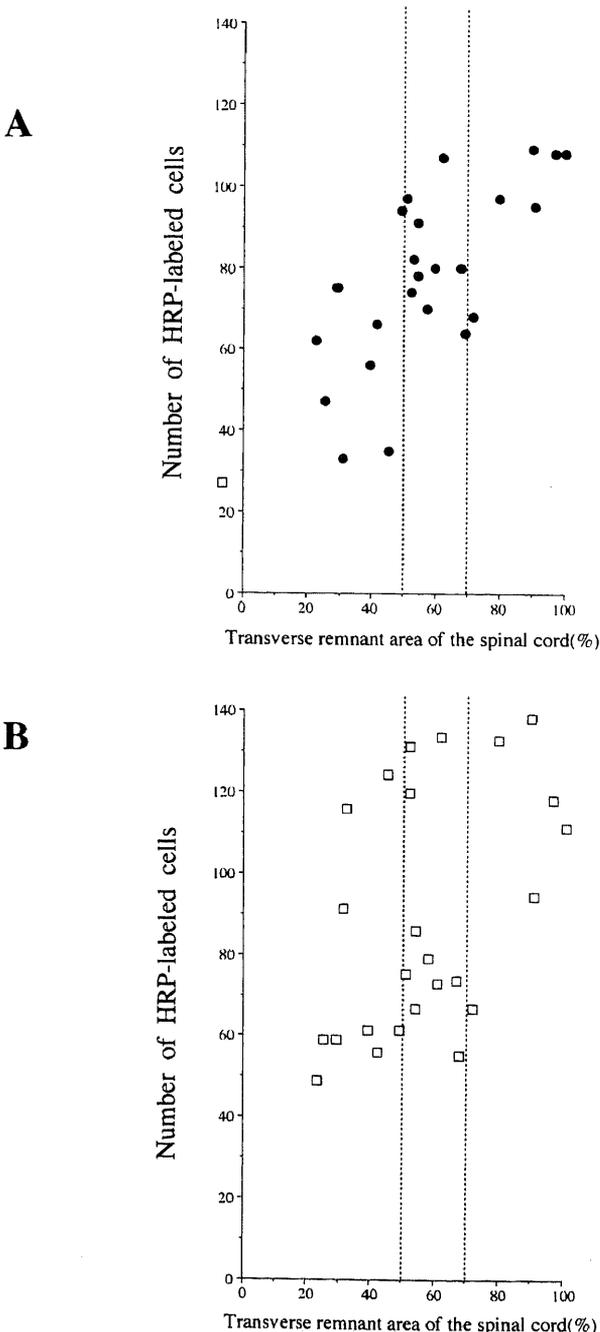


Fig. 10. Relationship between transverse remnant area of the spinal cord (%) and total number of HRP-labeled cells. (A) Compression side. (B) Non-compression side.

る。圧迫部での各層の狭小化は、臨床的には脊髄が慢性的に後方より圧迫を受ける頸椎黄色靭帯石灰沈着症や骨化症などにおいて、上肢の筋萎縮や筋力低下などより知覚障害が初発症状として多いことに関係していると思われる。さらに、圧迫部の物尾側での各層の拡大は、各々が物尾側に偏位するものと考えられ、脊髄の持つ柔軟性を示す証拠の一つと考えられた (図 12)。

脊髄は、慢性圧迫に対しどれだけ耐えられるのか? 本実験では脊髄面積と総前角細胞数との間にS字曲線の関係が得られ、脊髄残余面積が70%以上の圧迫では前角細胞は圧迫に耐え、前角細胞数は不変であるが、70%以下になると前角細胞数が減少し始め、さらに50%以下となると圧迫部の前角細胞数は、底をつき格好で一定となるものと考えられた。脊髄の機能およびその可逆性は、圧迫部の物尾側を含めた前角細胞数によく相関すると考えられる。

圧迫を受けた前角細胞の3次元的局在の変化をみてみると、脊髄残余面積が70%以下の圧迫例では、圧迫部の前角細胞数は減少するが、圧迫部の最物尾側前角細胞数は増加した。この最物尾側の前角細胞数の増加は、圧迫部から偏位移動したものと考えられ、脊髄の長軸方向への柔軟性を示すものである。

本研究では、圧迫に対して前角細胞がどのように対応し、局在分布が如何に変化するのかを副神経脊髄核の細胞柱を逆行性に機能的に標識し観察した。本実験で注目した twy マウスの圧迫は第2, 3頸髄に自然に発生するが、同じ高位に存在する副神経脊髄核に着目し、筋内注入の容易な胸骨乳突筋から逆行性に機能的に標識した。副神経脊髄核は頸神経根と異なり各細胞から出た線維は弧を描き脊髄外側面の後根と前根の間から出て神経幹となり、歯状靭帯の背側を上行し、大孔を通過して一度頭

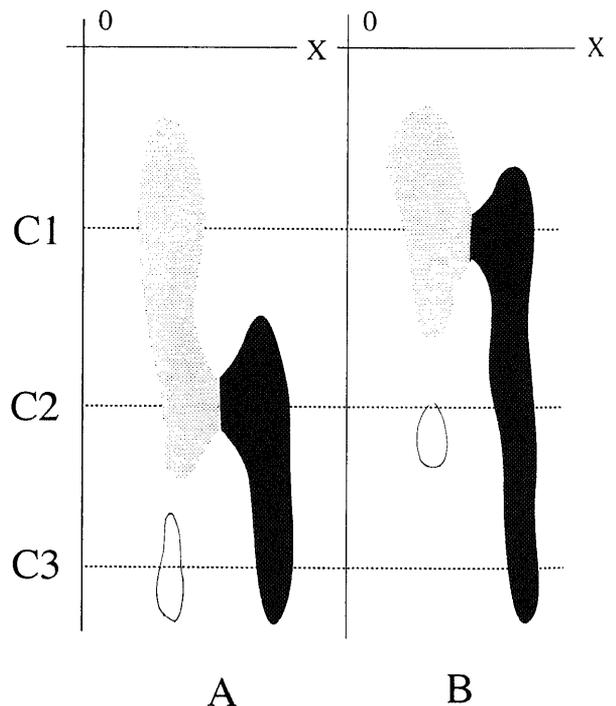


Fig. 11. Diagram of the dorsal view, through the segments from C1 to C3, of the medial column (dark area) and lateral column (black area) of the spinal accessory nucleus. (A) Control. (B) A twy mouse, TRAS=49.4%.

蓋腔に入りその後頸静脈孔から出る。すなわち、胸骨乳突筋に注入された HRP は逆行性に大孔から脊髄軟膜下を下行する^{24,25)}ため、圧迫部より物側部では副神経脊髄核は直接圧迫されず、圧迫部より物側における副神経脊髄核の HRP 陽性細胞の分布の変化は、圧迫により直接障害されることはなく、圧迫に対する物側部の影響を純粋に反映する。ラットの上位頸髄に存在する前角細胞群の中で副神経脊髄核は、解剖学領域ですでに報告されている^{25)~27)}。今回得られた HRP 陽性細胞群の分布は、北村の報告^{25,27)}と異なって第3頸髄より尾側では、再び第1群に相当する内側細胞群を認めた。以上の陽性細胞の分布から、ラットとマウスに差はあるが北村の報告に照らし合わせると、標識された HRP 細胞は胸骨乳突筋を支配するものが大部分であるが、一部鎖骨乳突筋を支配する細胞も標識された可能性がある。また、丁度圧迫レベルである第2頸髄後根と第3頸髄後根部の中間部で、脊髄前角の内側から外側へと細胞分布が移行しており、これら内外側の細胞分布の変化をとらえることにより脊髄の圧迫状態を3次元的に観察する事が可能であった。脊髄残余面積が70%以下の圧迫では内側細胞柱および外側細胞柱の物側偏位を認め、特に第6群に属する外側細胞柱の

物側部出現の物側化と内側細胞柱の陽性細胞の増加を認めた。すなわち、圧迫により本来の機能を有する前角細胞の分布が一連の連絡を保ちながら物側に偏位することがわかった。このことは、圧迫部の病理組織像で見られる前角細胞の消失という所見は、本来のレベルに存在すべき前角細胞の物側側への偏位を見ている可能性があると考えられた。また、このことは、臨床例における脊髄のもつ慢性圧迫に対する柔軟性や耐久性を示唆するものであり、術後の神経症状の回復をもたらす脊髄機能の可逆性に関与する重要な現象と考えられた。

一方、圧迫部より尾側部においては、第4頸髄以下は頸膨大に相当し極端に細胞数が増加するため、たとえ前角細胞数が増加しようとも誤差に含まれる危険性があり、本研究では第3頸髄までの検討を行った。しかし、圧迫より尾側部の前角細胞数と圧迫の程度のあいだには有意差がなく、圧迫による前角細胞はほとんどが物側に移動したものと考えられた。このことは頭頸移行部から上位頸椎にかけての後彎と後方からの腫瘤による圧迫の方向によると考えられた。

脊髄は力学的に柔らかく脆いものである。富永²⁸⁾は新鮮牛の下位頸髄を用い、脊髄横断面の力学的性質と力学的強度について検討した結果、脊髄の弾性係数は0.6Kg/cm²と非常に柔らかく弾性に富み、さらに、灰白質は白質に比して非常に柔らかく脆いことを報告した。病理学的に脊髄の柔軟性を証拠づける2つの興味ある現象、即ち円錐状軟化 (pencil-shaped softening)²⁹⁾と練り歯磨き様アーチファクト (toothpaste artifact)³⁰⁾が報告されている。前者は、硬膜外転移巣による脊髄圧迫、脊髄損傷、癒着性くも膜炎、髄内腫瘍、脳死症例などにまれに見られ、後索の腹側部や後角に壊死物質を内容とする空洞が上下長軸方向へ広がる現象をいう。これは脊髄内に発生する循環障害と二次的な機械的圧迫による結果と考えられている。後者は平野³⁰⁾により提唱され、髄内腫瘍や脊髄梗塞などの脊髄標本を摘出する際、機械的な圧迫が生じて人工的に脊髄実質が上下に広がるように破壊されるという現象である。いずれも正常組織でなく壊死組織による長軸方向への病変の広がりであるが、脊髄は横断面だけでなく長軸方向へも柔軟性を有することを示唆するものである。

本実験で得られた慢性圧迫に対する前角細胞の物側偏位は脊髄の長軸方向への柔軟性を現すものである。すなわち、脊髄は漸増慢性圧迫に対しあたかも“練り歯磨き”のごとく柔軟性を示し、従来から論じられている横断面での変形のほか、長軸方向へも偏位する柔軟性を示した。1990年第63回日本整形外科学会シンポジウムで脊髄の可塑性が論じられた。現在のところ脊髄が慢性圧迫に対してどうして如何なる耐久性を有するのか、また除圧手術後に如何に症状が改善するのか、それらのメカニズムについては殆ど解明されていない。そこには、記憶や学習といった中枢神経系におけるシナプスの促進と発芽 (sprouting) のような可塑性が脊髄にも存在する可能性が考えられている^{31,32)}。本研究は慢性圧迫に対する脊髄の可塑性について特定の筋内に HRP を注入し、前角細胞レベルから検討したが、発芽などの存在までは証明できなかった。今回示された“練り歯磨き現象 (toothpaste phenomenon)”は、神経解剖学的用語である脊髄の可塑性を意味するものではなく、脊髄の機械的な柔らかさ、すなわち慢性圧迫に対する脊髄の柔軟性や術後の臨床症状の改善など脊髄機能の可逆性を神経解剖学的に説明する一機序と考えられる。

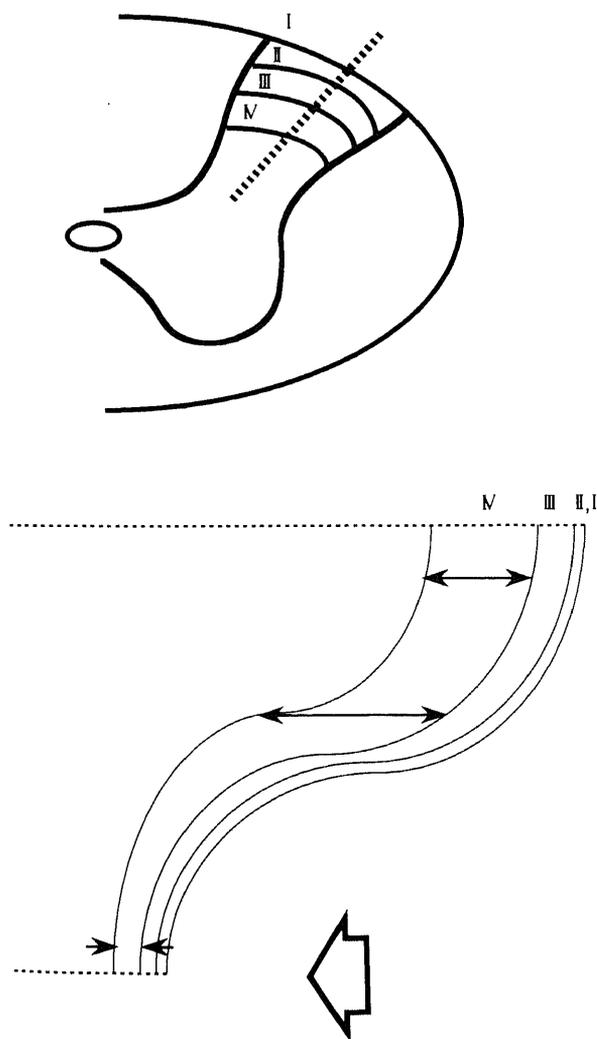


Fig. 12. Schematic diagram of Rexed's laminar structure of the posterior horn on sagittal view. Open black arrow indicates compressed site. Top is rostral part.

結 論

脊髄慢性圧迫の自然発症モデルである遺伝性骨軟骨異常マウス (twy マウス) を用い、脊髄の圧迫の程度と前角細胞の分布についての研究を行い、以下の結論を得た。

1. 錐体交叉から第3頸髄に至る脊髄に存在する前角細胞総数はS字状曲線的に減少し、脊髄残余面積が70%以上の圧迫では未だ前角細胞は圧迫に耐え前角細胞数は不変であるが、70%以下になると前角細胞数が減少し始め、さらに50%以下となると圧迫部の前角細胞数は底をつく格好で一定となるものと考えられた。

2. 前角細胞数の減少は主として圧迫部において細胞数が減少するためであり、脊髄残余面積が70%未満50%以上の圧迫では、圧迫部の前角細胞数は正常対照群 233 ± 14.1 個 ($n=10$) に対し、 112 ± 63.0 個 ($n=11$) と有意に減少した ($p<0.05$)。しかし、同時に最吻側部に存在する前角細胞数は、正常対照群 52.4 ± 6.98 個 ($n=10$) に対し 76.4 ± 14.7 個 ($n=11$) と有意に増加した ($p<0.05$)。さらに、脊髄残余面積が50%以下では、圧迫部の前角細胞数が 51.3 ± 26.3 個 ($n=8$)、最吻側部 93.0 ± 16.8 個 ($n=8$) と著明な細胞数の増加を認めた ($p<0.05$)。

3. 慢性圧迫に対する脊髄の細胞構築学的変化は、脊髄残余面積が70%以下の圧迫では Rexed のⅢ,Ⅳ層に著明であり、これら背側の各層は圧迫部において縮小消失を認め、圧迫の吻尾部において拡大を認めた。これは、脊髄残余面積が70%以下の圧迫では、圧迫現象に対して脊髄が圧迫平面で対応できなくなり、背側各層の細胞が吻尾側へ偏位移動した結果と考えられた。

4. 副神経脊髄核の細胞柱は、圧迫により吻側に持ち上げられたように一連の連続性を保ちながら分布の偏位を認めた。

以上より、慢性圧迫状態における脊髄の“練り歯磨き”様の柔軟性を認めた。また、この“練り歯磨き現象 (toothpaste phenomenon)”は慢性圧迫状態における脊髄の柔軟性や脊髄機能の可逆性を保つ一つの機序と結論した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました整形外科教室富田勝郎教授に深甚の謝意を捧げます。また直接御指導を賜りました金沢大学解剖学第3講座工藤基教授、福井医科大学整形外科教室馬場久敏助教授、ならびに多大なるご協力を戴きました金沢大学整形外科教室川原範夫講師、中橋謙次先生はじめ脊椎班の諸先生方に深謝致します。さらに、統計学的処理について御指導を戴きました金沢大学医学部衛生学教室橋本和夫教授に深謝致します。最後に、本研究の遂行に当たり、御協力を戴きました金沢大学解剖学第3講座中谷瀬治技官に感謝の意を表します。

尚、本論文の要旨は第76, 77回中部日本整形外科学会 (1991, 名古屋, 1991, 福井), 第26回日本パラプレジア医学会 (1991, 東京) および第7回日本整形外科学会基礎学術集会 (1992, 東京) において発表した。

文 献

- 1) Ono, k., H., Tada, K. & Yamamoto, T.: Cervical myelopathy secondary to multiple spondylotic protrusions: a clinicopathologic study. *Spine*, 2, 109-125 (1977).
- 2) 見松健太郎, 中川武夫, 川上紀明, 斎藤晴彦, 原田 敦, 矢崎 進, 村松哲雄, 加藤文彦, 佐藤公治: 頸髄症の予後推定の試み—多変量解析法を用いて. *整形外科*, 42, 1576-1582

(1991).

- 3) 黒佐義郎, 四宮謙一, 佐藤良治, 淵岡道行, 兵藤恭彰, 古屋光太郎, 山浦伊姿吉: 頸椎後縦靭帯骨化症の予後に関する脊髄横断面形態の分析. *日整会誌*, 62, S1459 (1988).
- 4) Fujiwara, K., Yonenobu, K., Ebara, S., Yamashita, K. & Ono, K.: The prognosis of surgery for cervical compression myelopathy. *J. Bone Joint Surg [Br.]*, 71-B, 393-398 (1989).
- 5) Fujiwara, K., Yonenobu, K., Hiroshima, K., Ebara, S., Yamashita, K. & Ono, K.: Morphometry of the cervical spinal cord and its relation to pathology in cases with compression myelopathy. *Spine*, 13, 1212-1216 (1988).
- 6) 広島和夫, 藤原桂樹: 慢性圧迫性脊髄症の病理組織変化について. *日獨医報*, 30, 510-520 (1985).
- 7) 細田泰弘: 遺伝性骨・軟骨・関節異常症 (twy マウス). 疾患モデル動物ハンドブック No.2 (川俣順一, 松下 宏編), 211-215 頁, 医歯薬出版, 東京, 1982.
- 8) 細田泰弘: twy マウス遺伝性関節炎. 難治疾患のモデルと実験動物 (京極方久編), 111-121 頁, ソフトサイエンス社, 東京, 1984.
- 9) 伊藤和夫: HRP の順行性, 逆行性標識. *生体の化学*, 36, 360-362 (1985).
- 10) Mesulam M. M.: Tetramethylbenzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem, Cytochem.*, 26, 106-117 (1978).
- 11) 北村清一郎, 境 章, 西口隆彦: ラット頸髄前角細胞の分類に関する細胞構築学的研究. *阪大歯学雑誌*, 25, 186-202 (1980).
- 12) Rexed, B.: A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 100, 297-379 (1954).
- 13) Hukuda, S. & Wilson, C. B.: Experimental cervical myelopathy: effect of compression and ischemia on the canine cervical cord. *J. Neurosurg.*, 37, 631-652 (1972).
- 14) Rubin, P.: Extradural spinal cord compression by tumor. *Radiology*, 93, 1243-1248 (1969).
- 15) Usino, Y., Posner, R., Posner, J. B. & Shapiro, W. R.: Experimental spinal cord compression by epidural neoplasms. *Neurology*, 27, 422-429 (1977).
- 16) 泉田 誠, 松井宣夫, 藤吉文規, 野尻 肇, 大塚隆信, 加藤泰治, 亘 弘: 354A腫瘍によるラット脊髄慢性圧迫モデルにおける脊髄誘発電位の検討. *日整会誌*, 65, S1025 (1991).
- 17) 斎藤晴彦, 岸 精一, 佐藤公治, 見松健太郎, 三浦隆行, 橋詰良夫: 家兎に BMP を用いて作成した慢性脊髄圧迫モデルにおける脊髄障害について. 脊柱靭帯骨化症調査研究班平成元年度研究報告書, 27-31 (1989).
- 18) 大浦晴夫, 玉置哲也, 松浦伸一, 吉田宗人, 島 欣也: 新生仔ラット頭蓋冠の脊柱管内移植による脊髄漸増圧迫モデル作成の試み. 脊柱靭帯骨化症調査研究班平成2年度研究報告書, 53-56 (1990).
- 19) Arbit, E., Galicich, W., Galicich, J. H. & Lau, N.: An animal model of epidural compression of the spinal cord. *Neurosurg.*, 24, 860-863 (1989).

- 20) McClung, J. R. & Castro, A.: Rexed's laminar scheme as it applies to the rat cervical spinal cord. *Exp. Neurol.*, **58**, 145-148 (1978).
- 21) Steiner, T. J. & Turner, L. M.: Cytoarchitecture of the rat spinal cord. *J. Physiol (London)*, **222**, 123p-124p (1972).
- 22) Brichta, A. M. & Grant, G.: Cytoarchitectural organization of the spinal cord. *In* G. Paxinos (ed.), *The rat Nervous System*, 1st ed., p293-300, Academic press, Australia, 1986.
- 23) Elsberg, C. A. & Stookey, B.: The mechanical effect of tumors of the spinal cord. *Arch. Neurol. Psychiat.*, **8**, 504-514 (1922).
- 24) 熊木克治: 頸神経と副神経線維解析に基づく形態学的考察. *解剖学雑誌*, **45**, 311-344 (1970).
- 25) 北村清一郎: Horseradish peroxidase (HRP) 法によるラット胸鎖乳突筋ならびに僧帽筋支配運動神経の局在に関する研究. *阪大歯学雑誌*, **26**, 295-315 (1981).
- 26) Brichta, A. M., Callister, B. J. & Peterson, E. H.: Quantitative analysis of cervical musculature in rats: Histochemical composition and motor pool organization. I. Muscles of the spinal accessory complex. *J. Comp. Neurol.*, **225**, 351-368 (1987).
- 27) Kitamura, S. & Sakai, A.: A study on the localization of the sternocleidomastoid and trapezius motoneurons in the rat by means of the HRP method. *Anat. Rec.*, **202**, 527-536 (1982).
- 28) 富永積生: 頸部脊椎骨軟骨症における脊髄症の発生機序に関する実験的ならびに臨床的研究. *Arch. Jap. Chir.*, **42**, 124-147 (1973).
- 29) Hashizume, Y., Iijima, S. & Hirano, A.: Pencil-shaped softening of the spinal cord. *Acta Neuropathol (Berl)*, **61**, 219-224 (1983).
- 30) 平野朝雄: 神経病理を学ぶ人のために. (平野朝雄編), 第2版, 6頁, 医学書院, 東京, 1986.
- 31) Lahr S. P. & Stelzner D. J.: Anatomical studies of dorsal column axons and dorsal root ganglion cells after spinal cord injury in the newborn rat. *J. Comp. Neurol.*, **293**, 377-398 (1990).
- 32) Bernstein, D. R. & Stelzner, D. J.: Plasticity of the corticospinal tract following mid-thoracic spinal injury in the postnatal rat. *J. Comp. Neurol.*, **221**, 382-400 (1983).

Neurohistological Study of Chronic Compression of the Spinal Cord using the Tiptoe Walking Yoshimura (twy) Mouse Yasuhisa Maezawa, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **102**, 575—585 (1993)

Key words spinal cord, horseradish peroxidase, twy mouse, motoneuron, cytoarchitecture

Abstract

To investigate spinal cord elasticity under chronic compression experimentally, possible structural defects in the spinal cord were studied using the tiptoe walking Yoshimura (twy) mouse, an animal model of ossification of the ligamentum flavum. In the twy mouse, wheat germ agglutinin horseradish peroxidase (WGA-HRP) was injected into the sternomastoid muscle. Two or three days later, the mice were deeply anesthetized and perfused with 8% formalin transcardially. Most of the spinal cords extracted vertically from the spinal canal, had marked posterior compressions between C2 and C3 level due to calcification of the posterior atlanto-axial ligament. The cervical cord segments (C1-C3) were cut into serial transverse sections 50 μ m thick on a frozen microtome. Immediately after the sections, alternate sections were serially mounted on glass slides and treated for HRP histochemistry with tetramethyl benzidine (TMB), while the remaining ones were stained with cresyl violet (Nissl stain). The relationship between the total number of motoneurons counted in the Nissl stained preparations and the magnitude of compressions, demonstrated three phases; the number of motoneurons showed very little or no change under light compression (over 70% in the transverse remnant area of the spinal cord (TRAS)), a positive linear correlation in cases of moderate compression (between 70% and 50% in TRAS), and a fixed minimum number in cases of severe compression (below 50% in TRAS). The distribution pattern of the accessory motoneuron pools, which were retrogradely labeled with WGA-HRP injected into the sternomastoid muscle, suggested that the motoneurons do migrate rostrally from the site of compression showing a "toothpaste"-like movement. This "toothpaste"-like movement strongly suggests pathoelasticity of the spinal cord under chronic compression.