



Title	The Relationship Between Apoptosis of Endplate Chondrocytes and Aging and Degeneration of the Intervertebral Disc
Author(s)	有賀, 健太
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43715
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ありがけんた
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 8 9 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	The Relationship Between Apoptosis of Endplate Chondrocytes and Aging and Degeneration of the Intervertebral Disc. (終板軟骨細胞のアポトーシスと椎間板の加齢および変性との関係)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉 川 秀 樹 (副査) 教 授 越 智 隆 弘 教 授 遠 山 正 彌

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

椎間板変性は頸椎症を含む様々な脊柱変性疾患において、その神経症状や疼痛の出現に広く関連しており、脊椎変性疾患の成因において重要な位置を占める病態である。椎間板変性は加齢と密接な関連があると考えられるが、そのメカニズムは明らかとなっていない。近年、椎間板細胞のアポトーシスが注目され、関連する様々な報告がなされている。しかし、現時点では椎間板におけるアポトーシス発生の事実は報告されているが、その生理的あるいは病理的意義は明らかとはなっていない。今回、椎間板変性に対するアポトーシスの関与を示す事を目的とし、マウス頸椎を用いて加齢に伴う椎間板の組織学的変化とアポトーシス発生との関係を、特に加齢に伴う組織学的変性が報告されている軟骨性終板に注目して検討した。さらに、頸椎症モデルマウスと比較することにより、メカニカルストレスにより加速された椎間板変性過程におけるアポトーシス発生様式の変化を検討した。

【方法】

動物モデル：30匹のICRマウス雄を2群に分けて用いた。18匹はC群として正常の加齢に伴う変化を検討した。12匹はE群として、頸椎症モデルの手術により実験的に加速された椎間板変性過程における変化を検討した。E群は生後5週令時において、手術を行った。腹腔内麻酔下に、背側正中に縦皮切を加え、傍脊柱筋を脊柱後方要素から剥離し、棘間・棘上靱帯、棘突起を一塊に切除した。傍脊柱筋を剥離したまま閉創し、術後はケージ内で制限なく飼育した。

組織処理：E群は、術後2、3、6、12ヶ月において各3匹ずつ頸椎を採取した。C群はE群と週令を合わせた4群に加え、術前（生後4週）、高齢（生後18ヶ月）の計6群に分けて頸椎を採取した。採取した頸椎は固定、脱灰の後、パラフィン包埋した。マイクロトームにより3-4 μm の正中矢状断切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン、サフラニン-O及び、TUNEL法により染色した。

細胞計数及び組織学的評価には、C3/4、C4/5、C5/6の3椎間板を用いた。

TUNEL法：各組織切片においてアポトーシス細胞を検出する目的でTUNEL法（Fluorescein）を施行した。カウンター染色にはPropidium Iodide (PI)を用いた。染色した切片を蛍光顕微鏡にて観察・細胞計数した。

組織学的評価：軟骨性終板の組織学的変性の程度を、ヘマトキシリン・エオジン染色像にて、以下の分類に従い3段階で評価した。軟骨性終板の層状構造が、終板の横径全体にわたって保たれている椎間板をGrade I（正常群）、

層状構造が消失している部分の横径の、終板全体の横径に対する割合が、50%未満の椎間板を Grade II（軽度変性群）、50%以上の椎間板を Grade III（高度変性群）と分類した。

細胞計数：各椎間板あたりの FITC 陽性のアポトーシス細胞数と PI 陽性の細胞数を、骨端線軟骨を除く軟骨性終板領域で計数した。計数は200倍の視野で、画像解析ソフト Mac Scope ver.2.5.1を用いて行った。計測した細胞数より、アポトーシス陽性率をアポトーシス細胞数／全細胞数として求めた。

【成績】

TUNEL 法により FITC ラベルされたアポトーシス細胞は、殆どが椎間板の軟骨性終板に存在した。C 群の生後 3 ヶ月まではアポトーシス細胞は僅かであったが、それ以降多数認められた。アポトーシス陽性率は加齢とともに生後 7 ヶ月をピークに増加し、以後漸減していた。E 群においては C 群より早期の術後 2 ヶ月からアポトーシス細胞が増加し始め、術後 6 ヶ月にピークとなり、以後減少していた。C 群と E 群のアポトーシス陽性率を、同週令においてそれぞれ比較すると、術後 2 および 6 ヶ月時において有意に E 群が高かった。

軟骨性終板における、生きている細胞数を PI 陽性細胞数として計数すると、加齢とともに減少しており、C 群では生後 7 ヶ月以降、E 群では術後 3 ヶ月以降有意に減少していた。

組織学的には加齢や頸椎症モデルの術後時間経過に伴い、椎間板変性が進行していた。軟骨性終板に注目すると、高齢になる程、軟骨性終板の部分的欠損像が高頻度に認められ、多くの軟骨性終板欠損部では断裂形成が認められた。軟骨性終板の変性を 3 段階分類で評価すると、加齢に伴い変性は進行し、頸椎症モデルの手術は軟骨性終板の変性を加速させていた。

【総括】

マウス頸椎組織におけるアポトーシスを TUNEL 法で評価した結果、軟骨性終板においてアポトーシスが生じており、それは加齢に伴って増加し、やがて終板軟骨細胞数は減少し、引き続いて軟骨性終板の組織学的変性が進行していた。頸椎症モデルの手術は、軟骨性終板の組織学的変性と、先行するアポトーシス発生の両者を促進させていた。これより、軟骨性終板の加齢的な細胞減少及び変性に、終板軟骨細胞のアポトーシスが関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

マウス頸椎では正常の加齢に伴って椎間板変性が生じており、実験的頸椎症モデルの手術によって変性は加速する。マウス頸椎では、組織学的には軟骨性終板の変性を含めてヒトの椎間板変性に類似した変化が認められるため、椎間板の変性メカニズムを経時的に検討する動物モデルとして適切と考えられる。

マウス頸椎椎間板の正常加齢における TUNEL 法による検討では、軟骨性終板においてアポトーシスが生じていることが示され、アポトーシス陽性率は生後 4 ヶ月以降、加齢とともに増加していた。アポトーシスの増加に引き続き終板軟骨細胞数が減少していたため、アポトーシスが軟骨性終板変性に寄与していることが示唆された。さらに椎間板変性を促進する頸椎症モデルの手術がアポトーシス発生とそれに引き続く細胞減少を促進していたため、アポトーシスの発生が椎間板変性に関与することを支持する結果と考えられた。また、頸椎症モデルにおける変性の原因であるメカニカルストレスが終板軟骨細胞のアポトーシスの誘因となることも示唆された。

今日まで、椎間板変性のメカニズムに関する知見が少なく、アポトーシスが加齢に伴う椎間板変性に関与する事を示した研究はないこと、脊柱変性疾患に対する予防医学的アプローチへの基礎的情報として有用と考えられることから、本研究は学位の授与に値すると考えられる。