

## 圧縮荷重負荷によるラット尾部椎間板の変性

**Degeneration of intervertebral disc to compression in a rat tail model**

中村 友和\*, 入部 尚郎\*\*, 麻生 義則\*\*\*, 宮入 裕夫\*, 池上 皓三\*, 高久田 和夫\*\*

Tomokazu NAKAMURA\*, Takaro IRIBE\*\*, Yoshinori ASOU\*\*\*,

Hiroo MIYAIRI\*, Kozo IKEGAMI\*, and Kazuo TAKAKUDA\*\*

**Abstract:** Intervertebral disc degeneration (IVD) induces the deterioration of spinal motion segment, which was important matter in stability of head and its disorder associated with neck pain was indicated by many researchers. The goal of this study was to reveal a development mechanism of the IVD induced by mechanical compression. In this study, we performed an in vivo experiment using rat tail model in which the tail disc between adjacent vertebrae was used. To investigate an effect of chronic compression to histology and mechanical properties of the disc, we developed an external loading device equipped with super elastic springs. Using this device, we applied a 1.0 MPa compression stresses to the rat tail disc for 2 weeks. The discs of sham group were applied sham surgery (the device was attached, but no loading). Before and after the experiment of 2 weeks period, we took x-ray photograph of ventral-dorsal direction of the tail to measure a disc thickness, and carried out an in vivo mechanical test, in which the tail disc was applied an axial tension-compression loading (from 16 to -16 N, 0.1 Hz, sinusoidal curve), to measure the load-displacement curve of the disc. Analyzing the curve, we evaluated the mechanical properties of the disc such as range of motion (ROM), neutral zone (NZ), hysteresis loss ratio (HLR), Stiffness (ST). Further, a mid-sagittal histological section of the disc was qualitatively observed under the light microscope. The experimental findings indicated that our loading device succeeded to apply the precise compression to the rat tail disc over for 2 weeks, and revealed that the chronic compression induced the decrease of disc thickness and considerable change of mechanical properties accompanying with histological degeneration of the disc. These findings suggested that the stability of the disc was collapsed after the compressive stress of 1.0 MPa for 2 weeks.

**Keywords:** Intervertebral disc, Compression load, Mechanical properties, Stability, Rat tail model

## 1. 緒言

脊椎はヒトの運動機能の中軸となることから、日常生活において繰り返し大きな荷重を受けており、頸椎症や腰痛症などさまざまな疾患がこれらの荷重負荷と関連して発症すると考えられている。特に椎間板の変性は、神経を圧迫し重篤な症状を引き起こす危険性があることから、その発生メカニズムを解明し予防法や治療法を確立することが求められている。

椎間板変性の原因には、加齢、遺伝、環境など種々の因子が示唆されているが、主として重労働などにもなう外的荷重因子の影響が指摘されている<sup>(1)</sup>。そのため、これまでもヒトや動物より摘出した椎間板を用いて椎間板のバイオメカニクスに関する研究が実施されてきた<sup>(2,3,4,5)</sup>。しかし、疾患に至る原因を説明するのに十分と言える成果は未だに得られていない。一方、MacGill<sup>(6)</sup>は、椎間板の変性は過度の大きさの荷重だけでなく、荷重の継続時間に依存して発生すると述べている。これは、椎間板変性の発生において、機械荷重が物理的な因子だけでなく、細胞応答などの生物学的な因子を引き起こすことを示唆している。すなわち、機械荷重に対する組織や細胞の生物学的な応答を考慮した慢性的な評価が必要になると考えられる。そこで、機械的荷重に起因する椎間板変性に関して *In vitro* 研究が実施された<sup>(7)</sup>。

原稿受付日:2008年12月24日, 受理日:2009年1月20日

\*東京電機大学大学院先端科学技術研究科

Graduate School of Advanced Science and Technology,  
Tokyo Denki University

\*\*東京医科歯科大学生体材料工学研究所

Institute of Biomaterials and Bioengineering,  
Tokyo Medical and Dental University

\*\*\*東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科整形外科

Section of Orthopedic Surgery, Graduate School,  
Tokyo Medical and Dental University

例えば, Handa<sup>(8)</sup>らは, 椎間板から摘出した細胞に静水圧を負荷し, 荷重の大きさや期間がプロテオグリカンなどの基質の合成能に影響することを示した. しかし, このような *In vitro* 実験の結果については, 生体の椎間板において適用できるかどうか検証する必要がある. ところが, 動物実験に関しては, その手技の難しさから現在でも十分な成果は得られていない<sup>(2)</sup>. このようなことから, 近年になって, げっ歯類の尾部椎間板を用いた動物実験モデルが注目されている<sup>(9,10,11,12,13)</sup>. 例えば Lotz<sup>(14)</sup>らは, マウス尾部に対して外付け型の荷重デバイスを取り付け, *In vivo* で尾部椎間板に 1 週間に渡って継続的な圧縮荷重を負荷した. その結果, 圧縮荷重によって髄核体積の減少やそれに伴う線維輪層構造の乱れなど椎間板の組織構造の著しい変性が確認された. また, コラーゲンやアグリカンの遺伝子発現の増減などリモデリングを示唆する応答を認め, さらにアポトーシスの増加と細胞数密度の減少という組織構造の破綻を示唆する応答も認められた. このように, 機械荷重と生物学的応答の関係が *In vivo* 研究によって検証され始めているが, 組織の変性に伴う力学特性の変化については十分に検討されていない. 髄核や線維輪の劣化による椎間板の荷重支持機能の破綻を評価することは, 荷重支持組織として椎間板の安定性を議論する上で重要である<sup>(15)</sup>.

そこで本研究では, ラット尾部椎間板に静的圧縮力を負荷するための超弾性ばねを用いた外付け型の荷重デバイスを開発し, 椎間板に 2 週間に渡って継続的な静圧縮荷重を負荷する *In vivo* 実験を実施した. そして, 椎間板の変性を組織学的に観察すると共に, 実験前後の生体力学的特性の変化を詳細に調べ, 圧縮荷重因子が椎間板の荷重支持能力に与える影響を明らかにすることを目的に研究を行った.

## 2. 材料と方法

### 2.1 静圧縮荷重デバイス

動物の尾部椎間板に対して, 機械的荷重を負荷するための外付け型のデバイスを開発した (Fig. 1). このデバイス(総重量: 6 g)は, 2 枚のアルミニウム合金製リングプレート, これを椎骨に固定するための 4 本ステンレスピン(直径: 0.8 mm), リングプレートとピンを固定するためのアルミニウム合金製のボルトおよびナット, そしてリングプレート間に軸対称に配置された 8 本の超弾性ばね(歯科矯正用引張コイルばね:

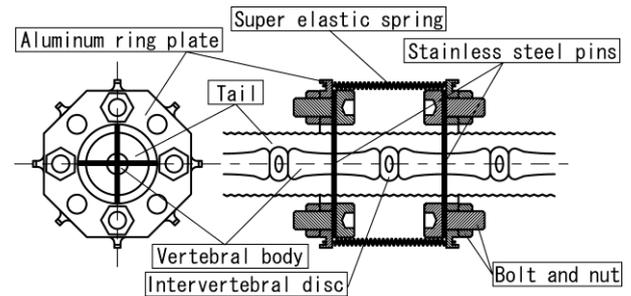


Fig. 1 Static loading device for rat tail disc. Eight super elastic springs installed between two plates generated 1.0 MPa compressive load on the intervertebral disc. Device attached to a rat tail by stainless steel pins inserted to the fifth and sixth vertebrae.

[Heavy type (509-23); Tomy, Ohkuma, Japan])で構成される. この超弾性ばねの荷重 - 伸び曲線を, 室温で電磁力式材料試験機 (MMT-250N; Shimadzu, Kyoto, Japan) を使って計測したところ, 伸びがおおよそ 1 mm から 15 mm までの範囲で, 超弾性効果により比較的フラットな荷重を示した. 実験では, デバイス(リングプレート間)に対して初期長 3.2 mm のばねを約 8 mm まで伸ばして使用した. 8 mm の伸びにおけるばねの引張力は, ばね 1 本あたり  $2.41 \pm 0.02$  N (n = 8) であった.

### 2.2 動物実験

本実験では実験動物に, 雄, 12 週齢, 体重約 400 g の SD 系ラットを使用した. 使用頭数は 12 匹(実験群 n = 6, 対照群 n = 6)とした. 実験群では, 動物の尾部第 5-6 椎骨間椎間板に対して, 外付け型の荷重負荷デバイスを用いて, 継続的な静圧縮荷重を負荷した. 実験 1 日目に, このデバイスを尾部に取り付けるために, ラットに 2% イソフルラン吸入麻酔 (IsoFlo; Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) を施した. また, 尾部皮膚を 70% エタノールで消毒した. 2 本のステンレスピンを第 5 尾椎骨の中央付近において, 尻尾長軸方向に対して垂直かつ互いに十字形となるように, ルーターを用いて経皮的に挿入した. 同じ方法で第 6 椎骨にもピンを挿入した. そして, リングプレートをボルトおよびナットを用いてピンに締結固定した. 実験 2 日目に, 椎間板に継続的な静圧縮荷重を負荷するため, 8 本の超弾性ばねを 2 つのリングプレート間に配置した. このときのばねの合力は, 19.28 N であり, 尾部第 5-6 椎間板の平均断面積  $17.69 \pm 0.74$  mm<sup>2</sup> (12 週齢, 雄, SD ラット, 12 匹) より, 圧縮応力は 1.09 MPa となる. 一方, 対照群は Sham (擬似実験) とし, リングプレートは取り付けが, ばねによる荷重は負荷しないものとした. いずれの群も, 実験期間は 2 週間とした. 以降,

本実験では、実験群を 1.0 MPa 群, 対照群を Sham 群と呼ぶ。全ての動物実験は東京医科歯科大学動物実験委員会によって認められたプロトコルで行われた。

### 2.3 エックス線解析による椎間板厚さの計測

実験 2 日目と 16 日目に(1.0 MPa 群では、ばねを取り付けた状態)、動物にイソフルラン吸入麻酔を施し、ラットの背腹方向における椎間板の規格化エックス線写真を撮影した。この写真をスキャナーを用いてスキャンしコンピュータへ転送し、画像解析ソフト (HALCON: MVtec, Munich, Germany) を使用した解析により、隣接する椎骨間の平均間隔より椎間板厚さを求めた<sup>(16)</sup>。

### 2.4 椎間板の力学特性

実験 2 日目と 16 日目に(1.0 MPa 群では、ばねを取り付けていない状態)に、椎間板の生体力学特性を調べるため、材料試験機 (MMT-250N; Shimadzu) を使用して力学試験を実施した (Fig. 2)。動物にイソフルラン吸入麻酔を施し、尾部に取り付けられたリングプレートを介して尾部を試験機に直接固定した。試験は、荷重制御で行い、試験条件は 16 から -16 N の繰返し荷重, 1 Hz 正弦波とした。プレコンディショニングのため、荷重を 9 回繰り返して負荷した後、10 回目の荷重 - 変位曲線を力学特性の解析に使用した。力学試験における典型的な荷重 - 変位曲線は Fig. 2(c) のように計測された。このような荷重 - 変位曲線から、椎間板の軸方向引張圧縮荷重負荷に対する力学特性として、Range of motion (ROM), Neutral zone (NZ), Hysteresis loss ratio (HLR), Stiffness (ST) を算出した。ROM は、全荷重範囲、すなわち 16 から -16 N の軸方向荷重による変形の範囲として測定した。NZ は、荷重 - 変位曲線の  $\pm 2$  N の荷重の範囲における変形の範囲として求めた。なおこの荷重は、ラット体重の約半分の値に相当する。NZ は、上側曲線 (Upper curve) と下側曲線 (Lower curve) のそれぞれについて求めた。HLR は、荷重 - 変位曲線の負荷曲線 (Loading) と除荷曲線 (Unloading) と x 軸によって囲まれる面積を負荷曲線と x 軸によって囲まれる面積で割算した % 比率で定義した。HLR は、引張側 (Tension) と圧縮側 (compression) のそれぞれについて求めた。ST は、荷重 - 変位曲線の 2 から 16 N までを最小二乗法により直線近似した直線の傾きとして求めた。ST についても、引張側 (Tension) と圧縮側 (compression) のそれぞれで求めた。

### 2.5 椎間板の組織観察

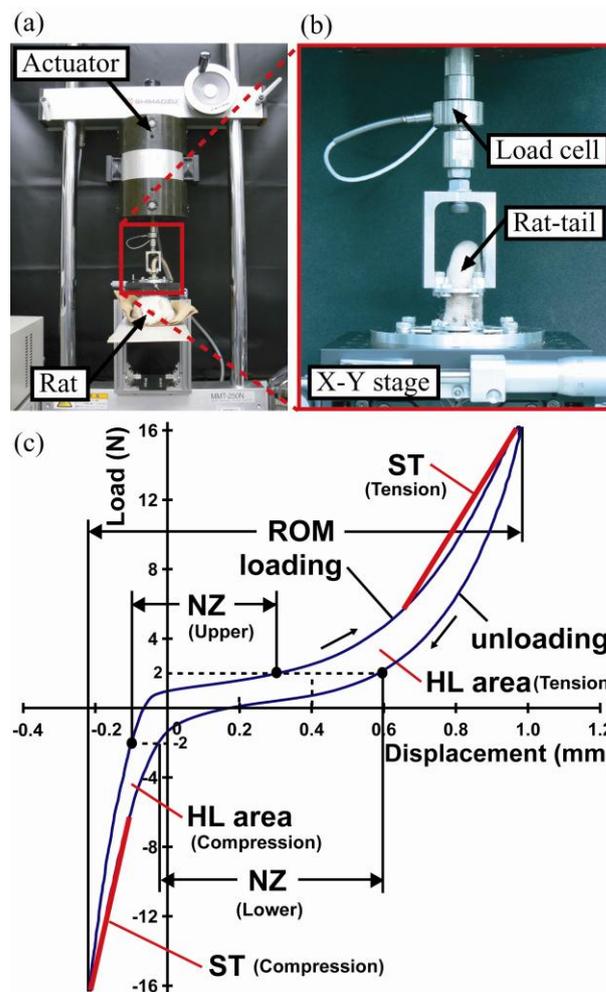


Fig. 2 Mechanical testing machine and biomechanical characteristics of the disc. (a) Electro-magnetic material testing machine (MMT-250N; Shimadzu, Kyoto, Japan) was used to measure the mechanical behavior of the disc. (b) Magnified view of the rat tail. The rat tail was attached to the machine via device and was applied an axial load by an actuator. A X-Y stage was used for positioning of the tail. (c) Typical load-displacement curve of the disc in the sham group measured. Range of motion (ROM) was defined as the peak-to-peak displacement difference under the axial load ranging from -16 to 16 N. Neutral zone (NZ) was the range of average displacement corresponding to the load ranging from -2 to 2 N. NZs were defined for both the upper curve and lower curve. Hysteresis loss ratio (HLR) was the ratio of the area surrounded by the loading and unloading curves versus the area surrounded by the loading curve and x-axis. HLRs were defined for both the tension and compression side. Stiffness (ST) was defined as the gradients of the linear approximation of the load-displacement curve in the range from 2 to 16 N. STs were defined for both the tension and compression side.

実験 16 日目の力学試験を実施した後、全ラットをペントバルビタールナトリウム (Somnopentil; Schering-Plough Animal Health, Omaha, NE, USA) の過剰投与により屠殺した。

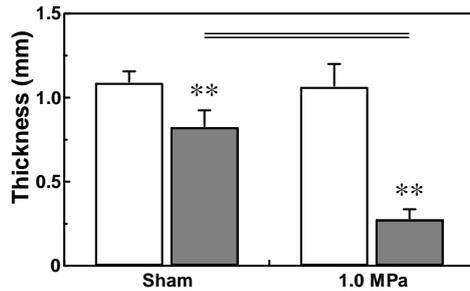


Fig. 3 Disc thicknesses before and after the experimental period of 2 weeks. Data are presented as mean  $\pm$  SD. (\*\*) indicates a significant difference with  $P < 0.01$  compared to the disc thickness before the experiment; (=) indicates a significant difference between sham and 1.0 MPa group with  $P < 0.01$ . The disc thicknesses after the experiment were significantly smaller than that before ( $P < 0.01$ ). Further, the thickness of 1.0 MPa group was significantly smaller than that of sham ( $P < 0.01$ ).

そして、実験終了時の形態を維持させるため、デバイスを取り付けた状態(1.0 MPa 群は、力学試験終了後に再度、ばねを取り付けた)で切り離され、4%ホルムアルデヒド溶液にて4°Cで一晩固定した後、デバイスを取り外した。そして、試料を脱灰した後、パラフィンで包埋した。切片は正中矢状方向に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン溶液(HE)およびサフランニン-O フェーストグリーン溶液(Safranin-O)で染色した。本実験では、薄切標本を光学顕微鏡(ECLIPSE 50i; Nikon, Tokyo, Japan)にて観察した。

## 2.6 統計解析

椎間板厚さ、ROM, NZ, HLR, STの各力学特性に対する実験条件の効果を解析するために、各群について実験前後での変化について  $t$ -検定を実施した。また、荷重因子の効果を解析するために、実験後の群間についても  $t$ -検定を実施した。 $P$ が0.05以下のとき有意差ありと判定した。統計解析には、オープンソフトウェア R (Available at <http://www.r-project.org/>)を使用した。

## 3. 実験結果

### 3.1 実験動物の状態

動物はケージ内において、デバイスをつけたままの状態でも自由に運動や食事が可能であった。また実験期間を通じて、ピン挿入部位における炎症や感染は確認されなかった。

### 3.2 椎間板の厚さ

実験16日目のエックス線写真から、隣接椎骨間における曲げ変形は観察されず、2週間の間、デバイスによって、椎間板には安定した軸方向

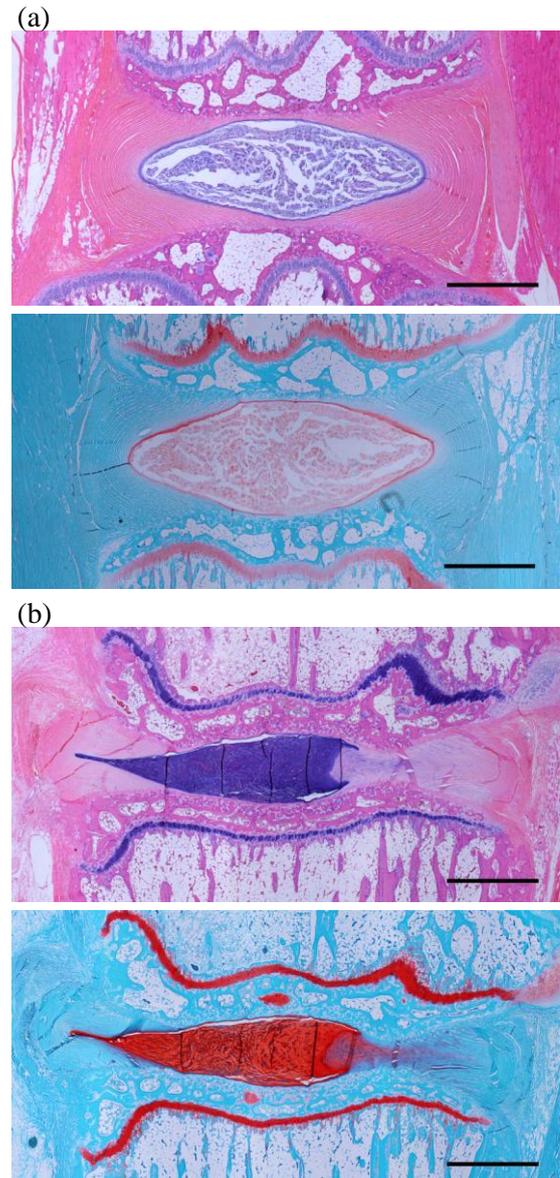


Fig. 4 Histological sections of the rat tail disc. H-E and Safranin-O stained mid-sagittal section of the disc are presented with macroscopic views and magnified views of annulus fibrosus. (a) Sham group, (b) 1.0 MPa group. Bar length = 1.0 mm.

圧縮荷重が負荷されたと考えられる。画像解析により求めた椎間板厚さを Fig. 3 に示す。 $t$ -検定によって、各群の実験条件および荷重因子が椎間板の厚さに対して統計的に有意な影響を持つことが示された( $P < 0.01$ )。椎間板厚さは、各群ともに実験前に比べて有意に減少していた。そして、Sham 群に比べて 1.0 MPa 群の方が有意に減少していた。なお、実験前においては、各群の間に有意差はなかった。

### 3.3 椎間板の組織観察

各群の正中矢状断面の HE および Safranin-O 染色組織像を Fig. 4 に示す。Sham 群では、椎間板は紡錘状の髄核とそれを囲む線維輪で構成され、近位および遠位側に軟骨終板および椎骨が隣接

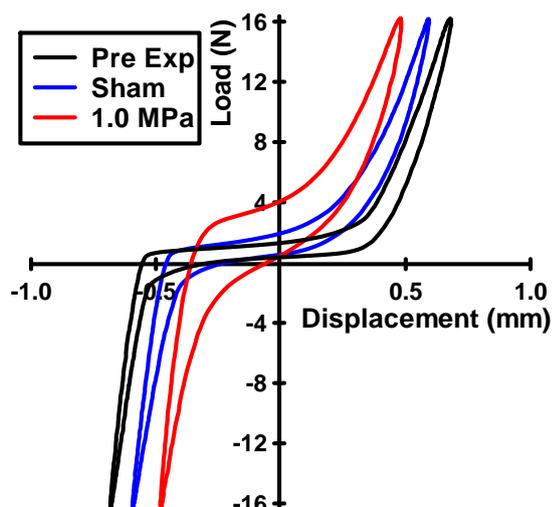


Fig. 5 Typical load-displacement curves of the discs in sham of before the experiment, sham and 1.0 MPa group after the 2-week experimental period. The curves expressed nonlinear S-shaped relation. The sham group demonstrated stiffer behaviors than that of before experiment. Further, the 1.0 MPa group demonstrated stiffer behaviors than the sham group.

していた。しかし、2週間に渡って1.0 MPaの静圧縮荷重を受けた椎間板では、髄核断面積が減少し、そしてそれに伴い、腹側の線維輪は全体的に外側に向かって屈曲していた。しかし、背側の線維輪の外側領域は外側に屈曲しているのに対して、内側領域は髄核内に向かって屈曲していた。このため、外側領域と内側領域の間の中間領域の層構造は著しく乱れていた。また、このような現象は、1.0 MPa群の全ての検体において観察された。一方、Safranin-O染色組織像から、Safraninによって赤く染まる軟骨様基質の分布を観察した。その結果、Sham群では、髄核と線維輪の境界付近でわずかに赤染色するのに対して、1.0 MPa群では、髄核全体に渡って強く染まっていた。また、背側線維輪領域において比較的 inner の層間に赤染色する基質が確認された。

### 3.4 椎間板の力学特性

力学試験によって得られた荷重-変位曲線は、Fig. 5に示すように、非線形のS字カーブを描き、NZおよびHLRをもっていた。実験前に比べて、Sham群、1.0 MPa群の順に徐々に剛性が増加していた。この荷重-変位曲線を解析して、力学特性値であるROM, NZ, HLR, STを求めた結果をFig. 6に示す。t検定によって、各群の実験条件および荷重因子が力学特性に対して統計的に有意な影響を持つことが示された。ROMおよびNZに関しては、各群ともに実験前に比べて有意に減少していた。そして、Sham群に比べて1.0 MPa群の方が有意に減少していた( $P < 0.01$ )。し

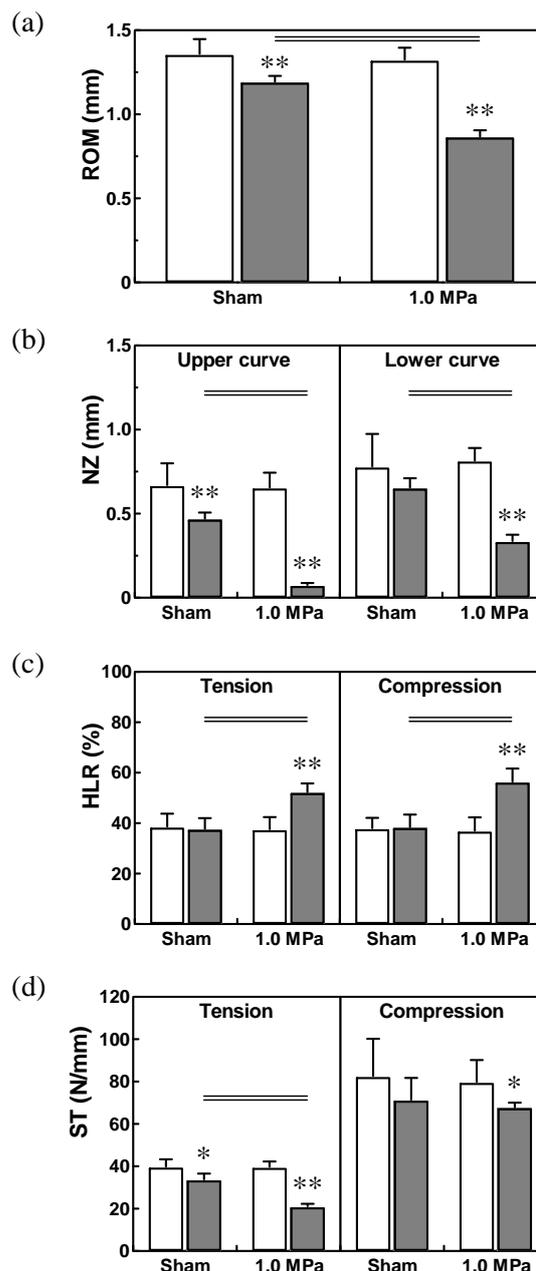


Fig. 6 The range of motion (ROM), neutral zone (NZ), hysteresis loss ratio (HLR), and stiffness (ST) of the disc obtained by the test. Data are presented as mean  $\pm$  SD. (\*\*) indicates a significant difference with  $P < 0.01$  and (\*) with  $P < 0.05$  compared to the properties of before the experiment; (=) indicates a significant difference between the 1.0 MPa group and sham group with  $P < 0.01$ .

かし、NZの下側曲線(Lower curve)のShamについては、実験前後に有意差はなかった。HLRに関しては、1.0 MPa群は実験前に比べて有意に増加していたが( $P < 0.01$ )、Sham群については有意差がなかった。しかし、Sham群に比べて1.0 MPa群の方が有意に増加していた( $P < 0.01$ )。STに関しては、各群ともに実験前に比べて有意に減少していたが( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ )、圧縮側(Compression)のSham群については、実験前後に有意差はなかった。そして、引張側(Tension)にお

いてのみ、Sham群に比べて1.0 MPa群の方が有意に減少していた( $P < 0.01$ )。なお、実験前においては、いずれの力学特性においても各群の間に有意差はなかった。

#### 4. 考察

椎間板の組織は、親水性に富むプロテオグリカンを含むゲル状物質で満たされた髄核と、それを囲むタイプ I コラーゲンを主成分とする線維輪層によって構成される。この椎間板に対して圧縮荷重が負荷されると髄核内に静水圧が発生し、この圧力を線維輪が引張荷重によって支えることで、荷重に対する安定性が維持されている。従って、髄核体積の増減は、椎間板の圧縮荷重支持能力に対して強く影響すると考えられる。Haefeli<sup>(17)</sup>らは、椎間板変性の初期段階として、髄核体積の減少とそれに伴う線維輪層構造の乱れが引き起こされることを報告している。そして、この椎間板変性に対して、機械的荷重が原因となることは、すでに多くの研究によって報告されている。例えば、Hutton<sup>(7)</sup>らなどによると、動物死体より摘出した椎間板の髄核細胞に対して規定した静水圧を負荷する *In vitro* 実験で、髄核細胞の基質合成能力に力学的荷重が影響することを報告している。このことから、プロテオグリカンを多く含む髄核基質の変化が保水力の低下を引き起こし、髄核体積が減少することで、椎間板の圧縮荷重支持能力が減衰すると推定される。しかし、このような機械的荷重による椎間板変性を実際の生体内において再現し、さらに力学特性の変化を詳細に調べた研究は少ない。

しかし近年、げっ歯類の尾部椎間板を用いたモデルが、コストの低さや扱い易さの観点からしばしば使われるようになった。Lotz<sup>(14,18)</sup>らは、カンチレバー式の金属ばねや歯科矯正用のエラストマーを用いた外付け型のデバイスにより、マウス尾部椎間板に0.4から1.3 MPaの静圧縮荷重を1から2週間に渡り負荷した結果、アポトーシスの増加、細胞数の減少、タイプ II コラーゲンの遺伝子発現の増加、アグリカンの遺伝子発現の減少を確認し、さらにアポトーシスの増加が荷重の大きさや期間に対して相関性を示すことを報告している。また、Iatridis<sup>(13)</sup>らは、圧縮コイル型の金属ばねにより、ラット尾部椎間板に0.15 MPaの静圧縮荷重を8週間に渡り負荷した結果、プロテオグリカンが増加することを示した。一方で、Hutton<sup>(19)</sup>らは、ラット尾部に引張

荷重を2週間および4週間に渡り負荷した結果、プロテオグリカン量が減少することを示した。このように、機械的荷重負荷が、椎間板細胞の代謝を促し、髄核や線維輪の基質を変化させる可能性が示唆されているにも関わらず、それに伴う椎間板の力学特性の変化については十分に検討されていない。例えば、Lotz や Iatridis は、曲げ試験によって椎間板の NZ や Siffness について評価しているが、椎間板の安定性を議論する上で重要な ROM を評価していない。また、曲げ試験では、中立面を境にして、伸展側では引張応力、屈曲側では圧縮応力が生じるため、引張荷重と圧縮荷重のそれぞれに対応する応答の差異を明確に評価できない。髄核体積の減少や基質的な変化による椎間板の圧縮荷重支持機構の劣化を議論する上では、椎間板が圧縮あるいは引張を受ける場合のそれぞれについて力学特性を求める必要がある。

そこで本研究では、ラットテイルモデルを用いて、尾部椎間板に継続的な静圧縮荷重を負荷し、実験前後の椎間板の軸方向力学特性の変化を詳細に調べ、さらに組織構造や基質の変化を観察した。本実験において、我々は、尾部椎間板に一定の圧縮荷重を継続的に負荷するために、歯科矯正用の引張コイルばねを採用した小型軽量の外付け型デバイスを開発した。超弾性ばねは鋼線で作られた金属ばねに比べて、伸びに対する荷重の変化が小さいため、実験期間中に椎間板が圧縮変形しても設定荷重を維持し続けることができる。実際、実験前後のエクス線観察より、1.0 MPa 群の椎間板厚さは最大で 0.83 mm 程度の減少が確認されたが、このときの圧縮応力の変化は、1.09 から 0.95 MPa 程度と小さかった。また、隣接椎骨間で曲げ変形が確認されなかったことは、デバイスによる曲げモーメントの発生が最小限に抑えられ、正確な軸圧縮荷重が負荷されたことを示している。本実験の荷重の大きさと期間に関しては、過去のテイルモデルを用いた研究を参考にした<sup>(14,18)</sup>。また、Wilke<sup>(20,21)</sup>らは、日常生活におけるヒトの腰椎椎間板内圧が、およそ 1 MPa であることを *In vivo* 実験によって示した。従って、本実験の圧縮応力値である 1.0 MPa は、ヒトの腰椎椎間板に生理的に作用する応力に相当する。

実験後の HE 染色組織像の観察結果より、Sham 群に比べて 1.0 MPa 群では、髄核の断面積の減少に伴い背側線維輪の層構造が著しく乱れることを観察した。このような現象は、各群の全ての

検体において認められた。また、椎間板厚さの計測結果においても 1.0 MPa 群の有意な減少を確認した。そして、Safranin-O 染色組織像より、その背側線維輪の内側付近の層間において軟骨様基質の形成が確認された。これは、本来は圧縮荷重によって髄核内に圧力が発生し、線維輪には引張応力が作用するのに対して、髄核が減少したことで、線維輪に圧縮応力が作用し、より応力変化の著しかった背側線維輪の内側付近において基質の変性が促されたことを示している。このような基質の変化は椎間板の圧縮荷重支持機構の破綻を意味しており、力学特性の有意な変化を示唆する。しかし一方で、椎間板厚さに関しては、Sham 群についても、実験前後で有意差が検出された。これはデバイスの取り付けのみによる効果があったことを示している。

椎間板の力学特性試験では、軸方向に $\pm 16$  N, 1 Hz の正弦波を負荷したときの荷重-変位曲線を計測した。その結果、椎間板の荷重-変位曲線は S 字カーブを描き、ヒステリシス損失をもつことを確認した。本研究では、実験前後の力学特性の変化を ROM, NZ, HLR, ST の4つの特性を用いて評価した。その結果、ROM および NZ に関しては、実験条件および荷重因子によって有意に減少することを確認した。このことは、椎間板の剛性の増加を意味しており、Iatridis らも、0 から 4 N 程度の軸方向圧縮荷重試験で、剛性の逆数であるコンプライアンスが減少することを示したと一致している。さらに、Lotz らの曲げ試験でも、剛性のわずかな増加が確認されている。ところが、本実験の ST は有意な減少を示した。この矛盾は ST の算出方法に起因すると考えられる。すなわち、非線形の S 字カーブを描く荷重-変位曲線に対して、本実験のように 2 から 16 N までの曲線全体を最小二乗法で線形近似する方法では、Iatridis らのように低い圧縮荷重領域で評価する場合や、Lotz らのように破壊荷重に近い大きな荷重領域で評価する場合とは一致しないと考えられる。また、Sham 群については、組織像に形態の変化が確認されなにも関わらず、実験前後において、椎間板厚さの有意な減少のみならず、ROM, NZ, ST の有意な減少が認められた。このことは、椎間板の周囲にある軟組織の影響を示唆する。すなわち、椎間板の周囲には腱などの強靱な組織があり、これらの力学的寄与が推定される。例えば、骨折治療などにおけるギプス固定など長期の関節固定が周囲組織の拘縮を引き起こし、関節可動

域を低下させることがあるが、ラットを用いた動物実験においても同様の現象が示唆されている<sup>(22)</sup>。従って、本実験でも、ピンの挿入により椎骨間の動きが拘束され、周囲組織が拘縮し、力学特性の有意な変化を招いた可能性がある。このような周囲組織の影響については、さらに検討する必要がある。一方、HLR に関しては、荷重因子のみによって有意に増加することを確認した。ヒステリシス損失は、荷重-変位曲線における S 字カーブの囲む面積で定義され、荷重時に物体に蓄積されたエネルギーと除荷時に開放されたエネルギーの差で求められる。このようなエネルギーの散逸は、主として組織が変形する際にコラーゲンなどの線維間やプロテオグリカンの中で生じていると考えられている<sup>(23)</sup>。本実験のように圧縮荷重が作用すると、組織内の水分が減少し、特に、コラーゲン線維間に存在するプロテオグリカンなどの細胞外基質に水和している水分が減少すると考えられる。Norcross<sup>(24)</sup>らは、ラット尾部椎間板において、Chondroitinase ABC の注入によるプロテオグリカンの化学的分解による変性モデルで、椎間板厚さの有意な減少とともに、ヒステリシス損失が有意に増加することを示した。すなわち、髄核内基質の変化は HLR に対して有意な因子になる。本実験の組織像においても、髄核断面積の減少は水分の減少を示唆し、同様のメカニズムによる HLR の増加現象が推定される。このように、組織内部の潤滑性が低下して摩擦抵抗が増加すると、結果的に支持組織の損傷を引き起こす可能性がある。このことから線維輪の強度特性についても検討する必要がある。

## 5. 結論

本研究では、ラット尾部椎間板に静的圧縮力を継続的に負荷するための外付型のデバイスを使用して、2 週間に渡り生理的応力である 1.0 MPa の静圧縮応力負荷実験を行った後、生体力学的試験および組織観察による評価を行った。その結果、デバイスの取り付けや圧縮荷重の負荷により、椎間板厚さが有意に減少することを示した。また、組織像より髄核断面積の減少と、それに伴う背側の線維輪の層構造の著しい乱れを観察した。このような線維輪における現象は、組織のリモデリングやコラーゲン束の廃用性による強度低下を引き起こし<sup>(25,26)</sup>、椎間板機能を破綻に導く可能性がある。今後、線維輪の強度試験を実施する方法を確立して、実証する必要が

ある。

本研究により、荷重因子によって ROM, NZ, ST が統計的に有意に減少することがわかった。また、HLR の有意な増加は、組織内の水分減少に伴う摩擦抵抗の増加を示唆した。しかし、このような変化は、髄核の減少に伴う力学特性の変化とは異なるメカニズムによるものと示唆される。すなわち、尾部椎間板の周囲にある腱や皮膚といった軟組織の影響が推定される。今後、このような組織の特性をより詳しく調べることで、椎間板の力学特性の変化をより明確にしていく必要がある。

### 参考文献

- (1) Osti OL, Vernon-Roberts B, Moore R, Fraser RD. Annular tears and disc degeneration in the lumbar spine. A post-mortem study of 135 discs. *J Bone Joint Surg Br* 74:678-682, 1992.
- (2) Brown T, Hansen RJ, Yorra AJ. Some mechanical tests on the lumbosacral spine with particular reference to the intervertebral discs; a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 39:1135-1164, 1957.
- (3) Berkson MH, Nachemson AL, Schultz AB. Mechanical properties of human lumbar spine motion segments - Part II: Responses in compression and Shear; Influence of gross morphology. *J Biomech Eng* 101:53-57, 1979.
- (4) Lin HS, Liu YK, Adams KH. Mechanical response of the lumbar intervertebral joint under physiological (complex) loading. *J Bone Joint Surg Am* 60:41-55, 1978.
- (5) White A, Panjabi M. Clinical biomechanics of the spine. 2nd ed, JB Lippincott, Philadelphia PA, 1990.
- (6) McGill SM. The biomechanics of low back injury: implications on current practice in industry and the clinic. *J Biomech* 30:465-475, 1997.
- (7) Hutton WC, Elmer WA, Boden SD, Hyon S, Toribatake Y, Tomita K, Hair GA. The effect of hydrostatic pressure on intervertebral disc metabolism. *Spine* 24:1507-1515, 1999.
- (8) Handa T, Ishihara H, Ohshima H, Osada R, Tsuji H, Obata K. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in the human lumbar intervertebral disc. *Spine* 22:1085-1091, 1997.
- (9) Ching CT, Chow DH, Yao FY, Holmes AD. The effect of cyclic compression on the mechanical properties of the inter-vertebral disc: an in vivo study in a rat tail model. *Clin Biomech* (Bristol, Avon) 18:182-189, 2003.
- (10) Ching CT, Chow DH, Yao FY, Holmes AD. Changes in nuclear composition following cyclic compression of the intervertebral disc in an in vivo rat-tail model. *Med Eng Phys* 26:587-594, 2004.
- (11) Court C, Colliou OK, Chin JR, Liebenberg E, Bradford DS, Lotz JC. The effect of static in vivo bending on the murine intervertebral disc. *Spine J* 1:239-245, 2001.
- (12) Court C, Chin JR, Liebenberg E, Colliou OK, Lotz JC. Biological and mechanical consequences of transient intervertebral disc bending. *Eur Spine J* 16:1899-1906, 2007.
- (13) Iatridis JC, Mente PL, Stokes IA, Aronsson DD, Alini M. Compression-induced changes in intervertebral disc properties in a rat tail model. *Spine* 24:996-1002, 1999.
- (14) Lotz JC, Colliou OK, Chin JR, Duncan NA, Liebenberg E. Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-element study. *Spine* 23:2493-2506, 1998.
- (15) Panjabi M. Clinical spinal instability and low back pain. *J Electromyogr Kinesiol* 13:371-379, 2003.
- (16) Lai A, Chow DH, Siu WS, Holmes AD, Tang FH. Reliability of radiographic intervertebral disc height measurement for in vivo rat-tail model. *Med Eng Phys* 29:814-819, 2006.
- (17) Haefeli M, Kalberer F, Saegesser D, Nerlich AG, Boos N, Paesold G. The course of macroscopic degeneration in the human lumbar intervertebral disc. *Spine* 31:1522-1531, 2006.
- (18) Lotz JC, Chin JR. Intervertebral disc cell death is dependent on the magnitude and duration of spinal loading. *Spine* 25:1477-1483, 2000.
- (19) Hutton WC, Yoon ST, Elmer WA, Li J, Murakami H, Minamide A, Akamaru T. Effect of tail suspension (or simulated weightlessness) on the lumbar intervertebral disc: study of proteoglycans and collagen. *Spine* 27:1286-1290, 2002.
- (20) Wilke HJ, Neef P, Caimi M, Hoogland T, Claes LE. New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life. *Spine* 24:755-762, 1999.
- (21) Wilke HJ, Neef P, Hinz B, Seidel H, Claes L. Intradiscal pressure together with anthropometric data--a data set for the validation of models. *Clin Biomech* (Bristol, Avon) 16:S111-S126, 2001.
- (22) Trudel G, Uhthoff HK, Brown M. Extent and direction of joint motion limitation after prolonged immobility: an experimental study in the rat. *Arch Phys Med Rehabil* 80:1542-1547, 1999.
- (23) Bogduk N. Clinical anatomy of the lumbar spine and sacrum. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005.
- (24) Norcross JP, Lester GE, Weinhold P, Dahners LE. An in vivo model of degenerative disc disease. *J Orthop Res* 21:183-188, 2003.
- (25) Ohno K, Yasuda K, Yamamoto N, Kaneda K, Hayashi K. Effects of complete stress-shielding on the mechanical properties and histology of in situ frozen patellar tendon. *J Orthop Res* 11:592-602, 1993.
- (26) Yamamoto N, Ohno K, Hayashi K, Kuriyama H, Yasuda K, Kaneda K. Effects of stress shielding on the mechanical properties of rabbit patellar tendon. *J Biomech Eng* 115:23-28, 1993.