

# 犬の頸椎における隣接椎間障害に関する研究

箱崎 貴治

犬の頸椎における隣接椎間障害に関する研究  
(Studies on the adjacent segment disease of the cervical spine in dogs)

箱崎 貴治

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教員： 原 康 教授)

平成 28 年 3 月

## 目次

第1章	序論	1
第2章	犬の頸椎椎間部の疾患における外科処置後の隣接椎間障害の発生状況に関する検討	
2-1	緒言	6
2-2	材料と方法	
2-2-1	対象症例	7
2-2-2	診療記録からのデータの抽出	7
2-2-3	隣接椎間障害の有無についての検討	9
2-2-4	統計学的解析	9
2-3	結果	
2-3-1	群分け	9
2-3-2	DC 群における診療記録の集計結果	10
2-3-3	VF 群における診療記録の集計結果	11
2-3-4	隣接椎間障害の有無についての検討結果	12
2-4	考察	12
2-5	小括	14

### 第3章 犬の頸椎椎間部における外科処置後の生体力学的検討

3-1	緒言	17
3-2	材料と方法	
3-2-1	試験体の収集と作成	18
3-2-2	試験装置	19
3-2-3	試験体モデルの作成	19
3-2-4	試験条件	20
3-2-5	3次元動画計測システム	21
3-2-6	術後評価	21
3-2-7	統計学的解析	21
3-3	結果	
3-3-1	屈曲・伸展方向への曲げ試験	21
3-3-2	左右側屈方向への曲げ試験	22
3-3-3	回旋試験	22
3-3-4	術後評価	23
3-4	考察	23
3-5	小括	27

## 第4章 犬の頸椎固定モデルを用いた頸椎椎間部における隣接椎間障害に関する検討

4-1	緒言	37
4-2	材料と方法	
4-2-1	供試動物	38
4-2-2	モデル犬の作成	38
4-2-3	各実験群の設定	39
4-2-4	術後評価	39
4-2-5	組織の処理方法および組織学的解析	40
4-2-6	免疫組織学的評価	41
4-2-7	統計学的解析	42
4-3	結果	
4-3-1	術後の評価	43
4-3-2	椎間板髄核における組織学的および免疫組織学的評価	43
4-3-3	線維輪における組織学的および免疫組織学的評価	44
4-4	考察	45
4-5	小括	48

第5章 総括	71
謝辞	74
参考文献	75

## 第1章 序論

骨格の中心的存在である脊椎は、脊椎骨が直列に配列したもので、姿勢を維持するだけでなく、多くの関節をもつことにより複雑な動きを可能にしている。また脊椎は脊髄を保護する役割も担っている。獣医学領域において、脊椎の不安定化による異常な動きは、椎間板や椎間関節の退行性変化、または脊髄損傷と関連づけられており、急性の骨折や脱臼、または慢性的な不安定性に対しては、それらを安定化する事を目的として、椎体固定が実施される。椎体固定は椎骨の骨折や脱臼をはじめとし、環軸椎不安定症、椎間板ヘルニア、頸椎脊髄症（ウォブラー症候群）、変性性腰仙椎狭窄症（馬尾症候群）、椎体腫瘍および脊髄腫瘍など様々な症例に適応されるが、いずれの症例においても椎体間に不安定性が生じている場合、もしくは減圧術により不安定性が予測される場合に椎体の安定化を目的として行われる（Fitch RB, 2000; Lemarié RE, 2000）。

小動物神経外科領域において、頸部に発生する代表的な疾患として、犬の頸部椎間板ヘルニア（Cervical intervertebral disc herniation: C-IVDH）および頸部脊椎脊髄症（Cervical spondylomyelopathy: CSM）などが挙げられる。犬の椎間板疾患は最も一般的に遭遇する疾患の1つとして認識されており、発生率は犬に発生するすべての疾病の約2%である（Braund KG, 1981）。中でもC-IVDHは全ての椎間板ヘルニアのおよそ15%を占めている（Braund KG, 1981; Fry TR, 1991; Morgan PW, 1993）。犬の椎間板ヘルニアは、椎間板の変性様式に基づいてHansen I型とII型に分類される。Hansen I型の病変は、一般に3から7歳齢の軟骨異栄養性犬種（Chondrodystrophoid breeds: CDB）で多く認められ、変性および石灰化した椎間板髄核の脊柱管への逸脱を特徴とする。Hansen II型の病変は6から8歳齢の非軟骨異栄養性犬種（Nonchondrodystrophoid breeds: NCDB）で多く認められ、線維輪の背側への膨隆に起因する慢性的な脊髄の圧迫性障害を特徴とする。全ての犬種がC-IVDHに罹患する可能性があるが、小

型犬種,あるいはビーグルやダックスフンドなどの CDB において発症が多い (Dallman M, 1992; Gage ED, 1975). また,罹患部位は第 2, 3 頸椎間 (以下 C2-3 と表す) が最も多く, 尾側ほど頻度は少ない (Fry TR, 1991; Seim HB, 1982). しかし, 中～大型の非軟骨異栄養性犬種においては, 尾側領域での発生が多いと報告されており (Cherrone KL, 2004), 小型の非軟骨異栄養性犬種においては複数椎間で多発しやすい傾向にあることも確認されている (Hakozaki T, 2015). C-IVDH では変性した椎間板が頸髄あるいは脊髄神経根を圧迫することで, 頸部痛, 神経根症状, 四肢の不全麻痺から完全麻痺まで様々な神経症状を示すが, 変性部位や圧迫の程度, 方向により症状は異なる. 上位頸髄が傷害された場合, 呼吸運動, そして全身循環に影響を及ぼす. 特に C5~C7 から分岐する横隔神経, そして胸椎椎間部から分岐する肋間神経上位の傷害は呼吸筋麻痺を誘発し, 受傷動物を死に至らしめる危険性を秘めている.

一方, CSM はドーベルマンやグレート・デンなどの大型犬または超大型犬に好発する脊椎の形成異常に起因した脊髄損傷性疾患である. CSM は椎体の奇形, 関節突起関節の奇形または不整合, そしてそれらの形成異常に起因した多様な病態を伴うことが知られているが, いずれの病態も直接的に, あるいは椎間部の二次的再構築に起因した脊柱管の狭窄により頸部脊髄が圧迫を受けることが特徴的である (Mckee WM, 2002; Seim HB, 1999; Zachary JF, 2006). 形成異常による脊髄圧迫の場合, 生後数ヵ月から 1 歳齢以前の若齢犬に多く認められる (de Lahunta A, 2009). 一方, Hansen II 型の椎間板ヘルニアや黄色靱帯の肥厚などによる動的圧迫は中高齢で多く認められる (Bagley RS, 2005). 発症部位としては C5-6, C6-7 が最も一般的である (Dewey CW, 2008). CSM の臨床徴候は歩行障害で, 多くの場合, 初期には後肢からはじまる (Dewey CW, 2008; Seim HB, 2007; Sharp NJH, 2006). その後徐々に進行し, 前肢の不全麻痺, 四肢での起立困難を経て, 最終的には四肢完全麻痺に至る.

臨床的には C-IVDH そして CSM 罹患症例に対する治療として, 個々の症例の脊髄圧迫の性



格（動のかまたは静的か）に基づいて、腹側減圧術（Ventral slot: VS）または椎体固定術（Vertebral fixation: VF）が適応される（Fitch RB, 2000）。VS は C-IVDH などによる脊髄腹側からの脊髄圧迫病変に対して適用され、この術式は脊髄の減圧だけでなく、椎間板物質の除去も可能であり、迅速に臨床徴候を解消する方法である（Sharp NJH, 2006）。VS 後の椎体の不安定化あるいは亜脱臼は重大な合併症であるが、VS 実施時に VF を併用することで予防することができる（Fitch RB, 2000; Lemarié RE, 2000）。通常、尾側頸椎の病変において、VS 後のスロット幅が椎体幅の 50%に近いときは VF を考慮する必要がある（Lemarié RE, 2000）。しかし、VF 実施後には隣接する椎間部に類似した病変（ドミノ病変）が連続する危険性が指摘されている（Bagley RS, 2005）。

ドミノ病変は、椎間部が固定されることにより隣接する椎間に異常な力学環境が生じ、潜在的な不安定性を悪化させ、椎間板髄核の逸脱や線維輪の肥大化を招くとされている（Bruecker KA, 1989; Seim HB, 1989）。犬において、本来 1 つの椎間部の可動域が大きい頸椎では、椎間部を固定することによる隣接椎間に及ぼす力学的な影響が大きいことが予測される。なお、ドミノ病変に起因した症状の再発は術後 6 ヶ月から 4 年の間に生じると報告されている（Bruecker KA, 1989; Mckee WM, 1999; Rusbridge C, 1998; Seim HB, 1986）。人医療の領域でも頸椎および腰椎の椎体固定後に隣接した椎間部における病変が報告されており、人の頸椎を用いた生体力学的検討においては、固定した部分に隣接した椎間部の圧力または可動性が増加すると報告されている（Eck JC, 2002; Matsunaga S, 1999）。また X 線による臨床研究においても、固定した隣接椎間で動きの増加が観察されている（Baba H, 1993; Shoda E, 1999）。さらに、単一の椎間よりも複数の椎間に対して外科的処置を実施した方が隣接椎間における障害が発生する危険性が低いと報告されており、病変のさらに頭側での椎間における固定の必要性も提案されている（Hilibrand AS, 1999）。しかしながら、犬の頸椎椎間部の可動性に関する情報は乏しく、頸椎椎間部に対して実施する VS や VF が隣接する椎間部の可動性に及ぼす影響については十分に検討

されていない。これまで、頸椎の腹側固定に際しては金属製インプラントとポリメチルメタクリレート (Polymethyl methacrylate: PMMA) を使用した固定法、そして近年では Locking system を備えた Plate を使用した固定法などが報告され、臨床的にも使用されている (Bergman RL, 2008; Danielski A, 2012; Steffen F, 2011; Voss K, 2006)。しかし、Locking system を備えた Plate による固定法に関する生体力学的な検討は少なく、またその両者の固定方法が隣接椎間部の力学的環境に及ぼす影響の差異に関しては比較されていないのが現状である。

椎体固定後の隣接椎間における影響として、椎間板の変性が生じることが報告されている (Bruecker KA, 1989)。椎間板変性は髄核組織におけるアグリカンおよびⅡ型コラーゲン (Type 2 collagen: Col2A1) の減少を特徴とし、水分含有量の減少を伴う (Antoniou J, 1996; Oegema TR, 1993)。そもそも髄核組織は脊索細胞と軟骨細胞様細胞の 2 種類の細胞で構成され、これらの 2 種類の細胞は円形であり、軟骨細胞と類似した形態を呈し、硝子軟骨と組成が似た細胞外基質の中でクラスターを形成している (Horner HA, 2002)。脊索細胞に関しては、加齢に伴い減少し、さらには再生能力を持つことからその減少が早期の変性と相関を示すとされている (Braund KG, 1975; Hansen HJ, 1952)。また、CDB では 1 歳齢までに消失するが、NCDB では中高齢でも存在することが確認されている (Hunter CJ, 2003)。椎間板髄核における細胞外基質に関しては、変性の過程で蛋白分解酵素であるマトリクスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinases: MMPs) の発現が亢進し、Ⅰ型コラーゲン (Type 1 collagen: Col1A1) やⅡ型コラーゲン (Type 2 collagen: Col2A1) 等の細胞外基質の組成が変化する (Le Maitre CL, 2007)。特に変性した髄核においては MMP13 の増加により Col2A1 が減少することが知られている (Itoh H, 2012)。また、椎間の不安定性の増加により炎症反応が惹起され、血管新生に関与している血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の発現量が増加し、それに伴い上流では腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ ) やインターロイキン-1 $\beta$  (Interleukin-1beta: IL-1 $\beta$ ) が、下

流では MMP-10 や ADAM (a disintegrin-like and metalloproteinase) ファミリータンパク質などの炎症性マーカーがそれぞれ増加することが知られている (Lee JM, 2011; Purmessur, 2008)。一方で、変性した線維輪における報告は髄核と比べて非常に乏しく、また犬の頸椎に関する報告はほとんどされていない。

以上より、本研究では犬の頸椎における隣接椎間障害の病態発生の一端を解明することを目的とし、以下に示す第 2 章から第 4 章までの検討を行った。第 2 章では、C-IVDH および CSM 罹患症例において、外科的処置後の隣接椎間障害の発生状況を把握することを目的として、C-IVDH 罹患症例および CSM 罹患症例に分類し、診療記録より収集した各種データに関して回顧的検討を行い、隣接椎間障害に関して検証した。第 3 章では、健常ビーグル犬から採取した頸椎を使用して頸椎可動モデルを作成し、椎体固定後の処置椎間部および隣接椎間部の力学環境に及ぼす影響について 6 軸材料試験機を用いて検証した。第 4 章では、第 3 章において隣接する椎間部において可動性の増加が認められたことから、犬の椎体固定モデルを作成することにより類似した力学的環境を再現し、隣接椎間における生体力学的環境の変化が及ぼす影響について組織学的評価により検証した。

## 第2章 犬の頸椎椎間部の疾患における外科処置後の隣接椎間障害の発生状況に関する検討

### 2-1 緒言

犬の椎間板疾患は最も一般的に遭遇する疾患の1つとして認識されており、その発生率は約2%である (Braund KG, 1981). 中でも頸部椎間板ヘルニア (Cervical Intervertebral Disc Herniation; C-IVDH) は全ての椎間板ヘルニアのおよそ15%を占めている (Braund KG, 1981; Fry TR, 1991; Morgan PW, 1993). 小型犬種、あるいはビーグルやダックスフンドなどの軟骨異栄養性犬種における発症が多く (Dallman M, 1992; Gage ED, 1975), 罹患部位は第2, 3頸椎間 (以下 C2-3 と表す) が最も多い (Fry TR, 1991; Seim HB, 1982). しかし、中～大型の非軟骨異栄養性犬種においては、尾側領域での発生が多いと報告されており (Cherrone KL, 2004), 小型の非軟骨異栄養性犬種においては複数椎間で多発しやすい傾向にあることも確認されている (Hakozaki T, 2015).

頸部脊椎脊髄症 (Cervical Spondylomyelopathy: CSM) はドーベルマンやグレート・デーンなどの大型犬または超大型犬に好発する疾患であり、発症年齢は病態によって異なる. 骨の形態異常による脊髄圧迫の場合、生後数ヵ月から1歳齢以前の若齢犬に認められる (de Lahunta A, 2009). 一方、Hansen II 型の椎間板ヘルニアなどによる腹側からの動的圧迫は中高齢で多く認められる (Bagley RS, 2005). いずれの病態も脊柱管の狭窄により頸部脊髄が圧迫を受けることが特徴的である. 発症部位としては C5-6, C6-7 が最も一般的である (Dewey CW, 2008).

臨床的には C-IVDH そして CSM 罹患症例に対する治療として、腹側減圧術 (Ventral Slot: VS) または椎体固定術 (Vertebral Fixation: VF) が適応されるが (Fitch RB, 2000), VS 後のスロット幅が椎体幅の 50%に近いときは VF を考慮する必要がある (Lemarié RE, 2000). しかし、VF 実施後には隣接する椎間部に類似した病変 (ドミノ病変) が生じることが指摘されており (Jeffery

ND, 2001), このドミノ病変に起因した臨床症状が術後 6 ヶ月から 4 年の間に生じると報告されている (Bruecker KA, 1989; Mckee WM 1999; Rusbridge C, 1998; Seim HB, 1986). これまで C-IVDH および CSM 罹患症例に関する報告は数多くされているが, 減圧または固定術後の隣接椎間における臨床症状の再発に関して調査したという報告は少ない. そこで本検討では, C-IVDH および CSM に罹患し, 外科的処置を行った症例における隣接椎間障害の有無を回顧的に明らかにすることを目的として, 診療記録から抽出したデータの比較検討を行った.

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 対象症例

日本獣医生命科学大学付属動物医療センターに 1993 年 4 月から 2015 年 10 月までの期間に来院し C-IVDH あるいは CSM と診断され, 外科的処置を行った症例を対象とした. なお, 診断は病歴, 臨床症状, X 線検査, 脊髄造影検査, CT 検査, MR 検査から総合的に判断した.

### 2-2-2 診療記録からのデータの抽出

対象とした症例の診療記録から種々のデータを記録した. 記録したデータは, 犬種, 性別, 年齢, 体重, 罹患椎間部位, 術式, 臨床症状に基づいた神経学的重症度, 罹患期間, 回復期間, 隣接椎間障害の有無, 再発期間, 追跡期間である. 犬種については, 純血種と雑種に分類し, 純血種のみを記録した. また純血種の内, 過去の報告に基づいて 14 犬種 (ダックスフント (ミニチュアを含む), ビーグル, バセットハウンド, フレンチまたはイングリッシュ・ブルドッグ, シーズー, ミニチュア・シュナウザー, ペキニーズ, ラサ・アプソ, ビション・フリーゼ, チベタン・スパニエル, キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル, ウェルシュ・コーギー, アメリカン・コッカー・スパニエル) を軟骨異常栄養性犬種 (chondrodystrophoid breed: CDB)

とし、これら以外の犬種を非軟骨異栄養性犬種（non-chondrodystrophoid breed: NCDB）として分類した（Smolders LA, 2013）。性別は雄（未去勢および去勢したものを含む）と雌（未避妊および避妊したものを含む）に分類した。年齢および体重は手術実施時のものである。なお、年齢は歳、体重はキログラム（kg）で記録した。罹患部位は脊髄造影検査（脊髄造影 X 線または CT）および MRI に基づいて決定し、C2-3 から C7-T1 において外科的処置を実施した罹患椎間部位を記録し、それぞれの対象症例で罹患椎間部数を数えた。脊髄造影検査は過去の報告に準じて行った（Hara Y, 1994）。第 5-6 腰椎椎間部または大槽より非イオン性ヨード系陽性造影剤（イオヘキソール 240 または 300 I mg/mL）を投与後に X 線または CT 撮影を行い、脊髄圧迫を伴う部位を罹患部位と判断した。MRI では頸部の T2 強調撮影を実施し、正中矢状断画像において脊髄に圧迫のある部位を罹患部位と判断した。また MRI により動的な脊髄圧迫が疑われた場合、MRI 後に脊髄造影下で屈曲伸展のストレス撮影を行い、罹患部位と判断した。術式は、腹側減圧術（VS）、片側椎弓切除術（Hemilaminectomy: HL）、背側椎弓切除術（Dorsal laminectomy: DL）および椎体固定術（VF）の 4 種類について実施の有無を記録した。脊髄障害の重症度は過去の報告に基づき、神経学的症状により 3 つのカテゴリーに分類した（Seim HB, 1982）。Grade 1 は頸部痛のみ、Grade 2 は四肢の不全麻痺、Grade 3 は四肢麻痺である。なお、それぞれの分類基準については Table 2-1 に示した。罹患期間は臨床症状が発現してから手術実施までとした。回復の定義に関しては、術前と術後の神経学的重症度を比較して改善がみられた場合を回復とし、手術実施から最も重症度が改善した時点までを回復期間とした。なお、罹患期間および回復期間はいずれも日数で記録した。術後 6 ヶ月以上の追跡が可能であり、頸部痛および四肢の不全麻痺および完全麻痺による臨床症状の再発が認められた症例、または脊髄造影検査（脊髄造影 X 線または CT）および MRI により頸髄に圧迫性の病変が認められた症例に関しては隣接椎間障害（ドミノ病変）と定義した。また手術実施から隣接椎間障害による臨床症状の再発までを

再発期間，手術実施から術後のフォローアップとして最近来院した期間までを追跡期間として記録した．なお，再発期間および追跡期間はいずれも月数で記録した．各データに関しては，平均値 ± 標準誤差で示し，罹患期間，回復期間，再発期間，追跡期間に関しては中央値を記録した．

### 2-2-3 隣接椎間障害の有無についての検討

VS, HL および DL の減圧術 (Decompression: DC) のみをそれぞれ単独で行った群を DC 群，また椎体固定術 (VF) を併用した群を VF 群として分類し，VF の併用と隣接椎間障害の有無に関して検討を行った．

### 2-2-4 統計学的解析

DC 群と VF 群における VF の併用と隣接椎間障害の有無に関しては  $\chi^2$  検定を用いて解析し， $p < 0.05$  を以って有意であると判定した．

## 2-3 結果

### 2-3-1 群分け

本検討においては，診療記録からのデータの抽出が可能であった 217 症例中，DC 群が 172 症例 (79.3%)，VF 群が 45 症例 (20.7%) であった．さらに DC 群の 172 症例中，C-IVDH と診断されたのが 155 症例 (90.1%)，CSM と診断されたのが 17 症例 (9.9%) であった．また VF 群の 45 症例中，C-IVDH と診断されたのが 14 症例 (31.1%)，CSM と診断されたのが 31 症例 (68.9%) であった．

### 2-3-2 DC 群における診療記録の集計結果

DC 群における診療記録から抽出したデータを以下に示した。各犬種での発生頻度を調べた結果、最も多かった犬種がビーグル (n=42) であり、24.4%を占めていた。ビーグルに次いでダックスフントが 20.9% (n=36)、シーザーが 15.7% (n=27)、F. ブルドッグが 5.2% (n=9)、ポメラニアンが 5.2% (n=9)、ペキニーズが 3.5% (n=6)、ヨークシャーテリアが 2.9% (n=5)、マルチーズが 2.9% (n=5)、その他 4 頭以下の 18 犬種が 19.2% (n=33) であった。これらの犬種の内、軟骨異栄養性犬種 (CDB) が 9 犬種 127 頭 (73.8%)、非軟骨異栄養性犬種 (NCDB) が 17 犬種 45 頭 (26.2%) であった。性別の分布は、雄 81 頭、去勢雄 25 頭、雌 33 頭、避妊雌 33 頭であった。年齢は  $8.2 \pm 2.7$  歳 (n=172) であり、最低年齢が 2.0 歳、最高年齢が 16.0 歳齢であった。体重は  $9.4 \pm 8.3$ kg (n=172) であり、最低体重が 2.4kg、最高体重が 57.8kg であった。罹患椎間部位は、計 224 箇所であり、1 頭あたりの平均罹患椎間部数は  $1.3 \pm 0.6$  箇所であった。また、罹患椎間部位の分布は、C2-3 で 71 箇所 (31.7%)、C3-4 で 41 箇所 (18.3%)、C4-5 で 52 箇所 (23.2%)、C5-6 で 38 箇所 (17.0%)、C6-7 で 20 箇所 (8.9%)、C7-T1 で 2 箇所 (0.9%) であった。術式は VS が 97.7% (n=168)、DL が 2.3% (n=4) であった。神経学的重症度は  $1.9 \pm 0.7$  (n=172) であり、Grade 1 が 53 症例 (30.8%)、Grade 2 が 79 症例 (45.9%)、Grade 3 が 40 症例 (23.3%) であった。症状の発現から手術までの期間は、 $41.9 \pm 40.3$  日 (1~293 日, n=166) であり中央値は 29.5 日であった。また、術後に最も回復が認められるまでの期間は、 $22.4 \pm 26.1$  日 (1~180 日, n=137) であり、中央値は 14.0 日であった。術後の評価に関しては、改善がみられた症例が 89.9% (n=142)、改善がみられなかった症例が 10.1% (n=16) であり、この中で再手術を行ったのが 2 症例、死亡したのが 3 症例であった。なお、再手術を行った 2 症例に関しては、いずれの症例に対しても同部位における VS の適応により改善が認められた。死亡した 3 症例に関しては、治療とは無関係な理由で死亡したのが 2 症例、安楽死行ったのが 1 症例



であった。隣接椎間障害は 172 症例中 9 症例 (5.2%) で認められ、いずれも VS のみを行った症例における発生であった。なお、これらの 9 症例の詳細なデータは Table 2-1 に示した。再発期間は  $22.7 \pm 13.1$  カ月 (1~45 ヶ月, n=8), 中央値は 18.0 ヶ月であった。追跡期間は  $4.5 \pm 8.5$  ヶ月 (0~49 ヶ月, n=145), 中央値は 1.0 ヶ月であり、6 ヶ月以上の追跡が可能であった症例は 20.7% (n=30) であった。

### 2-3-3 VF 群における診療記録の集計結果

VF 群における診療記録から抽出したデータを以下に示した。各犬種での発生頻度を調べた結果、最も多かった犬種はドーベルマン (n=8) であり、17.8%を占めていた。次いでバーニーズ・マウンテン・ドッグが 13.3% (n=6), ドーベルマンが 13.3% (n=6), ワイマラナーが 8.9% (n=4), ペキニーズが 6.7% (n=3), およびビーグルが 6.7% (n=3) であり、その他 2 頭以下の 11 犬種が 33.3% (n=15) であった。これらの犬種の内、CDB が 4 犬種 9 頭 (20.0%), NCDB が 13 犬種 36 頭 (80.0%) であった。性別の分布は、雄 16 頭, 去勢雄 10 頭, 雌 8 頭, 避妊雌 11 頭であった。年齢は  $8.1 \pm 2.7$  歳 (n=45) であり、最低年齢が 2.1 歳, 最高年齢が 13.0 歳であった。体重は  $20.4 \pm 15.8$ kg (n=45) であり、最低体重が 1.5kg, 最高体重が 61.5kg であった。罹患椎間部位は、計 74 箇所であり、1 頭あたりの平均罹患椎間部数は  $1.6 \pm 0.7$  箇所であった。罹患椎間部位の分布は、C2-3 で 6 箇所 (8.1%), C3-4 で 7 箇所 (9.5%), C4-5 で 11 箇所 (14.9%), C5-6 で 27 箇所 (36.5%), C6-7 で 22 箇所 (29.7%), C7-T1 で 1 箇所 (1.4%) であった。術式は VS と VF の併用が 84.4% (n=38), DL と VF の併用が 4.4% (n=2), HL と VF の併用が 2.2% (n=1), VS と DL と VF の併用が 8.9% (n=4) であった。神経学的重症度は  $2.3 \pm 0.6$  (n=45) であり、Grade 1 が 3 症例 (6.7%), Grade 2 が 28 症例 (62.2%), Grade 3 が 14 症例 (31.1%) であった。症状の発現から手術までの期間は、 $67.9 \pm 69.0$  日 (5~306 日, n=43) であり中央値は

37.0 日であった。また、術後に最も回復が認められるまでの期間は、 $32.9 \pm 20.9$  日（1~88 日， $n=36$ ）であり、中央値は 30.5 日であった。術後の評価に関しては、改善がみられた症例が 86.4%（ $n=38$ ），改善がみられなかった症例が 13.6%（ $n=6$ ）であり、この中で再手術を行ったのが 4 症例，死亡したのが 2 症例であった。なお，再手術を行った 4 症例に関しては，いずれも同部位での椎体固定術の適応または再固定により改善が認められた。死亡した 2 症例に関しては，治療とは無関係な理由で死亡した。隣接椎間障害は 45 症例中 7 症例（15.6%）で認められ，いずれも VS に VF を併用した症例における発生であった。なお，これらの 7 症例の詳細なデータは Table 2-1 に示した。再発期間は  $26.7 \pm 18.7$  カ月（6~60 ヶ月， $n=7$ ），中央値は 27.0 ヶ月であった。追跡期間は  $14.0 \pm 16.8$  ヶ月（0~62 ヶ月， $n=36$ ），中央値は 7.0 ヶ月であり，6 ヶ月以上追跡が可能であった症例は 44.4%（ $n=20$ ）であった。

#### 2-3-4 隣接椎間障害の有無についての検討結果

C-IVDH および CSM 罹患症例において VF の併用と隣接椎間障害の有無に関して  $\chi^2$  検討を行った結果，有意な関連性が認められた（ $p=0.018$ ）。

#### 2-4 考察

隣接椎間障害（ドミノ病変）は，椎間部が固定されることにより隣接する椎間に異常な力学環境が生じ，潜在的な不安定性を悪化させ，椎間板髄核の逸脱や線維輪の肥大化を招く病変と定義されている（Bruecker KA, 1989; Seim HB, 1986）。これらの報告に準じ，本検討においては，隣接椎間障害を“C-IVDH および CSM 罹患症例において術後に頸部痛，四肢の不全麻痺および完全麻痺による臨床症状の再発が認められた症例，または脊髓造影検査（脊髓造影 X 線または CT）および MRI により頸髄に圧迫性の病変が認められた症例”と定義した。その結果，隣接

椎間障害の発生率は、減圧術のみを行った DC 群で 5.2% (n=9/172), 減圧術と椎体固定術を併用した VF 群で 15.6% (n=7/45) であり, 全体では 7.9% (n=16/217) で認められた.

術後の隣接椎間障害に関しては, CSM 罹患症例において報告がいくつか存在する. Bruecker らは CSM 罹患症例において予後評価を行った際に, VS により改善が認められた 14 症例中 4 症例 (28.6%) において 12~60 ヶ月の間に臨床症状の再発が認められたと報告している. なお, その内の 1 例 (7.1%, n=1/14) では, 処置を行った前方の椎間における椎間板の変性が確認されている (Bruecker KA, 1989). また Bruecker らは, 金属インプラントと骨セメントによる処置を行った際の予後評価も行っており, 37 症例中 8 症例 (21.6%) において 5~42 ヶ月の間に臨床症状の再発が認められたと報告している. その内の 3 症例 (8.1%, n=3/37) においては椎間板の圧迫によるドミノ病変が確認されたと報告している (Bruecker KA, 1989). さらに, Rusbridge らは, CSM に罹患したドーベルマン 28 頭において, 14 頭ずつに VS および VF (スクリューまたはワッシャーによる固定) を実施し, 予後評価を行った. その結果, VS では改善した 13 頭中 5 頭 (38.5%) において 16~33 ヶ月の間に再発が認められた. 一方, VF においても改善した 13 頭中 7 頭 (53.8%) において 7~27 ヶ月の間に再発が認められており, その内の 4 頭 (14.3%, n=4/28) においては 1 椎間以上での椎間板の圧迫によるドミノ病変が認められている (Rusbridge C, 1998). これらの報告以外にも, C-IVDH 罹患症例における臨床症状の再発が報告されている (Cherrone KL, 2004; Fitch RB, 2000; Hillman RB, 2009) (Table 2-2). また, 隣接椎間障害に関しては, 安定化術の実施後に生じる晩期の合併症であると報告されていることから (Bruecker KA, 1989; Seim HB, 1986), 減圧術を単独で実施した場合より, VF を併用した場合での発生が多いと推測された. 今回の検討において, VF を併用した症例の 15.6% において隣接椎間障害が認められており, 減圧術のみを行った症例と比較して再発率は約 3 倍であった. さらに, 本検討においては, VF の併用に関して隣接椎間障害の発生と有意な関連性が認められたことから, 隣接

椎間障害の発生には椎体の安定化術が関連していることが示唆された。

一方、減圧術実施後のドミノ病変の発生に関しては、CSM 罹患症例の VS 後においても認められており、骨癒合に続発して生じている可能性が報告されている (Bruecker, 1989; Sharp NJ, 2005)。また、近年では MRI を用いた VS 後の長期的なフォローによっても確認されている (da Costa RC, 2007)。本検討でも、隣接椎間障害が認められた 16 症例中 9 症例で VS を単独で実施していることから、VS 実施後に椎間部が安定化することにより、隣接椎間に影響していた可能性がある。よって C-IVDH 罹患犬群で減圧術を単独で実施した症例においても、椎体固定を併用した症例と同様に、隣接椎間障害による臨床症状の再発を考慮し、長期的なフォローアップが必要である。隣接椎間障害の罹患部位に関しては、頸椎の尾側領域において安定化術を実施する機会が多いことから、頭側領域での発生が多いことが予測されたが、本検討において認められた症例に関しては、罹患部位に偏りは認められなかった。これらの関連性については、より隣接椎間障害の発生数が多い集団における検証や、長期的な予後のモデル犬作成による検討などが必要である。

## 2-5 小括

今回の検討では C-IVDH および CSM 罹患症例における減圧または固定術後の回顧的検討を行った結果、全 217 症例中 16 症例 (7.9%) において、また椎体固定術を行った 45 症例中 7 症例 (15.6%) において隣接椎間障害の発生が認められた。また、VF の併用に関して、隣接椎間障害の発生と有意な関連性が認められたことから、隣接椎間障害の発生には椎体の安定化術が関連していることが示唆された。

Table 2-1—Case summaries of 16 dogs that have adjacent segment disorder for C-IVDH and CSM.

Dog	Signalment (Breed, sex, age, B.W.)	Neurologic grade		Duration of signs (d)	Recovery time (d)	Time to recurrence (m)	Follow-up period (m)	Diagnostic methods	Surgical procedures	Affected disk	Domino disk
		pre	post								
Decompression group											
1	Beagle, M, 9y, 13.0kg	3	0	17	42	30	31	CT, MG	VS	C3-4	C2-3
2	Shih Tzu, F, 8y, 5.4kg	2	0	60	11	45	46	MRI	VS	C2-3,6-7	C4-5
3	Shih Tzu, FS, 16y, 6.0kg	3	2	9	30	17	17	MRI	VS	C2-3,4-5,6-7	C3-4
4	Rottweiler, M, 2y, 47.0kg	3	2	14	86	38	39	MRI	VS	C3-4	C6-7
5	Shih Tzu, F, 8y, 6.5kg	1	0	88	29	17	18	MRI	VS	C3-4,4-5	C2-3
6	Beagle, M, 7y, 20.6kg	2	0	43	-	18	18	MRI	VS	C3-4	-
7	Shih Tzu, FS, 9y, 7.5kg	2	0	13	30	7	20	MRI	VS	C4-5	C3-4
8	Shih Tzu, FS, 10y, 8.4kg	2	0	3	2	25	27	MRI	VS	C3-4	C5-6,6-7
9	Dachshund, FS, 6y, 5.0kg	2	0	16	3	7	18	MRI	VS	C4-5	C2-3
Vertebral fixation group											
1	Great Dane, M, 5y, 61.5kg	2	0	30	26	27	29	CT, MG	VS,DL,VF	C6-7	C5-6
2	B.M.D, F, 5y, 34.2kg	3	0	108	57	30	37	MRI	VS,VF	C5-6,6-7	-
3	Toy Poodle, CM, 5y, 5.5kg	2	0	69	20	39	62	MRI	VS,VF	C3-4,4-5,5-6	-
4	Pekingese, M, 9y, 5.4kg	3	0	28	46	61	61	MRI	VS,VF	C6-7	C5-6
5	M.Pinscher, FS, 5y, 3.0kg	2	0	60	8	12	42	MRI	VS,VF	C2-3,5-6	-
6	Pekingese, CM, 9y, 7.5kg	2	0	36	18	13	13	MRI	VS,VF	C6-7	-
7	Dachshund, CM, 12y, 12.5kg	2	0	8	14	6	8	MRI	VS,VF	C3-4	-

Abbreviation: B.M.D., Bernese Mountain Dog; B.W., body weight; M, male; CM, male castrated; F, female; FS, female spayed; CT, computed tomography; MG, Myelography; MRI, magnetic resonance imaging; For neurologic grade, grade 1 was defined as signs of neck pain with normal ambulation, grade 2 was defined as ambulatory tetraparesis with or without signs of neck pain, and grade 3 was defined as nonambulatory

Table 2-2— Previous reports of dogs that have adjacent segment disorder for C-IVDH and CSM.

No.	authors	disease	operative procedure	number of cases	rate of recurrence (%)	Time to recurrence (m)	Follow-up period (m)
1	Fitch RB. (2000)	C-IVDH	VS/VF	112	7.1% (n=8)	—	6-
2	Cherrone KL. (2004)	C-IVDH	VS/DL	190	10% (n=18)	91days	—
3	Hillman RB. (2009)	C-IVDH	VS/DL	20	15% (n=3)	19-85	5-111
4	Bruecker KA. (1989)	CSM	VS	14	28.6% (n=4)	12-60	10-60
5	Bruecker KA. (1989)	CSM	VF	37	21.6% (n=8)	5-42	3-50
6	Rusbridge C. (1998)	CSM	VS	14	38.5% (n=5)	16-33	6-40
			VF	14	53.8% (n=7)	7-27	
7	present study	C-IVDH/CSM	VS/DL	172	5.2% (n=9)	7-45	0-49
			VS/VF	45	15.6% (n=7)	6-60	0-62

Abbreviation: C-IVDH, cervical intervertebral disc herniation; CSM, cervical spondylomyelopathy; VS, ventral slot; VF, vertebral fixation; HL, hemilaminectomy; DL, dorsal laminectomy

### 第3章 犬の頸椎椎間部における外科処置後の生体力学的検討

#### 3-1 緒言

小動物神経外科領域において、犬の尾側頸椎に発生する代表的な疾患として頸部椎間板ヘルニア（C-IVDH）や尾側頸部脊椎脊髄症（CCSM）が挙げられる。臨床的にはC-IVDHそしてCCSM罹患症例に対する治療として、個々の症例の脊髄圧迫の性格（動的/静的）に基づいて、腹側減圧術（Ventral Slot: VS）または椎体固定術（Vertebral Fixation: VF）が適応される（Fitch RB, 2000）。VS後の椎体の不安定化あるいは亜脱臼は重大な合併症であるが、VFを併用することで予防することができる（Fitch RB, 2000; Lemarié RE, 2000）。通常、尾側頸椎の病変において、VS後のスロット幅が椎体幅の50%に近い場合にはVFを考慮する必要がある（Lemarié RE, 2000）。しかし、VF実施後には隣接する椎間部に類似した病変（ドミノ病変）の危険性が指摘されている（Jeffery ND, 2001）。ドミノ病変は、椎間部が固定されることにより隣接する椎間に異常な力学環境が生じ、潜在的な不安定性を悪化させ、椎間板髄核の逸脱、または線維輪の肥大化を招く（Jeffery ND, 2001）。このドミノ病変に起因した臨床症状が術後6ヵ月から4年の間に生じると報告されている（Bruecker KA, 1989; McKee WM, 1999; Rusbridge C, 1998; Seim HB, 1986）。一方、人の頸椎を用いた生体力学的検討においては、椎体固定後に隣接椎間の圧力または可動性が増加すると報告されている（Eck JC, 2002; Matsunaga S, 1999）。またX線による臨床研究でも、固定した部分に隣接した椎間部で動きの増加が観察されている（Baba H, 1993; Shoda E, 1999）。しかしながら、犬の頸椎椎間部の可動性に関する情報は乏しく、頸椎椎間部に対して実施するVSやVFが隣接する椎間部の可動性に及ぼす影響については十分に検討されていない。これまで、犬の頸椎の腹側固定に際しては、金属製インプラントとポリメチルメタクリレート（Polymethyl methacrylate: PMMA）を使用した固定法、そして近年ではLocking systemを備えたPlateを使用した固定法などが報告され、臨床的にも使用されている（Bergman RL, 2008; Danielski A, 2012; Steffen F, 2011; Voss K, 2006）。しかし、Locking systemを備えたPlateによる固定法に関する生体力学的な検討は少なく、またその両者の固定方法が隣接椎間部

の力学的環境に及ぼす影響の差異に関しては比較されていない。そこで我々は健常ビーグル犬から採取した頸椎を使用して頸椎可動モデルを作成し、金属インプラントと PMMA を使用した固定法および Locking system を備えた Plate を使用した固定法が、処置椎間および隣接椎間部の力学環境に及ぼす差異について検討した。

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 試験体の収集と作成

他の目的のため安楽死となった健常ビーグル成犬 10 頭（1-2 歳齢，8.6-14.2kg，性別は雄 10 頭）より採材した頸椎（C1-T3）10 検体を使用し，試験体を作成した。安楽死および採材は日本獣医生命科学大学動物実験規定（承認番号 13-58）に準じて行った。すべての試験体について形態および椎間板変性を評価するため，CT および MR 撮影を行った（Figure 3-1）。CT 撮影には 80 列/160 スライス CT（Aquilion PRIME, Toshiba Medical Systems, Tochigi, Japan）を用い，画像処理ソフト（AZE Virtual Place Fujin 310 3.1002, AZE, Tokyo, Japan）で作成した 3D 再構築画像により脊椎の骨折および奇形を除外した。MRI 撮影には 3.0T MRI（Signa EXCITE 3.0 T, GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan）を用い，T2 強調矢状断画像により Pfirrmann Grading System（Pfirrmann CW, 2001）に準じて椎間板髄核が低信号を示したものは除外した。なお，Pfirrmann Grading System は Grade1 から Grade5 までの 5 段階評価によるグレード分類であるが，本検討では Grade1 から Grade3 までに該当する試験体を用いた。尾側頸椎（C4-C7）の関節包，椎間板および主要な靱帯以外の軟部組織を全て除去した後，生理食塩水（0.9% NaCl）に浸したガーゼに包み，-20℃で試験前まで保存した。4℃において 12 時間かけて解凍した後，C4 および C6，C7 を歯科用レジン（OSTRON II, GC Co., Ltd., Tokyo, Japan）に埋め込み固定した。本検討においては，椎体固定後の隣接する椎間への影響を明らかにするため，C4-5 および C5-6 の 2 椎間における可動モデルとし，C4-5 を隣接椎間，C5-6 を処置椎間とした。



### 3-2-2 試験装置

本検討では、Inaba らによって共同開発された 6 軸材料試験機を生体力学的試験装置として用いた (Figure 3-2) (Kasai Y, 2010; Kyaw TA, 2014). 6 軸材料試験機は、2 本 1 組の直動型アクチュエータが 120°対称に並行配置された垂直直動型の平行メカニズムであり、これらの 6 つの直動アクチュエータは各々が独立して制御されている。先端部には 6 軸力覚センサを備え、x, y, z 軸方向の力とそれぞれの軸回りのトルクを検出できる構造を有している。

### 3-2-3 試験体モデルの作成

本検討では、無処置 (Intact モデル)、PMMA 固定 (PMMA モデル)、Plate 固定 (Plate モデル) の 3 種類のモデルを同一試験体に対し段階的に作製し (Figure 3-3)、各モデルに対して試験を行った。

#### (1) Plate モデルの作製

Plate モデルの固定用デバイスには MatrixMANDIBLE System (MatrixMANDIBLE System, DePuy Synthes Japan VET, Tokyo, Japan) を用いた。Plate は厚さ 2.0mm であり、いずれの試験体でも 5 穴 (全長 40mm) に切断したものを使用した。Screw は径 2.4mm であり、試験体の大きさにより 10~14mm の長さのものを使用した。まず、Plate の最頭側の screw hole (C5) に専用のドリルスリーブを装着した状態でアライメントを合わせ、径 1.8mm の専用のドリルを用いて椎体腹側より両側の皮質を貫通するようにドリリングを行った後、Screw を設置した。次に Plate の最尾側の screw hole (C6) にドリリングを行い、Screw を設置した。なお plate 中央の screw hole は empty hole とし、残りの screw hole に 1 本ずつ screw を設置した。同様の手順で対側にも Plate を設置し、C5-6 椎間を固定した (Figure 3-4A)。

## (2) PMMA モデルの作製

PMMA モデルの固定には金属製インプラントと PMMA を用いた。金属製インプラントには径 2.7mm, 長さ 20mm の皮質骨スクリュー (瑞穂医科工業) を用い, PMMA には歯科用レジン (OSTRON II, GC Corporation, Tokyo, Japan) 10g を用いた。Screw は C5 および C6 椎体腹側に 2 本ずつ並列するように配置し, 椎体腹側より 10mm 露出するように設置した。その後, screw head が完全に覆われるように PMMA を形成し, C5-6 椎間を固定した (Figure 3-4B)。なお, PMMA および Plate モデルのいずれにおいても椎間板は無処置のままで椎間の固定を行った。

### 3-2-4 試験条件

本検討では上述した各モデルに対して, 角度を規定した曲げ試験および回旋試験を行い, それぞれにトルク負荷を与えた際の可動域 (ROM) を測定した。

#### (1) 曲げ試験条件

曲げ試験における試験条件は, 3 自由度, 角速度 0.30[deg./s]であった。なおここでの 3 自由度の定義は, x および y 軸における並進と z 軸における回旋を制限し, x および y 軸における回旋と z 軸における並進を許容することとした。また角度に関しては屈曲・伸展方向では 1[N・m]の, 左右側屈方向では 2[N・m]の torque 負荷時における最大曲げ角で規定した。

#### (2) 回旋試験条件

回旋試験における試験条件は, 4 自由度, 角速度は 0.30[deg./s]であった。なおここでの 4 自由度の定義は, z 軸において回旋が生じる際, x, y 軸における回旋運動を制限し x, y, z 軸における並進を許容することとした。また角度に関しては左右回旋方向で 5[Nm]の torque 負荷時における最大曲げ角で規定した。曲げ試験および回旋試験いずれも試験は 3 回行い, 検討には 3 回目の試験結果を用いた (Kyaw TA, 2014)。

### 3-2-5 3次元動画計測システム

各試験において、処置を行った処置椎間（C5-6）およびその頭側の隣接椎間（C4-5）における可動域に関しては3次元動画計測システムにて算出した（Kyaw TA, 2014）。以下に3次元動画計測システムによる解析の手順を示す。1) 治具と試験体にマーカーを設置。2) 2台のビデオカメラを所定の位置に配置し、試験時に撮影。3) 動画データをPCへ取り込み後、計測ソフト（Move-tr/3D; Library Co., Ltd., Tokyo, Japan）により2値化。4) マーカーを追跡し、各椎間の相対角度を計測。

### 3-2-6 術後評価

試験後、骨折と椎間腔内へのドリルの侵入がなかったかを確認するため、全ての試験体に対してCT撮影を行った。

### 3-2-7 統計学的解析

データに関しては、統計解析ソフト「SPSS version 16.0」を用いて解析を行った。各椎間におけるモデル間でのROMの比較には、Tukey-HSD testを使用し、 $p < 0.05$ をもって有意であると判定した。また、各モデルにおけるC4-5とC5-6のROMの比較には、paired t testおよびWilcoxon signed rank testを使用し、 $p < 0.05$ をもって有意であると判定した。なお、等分散性の検定にはLeven検定を用いた。

## 3-3 結果

### 3-3-1 屈曲・伸展方向への曲げ試験

曲げ試験より得られた各モデルおよび各椎間におけるROMをTable 3-1に示した。グラフの値は試験体6体のデータの平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。なお、C4-5が隣接椎間、C5-6が処置椎間である（Figure 3-5 および Figure 3-6）。

隣接椎間であるC4-5の屈曲伸展方向への曲げ試験におけるROM[deg.]は、Intactモデルで $19.4 \pm 2.3$ 、PMMAモデルで $24.7 \pm 2.7$ 、Plateモデルで $27.8 \pm 5.0$ であった。PMMAモデル（ $p = 0.035$ ）お

よび Plate モデル ( $P = 0.002$ ) は Intact モデルと比較して有意に高値を示したが, PMMA モデルと Plate モデルとの間に有意な差は認められなかった ( $p = 0.295$ ). 処置椎間である C5-6 の屈曲・伸展方向への曲げ試験における ROM[deg.]は, Intact モデルで  $22.0 \pm 2.3$ , PMMA モデルで  $9.3 \pm 1.5$ , Plate モデルで  $7.9 \pm 1.7$  であった. PMMA モデル ( $p < 0.001$ ) および Plate モデル ( $p < 0.001$ ) は Intact モデルと比較して有意に低値を示したが, PMMA モデルと Plate モデルとの間に有意な差は認められなかった ( $p = 0.374$ ). なお, 各モデルにおける屈曲伸展方向それぞれの ROM に関して C4-5 と C5-6 の間に有意な差は認められなかった.

### 3-3-2 左右側屈方向への曲げ試験

隣接椎間である C4-5 の左右側屈方向への曲げ試験における ROM[deg.]は, Intact モデルで  $15.6 \pm 2.0$ , PMMA モデルで  $21.6 \pm 2.0$ , Plate モデルで  $22.9 \pm 1.1$  であった. PMMA モデル ( $p < 0.001$ ) および Plate モデル ( $p < 0.001$ ) は Intact モデルと比較して有意に高値を示したが, PMMA モデルと Plate モデルとの間に有意な差は認められなかった ( $p = 0.470$ ). 処置椎間である C5-6 の左右側屈方向への曲げ試験における ROM[deg.]は, Intact モデルで  $14.3 \pm 2.8$ , PMMA モデルで  $8.0 \pm 2.0$ , Plate モデルで  $3.2 \pm 1.2$  であった. PMMA モデル ( $p < 0.001$ ) および Plate モデル ( $p < 0.001$ ) は Intact モデルと比較して有意に低値を示した. また Plate モデルは PMMA モデルと比較して有意に低値を示した ( $p = 0.004$ ). なお, 各モデルにおける左右側屈方向それぞれの ROM に関して C4-5 と C5-6 の間に有意な差は認められなかった.

### 3-3-3 回旋試験

左右への回旋試験より得られた各モデル, 各椎間における ROM を Table 1 に示す. グラフの値は試験体 8 体のデータの平均値であり, エラーバーは標準偏差を示す. また, C4-5 が隣接椎間であり, C5-6 が処置椎間である (Figure 3-7).

隣接椎間である C4-5 の左右への回旋試験における ROM[deg.]は, Intact モデルで  $4.2 \pm 2.6$ , PMMA

モデルで  $12.5 \pm 2.4$ , Plate モデルで  $9.5 \pm 1.4$  であった. PMMA モデル ( $p < 0.001$ ) および Plate モデル ( $p < 0.001$ ) は Intact モデルと比較して有意に高値を示した. また PMMA モデルは Plate モデルと比較して有意に高値を示した ( $p = 0.030$ ). なお, 各モデルにおける左右回旋方向それぞれの ROM に関して C4-5 と C5-6 の間に有意な差は認められなかった. 処置椎間である C5-6 の左右への回旋試験における ROM[deg.]は, Intact モデルで  $16.8 \pm 2.3$ , PMMA モデルで  $6.8 \pm 1.0$ , Plate モデルで  $10.0 \pm 1.0$  であった. PMMA モデル ( $p < 0.001$ ) および Plate モデル ( $p < 0.001$ ) は Intact モデルと比較して有意に低値を示した. また PMMA モデルは Plate モデルと比較して有意に低値を示した ( $p = 0.001$ ).

#### 3-3-4 術後評価

試験後, 全ての試験体に対して CT 撮影を行ったところ, いずれの試験体においても骨折および椎間腔内へのドリルの侵入は認められなかった.

#### 3-4 考察

処置椎間である C5-6 の可動域を調べた結果, Intact モデルと比較して PMMA および Plate モデルにおいて ROM が有意に減少した. これまで尾側の頸椎 (C4-5 および C5-6) において固定による可動性を評価した報告では, Pin と PMMA を用いた固定方法で可動域の減少が認められている. Adamo らは大型犬 6 頭の頸椎 (C2-T1) を使用し, C5-6 をスムーズピンと PMMA により固定したモデルについて検討した結果, 屈曲伸展および左右側屈で C5-6 椎間の可動域が減少したと報告している (Adamo PF, 2007). また Koehler らは 14 頭の犬の頸椎 (C3-C6) を使用し, スムースまたはスレッドピンと PMMA により固定したモデルについて屈曲伸展方向への 4 点曲げ試験を行った結果, 固定した C4-5 椎間の可動域が  $27.6 \pm 2.1^\circ$  から  $4.5 \pm 1.5^\circ$  へ減少したと報告している (Koehler CL, 2005). 従来, 金属製インプラントと PMMA による固定方法は, 各椎体の正中縦方向に沿って 2 本の pin あるいは screw を交差させて挿入し固定するのが一般的である (Adamo PF, 2007; Koehler CL, 2005). しかし, 小型犬の頸椎を対象とする場合, 椎間部にスロットを作成した後に金属製インプラントを

縦方向に配置できる場所は十分に確保できない。そこで本検討における PMMA モデルでは、各椎体に screw を平行な位置に設置して固定した結果、C5-6 の ROM の減少が認められた。さらに Hettlich らの大型犬を用いた力学試験の報告によると、片側の皮質骨のみの固定でも、両側の皮質骨の場合と同等の固定強度があることが示されている (Hettlich BF, 2014)。本検討の PMMA および Plate モデルにおいては、確実に固定の効果を得るために bicortical にスクリューを設置した結果、可動域の減少が認められたことから、今回のスクリューの設置方法は有効な方法であると考えられた。

また、固定装置に Locking Compression Plate (LCP) を用いた方法においても ROM の減少が認められている。Agnello らは7頭の犬の頸椎 (C3-6) を使用して、対象とする C4 と C5 の正中腹側に LCP3.5 を1枚配置し、各椎体に2本ずつ計4本のスクリューを使用して固定したモデルで屈曲伸展方向への4点曲げ試験を行ったところ、Plate 固定した C4-5 椎間の可動域が  $17.6 \pm 24.3^\circ$  から  $3.2 \pm 3.0^\circ$  に減少したと報告している (Agnello KA, 2010)。さらに臨床例においても尾側頸椎領域における Plate 固定の有用性がいくつか報告されており (Bergman RL, 2008, Danielski A, 2012)、Voss らは Plate を椎体腹側の左右に2枚平行に設置した固定法が有用であることを報告している (Voss K, 2006)。しかしながら、同様の固定モデルにより椎間部の可動性を評価したという報告はない。よって今回の検討に用いた Plate モデルにおいては、屈曲伸展だけでなく、左右側屈そして左右回旋に対しても可動域が減少することが示された。

曲げ試験において、C5-6 の ROM を PMMA モデルと Plate モデルで比較した結果、屈曲伸展では有意な差は認められなかったが、左右側屈では PMMA モデルよりも Plate モデルにおいて有意に低値を示した。その理由の一つとして、使用した Plate 固定法による影響が挙げられる。本検討において使用した Matrix MANDIBLE System は Locking system を備えているため (Gateno J, 2013)、Plate に対する Screw の角度安定性が高く、より固定強度が大きかったことが起因していると考えられた。

一方、回旋試験では処置椎間である C5-6 の ROM が Plate モデルよりも PMMA モデルにおいて有意に低値を示した。なお、これらの固定性の違いに関しては、Plate と PMMA の固定装置の違いによる影響だと考えられる。つまり、Plate モデルでは椎体腹側の左右に設置した2枚の Plate がそ

それぞれ独立した固定装置として働くのに対し、PMMA モデルでは左右に設置した Screw が PMMA によって一体となるため、より可動域が制限されやすく、その分 ROM が減少したと考えられる。人医学領域においては脊椎の安定性獲得のため、チタン製の椎体 cage 及び Cross-link System を併用した固定法が一般的に使用されている (Doulgeris JJ, 2013)。この Cross-link System は椎体左右に設置した pedicle screw とロッドを一体化するという点において、本検討における PMMA モデルと類似している。つまり、左右のロッド間距離を一定に保ち、ねじれに対する変位を抑えることで ROM が減少するように、PMMA モデルにおいても同様の効果により ROM が減少したと考えられる。また PMMA モデルの可動域には使用する PMMA の量も影響している可能性がある。金属製インプラントと PMMA を使用した固定法に関して、臨床的に使用する PMMA の量は 1.5~2cm 露出させた金属製インプラントが完全に覆われる量とされているが (Bruecker KA, 1998)、PMMA の量の違いによる固定強度に関する報告はされていない。本検討で用いた PMMA の量は特に回旋時において Plate の固定強度を上回るのに十分な量であったが、実際に椎体固定を行う際に適した量なのかどうかは不明であり、この点に関しては更なる検討が必要だと考えられる。また本検討で使用した歯科用レジンに関しては、粉末（メタクリル酸メチル重合体等を主成分）と液体（メタクリル酸メチルを主成分）によって構成されており、臨床で使用されている骨セメントとほぼ同様の成分組成であることから、同等の強度を示していたと考えられる。

隣接椎間の ROM を調べた結果、C4-5 の ROM は PMMA モデルおよび Plate モデルのいずれにおいても Intact モデルと比較して有意に増加していた。これは処置椎間の固定により失われた可動域を隣接椎間が補うことで可動域が増加したためだと考えられる。このことは犬の頸椎を用いた生体力学的検討において、椎間を固定した際に隣接椎間で可動域の増加が認められた Koehler らの報告と一致する所見であった。Koehler らは Pin と PMMA を使用して C4-5 の腹側固定を行い、屈曲伸展時に正常と比べ C3-4 で 5.9°、C5-6 で 6.6°、可動域の増加が認められたと報告している (Koehler CL, 2005)。本検討においては C5-6 を screw と PMMA により固定した際、C4-5 の可動域は 5.3°増加していたことから、過去の報告とほぼ同様の結果であったと考えられる。一方、C4-5 に Locking Plate

固定を行ったという Agnello らの報告では、隣接椎間である C3-4 への影響はほとんど認められなかったとされている (Agnello KA, 2010). しかし、人医学領域における隣接椎間障害に関する生体力学的検討では、本検討と同様に C5-6 の前方 (腹側) を Plate 固定した際に、C4-5 および C6-7 における椎間板内圧と可動域の増加が確認されており、早期の椎間板変性に関与している可能性があると報告されている (Matsunaga S, 1999). 本検討においても Plate 固定時の隣接椎間の可動域の増加により、隣接椎間に何らかの影響が生じている可能性が示唆された.

また回旋時における C4-5 の ROM に関しては、Plate モデルと PMMA モデルを比較したところ、PMMA モデルにおいて有意に高値を示した. これは回旋に対して PMMA モデルが Plate モデルよりも強固な固定性を示した分、隣接椎間である C4-5 が失われた可動域を補ったためだと考えられる. さらに回旋試験の Intact モデルでのみ、C4-5 の ROM が C5-6 と比較して有意に低値を示した. C4-5 の可動域について検討した Hofstetter らの報告によると、1Nm における左右回旋方向への可動域は  $1.1^{\circ}$  であった (Hofstetter M, 2009). 本検討においても 5Nm における可動域は  $4.2^{\circ}$  と、C4-5 本来の可動域が小さいことが推測された. また、犬の頸椎において頭側と尾側の可動域を比較した Johnson らの報告によると、頭側に比べ尾側が最大で 2.6 倍回旋していた (Johnson JA, 2011). 本検討においても C5-6 の可動域が C4-5 の約 4 倍であったことから、尾側頸椎ほど回旋しやすいことが示唆された.

これまで、犬の頸椎における Plate 固定あるいは Pin と PMMA の固定による生体力学的検討は行われているものの、同一の試験体においてその固定性を比較し、また隣接椎間への影響を評価したという報告は筆者の知る限りされていない. 今回の結果から、固定法の違いにより隣接椎間に生じる影響が異なることが示唆された. しかし、本検討で用いたモデルでは椎間板、関節包、および主要な靱帯以外の軟部組織が全て除去されている. また曲げおよび回旋をそれぞれ単独で試験している. 実際の犬の頸椎ではこれらの動きが複雑に組み合わさって生じるため、同様の可動性は再現できていないと考えられる. また、本検討では椎間板は無処置のまま固定を行っている. 本来、椎体固定の目的は椎体の癒合であることから、椎間板および椎間腔に何らかの処置を行うのが一般的で



ある (Bruecker KA 1989; Bergman RL, 2008; Steffen F, 2011). よって, 実際に椎体固定後に生じる影響とは異なる可能性がある.

### 3-5 小括

本章においては, 健常ビーグル犬から採取した頸椎を使用して頸椎可動モデルを作成し, 椎体固定後の処置椎間部および隣接椎間部の力学環境に及ぼす影響について, 6 軸材料試験機を用いて検証した. その結果, 椎体固定は隣接椎間における力学的環境を変化させ, 隣接椎間障害の一因となる可能性が示唆された. また, 左右側屈においては Plate モデルの方が, 左右回旋においては PMMA モデルの方がより高い固定強度を有していたことから, 固定法の違いにより隣接椎間に生じる影響が異なることが示唆された.

Table 3-1. The ranges of motion (°) in the bending (flexion and extension direction and left and right direction) and rotational tests (left and right direction) in the three models.

Level	Flexion/Extension (n=6)			Lateral bending (n=6)			Axial rotation (n=8)		
	Intact	PMMA	Plate	Intact	PMMA	Plate	Intact	PMMA	Plate
C4-5	19.4 ± 2.3	25.5 ± 2.1	27.8 ± 5.0	15.6 ± 2.0	21.6 ± 2.0	22.9 ± 1.1	4.2 ± 2.6	12.5 ± 2.4	9.5 ± 1.4
C5-6	22.0 ± 2.3	9.6 ± 1.4	7.8 ± 1.7	14.3 ± 2.8	8.0 ± 2.0	3.2 ± 1.2	16.8 ± 2.3	6.8 ± 1.0	10.0 ± 1.0

The data are presented as the means ± standard deviation. C4-5: fourth to fifth cervical interspace, C5-6: fifth to sixth cervical interspace, PMMA: polymethylmethacrylate.

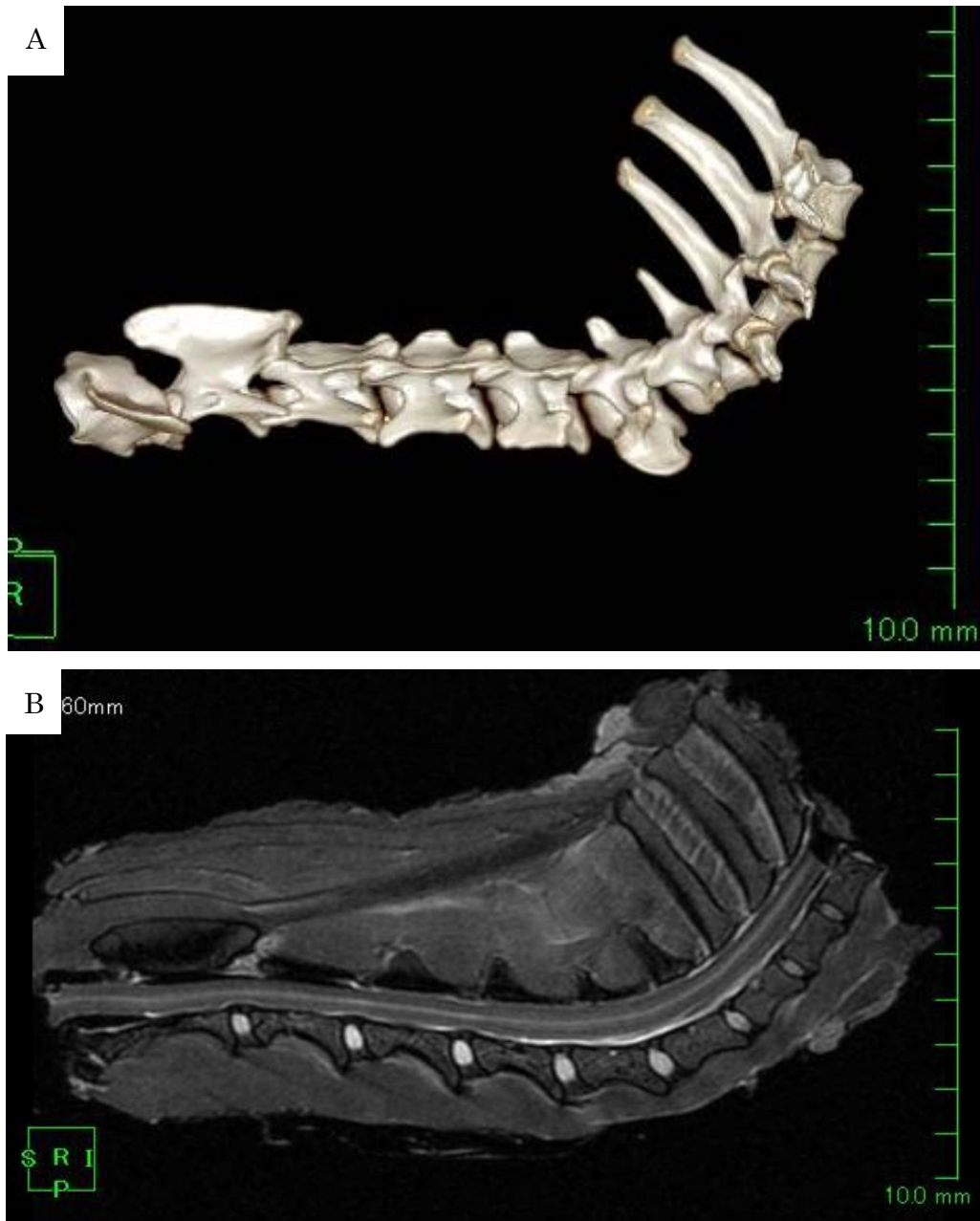


Figure 3-1. Computed tomography and magnetic resonance images were taken in all spines to evaluate vertebral morphology and intervertebral disc hydration. Three-dimensional computed tomography reconstruction images (A) were used for exclude a fracture or deformity of the spine. Sagittal T2-weighted magnetic resonance images (B) were used for exclude nucleus pulposus tissues exhibiting low signal intensities by the Pfirrmann Grading System.

A

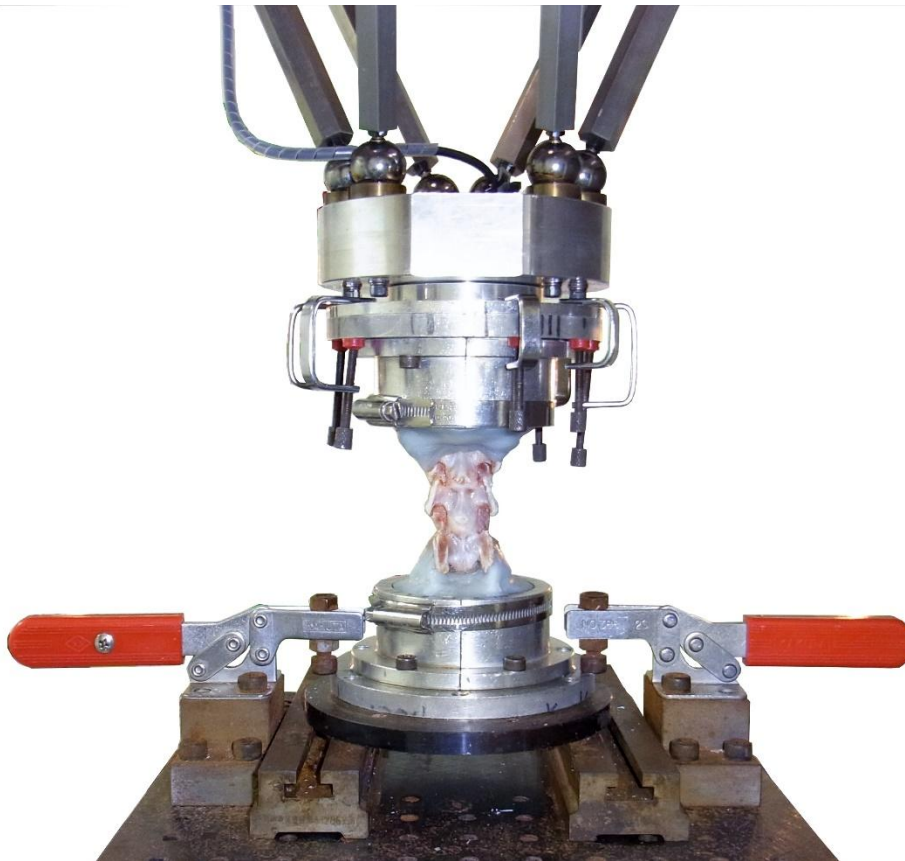


Figure 3-2. Photograph (A) of the 6-axis material tester. The most cranial vertebra (C4) and caudal vertebrae (C6 and C7) were fixed on a mounting jig using dental resin.

B

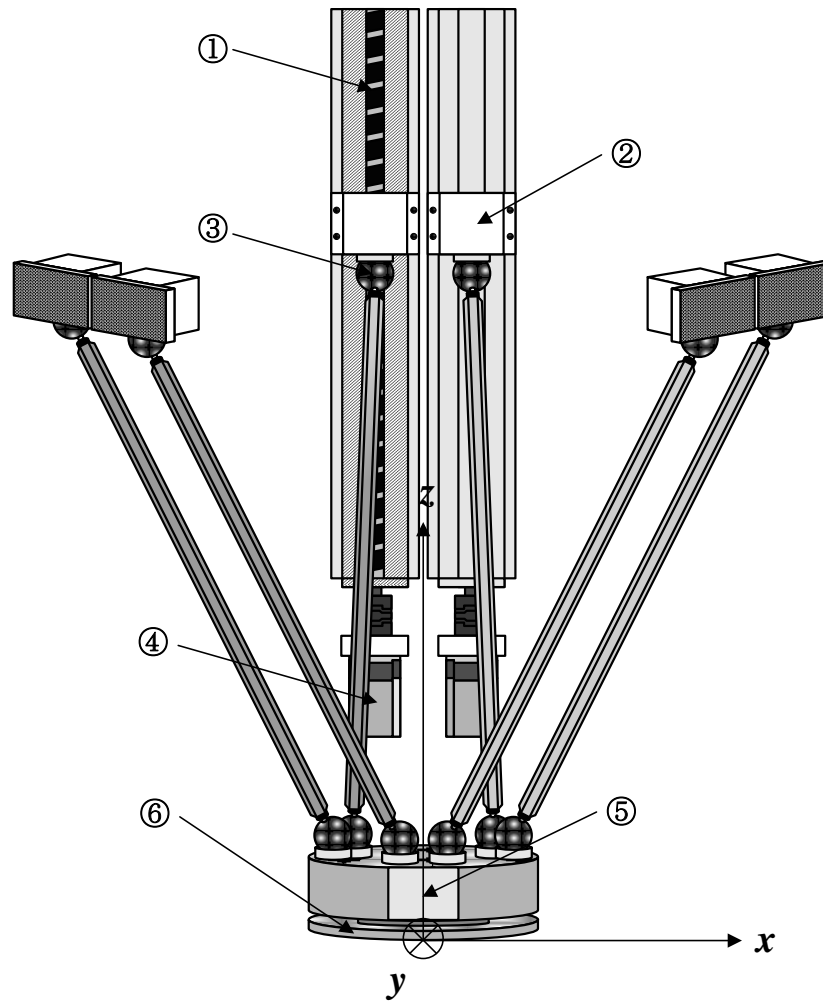


Figure 3-2. Illustration (B) of the 6-axis material tester. 1) Ball screw, 2) Linear actuator, 3) Magnet ball joint, 4) Servo motor, 5) 6-axis force sensor, 6) End effector.

The 6-axis force sensor at the tip of the device enables the detection of force and rotational torque along the  $x$ ,  $y$ , and  $z$  axes.

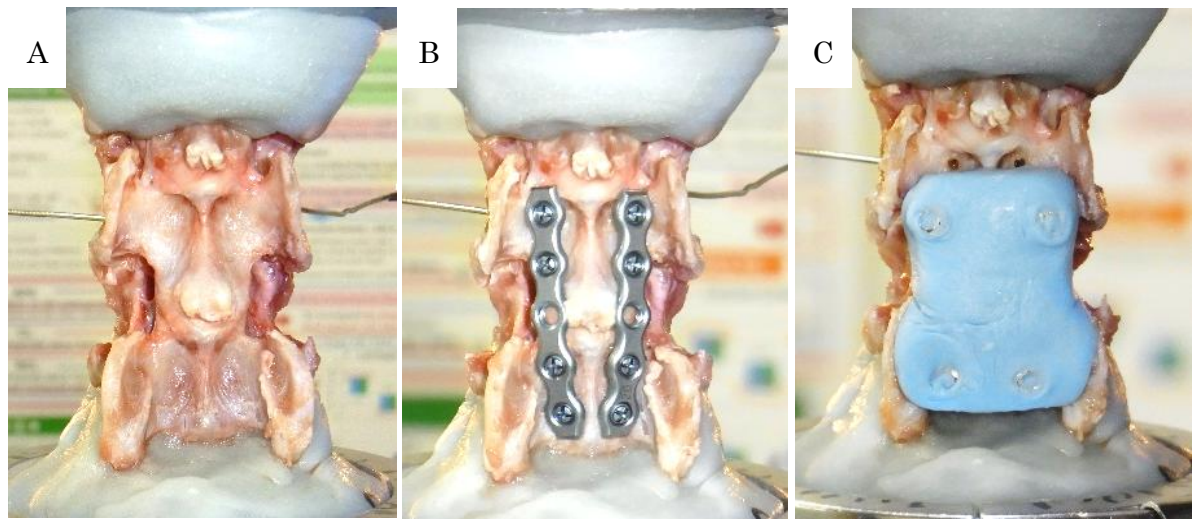


Figure 3-3. Photographs illustrating the three models that were prepared stepwise on the same specimen. The Intact model was left untreated (A). The Plate model was stabilized at the C5-6 vertebral segment using the MatrixMANDIBLE System (B). The polymethylmethacrylate model was stabilized at the C5-6 vertebral segment using a metal implant and PMMA (C).

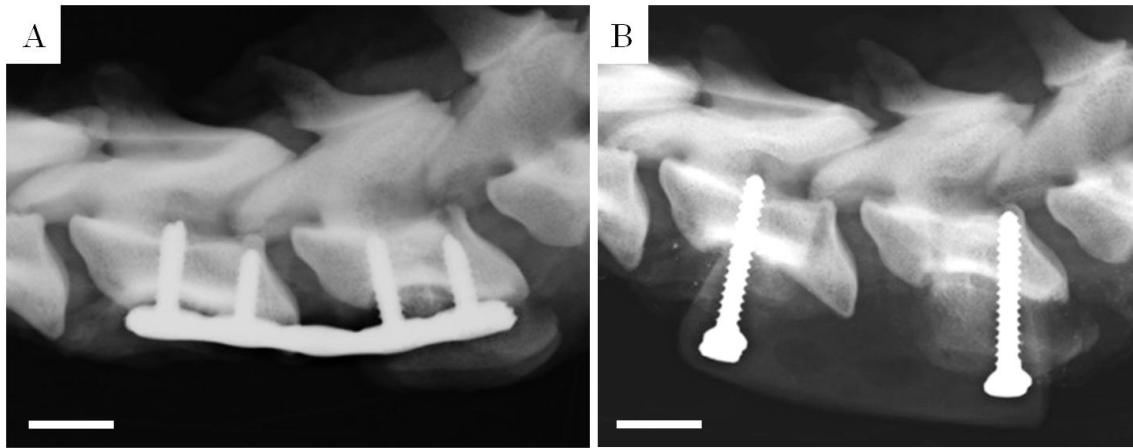


Figure 3-4. Lateral radiograph of fixation models of C5-6: Plate model (A) and PMMA model (B). Scale bar: 10 mm.

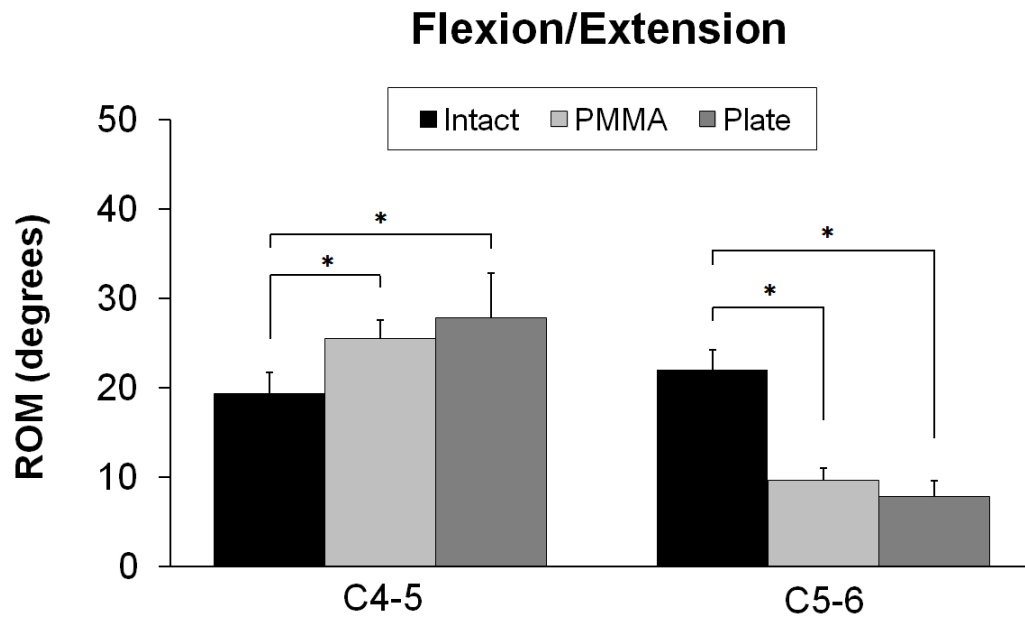


Figure 3-5. The range of motion (mean  $\pm$  standard deviation) of each model and interspace in the bending test in the flexion-extension direction. The values are presented as the mean of 6 specimens, and the error bars indicate the standard deviations. C5-6 is the treated site, and C4-5 is the adjacent segment. \* $p < 0.05$  between the models.



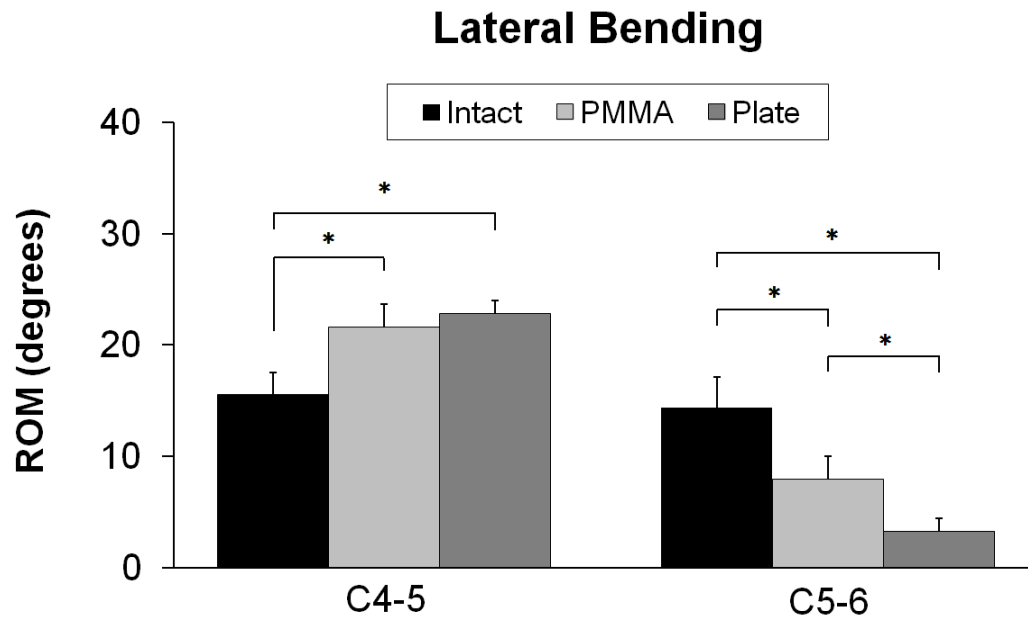


Figure 3-6. The range of motion (mean  $\pm$  standard deviation) of each model and interspace in the bending test in the left and right direction. The values are presented as the mean of 6 specimens, and the error bars indicate the standard deviations. C5-6 is the treated site, and C4-5 is the adjacent segment. \* $p < 0.05$  between the models.

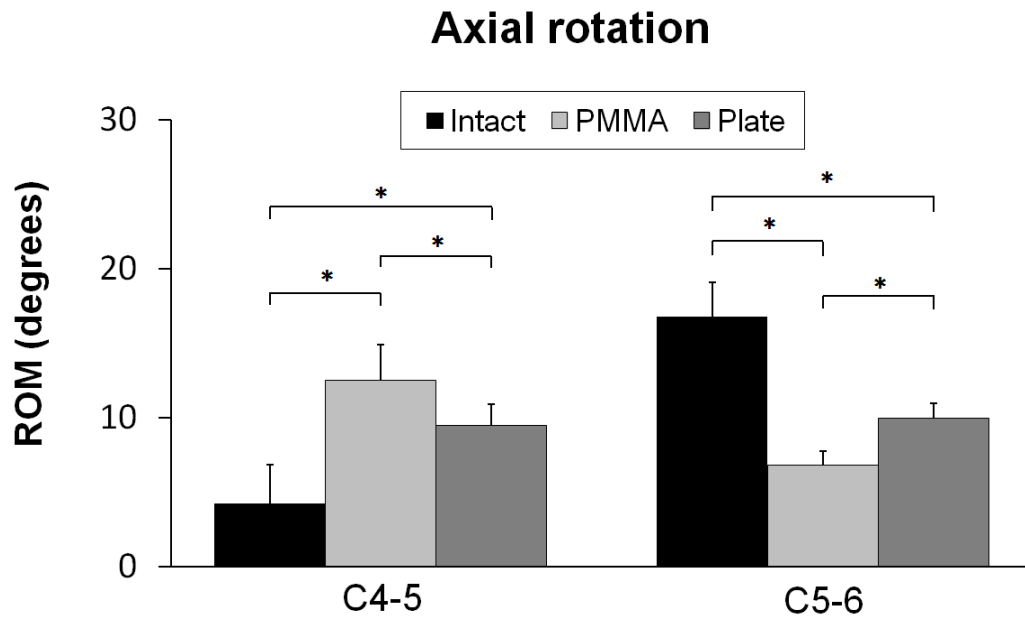


Figure 3-7. The range of motion (mean  $\pm$  standard deviation) of each model and interspace in the rotational test in the left and right direction. The values are presented as the mean of 8 specimens, and the error bars indicate the standard deviations. C5-6 is the treated site and C4-5 is the adjacent segment. \* $p < 0.05$  between the models.

## 第4章 犬の頸椎固定モデルを用いた頸椎椎間部における隣接椎間障害に関する検討

### 4-1 緒言

椎体固定術 (Vertebral Fixation: VF) は椎骨の骨折や脱臼をはじめとし、環軸椎不安定症、椎間板ヘルニア、頸部脊椎脊髄症 (ウォブラー症候群)、馬尾症候群、椎体および脊髄腫瘍など様々な症例に適応されるが、いずれの症例においても椎体間に不安定性が生じている場合、もしくは減圧術により不安定性が予測される場合に椎体の安定化を目的として行われる (Fitch RB, 2000; Lemarié RE, 2000). しかし、VF 実施後には隣接する椎間部に類似した病変 (ドミノ病変) が続発する危険性が指摘されている (Bagley RS, 2005). ドミノ病変は、椎間部が固定されることにより隣接する椎間に異常な力学環境が生じ、潜在的な不安定性を悪化させ、椎間板髄核の逸脱や線維輪の肥大化を招くとされている (Bruecker KA, 1989; Seim HB, 1989).

変性した椎間板の髄核においては変性の過程で蛋白分解酵素であるマトリクスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinases: MMPs) の発現が亢進し、I 型コラーゲン (Type I collagen: Col1A1) や II 型コラーゲン (Type II collagen: Col2A1)、アグリカン (aggrecan) 等の細胞外基質の組成が変化する (Le Maitre CL, 2007). 特に変性した髄核においては MMP13 の増加により Col2A1 が減少することが知られている (Itoh H, 2012). また椎間の不安定性の増加により炎症反応が惹起され、血管新生に関与している血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の発現量が増加し、それに伴い上流では腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ ) やインターロイキン-1  $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ : IL-1  $\beta$ ) が、下流では MMP-10 や ADAMST (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin) などの炎症性マーカーがそれぞれ増加することが知られている (Purmessur D, 2008; Lee JM, 2011). 一方で、変性した線維輪における報告は髄核と比べて非常に乏しく、またイヌの頸椎に関する報告はほとんどされていない.

本研究の第3章において、健常ビーグル犬より採取した頸椎を使用し、椎体固定後の隣接する椎間部に生じる力学的特性の定量的な評価を行ったところ、隣接する椎間部において可動性の増加が

認められたことから、椎体固定により隣接椎間で生体力学的環境の変化が生じている可能性が示唆された。しかしながら、犬において椎体固定後の隣接する椎間部での力学環境の変化が及ぼす影響について検討したという報告は少なく、その詳細については知られていない。そこで本検討の目的は、犬の椎体固定モデル作成により類似した力学的環境を再現し、隣接椎間における生体力学的環境の変化が及ぼす影響を組織学的に評価することである。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 供試動物

本検討では健常ビーグル成犬 12 頭を用いた。いずれも未避妊雌で、実験開始時の平均月齢は  $12.5 \pm 1.9$  (11~15 ヶ月齢)、平均体重は  $9.1 \pm 1.0$  (8.8~10.4kg) であった。これら 12 頭は術式の違いにより Control 群と椎体固定群に分け、モデル犬を作成した。外科的処置と術後管理は日本獣医生命科学大学動物実験規定 (承認番号 26-43) に準じて行い、すべての実験処置と動物の飼育は日本獣医生命科学大学にて行った。

### 4-2-2 モデル犬の作成

全てのモデル犬においてプロポフォール (6mg/kg IV) により麻酔導入後、イソフルラン (1.5~2.5%) にて麻酔を維持した。なお、周術期の疼痛管理には塩酸ブプレノルフィン (0.02 mg/kg IM) を用いて行い、術後の鎮静および感染予防としてブプレノルフィン (0.01mg/kg IM BID) およびセフメタゾン (25mg/kg IV BID) 投与を 2 週間継続した。また頸椎の形態および椎間板変性を評価するため、麻酔下で CT および MRI 撮影を行った。CT 撮影には 80 列/160 スライス CT (Aquilion PRIME, Toshiba Medical Systems, Tochigi, Japan) を用い、画像処理ソフト (AZE Virtual Place Fujin 310 3.1002, AZE, Tokyo, Japan) で作成した 3D 再構築画像により脊椎の骨折および奇形を除外した。MRI 撮影には 3.0T MRI (Signa EXCITE 3.0 T, GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) を用い、T2 強調矢状断画像により Pfirrmann Grading System (Pfirrmann CW, 2001) に準じて椎間板髄核が低信号を示したものは

除外した。なお、Pfirrmann Grading System は Grade1 から Grade5 までの 5 段階評価によるグレード分類であるが、本検討では Grade1 から Grade3 までに該当する個体を用いた。

Control 群および椎体固定群はいずれも仰臥位にて頸部を無菌的に準備し、頸部腹側アプローチより第 5, 6 頸椎間 (C5-6) を露出後、各処置を行った (Figure 4-1)。Control 群においては各椎体腹側に径 2.4mm の titanium screw (MatrixMANDIBLE screw, DePuy Synthes Japan VET, Tokyo, Japan) を 2 本ずつ平行に設置した。一方、椎体固定には厚さ 2.0mm の titanium plate (MatrixMANDIBLE plate, DePuy Synthes Japan VET, Tokyo, Japan) を用い、第 3 章と同様の固定方法を実施した。

#### 4-2-3 各実験群の設定

実験群は術式の違いにより Control 群と椎体固定群に分類し、椎体固定群はさらに術後の管理によって、短期・安静管理群 (6M 群)、短期・運動負荷群 (treadmill: TM 群)、長期・安静管理群 (12M 群) の 4 群に分けて検討を行った。安静管理群に関しては、術後の検査時以外はケージレストとした。また運動負荷群に関しては、術後 2 週間から 6 ヶ月目までトレッドミルを用いて運動負荷を適用した。プロトコールは、週 5 日間、1 日 1 回 30 分間、時速 10km で実施した。なお、Control 群、6M 群、TM 群は術後 6 ヶ月間、12M 群は術後 12 ヶ月間の経過観察を行い、その後安楽死とした。

#### 4-2-4 術後評価

術後 1・2・3・4・5・6・9・12 ヶ月に神経学的検査、X 線検査、および MR 検査を実施した。1) 神経学的検査に関しては、固有位置感覚 (CP)、橈側手根伸筋反射および膝蓋腱反射により評価した。2) X 線検査に関しては、全身麻酔下において頸部の単純 X 線側方面像および腹背像を撮影し、椎骨終板における骨硬化像、変形性脊椎症の有無、固定装置の破損および骨折の有無を評価した。3) MRI 検査に関しては、全身麻酔下において頸部の T2 強調矢状断画像を撮影し、脊髄圧迫の有無を評価した。また Iwata らの報告に準じて椎間板髄核の信号値の測定を行った (Iwata M, 2015)。

#### 4-2-5 組織の処理方法および組織学的解析

実験犬は、各観察期間終にペントバルビタールナトリウム（50mg/kg IV）の過剰投与により安楽死後、C4-5の椎間板髄核（NP）および腹側の線維輪（AF）をそれぞれ採取した。採取した組織は、まず4%PFAで固定後、パラフィンに包埋し、組織切片を作成した。各組織切片は脱パラフィン後、エタノールにより段階的に脱水し、各染色法により染色した。なお以下に各染色法の詳細について示した。

##### (1) ヘマトキシリン・エオジン（Hematoxylin-Eosin: HE）染色

細胞密度、細胞形態および組織学的スコアの評価を目的としてHE染色を行った。

NPおよびAFの細胞密度は、400倍で無作為に選択した10視野において細胞数を計測し、各細胞数を面積で割り算出したものを各群で比較した。

NPは細胞形態により脊索細胞と軟骨細胞様細胞に分類した（Homer HA, 2002）。なお、脊索細胞に関しては、核が円形で細胞質が好酸性の細胞が小胞巣状または索状に配列し、後述するAE1/AE3（cytokeratin）に陽性を示したものと併せて脊索細胞と判定した。AFは細胞形態により球形細胞と紡錘形細胞に分類した（Johnson JA, 2010）。なお、細胞周囲が軟骨基質のより取り囲まれている細胞を球形細胞、核の長さが幅に対して2倍以上の細胞を紡錘形細胞と判定した。また、AFに関しては各群における球形細胞と紡錘形細胞の割合を比較した。

組織学的スコアに関しては、Bergknut histological grading system（Bergknut N, 2013）を用いて評価した。400倍で無作為に選択した10視野において軟骨細胞の増殖（0~6points）、脊索細胞の有無（0~2points）、基質の染色性（0~2points）を計10ポイントで評価し、各群で比較した（Table 4-1）。

##### (2) pH2.5 アルシアンブルー（Alcian-Blue: AB）染色

細胞外基質の評価を目的としてAB染色を行った。NPではHE染色と併せて組織学的スコアの評価に用いた。またAFでは軟骨基質の評価に用いた。

#### 4-2-6 免疫組織学的評価

NP および AF における変性変化を評価するため、Col1A1, Col2A1, VEGF, そして MMP13 の免疫染色を行った。それぞれの切片において 400 倍で無作為に選択した 5 視野の陽性細胞数および陽性細胞率を計測し、各群間で比較した。なお陽性細胞率は次のように算出した:  $(\text{positive cells number} / \text{total cell number}) \times 100$ 。また、NP においてのみ、脊索細胞の評価を目的としてサイトケラチン (AE1/AE3) を用いた免疫染色を行った。各免疫染色に用いた一次抗体の詳細については Table 4-2 に示した。いずれも二次抗体にはホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (HRP-labelled goat anti-rabbit immunoglobulin antibody, Dako Japan Inc., Tokyo, Japan.) を用いた。一次抗体の反応時間は 4°C 下で 24 時間とし、二次抗体は室温で 20 分間とした。増感およびペルオキシダーゼの発色には LSAB2 kit/HRP (LSAB2 kit/HRP, Dako Japan Inc., Tokyo, Japan.) を 2 分間適用し、その後ヘマトキシリンにて核染および封入し、陽性細胞の観察を行った。以下に各免疫染色における詳細について示した。

##### (1) Col1A1

I 型コラーゲン線維の評価を目的として、抗 Col1A1 抗体 (1:1000, LSL Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用いた免疫染色を行い、いずれも細胞質内に陽性反応が認められたものを陽性細胞と判定した。なお、抗 Col1A1 抗体のイヌでの交差反応性については確認されており (Ichinohe T 2015), 本検討では健常ビーグル成犬の椎骨終板における骨基質を Col1A1 の陽性コントロールとして用いた。

##### (2) Col2A1

II 型コラーゲン線維の評価を目的として、抗 Col2A1 抗体 (1:500, LSL Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用いた免疫染色を行い、いずれも細胞質内に陽性反応が認められたものを陽性細胞と判定した。なお、抗 Col2A1 抗体のイヌでの交差反応性については確認されており (Ichinohe T 2015), 本検討では健常ビーグル成犬の椎骨終板における軟骨細胞を Col2A1 の陽性コントロールとして用いた。

### (3) MMP13

MMPs の評価を目的として、抗 MMP13 抗体 (1:100, Abcam, UK) を用いた免疫染色を行い、いずれも細胞質内に陽性反応が認められたものを陽性細胞と判定した。なお、抗 MMP13 抗体のイヌでの交差反応性については確認されており (Boileau C, 2009)、本検討では健常ビーグル成犬の頸椎椎間関節における軟骨細胞を MMP13 の陽性コントロールとして用いた。

### (3) VEGF

炎症性サイトカインの評価を目的として、抗 VEGF 抗体 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) を用いた免疫染色を行い、いずれも細胞質内に陽性反応が認められたものを陽性細胞と判定した。本検討では、健常ビーグル成犬の腎臓尿管上皮細胞を陽性コントロールとして用いた。

### (4) サイトケラチン (AE1/AE3)

上皮性マーカーであるサイトケラチンの評価を目的として、抗 AE1/AE3 抗体 (1:200, Dako Japan Inc., Tokyo, Japan.) を用いた免疫染色を行い、いずれも細胞質内に陽性反応が認められたものを陽性細胞と判定した。本検討では、健常ビーグル成犬の角膜上皮を陽性コントロールとして用いた。

## 4-2-7 統計処理

各群間における細胞密度、組織学的スコア、陽性細胞数および陽性細胞率の比較には、Leven 検定を用いて等分散性を検定した。その後、Parametric 法として Tukey-HSD test または Games-Howel test を使用し、Non-parametric 法として Bonferroni correction を使用し、 $p < 0.05$  をもって有意であると判定した。



#### 4-3 結果

##### 4-3-1 術後の評価

術後の神経学的検査により, Control 群および椎体固定群において各検査日で明らかな神経学的な異常は認められなかった. 単純 X 線検査においては, 椎体固定群 (12M 群) の 1 頭のみでわずかに変形性脊椎症を示唆する所見が認められたが, Control 群では認められず, また椎骨終板の骨硬化像は両群において認められなかった. また固定装置の破損や椎体の骨折も認められなかった. MRI 検査においては, 各群のいずれの検査日においても脊髄実質の圧迫は認められなかった (Figure 4-2A, B). また椎間板髄核の信号値を各群で計測したところ, Control 群では術前が  $107.4 \pm 23.5$ , 6 ヶ月後が  $99.2 \pm 18.6$  であり, 有意な差は認められなかった ( $p = 0.082$ ). 6M 群では術前が  $95.9 \pm 20.1$ , 6 ヶ月後が  $86.6 \pm 25.2$  であり, 有意な差は認められなかった ( $p = 0.398$ ). TM 群では 6 ヶ月後が  $73.1 \pm 12.8$  であり, 術前の  $105.0 \pm 15.9$  と比較して有意に低値を示した ( $p < 0.001$ ). 12 群では 12 ヶ月後が  $64.4 \pm 12.8$  であり, 術前の  $116.1 \pm 13.9$  と比較して有意に低値を示した ( $p < 0.001$ ).

##### 4-3-2 椎間板髄核における組織学的および免疫組織学的評価

NP における細胞密度および組織学的スコアを Table 4-3 に示した. 細胞密度を各群で比較したところ, Control 群と比較して TM 群 ( $p = 0.020$ ) および 12M 群 ( $p = 0.013$ ) で有意に高値を示した (Figure 4-3). また組織学的スコアを各群で比較したところ, Control 群と比較して 6M 群 ( $p < 0.001$ ), TM 群 ( $p = 0.005$ ) および 12M 群 ( $p < 0.001$ ) で有意に高値を示した (Figure 4-4). 椎体固定群においては, 軟骨細胞様細胞の増加および細胞集塊の形成が多数観察された (Figure 4-5A). 一方, Control 群においては軽度の軟骨細胞様細胞の増加が認められたが, 椎体固定群ほどの増加は認められず, 細胞集塊はほとんど観察されなかった (Figure 4-5B). また一部においては脊索細胞の残存が認められた (Figure 4-5C, D).

Coll1A1, Col2A1, MMP13 および VEGF における免疫組織化学染色の結果, Control 群および椎体固定群の NP において, 陽性細胞が認められた (Figure 4-6). なお, 計測した陽性細胞数および

陽性細胞率は Table 4-3 に示した. Col1A1 の陽性細胞率を各群で比較したところ, Control 群と比較して 6M 群 ( $p < 0.001$ ) および TM 群 ( $p < 0.001$ ) で有意に高値を示した (Figure 4-7). Col2A1 の陽性細胞率を各群で比較したところ, Control 群と比較して 6M 群 ( $p = 0.003$ ), TM 群 ( $p = 0.007$ ) および 12M 群 ( $p = 0.003$ ) で有意に低値を示した (Figure 4-8). MMP13 の陽性細胞率を各群で比較したところ, Control 群と比較して TM 群 ( $p = 0.002$ ) で有意に高値を示した (Figure 4-9). VEGF の陽性細胞率を各群で比較したところ, Control 群と比較して TM 群 ( $p = 0.006$ ) で有意に低値を示した (Figure 4-10).

#### 4-3-3 線維輪における組織学的および免疫組織学的評価

AF における細胞密度を Table 4-3 に示した. 細胞密度を各群で比較したところ, Control 群と比較して 6M 群 ( $p < 0.001$ ), TM 群 ( $p < 0.001$ ) および 12M 群 ( $p < 0.001$ ) で有意に低値を示した (Figure 4-11). Control 群においては線維輪中に多数の紡錘形細胞と, わずかに球形細胞が認められた (Figure 4-12A, C). 一方, 椎体固定群においては球形細胞の増加が認められ, 外側の層状構造が不明瞭であった (Figure 4-12B, D). また, 各群において球形細胞と紡錘形細胞の割合を比較したところ, 特に TM 群と 12M 群において球形細胞の割合が増加する傾向にあった (Figure 4-13).

Col1A1, Col2A1, MMP13 および VEGF における免疫組織化学染色の結果, 椎体個体群の AF において, 陽性細胞が認められた (Figure 4-14). また Control 群においては, Col1A1 を除き, 陽性細胞が認められた. なお, 計測した陽性細胞数および陽性細胞率はいずれも Table 4-3 に示した. Col1A1 の陽性細胞率を各群で比較したところ, Control 群と比較して 6M 群 ( $p = 0.030$ ) で有意に高値を示した (Figure 4-15). Col2A1 の陽性細胞率を各群で比較したところ, Control 群と比較して 6M 群 ( $p = 0.006$ ) で有意に高値を示した (Figure 4-16). MMP13 の陽性細胞率を各群で比較したところ, Control 群と比較して 6M 群 ( $p = 0.003$ ) および 12M 群 ( $p = 0.013$ ) で有意に低値を示した. また, TM 群は 6M 群 ( $p < 0.001$ ) および 12M 群 ( $p < 0.001$ ) と比較して有意に高値を示した (Figure. 4-17). VEGF の陽性細胞率を各群で比較したところ, 有意な差は認められなかった (Figure. 4-18).

#### 4-4 考察

本検討では健常ビーグル成犬の C5-6 において椎体固定を実施し、隣接椎間 (C4-5) における影響を組織学的に検証した。その結果、椎体固定群において C4-5 の NP 内で軟骨細胞様細胞が増加し、さらには集塊形成も多数認められた。犬の椎間板ヘルニアは、椎間板の変性様式に基づいて Hansen I 型と II 型に分類され、犬種により好発年齢が異なることが知られている (Braund KG, 1975; Gage, ED, 1975; Hansen HJ, 1952)。本検討に用いた犬種は全てビーグル犬 (軟骨異常栄養性犬種) であることから、Hansen I 型に認められる変性が早期に生じ、今回の結果に影響していた可能性がある。組織学的には、椎間板早期の変性として髄核組織における特徴的な細胞成分の変化が認められている。つまり、脊索細胞が軟骨細胞様細胞とそれらに関連した細胞外基質 (ヒアリン軟骨様物質と崩壊したコラーゲン線維) によって置換される “*chondrification*” が生じる (Braund KG, 1975; Cappello R, 2006; Ghosh P, 1975; Hansen HJ, 1952; Hunter CJ, 2004)。また、変性した髄核内では軟骨細胞様細胞が集塊を形成することが報告されている (Ganey T, 2009)。以上の報告より、本検討では椎体固定の影響により隣接椎間での変性が進行している可能性が示唆された。また、椎間板変性に関しては、近年 Bergknut らによって提唱されている histological grading system によるスコアが変性と相関することが知られている (Bergknut N, 2013)。本検討においても Bergknut らの報告に準じて NP でのスコア化を行った結果、椎体固定群 (6M 群, TM 群, 12M 群) で C4-5 におけるスコアの上昇が認められたことから、椎体固定の影響による変性の進行が示唆された。さらに、本検討では TM 群および 12M 群における NP の MRI 信号値が術前と比較して有意に低値を示し、過去の報告 (Iwata M, 2015) における中等度の変性 (Grade 2:45-85) と同程度であったことから、椎体固定の影響による隣接椎間での変性が MRI の信号値の低下として確認された。

本検討においては、Control 群と比較して椎体固定群の C4-5 の NP において Col1A1 陽性細胞および MMP13 陽性細胞の増加と、それに伴う Col2A1 陽性細胞の減少が C4-5 で認められた。椎間板髄核における細胞外基質に関しては、変性によりアグリカンおよび Col2A1 が減少し、水分含有量の減少を伴うことが報告されている (Antoniou J, 1996; Oegema TR, 1993)。その背景には変性の過程で

蛋白分解酵素である MMP の発現が亢進し、特に MMP13 の増加により Col2A1 が減少することが知られている (Itoh H, 2012). また Col2A1 だけでなく、線維軟骨組織に特異的に発現する Col1A1 の組成も変化することが知られており (Le Maitre CL, 2007), 変性および逸脱した髄核組織において Col1A1 の発現量が増加することが確認されている (Iwata M, 2013). さらにヒトの変性髄核組織に関しては、メカニカルストレスを加えることで細胞外基質である periostin の遺伝子発現が増加し、線維化とそれに伴う Col1A1 の増加や SOX9 の減少が確認されている (Tsai TT, 2013). これらの自然発生性に認められる椎間板変性の過程に類似した所見が本検討でも認められたことから、椎体固定の影響により隣接椎間での変性が進行している可能性が示唆された。

一方、線維輪の変性においては組織学的に 2 つの特徴的な変化が認められることが報告されている (Bergknut N, 2013). 1 つは層状のコラーゲン線維の崩壊であり、半円構造の消失が認められる。もう 1 つは線維輪における軟骨化生であり、移行帯を超えて軟骨細胞様細胞の増殖が認められる。本検討における AF の組織学的所見としては、Control 群においてわずかであった球形細胞が椎体固定群において増加する傾向が認められ、また外側の層状構造が不正となっている部分も多く認められたことから、線維輪における変性が生じていたと考えられる。細胞密度に関しては、Control 群と比較して椎体固定群すべてにおいて有意に低値を示した。変性した線維輪における細胞密度の変化に関して明確な報告はされていないものの、NP で細胞密度の低下が報告されていることから (Johnson JA, 2010)、本検討でも認められた細胞密度の低下が細胞成分の変化 (球形細胞の割合の増加) と関連している可能性がある。

線維輪の変性において、細胞外基質の組織学的変化を調査したという報告は少ない。そこで今回の検討では、隣接椎間である C4-5 の線維輪において各種免疫染色を行い、コラーゲン線維の組成の変化を調べたところ、Control 群および椎体固定群のいずれにおいても広範囲に Col1A1 陽性領域が認められた。しかしながら、TM 群や 12M 群においては Col1A1 の陽性反応が低下し、一部で軟骨基質に置き換わっている部分も認められたことから、椎体固定の影響によりコラーゲン線維の分解と軟骨化生の進行が示唆された。また Col1A1 陽性細胞率に関しては一部で有意な差が認められ

たものの、いずれも陽性細胞数は少なく、反応に乏しかった。Col1A1 は椎間板線維輪だけでなく、靱帯組織においても豊富に存在しているが、張力負荷の増大に伴い細胞外基質の分解が亢進され、陽性領域が減少することが報告されている (Ichinohe T, 2015)。本検討においても、TM 群や 12M 群で Col1A1 陽性領域が減少したのは、椎体固定の影響により張力負荷が増大したことが原因の一つであると考えられる。一方、Col2A1 に関しては陽性領域が認められなかったものの、陽性細胞率はコントロール群と比較して椎体固定群において高値を示し、また MMP13 の陽性細胞率は 6M 群および 12M 群において低値を示した。よって、線維輪においては MMP13 の発現が亢進せず、Col2A1 の分解が認められなかったと考えられる。また今回の検討においては、隣接椎間の可動性の増加に伴い VEGF の発現が増加することが予測されたが、NP および AF のいずれにおいても Control 群と椎体固定群に有意な差は認められなかったことから、これらの反応はより長期的な経過もしくは椎間板の逸脱を生じた際に認められる反応であると推察された。

本検討においては、固定期間の長さおよび運動負荷の有無の違いにより、実験群を分けて検討を行ったところ、特に TM 群および 12M 群において変化が認められた。前述したように、椎間板髄核の MRI 信号値に関しては、TM 群および 12M 群において術前と比較して有意に低値を示した。また MMP13 陽性細胞率は TM 群の NP または AF の両方で高値を示した。しかしながら 6M 群と 12M 群を比較したところ、いずれの項目においても明らかな差は認められなかった。よって、椎体固定後の隣接椎間においては、隣接椎間の可動域が増加した状態で日常的な運動を繰り返すことにより、隣接椎間障害の進行を早めている危険性があると考えられた。

本検討においては、隣接椎間における組織学的評価を目的として各種染色を行った。NP の変性に関しては、上流では TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  が、下流では MMP-10 や ADAMST などの炎症性マーカーがそれぞれ増加すると報告されているが (Lee JM, 2011; Purnessur D, 2008)、これらのマーカーに関して本検討では評価できていない。また今回の検討では、各マーカーにおける遺伝子発現解析も併せて評価出来ていない。よって、今後はこれらの炎症性マーカーに関する評価と、各マーカーにおける遺伝子発現解析の評価を併せたより詳細な検討が必要である。

#### 4-5 小括

本検討においては、第3章において、健常ビーグル犬の頸椎を使用し、隣接する椎間部において可動性の増加が認められたことから、犬の椎体固定モデル作成により類似した力学的環境を再現し、隣接椎間における力学的環境の変化が及ぼす影響の評価を行った。その結果、NP のみでなく AF において変性を示唆する所見が認められたことから、椎体固定の影響により椎間板髄核および線維輪の変性が進行し、椎間の逸脱や線維輪の肥大化といった隣接椎間障害を招く危険性があることが示唆された。また椎体固定後の隣接椎間においては、固定期間や運動負荷による影響を受けている可能性があることが示唆された。

Table 4-1 Bergknot histological grading system for analysis of nucleus pulposus (NP).

Cells chondrocyte proliferation (0~6 points)

---

- 0 No proliferation
- 1 Increased chondrocyte-like cell density
- 2 Connection of two chondrocytes
- 3 Small size clones (i.e., several chondrocytes group together, i.e. 2~7 cells)
- 4 Moderate size clones (i.e. >8 cells)
- 5 Huge clones (i.e. >15 cells)
- 6 Scar/tissue defects

Presence of notochordal cells (0~2 points)

---

- 0 Abundantly present (>50%)
- 1 Present (1~50%)
- 2 Absent

Matrix staining Alcian blue (0~2 points)

---

- 0 Blue stain dominates
- 1 Middle
- 2 Weak blue stain

Table 4-2 Primary antibodies used in this study.

Antibody	Source	Dilution	Pretreatment
Col1A1	Rabbit polyclonal	1:1000	60°C in citrate buffer for 60 minutes
Col2A1	Rabbit polyclonal	1:500	60°C in citrate buffer for 60 minutes
MMP13	Rabbit polyclonal	1:100	60°C in citrate buffer for 60 minutes
VEGF	Rabbit polyclonal	1:100	60°C in citrate buffer for 60 minutes
AE1/AE3	Mouse monoclonal	1:200	60°C in citrate buffer for 60 minutes



Table 4-3 Histological analysis of nucleus pulposus (NP) and annulus fibrosus (AF).

Measurement	NP				AF			
	Control	6M	TM	12M	Control	6M	TM	12M
Cell density (cells/mm <sup>2</sup> )	215.8 ± 82.6	274.0 ± 121.8	301.1 ± 101.2	294.7 ± 68.0	348.0 ± 75.4	207.9 ± 45.3	169.1 ± 42.6	200.9 ± 51.3
Histological score	2.7 ± 1.5	5.3 ± 2.7	4.8 ± 2.2	5.7 ± 1.8				
% of notochodal cells	23.1	30.8	33.2	41.3				
% of chondololike cells	76.9	69.2	66.8	58.7				
% of elongated cells					65.2	58.5	17.0	14.5
% of rounded cells					34.8	41.5	83.0	85.5
Col1A1 (total positive cells)	7.1 ± 5.6	16.1 ± 7.3	21.7 ± 13.4	10.7 ± 9.3	0	0.4 ± 0.7	0.1 ± 0.4	0.4 ± 0.8
Col1A1 (% of positive cells)	14.1 ± 9.8	49.2 ± 12.0	47.7 ± 20.1	34.1 ± 26.1	0	1.3 ± 2.7	0.2 ± 1.1	1.4 ± 3.0
Col2A1 (total positive cells)	20.5 ± 7.1	8.9 ± 5.4	22.9 ± 17.9	12.2 ± 6.5	1.2 ± 1.5	1.9 ± 1.6	2.0 ± 2.2	1.4 ± 1.7
Col2A1 (% of positive cells)	57.7 ± 14.5	29.3 ± 16.9	30.9 ± 25.0	28.6 ± 15.0	2.1 ± 2.7	6.8 ± 5.9	7.9 ± 8.0	4.5 ± 5.3
MMP13 (total positive cells)	8.3 ± 3.4	13.9 ± 7.5	23.8 ± 13.7	13.9 ± 8.6	5.1 ± 4.7	0.8 ± 1.2	5.2 ± 3.5	1.3 ± 2.1
MMP13 (% of positive cells)	20.2 ± 37.1	37.1 ± 19.0	53.1 ± 17.6	37.1 ± 8.4	11.2 ± 11.9	2.2 ± 3.0	18.7 ± 12.8	3.8 ± 6.2
VEGF (total positive cells)	13.8 ± 4.3	5.8 ± 3.9	3.9 ± 2.9	8.1 ± 10.1	0.2 ± 0.5	0.1 ± 0.2	1.2 ± 2.0	0.1 ± 0.2
VEGF (% of positive cells)	26.5 ± 4.3	13.1 ± 7.3	10.0 ± 7.5	21.3 ± 26.0	0.3 ± 1.0	0.1 ± 0.4	6.0 ± 12.8	0.1 ± 0.5

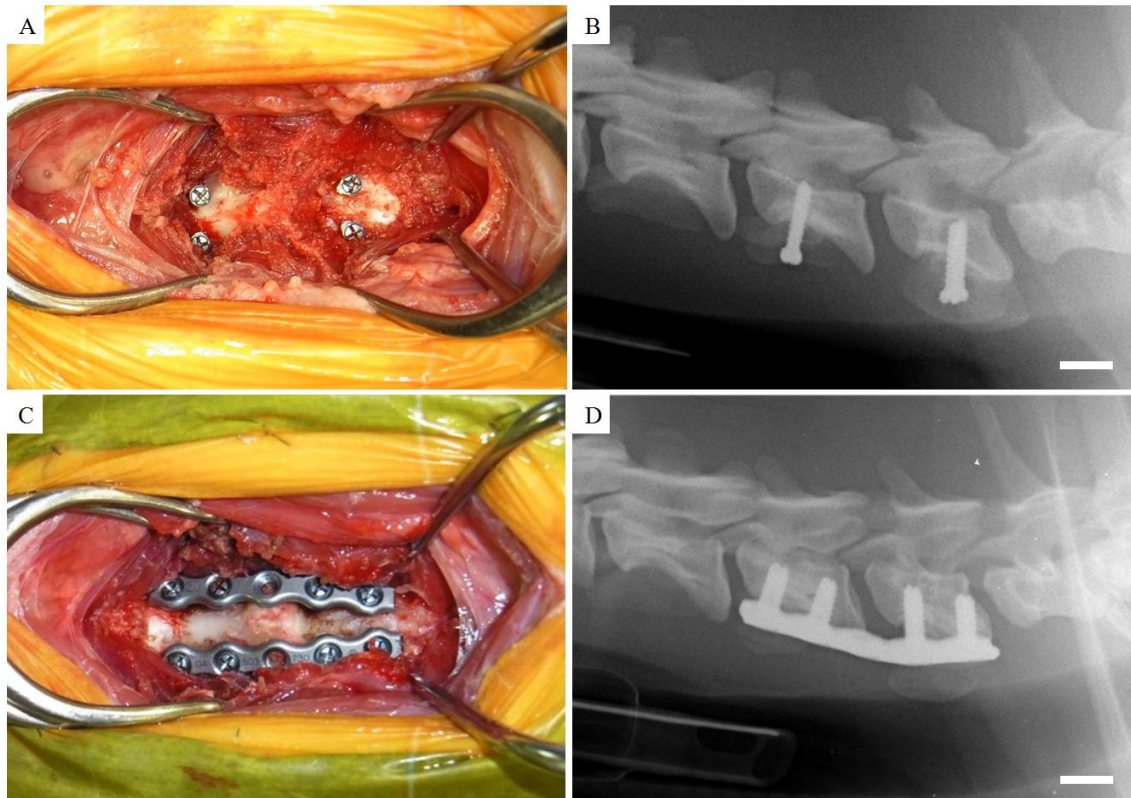


Figure 4-1 Photograph (A,C) and Lateral radiograph (B,D) of Control and fixation models of C5-6.

In the Control model, the titanium screw was used as sham operation. These screws were placed on the left and right ventral sides of the vertebral body. In the fixation model, the Plate and screw made of titanium was used as the fixing device. These Plates were placed in parallel on the left and right ventral sides of the vertebral body, and used to stabilize the C5-6 vertebral segment. Scale bar: 8 mm.

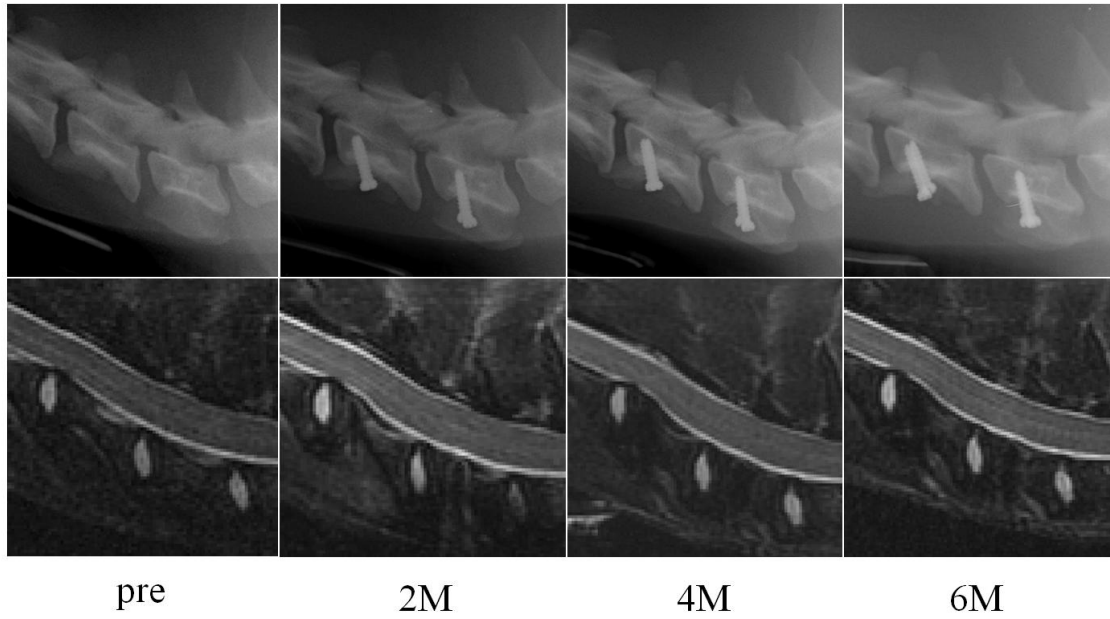


Figure 4-2A. Lateral radiograph and magnetic resonance imaging of control group in C5-6.

In lateral radiograph of each examination date, it was not observed spondylosis deformans, sclerostenosis in the vertebral endplate, and fracture of the fixation device and vertebral body. In MR T2 weighted image, it was not observed change in the signal intensity and compression of the spinal cord.

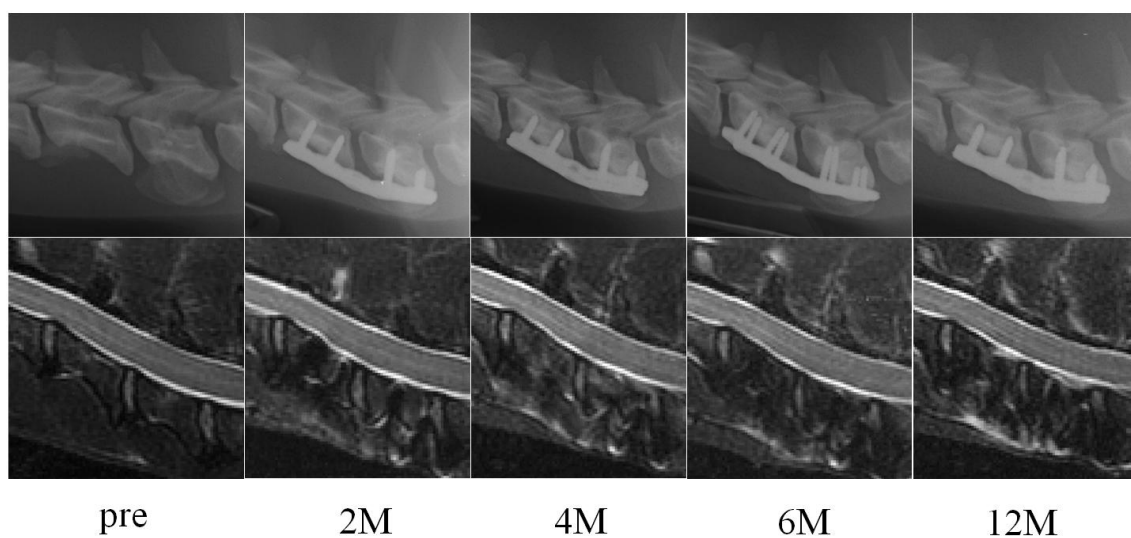


Figure 4-2B. Lateral radiograph and magnetic resonance imaging of vertebral fixation group in C5-6.

In lateral radiograph of each examination date, it was not observed spondylosis deformans with the exception of one case. Also, sclerostenosis in the vertebral endplate or fracture of the fixation device and vertebral body was not observed. In MR T2 weighted image, it was not observed change in the signal intensity and compression of the spinal cord.

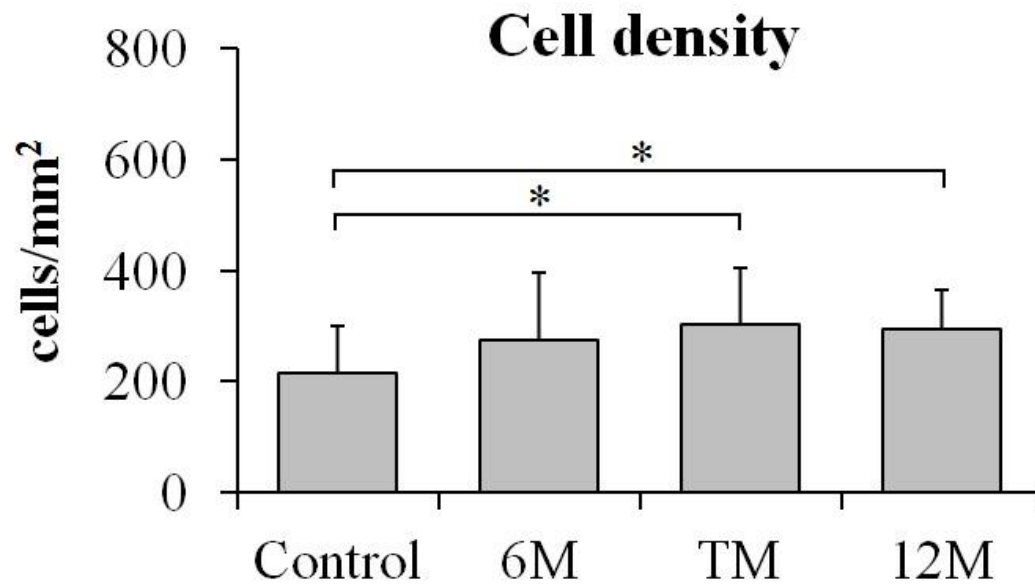


Figure 4-3. Comparison of the cell density of nucleus pulposus (NP) in each group. Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

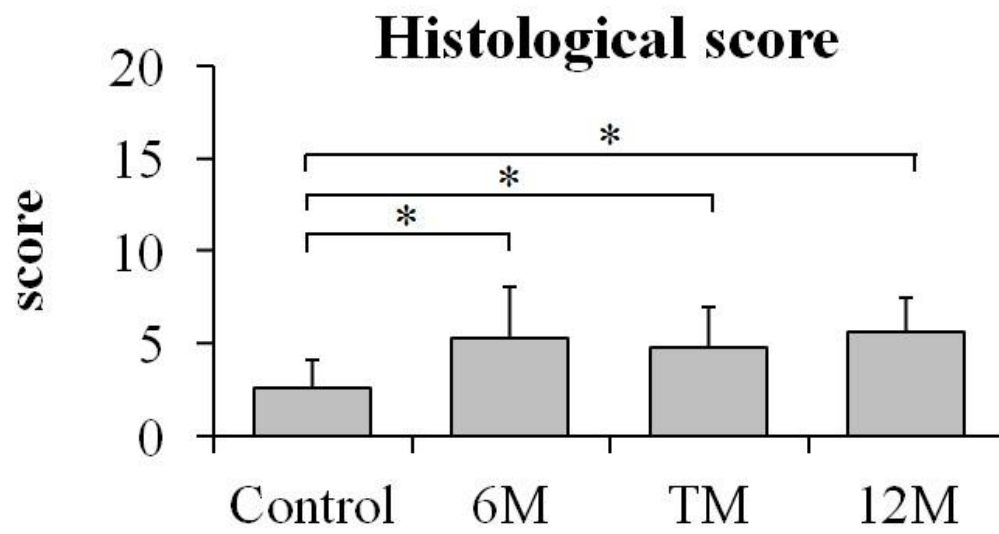


Figure 4-4. Comparison of the histological score of nucleus pulposus (NP) in each group. Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

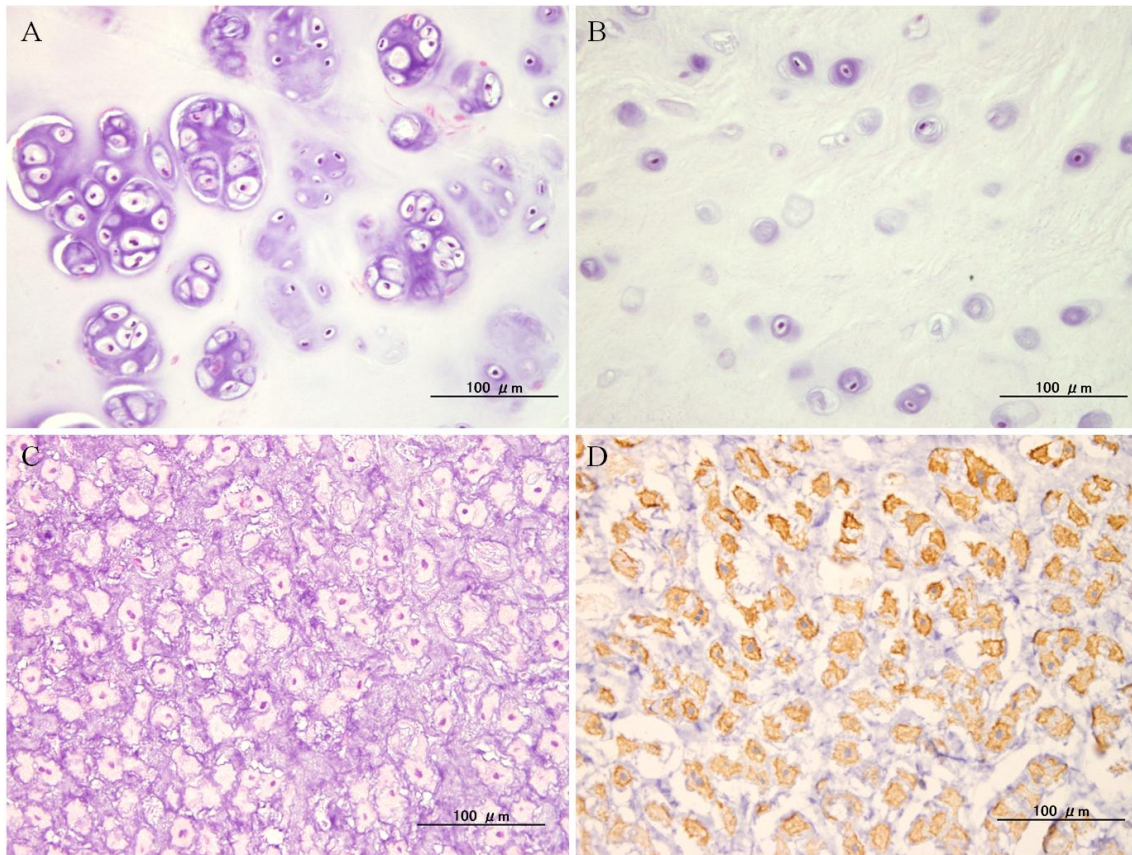


Figure 4-5. Histological findings in the nucleus pulposus.

In the vertebral fixation group, increase of chondrocyte-like cells and cell clusters were observed (A). Mild increase of chondrocyte-like cells was observed in the control group (B). Residual of notochord cells were observed in some part (C), and AE1/AE3 positive cells was also observed (D). Scale bar: 100  $\mu$ m.



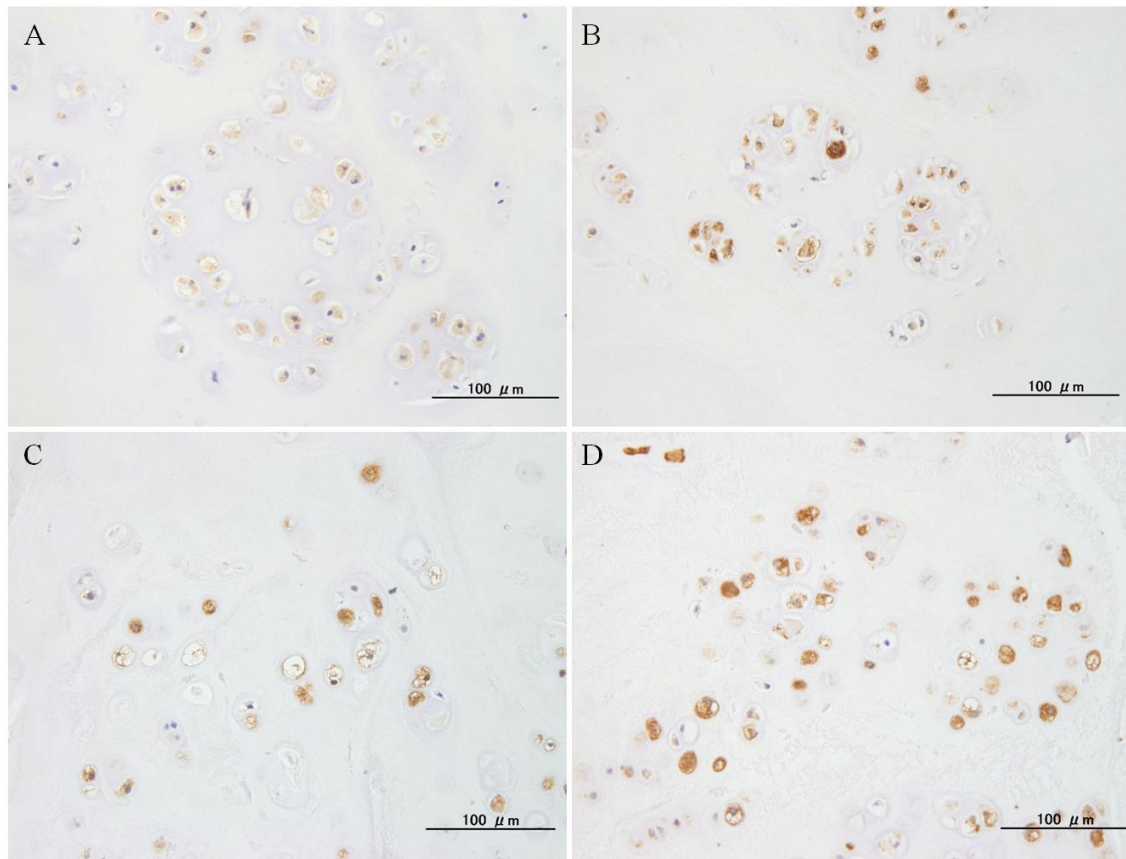


Figure 4-6. Immunostaining in the nucleus pulposus. Col1A1 (A), Col2A1 (B), VEGF (C) and MMP13 (D)

Positive cells were observed in the control and vertebral fixation group. Scale bar: 100 μm.



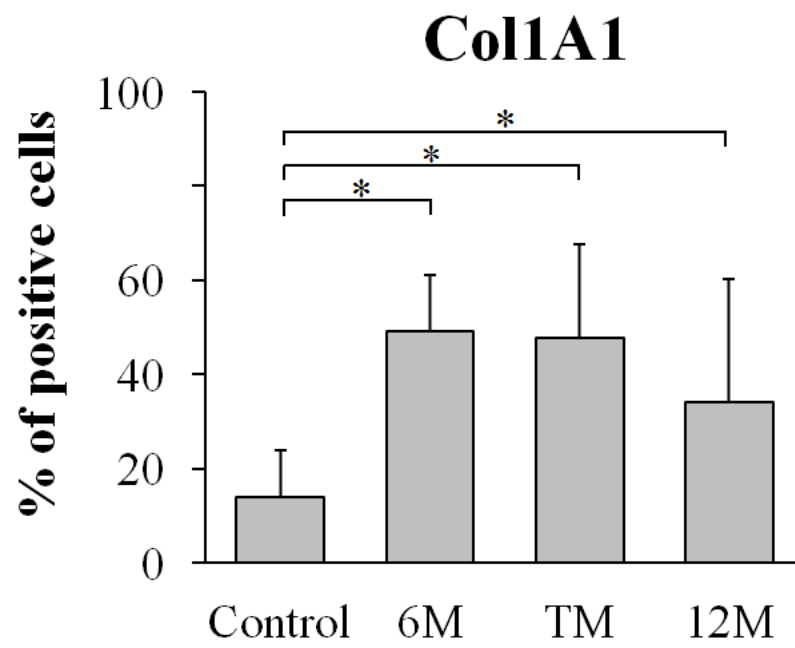


Figure 4-7. Comparison of the percentage of Col1A1-positive cells of nucleus pulposus (NP) tissue in each group. Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

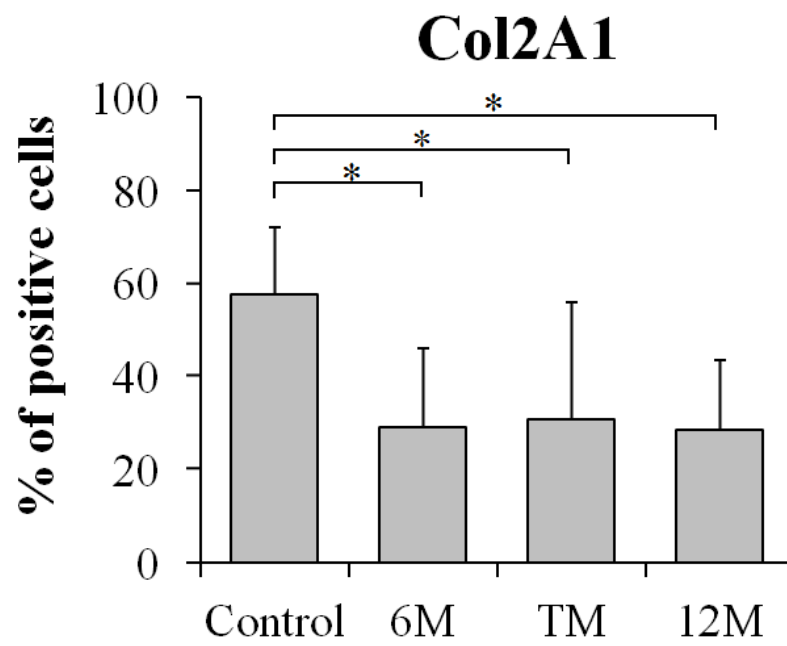


Figure 4-8. Comparison of the percentage of Col2A1-positive cells of nucleus pulposus (NP) tissue in each group. Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

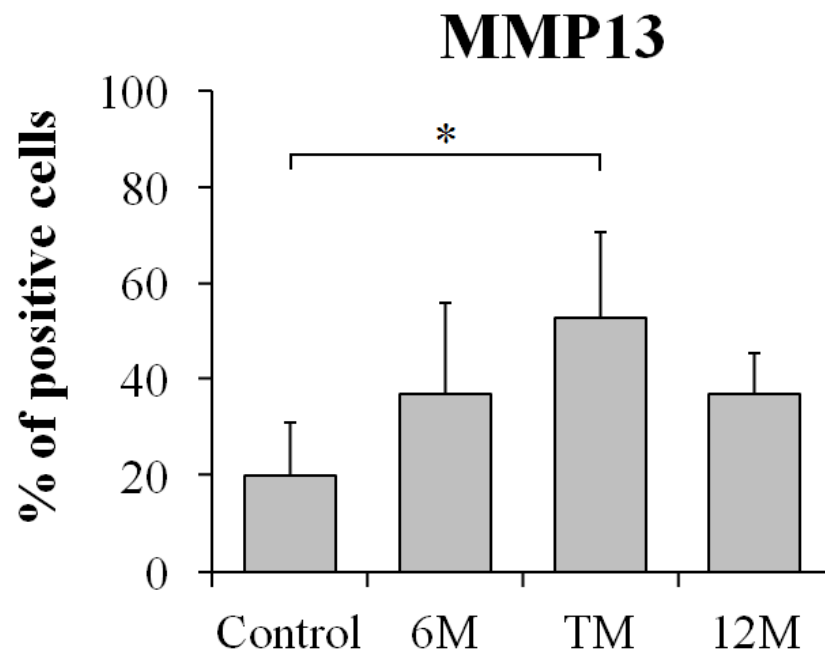


Figure 4-9. Comparison of the percentage of MMP13-positive cells of nucleus pulposus (NP) tissue in each group. Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

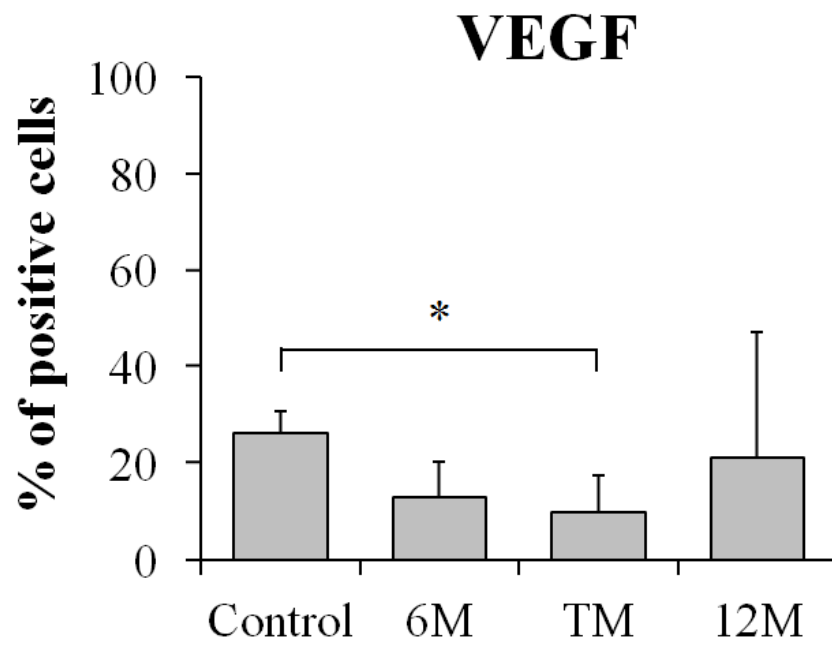


Figure 4-10. Comparison of the percentage of VEGF-positive cells of nucleus pulposus (NP) in each group.

Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

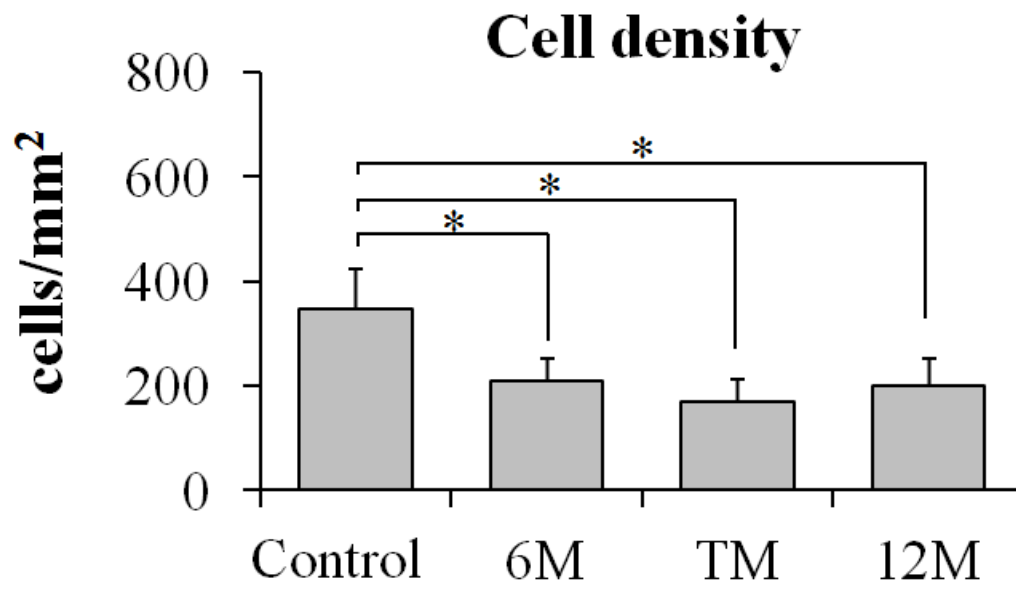


Figure 4-11. Comparison of the cell density of annulus fibrosus (AF) in each group. Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

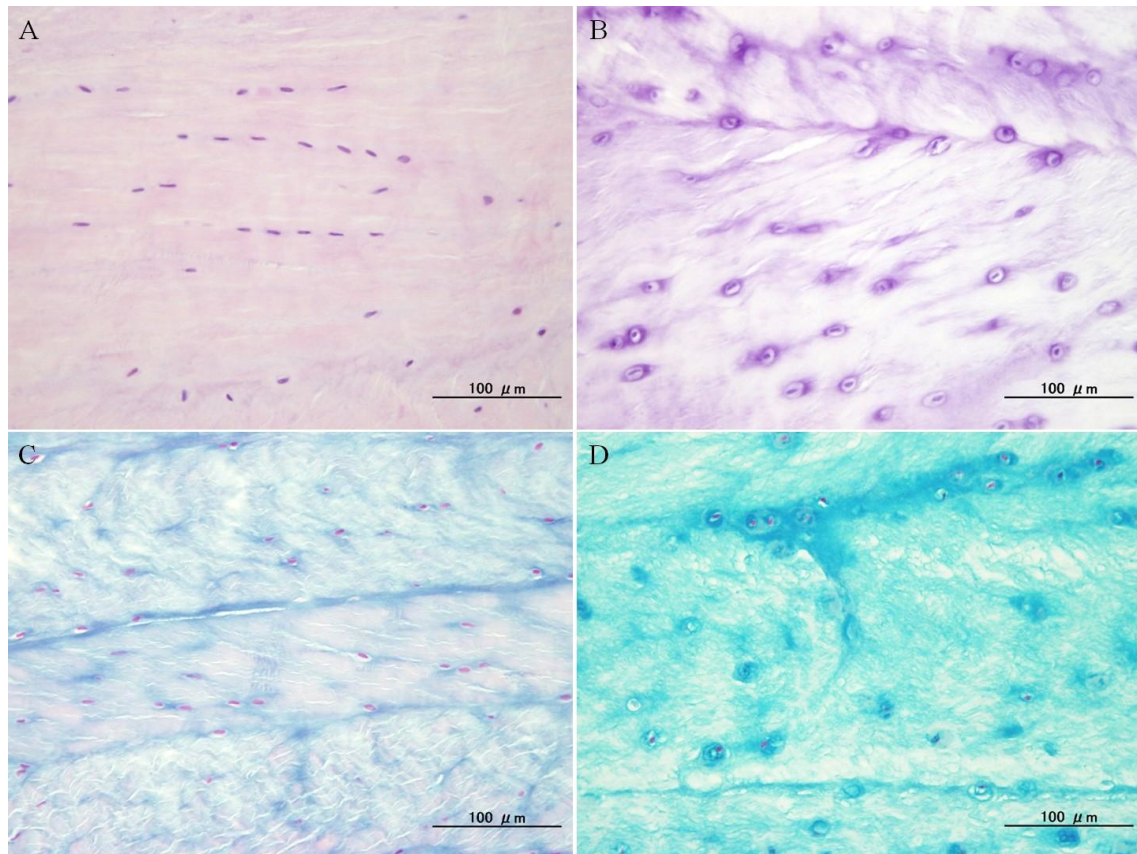


Figure 4-12. Histological findings in the annulus fibrosus. In the control group, a number of elongated cells were observed in the annulus fibrosus (A). In the vertebral fixation group, increase of rounded cells was observed and the outer layered structure was unclear (B). In the control group, stain of the Alcian-Blue was overall decline (C). On the other hand, in the vertebral fixation group, it was observed strongly blue staining around the rounded cells (D). Scale bar: 100 μm.

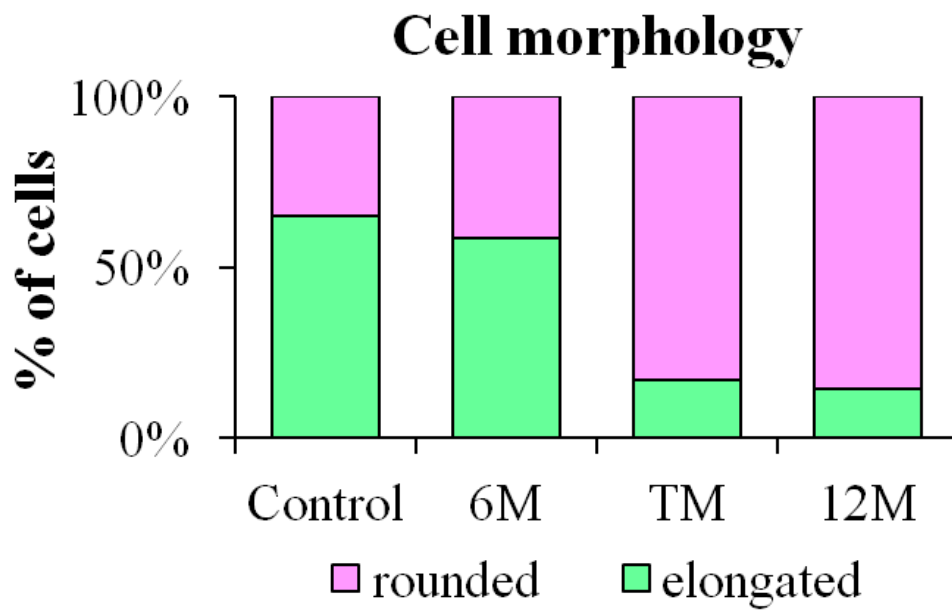


Figure 4-13. Comparison of the percentage of the rounded cells and elongated cells in each group. Percentage of rounded cells tended to increase in the TM group and the 12M group.

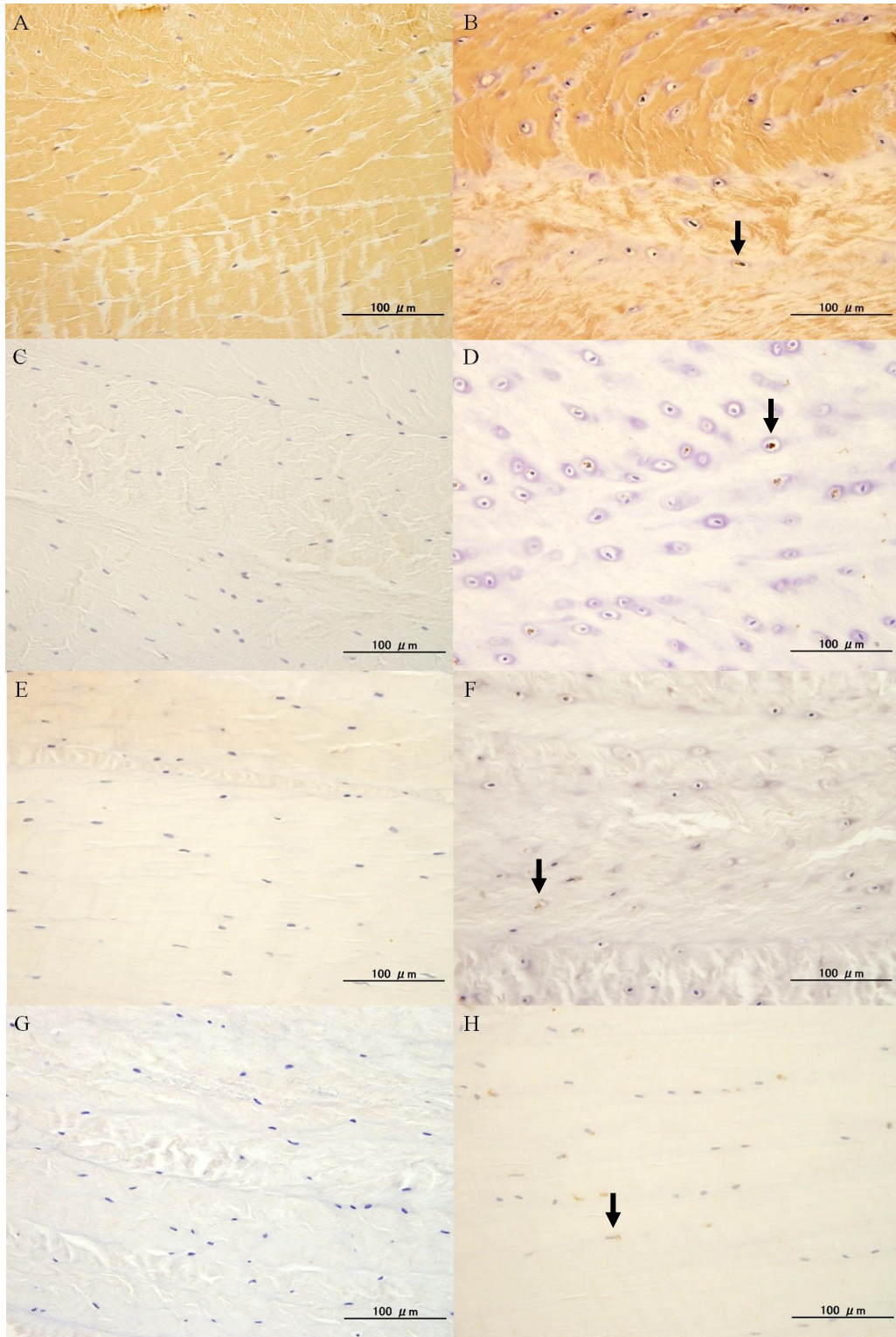


Figure 4-14. Immunostaining in the annulus fibrosus (AF) of the control group (A, C, E, G) and vertebral fixation group (B, D, F, H). Col1A1(B), Col2A1(D), MMP13(F) and VEGF(H) positive cells (arrows) were observed in AF of vertebral fixation group. Scale bar: 100 μm.



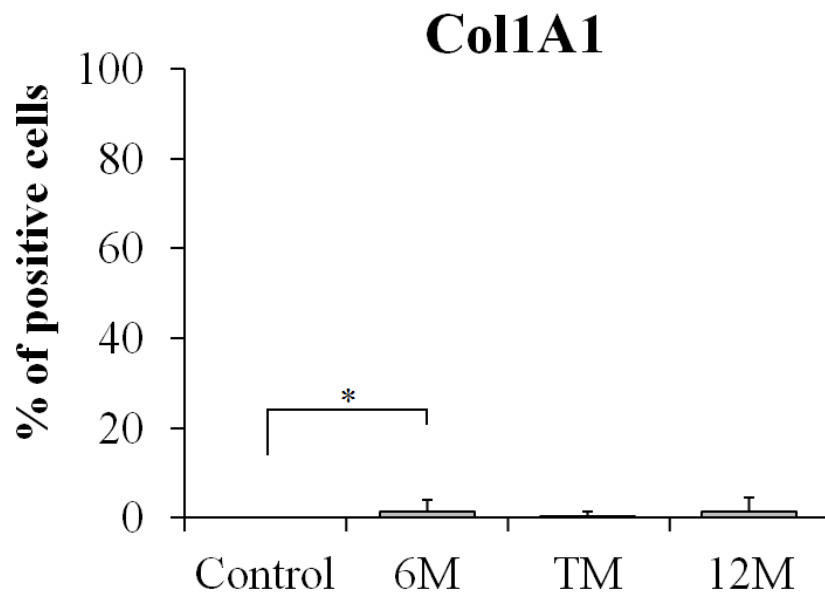


Figure 4-15. Comparison of the percentage of Col1A1 positive cells of annulus fibrosus (AF) in each group.

Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

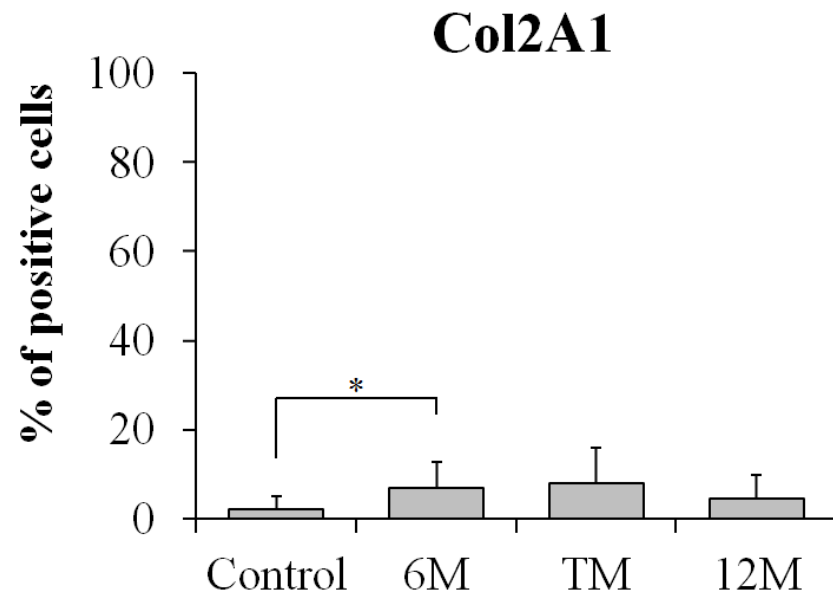


Figure 4-16. Comparison of the percentage of Col2A1 positive cells of annulus fibrosus (AF) in each group.

Each column and bar represents the mean  $\pm$ SD. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

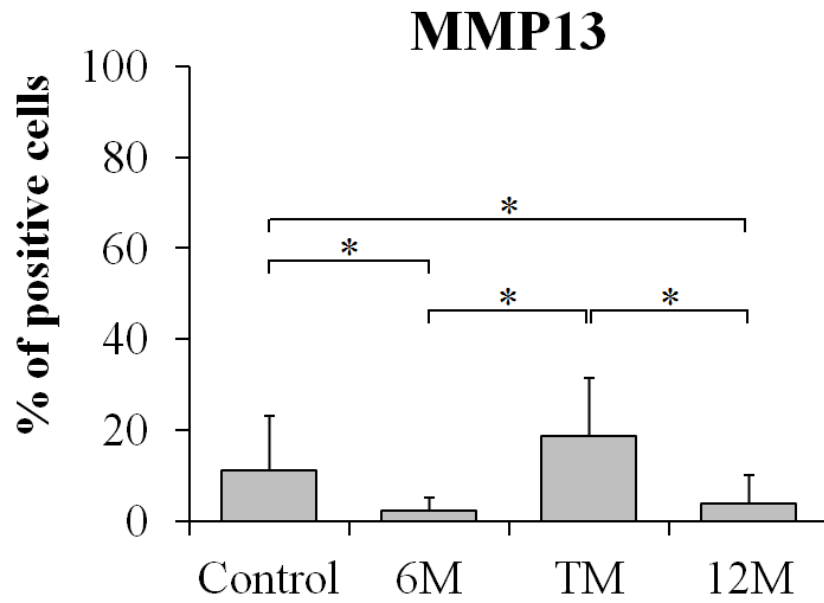


Figure 4-17. Comparison of the percentage of MMP13 positive cells of annulus fibrosus (AF) in each group.

Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

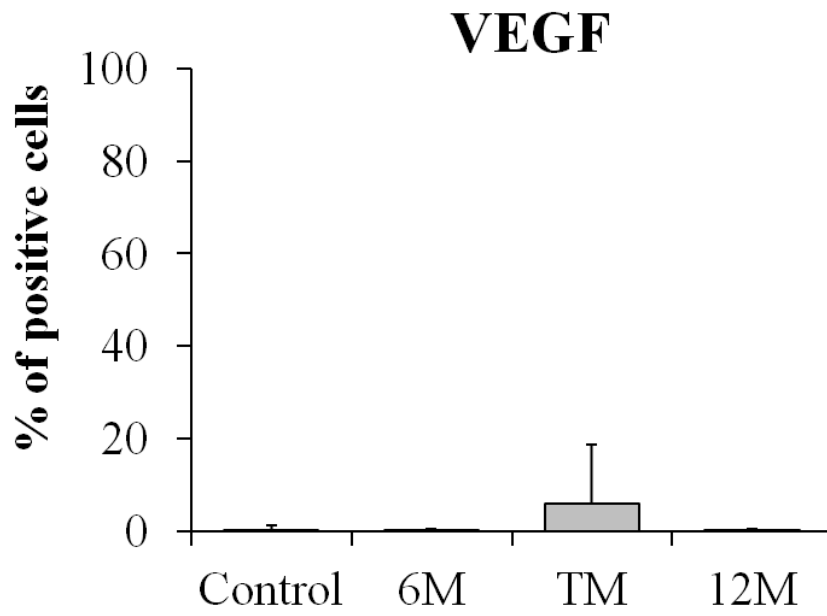


Figure 4-18. Comparison of the percentage of VEGF positive cells of annulus fibrosus (AF) in each group.

Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

## 第5章 総括

小動物神経外科領域においては、脊椎の外傷性損傷（骨折や脱臼など）、そして脊椎椎間関節の不安定性を伴う疾患に対して、椎体固定術（Vertebral Fixation: VF）が適応される（Fitch RB, 2000; Lemarié RE, 2000）。後者には、環軸椎不安定症、頸椎脊髓症（ウォブラー症候群）、変性性腰仙椎狭窄症（馬尾症候群）、片側脊椎、蝶形脊椎など、脊椎骨の形成異常に関連した症候群や、椎間板ヘルニア、脊椎腫瘍などが含まれる。また、VF は臨床的に、脊髓腫瘍など、脊髓圧迫性疾患に対して適用した脊髓の減圧術後に生じる不安定症に対しても適用されている。しかし、VF 実施後には隣接する椎間部に類似した病変（ドミノ病変）が連続する危険性が指摘されている（Bagley RS, 2005）。この病変は、椎間部が固定されることにより隣接する椎間に異常な力学環境が生じ、潜在的な不安定性を悪化させ、椎間板髄核の逸脱や線維輪の肥大化を招くとされている（Bruecker KA, 1989; Seim HB, 1989）。同様の病変が人の臨床においても報告されており、生体力学的な研究も数多く行われている。一方、犬において隣接椎間障害の病態に関する報告は少なく、生体力学および分子生物学的なメカニズムは未だに不明な点が多い。この病態を解明する上ではこれらのメカニズムに関する検討が不可欠であるが、より詳細な検討を行うためには疫学的特徴を考慮する必要がある。しかしながら、外科処置後の隣接椎間における疫学的特徴を調査したという報告は少なく、また大規模な症例において検討したという報告はなされていない。

そこで第2章では、犬の頸部脊髓疾患における外科的処置後の隣接椎間障害の発生状況を把握するため、犬の頸部に発生する代表的な疾患である、頸部椎間板ヘルニア（Cervical intervertebral disc herniation: C-IVDH）および頸部脊椎脊髓症（Cervical spondylomyelopathy: CSM）に着目し、回顧的検討を行った。その結果、隣接椎間障害の発生率は、減圧術のみを行った群で 5.2%（n=9/172）、減圧術と椎体固定術を併用した群で 15.6%（n=7/45）であり、全体では 7.9%（n=16/217）で認められた。さらに、本検討においては、VF の併用に関して隣接椎間障害の発生と有意な関連性が認められたことから、隣接椎間障害の発生には椎体の安定化術に関連していることが示唆された。

また第3章では、健康ビーグル犬から採取した頸椎を使用して頸椎可動モデルを作成し、椎体固定後の処置椎間部および隣接椎間部の力学環境に及ぼす影響について6軸材料試験機を用いて検討した。その結果、処置椎間であるC5-6の可動域は、Intactモデルと比較してPMMAおよびPlateモデルにおいて有意に低値を示した。なお、C5-6の可動域をPMMAモデルとPlateモデルで比較した結果、左右への側屈に対してはPlateの方が、回旋に対してはPMMAの方がより強固な固定性を有することが示唆された。また隣接椎間であるC4-5の可動域は、PMMAモデルおよびPlateモデルのいずれにおいてもIntactモデルと比較して有意に高値を示した。よって処置椎間の固定により失われた可動域を隣接椎間が補うことで可動域が増加することが示唆された。以上の結果から、椎体固定は隣接椎間における力学的環境を変化させ、隣接椎間障害の一因となる可能性が示唆された。

第4章では、第3章において隣接する椎間部において可動性の増加が認められたことから、犬の椎体固定モデルを作成することにより類似した力学的環境を再現し、隣接椎間における生体力学的環境の変化が及ぼす影響について検討した。その結果、隣接椎間における髄核でのMRI信号値の低下、組織学的スコアの上昇、および軟骨細胞様細胞の増加と集塊形成が多数認められたことから、椎体固定の影響により変性が進行している可能性が示唆された。また椎間板髄核における細胞外基質の変化に関しては、椎体固定群においてColl1A1およびMMP13陽性細胞の増加と、それに伴うColl2A1陽性細胞の減少が認められたことから、椎体固定の影響により変性が進行していると考えられた。一方、線維輪においても、椎体固定群において細胞密度が減少し、球形細胞が増加する傾向が認められ、また外側の層状構造が不正となっている部分も多く認められたことから、固定の影響による変性の進行が示唆された。また線維輪においてコラーゲン線維の組成の変化を調べたところ、椎体固定の影響により一部ではColl1A1の陽性反応が低下し、軟骨基質に置き換わっている部分も認められたことから、コラーゲン線維の分解と軟骨化生の進行が示唆された。以上の結果より、本検討では椎間板髄核での椎体固定の影響による変性の進行が示唆された。また椎間板髄核のみでなく線維輪においても変性の所見が認められたことから、椎体固定の影響により椎間板髄核および線維輪の変性が進行し、椎間の逸脱や線維輪の肥大化といった隣接椎間障害を招く危険性があるこ

とが示唆された.

以上より, 本研究では初めに犬における隣接椎間障害の発生状況に関する回顧的検討を行い, 臨床症例での外科処置後の影響について評価した. 次いで健常ビーグル犬の頸椎を使用して生体外および生体における椎体固定モデルを作成し, 隣接椎間における力学的環境の変化が及ぼす影響について検討した. このことから, 椎体固定は隣接椎間における力学的環境を変化させ, 隣接椎間障害を招く危険性があることが示唆された.

## 謝辞

本研究を行うに際して、終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました日本獣医生命科学大学獣医外科学教室 原康教授に深甚なる謝意を表します。また本研究に対し有益なご指導とご援助を賜りました三重大学大学院医学系研究科 笠井裕一教授、三重大学工学研究科 稲葉忠司教授、日本獣医生命科学大学獣医外科学教室 多川政弘名誉教授、原田恭治准教授、余戸拓也講師、神野信夫助教に深く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり終始多大なる御協力を頂きました、岩田宗峻氏、一戸登夢氏、整形外科班の香取大智、伊藤亜衣、内山莉花、高野重徳、松村和紀、熊沢一輝、島田昌和、溝上二千翔の各氏に厚く御礼申し上げます。また本研究に対し多大なる御協力を頂きました、日本獣医生命科学大学 獣医外科学教室室員の皆様、三重大学 生体システム工学研究室の皆様にご感謝致します。

そして最後に、長年に渡り温かい励ましと協力を頂いた箱崎泰秀氏および箱崎宏子氏に心より感謝致します。



## 参考文献

Adamo PF, Kobayashi H, Markel M, et al. In vitro biomechanical comparison of cervical disk arthroplasty, ventral slot procedure, and smooth pins with polymethylmethacrylate fixation at treated and adjacent canine cervical motion units. *Vet Surg.* 2007;36:729–741.

Agnello KA, Kapatkin AS, Garcia TC, et al. Intervertebral biomechanics of locking compression plate monocortical fixation of the canine cervical spine. *Vet Surg.* 2010;39:991–1000.

Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, et al. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the bio-synthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest.* 1996;98:996–1003.

Baba H, Furusawa N, Imura S, et al. Late radiographic findings after anterior cervical fusion for spondylotic myeloradiculopathy. *Spine (Phila Pa 1976).* 1993;18:2167–73.

Bagley RS. Clinacal Features of Important and Common Diseases Involving the Spinal Cord of Dogs and Cats. Ames,IA,Wiley–Blackwell, 2005

Bergknut N, Meij BP, Hagman R, et al. Intervertebral disc disease in dogs – Part 1: A new histological grading scheme for classification of intervertebral disc degeneration in dogs. *Vet J.* 2013;195(2):156–63.

Bergman RL, Levine JM, Coates JR, et al. Cervical spinal locking plate in combination with cortical ring allograft for a one level fusion in dogs with cervical spondylotic myelopathy. *Vet Surg.* 2008;37:530–6.

Boileau C, Martel-Pelletier J, Caron J, et al. Protective effects of total fraction of avocado/soybean unsaponifiables on the structural changes in experimental dog osteoarthritis: inhibition of nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-13. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(2):R41.

Braund KG, Ghosh P, Taylor TK, Larsen LH. Morphological studies of the canine intervertebral disc. The assignment of the beagle to the achondroplastic classification. *Res Vet Sci*. 1975;19(2):167–72.

Braund KG. Canine intervertebral disc disease. In Bojrab MJ, (ed): *Pathophysiology in Small Animal Surgery*, Lea & Febiger, Philadelphia, 739–46, 1981

Bruecker KA, Seim HB, Blass CE. Caudal cervical spondylomyelopathy: decompression by linear traction and stabilization with Steinmann pins and polymethyl methacrylate. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1989;25:677–83.

Bruecker KA, Seim HB, Withrow SJ. Clinical evaluation of three surgical methods for treatment of caudal cervical spondylomyelopathy of dogs. *Vet Surg*. 1989;18(3):197–203.

Bruecker KA. Caudal Cervical Spondylomyelopathy in Large Breed Dogs. In: Bojrab MJ, ed. *Current techniques in small animal surgery*, 4th ed. Philadelphia, PA: Williams & Wilkins, 1998; 828–34

Cappello R, Bird JL, Pfeiffer D, et al. Notochordal cells produce and assemble extracellular matrix in a distinct manner, which may be responsible for the maintenance of healthy nucleus pulposus. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006;31(8):873–82.

Cherrone KL, Dewey CW, Coates JR. A retrospective comparison of cervical intervertebral disk disease in nonchondrodystrophic large dogs versus small dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2004;40(4):316–20.

da Costa RC, Parent JM. One-year clinical and magnetic resonance imaging follow-up of Doberman Pinschers with cervical spondylomyelopathy treated medically or surgically. *J Am Vet Med Assoc*. 2007;231(2):243–50.

Dallman M, Palettas P, Bojrab MJ. Characteristics of dogs admitted for treatment of cervical intervertebral disk disease: 105 cases (1972-1982). *J Am Vet Med Assoc*. 1992;200(12):2009–11.

Danielski A, Vanhaesebrouck A, Yeadon R. Ventral stabilization and facetectomy in a Great Dane with wobbler syndrome due to cervical spinal canal stenosis. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2012;25(4):337–41.

de Lahunta A, Glass EN. Small animal spinal cord disease. *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*, 2009

Dewey CW. *Myelopathies: Disorders of the Spinal Cord*. St.Louis, MO, Saunders Elsevier, 2008

Doulgeris JJ. Comparative analysis of posterior fusion constructs as treatments for middle and posterior column injuries: an in vitro biomechanical investigation. *Clinical Biomech*. 2013;28:483–9.

Eck JC, Humphreys SC, Lim TH, et al. Biomechanical study on the effect of cervical spine fusion on adjacent-level intradiscal pressure and segment motion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27:2431–4.

Fitch RB, Kerwin SC, Hosgood G. Caudal cervical intervertebral disk disease in the small dog: role of distraction and stabilization in ventral slot decompression. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2000;36:68–74.

Fry TR., Johnson AL, Hungerford L, Toombs J.: Surgical treatment of cervical disc herniations in ambulatory dogs: ventral decompression versus fenestration, 111 cases (1980-1988). *Prog Vet Neurol.* 1991;2:165–73.

Gage ED. Incidence of clinical disc disease in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1975;11:135–8.

Ganey T, Hutton WC, Moseley T, et al. Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells: experiments in a canine model. *Spine (Phila Pa 1976).* 2009;34(21):2297–304.

Gateno J, Cookston C, Hsu SS, et al. Biomechanical evaluation of a new MatrixMandible plating system on cadaver mandibles. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71:1900–14.

Ghosh P, Taylor TK, Yarroll JM. Genetic factors in the maturation of the canine intervertebral disc. *Res Vet Sci.* 1975;19(3):304–11.

Hakozaki T, Iwata M, Hara Y. Cervical intervertebral disk herniation in chondrodystrophoid and nonchondrodystrophoid small-breed dogs: 187 cases (1993–2013). *J Am Vet Med Assoc.* 2015;247(12):1408–11

Hansen HJ. A pathologic-anatomical study on disc degeneration in dogs: with special reference to the so-called enchondrosis intervertebralis. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1952;11:1–117.

- Hara Y, Tagawa M, Ejima H. Usefulness of computed tomography after myelography for surgery on dogs with cervical intervertebral disc protrusion. *J. Vet. Med. Sci.* 1994;56:791–4.
- Hettlich BF, Allen MJ, Glucksman GS, et al. Biomechanical comparison between bicortical pin and monocortical screw/polymethylmethacrylate constructs in the cadaveric canine cervical vertebral column. *Vet Surg.* 2014;43:988–94.
- Hilibrand AS, Carlson GD, Palumbo MA, et al. Radiculopathy and Myelopathy at Segments Adjacent to the Site of a Previous Anterior Cervical Arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81(4):519–28.
- Hillman RB, Kengeri SS, Waters DJ. Reevaluation of predictive factors for complete recovery in dogs with nonambulatory tetraparesis secondary to cervical disk herniation. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2009;45(4):155–63.
- Hofstetter M, Gédet P, Doherr M, et al. Biomechanical analysis of the three-dimensional motion pattern of the canine cervical spine segment C4–C5. *Vet Surg.* 2009;38:49–58.
- Horner HA, Roberts S, Bielby RC, et al. Cells from different regions of the intervertebral disc: effect of culture system on matrix expression and cell phenotype. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002;27:1018–28.
- Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. The three-dimensional architecture of the notochordal nucleus pulposus: novel observations on cell structures in the canine intervertebral disc. *J Anat.* 2003;202:279–91.
- Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison. *J Anat.* 2004;205(5):357–62.

Ichinohe T, Kanno N, Hara Y. Histological and immunohistological analysis of degenerative changes in the cranial cruciate ligament in a canine model of excessive tibial plateau angle. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2015;28(4):240–9.

Itoh H, Hara Y, Asou Y, et al. Evaluation of the association between runt-related transcription factor 2 expression and intervertebral disk aging in dogs. *Am J Vet Res*. 2012;73(10):1553–9.

Iwata M, Aikawa T, Hakoziaki T. Enhancement of Runx2 expression is potentially linked to  $\beta$ -catenin accumulation in canine intervertebral disc degeneration. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):180–90.

Iwata M, Ochi H, Asou Y. Variations in gene and protein expression in canine chondrodystrophic nucleus pulposus cells following long-term three-dimensional culture. *PLoS One*. 2013;8(5): e63120.

Jeffery ND, McKee WM. Surgery for disc-associated wobbler syndrome in the dog — an examination of the controversy. *J Small Anim Pract*. 2001;42(12): 574–81.

Johnson JA, da Costa RC, Allen MJ. Micromorphometry and Cellular Characteristics of the Canine Cervical Intervertebral Discs. *J Vet Intern Med*. 2010;24(6):1343–9.

Johnson JA, da Costa RC, Bhattacharya S, et al. Kinematic motion patterns of the cranial and caudal canine cervical spine. *Vet Surg*. 2011;40:720–7.

Kasai Y, Inaba T, Kato T, et al. Biomechanical study of the lumbar spine using a unilateral pedicle screw fixation system. *J Clin Neurosci*. 2010;17:364–7.

- Koehler CL, Stover SM, Le Couteur RA, et al. Effect of a ventral slot procedure and of smooth or positive-profile threaded pins with polymethylmethacrylate fixation on intervertebral biomechanics at treated and adjacent canine cervical vertebral motion units. *Am J Vet Res.* 2005;66:678–87
- Kyaw TA, Wang Z, Sakakibara T, et al. Biomechanical effects of pedicle screw fixation on adjacent segments. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2014;24(1):283–7.
- Lee JM, Song JY, Baek M, et al. Interleukin-1 $\beta$  induces angiogenesis and innervations in human intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res.* 2011;29(2):265–9.
- Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ. Interleukin-1 receptor antagonist delivered directly and by gene therapy inhibits matrix degradation in the intact degenerate human intervertebral disc: an in situ zymographic and gene therapy study. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(4):83.
- Lemarié RE, Kerwin SC, Partington BP, et al. Vertebral subluxation following ventral cervical decompression in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2000;36:348–58.
- Matsunaga S, Kabyama S, Yamamoto T, et al. Strain of intervertebral discs after anterior cervical decompression and fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 1999;24(7):670–5.
- Mckee WM, Butterworth SJ, Scott HW. Management of cervical spondylopathy-associated intervertebral disc protrusions using a screw and metal washers in 78 dogs. *J Small Anim Pract.* 1999;40:465–72.
- Mckee WM, Sharp NJH. Cervical Spondylopathy. Philadelphia, PA, Saunders, 2002

Morgan PW, Parent J, Holmberg DL. Cervical pain secondary to intervertebral disc disease in dogs; radiographic findings and surgical implications. *Prog Vet Neurol*. 1993;4:76–80.

Oegema TR Jr. Biochemistry of the intervertebral disc. *Clin Sports Med*. 1993;12:419–39.

Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, et al. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26:1873–8.

Purmessur D, Freemont AJ, Hoyland JA. Expression and regulation of neurotrophins in the nondegenerate and degenerate human intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(4):R99.

Rusbridge C, Wheeler SJ, Torrington AM, et al. Comparison of two surgical techniques for the management of cervical cord spondylomyelopathy in Dobermanns. *J Small Anim Pract*. 1998;39:425–31.

Seim HB, Prata R. Ventral decompression for the treatment of cervical disk disease in the dog: a review of 54 cases. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1982;18:233–40.

Seim HB. Caudo-cervical spondylomyelopathy. Proceedings of the 14th Annual Veterinary Surgical Forum (Neuroscopy) 1986;72–8.

Seim HB. Diagnosis and Treatment of Cervical Vertebral Instability Malformation Syndromes. Philadelphia, PA, Saunders, 1999

Seim HB. Surgery of the Cervical Spine. St.Louis, MO, Elsevier Mosby, 2007



Sharp NJH, Wheeler SJ. Cervical Spondylopathy. Small animal spinal disorders diagnosis and surgery. 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia, Elsevier Mosby, 2005. p.211–46.

Shoda E, Sumi M, Kataoka O, et al. Development and dynamic canal stenosis as radiologic factors affecting surgical results of anterior cervical fusion for myelopathy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24(14):1421–4.

Smolders LA, Bergknut N, Grinwis GC, et al. Intervertebral disc degeneration in the dog. Part 2: Chondrodystrophic and non-chondrodystrophic breeds. *Vet J*. 2013;195(3):292–9.

Steffen F, Voss K, Morgan JP. Distraction-fusion for caudal cervical spondylomyelopathy using an intervertebral cage and locking plates in 14 dogs. *Vet Surg*. 2011;40(6):743–52.

Tsai TT, Lai PL, Liao JC, et al. Increased periostin gene expression in degenerative intervertebral disc cells. *Spine J*. 2013;13(3):289–98.

Voss K, Steffen F, Montavon PM. Use of the ComPact UniLock System for ventral stabilization procedures of the cervical spine: a retrospective study. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2006;19(1):21–8.

Zachary JF. Nervous System. St.Louis, MO, Elsevier Mosby, 2006