ラット頸椎症性脊髄症モデルにおける除圧術後の経時的頸髄血流量増加

Spinal Cord Blood Flow Augmentation in Decompressive Surgery Using a Cervical Spondylotic Myelopathy Rat Model

山本慎司^{*1} 黒川 龍^{*2} 金 彪^{*2}Shinji Yamamoto, M.D.^{*1}, Ryu Kurokawa, M.D.^{*2}, Phyong Kim, M.D., Ph.D.^{*2}

目 的

頸椎症性脊髄症や後縦靱帯骨化症などの脊髄慢性圧迫障害の病態生理として、繰り返す機械的圧迫による脊髄微細損傷と慢性圧迫に伴う脊髄実質の循環障害が挙げられる。脊柱管拡大手術などによる脊髄圧迫解除にて脊髄実質内灌流が改善し、神経機能が回復するメカニズムが推測されてきたが、それを実証するデータは非常に乏しい。今回、ラット頸椎症性脊髄症モデルを用い、慢性圧迫脊髄の除圧手術後の脊髄血流量の経時変化を蛍光マイクロスフェア法にて測定し、病態解析を行った。

方 法

本研究は、獨協医科大学実験動物委員会の手続きを得て実施した。急性脊髄障害をきたすことなく、ヒトの頸椎症性脊髄症と同じ慢性進行性の病態経過をたどるラット頸椎症性脊髄症モデル¹⁻³⁾を使用した。12~14週齢、体重250~300gの雄性Wistarラットを購入後、実験終了まで回転式自動運動量測定器(SN451; Shinano Manufacturing, Tokyo, Japan)内で自由に水と餌が与えられる状態で、室温23℃の空調管理下に12時間ごとに照明を調整する専用飼育室にて飼育した。実験期間中は週1回の体重測定と自動運動量測定に加え、週2回のロータリーロード(SN445; Shinano Manufacturing, Tokyo, Japan)を用いた強制運動能力測定と、デジタルフォースゲージ(FGP-0.5, Nippondensan Simpo Inc., Kyoto, Japan)を用いたMeyer法による各前脚握力測定を行った^{1,2)}。前者では回転ローター(直径90mm, 10rpm)上で落下せずに走り続けられる時間を測定し、カットオフ値は300秒

に設定し、最長時間を測定値とした。後者ではラットを興奮させることなく慎重に四肢体幹を保持し、片側の前脚でデジタルフォースゲージに接続されたワイヤー(直径1.0mm)を把持させた後、緩徐に水平後方へ引き、把持できなくなった時点の最大張力を測定し、休息を交えて測定した5回の値の平均を握力測定値とした。強制運動能力測定値、両前脚握力測定値ともに週2回の平均値をその週の測定値とした。

飼育開始後3週間は、環境への適応と各種運動機能測定の訓練を行い、その後にモデル作成手術を実施した。1%イソフルレン吸入による全身麻酔導入後、加温パッド上で直腸温を37.5℃に保ち、自発呼吸下に0.5~1.0%イソフルレンをマスク投与し麻酔を維持した。後頸部を切開し手術用顕微鏡下にC5-6の椎弓を露出後、黄色靱帯を切除し、髄液漏を生じないように硬膜を露出した。脊髄損傷をきたさないようにC5-6椎弓下の硬膜外腔に3×5×0.7mmの吸水膨張性ポリマー(Aquaprene C, Sanyo Chemical Industries, Kyoto, Japan)を慎重に留置し、創部を閉鎖した。コントロール群はポリマーを留置後ただちに除去し、創部を閉鎖した(sham手術)。留置した薄いポリマーは48~72時間かけて体積が約230%まで緩徐に膨張し、その後も収縮することなく安定し、急性脊髄障害をきたすことなく脊柱管狭窄状態を形成する。本モデルは体重や自動運動量の低下をきたすことなく、両前脚握力が術後7~8週より、強制運動能力が術後17週より進行性に低下する。組織学的にも炎症反応を誘発せず、圧迫部位において進行性の前角運動ニューロンの脱落と空胞形成、脱髄を生じ、頸椎症性脊髄症の

^{*1} 大西脳神経外科病院脳神経外科/Department of Neurosurgery, Ohnishi Neurological Center

連絡先: 〒674-0064 明石市大久保町江井島1661-1 大西脳神経外科病院脳神経外科 山本慎司 [Address reprint requests to: Shinji Yamamoto, M.D., Department of Neurosurgery, Ohnishi Neurological Center, 1661-1 Eigashima, Okubo-cho, Akashi-shi, Hyogo 674-0064, Japan]

^{*2} 獨協医科大学脳神経外科/Department of Neurologic Surgery, Dokkyo University Hospital

病態をよく再現する^{1,2)}。また、黒川ら³⁾は、蛍光マイクロスフェア法を用い、術後12週でのC5-6圧迫脊髄の血流量低下を報告している。

48匹のラットを無作為に頸椎症性脊髄症モデル群24匹とコントロール群24匹に振り分け、それぞれモデル作成手術とsham手術を行った。強制運動能力、両前脚握力の経時変化で頸髄症の発症を確認し、モデル作成手術から9週後にC5-6椎弓切除術に伴う経時的脊髄血流量測定と組織学的評価を実施した。暗室内で1%イソフルレン吸入による全身麻酔導入後、直腸温37.5℃管理、気管切開人工呼吸管理下に、右総頸動脈に動脈圧測定および蛍光マイクロスフェア投与用のポリエチレンチューブを挿入し、右大腿動脈に動脈血採取用のポリエチレンチューブを留置した。血流量測定開始前に動脈血ガス分析を行い、補液、平均血圧70 mmHg維持下に、右総頸動脈に留置したチューブを一時的に左心室内へ進め、約 5×10^5 個の直径15 μm 蛍光マイクロスフェアを左心室経由で投与し、動脈血中の蛍光マイクロスフェア数計測のために右大腿動脈から0.5 ml/minの速度で機械式採血を実施した。その後、腹臥位へ体位変換し、手術用顕微鏡下にハイスピードドリルを用いて慎重にC5-6椎弓切除を行い、頸椎症性脊髄症モデル群では硬膜外腔に留置したポリマーも脊髄損傷をきたさないように除去した。創部を閉鎖後、ふたたび仰臥位へ体位変換し、椎弓切除15分後、60分後、120分後に色調の異なる蛍光マイクロスフェアを同様に左心室経由で投与し、動脈血採取も行った。灌流固定後に脳幹～上位胸髄を摘出し、48時間の冷所暗室固定後に全工程を暗室内で非有機溶媒使用下にパラフィン包埋した。各群12匹は圧迫部位であるC5-6レベルにおいて5 μm 厚の連続切片を作成し、HE染色後に脊髄扁平率とC5-6レベル3 mm長における前角運動ニューロン総数を計測し^{1,2)}、残りの各群12匹は15 μm 厚の連続切片を暗室内で作成し (Fig. 1)、脳幹、C1-2、C3-4、C5-6、C7-T1分節ごとに各3 mm長にわたり蛍光マイクロスフェア数、体積、固定とパラフィン包埋による組織収縮率を測定し、測定された動脈血中の蛍光マイクロスフェア数とともにDe Visscherら⁴⁾の方法を用いて組織血流量を算定した。各計測値は平均値 $\pm$ 標準誤差(mean $\pm$ SEM)で表示し、各検討項目に関してはone-way ANOVAを用いて検定し、 $p < 0.05$ にて統計学的有意とした。

結 果

観察期間中、コントロール群と頸椎症性脊髄症モデル群間に、体重、自動運動量、強制運動能力に有意差を認

Fig. 1

Microphotograph of unstained rat spinal cord paraffin section having a thickness of 15 μm . Blue epi-illumination provides a clear visualization of histological structures of blue/yellow/yellow-green/red colored fluorescent microspheres of 15- μm diameter.

めなかった。両前脚握力はコントロール群では経時的変化を認めなかったが、頸椎症性脊髄症モデル群は術後6週日以降、左右とも進行性の低下を認めた。

モデル作成9週後の除圧手術における術中平均血圧、動脈血ガス分析での PaCO_2 濃度、 PaO_2 濃度、血中ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値は両群間に有意差を認めなかった。

組織学的検討では、コントロール群と比較し頸椎症性脊髄症モデル群では著明な扁平化とC5-6前角運動ニューロン数の有意な低下($2,392 \pm 78$ vs $1,752 \pm 54$ cells, $p < 0.05$)を認めた。脊髄実質内に炎症所見は認めなかったが、軽度の空胞変性や脱髄所見を認めた。

コントロール群の脳幹血流量は 31.2 ± 4.6 ml/min/100 g、頸髄血流量は約25 ml/min/100 gで、頸髄部位別の血流量に有意差は認めず、C5-6椎弓切除術後も全部位で有意な経時変化を認めなかった。

頸椎症性脊髄症モデル群の脳幹血流量は 32.5 ± 5.4 ml/min/100 g、圧迫部位であるC5-6脊髄血流量 20.8 ± 3.7 ml/min/100 gで、その他の頸髄部位の約25 ml/min/100 gと比較し、有意な低下を認めた。除圧術後、C5-6脊髄血流量は経時的に増加し、60分後には 29.4 ± 5.6 ml/min/100 g、120分後には 34.5 ± 4.8 ml/min/100 gまで著明に増加した。統計学的有意差は認めなかったが、隣接するC3-4レベルにもC5-6椎弓切除後に軽度の脊髄血流量の増加を認めた。

考 察

頸椎症性脊髄症は、繰り返す機械的微細損傷と慢性微小循環障害の結果、前角運動ニューロンの脱落と灰白質

を中心とした空胞形成、白質における脱髄と軸索腫脹が進み、臨床的には無症状の期間を経た後に四肢筋力低下、協調運動障害、感覚障害、膀胱直腸障害が出現、進行する。本実験でも頸椎症性脊髄症モデル群では、モデル作成6週後より進行性両前脚握力低下を認め、9週後のC5-6圧迫部位における前角運動ニューロン数はコントロール群と比べ約27%減少し、灰白質空胞化や脱髄変化の出現も確認され、実際の頸椎症性脊髄症の経過をよく再現している。

臨床的に脊髄血流量を非侵襲的に測定することが困難なため、諸家より動物モデルで水素クリアランス法やRIなどを用いて脊髄血流量が測定、報告されてきたが、使用モデル、測定手法、測定部位の相違により、算定された正常頸髄血流量も23.7~61.1 ml/min/100 gと非常に幅が大きい。本実験では、マイクロスフェア法を用いることで測定前に脊髄へ侵襲的操作を加えることなく、全身麻酔人工呼吸器管理にて血圧や血液ガス濃度を安定化した状態にて測定した結果、頸椎症性脊髄症群とコントロール群とも脳幹血流量は約32 ml/min/100 g、圧迫部位以外の頸髄血流量は約25 ml/min/100 gであった。血流量測定結果の信頼性を担保するためには、測定組織内に十分量のマイクロスフェアが存在することが必要であるが、ラット頸髄の体積が非常に小さく、血圧低下などの全身反応をきたすことなく投与可能なマイクロスフェア量に限りがあるため、本研究では白質と灰白質を区別せず分節ごとの血流量測定としたが、両群ともほぼ合致した値であり、従来の報告と比較しても妥当な結果であった。

圧迫性脊髄障害の病態解明目的に、圧迫脊髄の血流量も測定、報告されてきたが、多くは胸髄急性圧迫モデルでの報告で、頸髄慢性圧迫モデルの測定報告もごく少数存在するが、用いたモデルの頸髄障害の程度が不均一で測定個体数も非常に少なく信頼性に乏しい。本実験では、コントロール群のC5-6脊髄血流量が約25 ml/min/100 g、頸椎症性脊髄症モデル群のC5-6脊髄血流量が約20 ml/min/100 gと、約20%の低下を認めた。今回の実験では、モデル作成手術から9週後における圧迫脊髄の血流量低下を実証したが、実際には圧迫開始後から生じる血流量低下の程度は一様ではなく、脊髄圧迫の程度、微小循環障害持続による血管床の変化、白質灰白質量の体積変化、脊髄萎縮の程度などにより脊髄血流量は変化していると考えられる。測定時期による血流量の推移に関しても、神経症状の推移や組織学的変化と合わせ、今後の追加検討が必要である。

慢性圧迫頸髄に対する除圧術後の頸髄血流量変化に関

し、Harkeyら⁵⁾が動物モデルに対し水素クリアランス法を用いて測定しているが、測定個体数が少なく、圧迫前の脊髄血流量が約9 ml/min/100 gと著しく低く、血流量測定のための頸髄侵襲的操作による脊髄圧迫後の脊髄血流量上昇反応などを認めるものの、統計学的有意差を認めないが除圧に伴う脊髄血流量の一過性血流量上昇を報告している。われわれの実験では、測定前に脊髄に侵襲を加えることなく血圧や循環血液量などの全身状態が安定した状態で測定し、除圧後120分までの測定であるが、圧迫部位のC5-6脊髄血流量は継時的に増加し、それに関連し隣接するC3-4脊髄血流量もわずかな上昇反応を認め、除圧に伴う継時的血流量増加反応を実証した。さらに、圧迫中心部位は経時的脊髄血流量の上昇が続き、過灌流とも考えられる著しい血流量増加反応も認めた。これらの血流変化が術後の神経機能の回復に加え、C5 palsyなどの周術期一過性脊髄機能障害に関係している可能性も考えられた。

結 語

頸髄慢性圧迫により頸髄実質の血流量は有意に低下し、炎症反応をきたすことなく前角運動ニューロンの脱落と空胞変性が出現し、進行性の運動機能低下をきたした。頸髄慢性圧迫状態を解除することで圧迫脊髄の血流量の回復と継時的な上昇変化が得られ、これらの血流変化が術後の脊髄機能回復に関与している可能性が示唆された。

利益相反の開示

本論文に関連し、関連すべきCOI関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) Kim P, Haisa T, Kawamoto T, et al : Delayed myelopathy induced by chronic compression in the rat spinal cord. *Ann Neurol* 55 : 503-511, 2004
- 2) Yamamoto S, Kurokawa R, Kim P : Cilostazol, a selective Type III phosphodiesterase inhibitor : prevention of cervical myelopathy in a rat chronic compression model. *J Neurosurg Spine* 20 : 93-101, 2014
- 3) Kurokawa R, Murata H, Ogino M, et al : Altered blood flow distribution in the rat spinal cord under chronic compression. *Spine* 36 : 1006-1009, 2011
- 4) De Visscher G, Haseldonckx M, Flameng W : Fluorescent microsphere technique to measure cerebral blood flow in the rat. *Nat Protoc* 1 : 2162-2170, 2006
- 5) Harkey HL, al-Mefty O, Marawi I, et al : Experimental chronic compressive cervical myelopathy : effects of decompression. *J Neurosurg* 83 : 336-341, 1995