

## 学位論文題名

## コンドロイチナーゼ ABC が椎間板に与える長期的影響

## 学位論文内容の要旨

## [目的]

Chymopapainによる化学的髄核融解術は欧米において臨床応用されているが、組織毒性やアナフィラキシーショックなどの副作用が報告されている。Chondroitinase ABCはムコ多糖分解酵素であり、椎間板髄核に含まれるプロテオグリカンを特異的に分解し、椎間板周囲の神経血管組織への毒性がchymopapainに比べて著しく少ないことが報告されている。しかし髄核融解術後の椎間板の力学的特性に対する長期的な研究は少なく、chondroitinase ABCとchymopapainを比較検討したものはない。本研究では、ブタ椎間板における、両酵素による髄核融解術の長期的な影響を、生体力学的、形態学的に検討することを目的とした。

## [材料と方法]

## (実験材料)

成熟豚11頭を使用し、X線透視を用いて経皮的に椎間板に薬剤を注入した。Chondroitinase ABCは、4.0 unit/0.05 ml/discのlow dose群と、12.5 unit/0.05 ml/discのhigh dose群の二群に分け、22椎間ずつに注入した。Chymopapainは400pKU/0.05 ml/discで、対照用生理食塩水は0.05 ml/discでそれぞれ11椎間に注入した。注入1週後に6頭36椎間板を摘出し、53週後に5頭30椎間板を摘出した。

## (生体力学試験)

椎間板-椎体複合体を作成し、自作の三次元荷重負荷装置を用いて屈曲-伸展、軸回旋、左右側屈の6方向のモーメントを負荷した。検体の運動は二方向同時写真撮影法を用いて記録した。設置したマーカーの三次元動態を解析し、得られた荷重-変位曲線から、以下の2つのパラメーターを算出した。1. Range of Motion (ROM): 最大負荷時の回旋角度。2. Neutral Zone (NZ): 0Nm負荷時の残余変位。統計解析には、one-way ANOVAとTukey-Kramer検定を使用した。また、1週時と53週時の変化については、StudentのT検定を用いて解析した。

## (X線計測)

薬剤注入前と注入後3ヶ月毎にX線側面像を撮影し、椎間板高を計測した。椎体間および撮影条件の差による影響を除くため、椎間板高を下位椎体高にて補正したBrandnerのdisc indexを用いて評価した。注入前のIndexを100%として、注入後の椎間板高の残存率を算出した。椎間板高の各時期において、one-way ANOVAとTukey-Kramer検定を用いて解析した。

## (組織学的検査)

非破壊力学試験後に各椎間板を10%中性ホルマリン固定し、EDTA脱灰後にパラフィン切片を作成した。光顕用標本はsafranin-O染色を行い観察した。また免疫組織化学的検討として、二次抗体を用いた間接法を行い、type I collagenとtype II collagenの局在を光学顕微鏡にて観察した。

## [結果]

## (生体力学的評価)

酵素注入後1週時、屈曲-伸展では、すべての酵素群でROMおよびNZは、対照群に比べて有意に大きかった( $p < 0.05$ )。軸回旋では、ROMはすべての酵素群で対照群に比べて有意に大きく、NZはchymopapain群のみ対照群に比べて有意に大きかった( $p < 0.05$ )。左右側

屈では、群間に有意差を認めなかった。53週時、屈曲-伸展および左右側屈において、すべての酵素群でROMおよびNZは減少し、対照群との有意差を認めなかった。軸回旋では、ROMでchymopapain群のみ対照群に比べて有意に小さかった( $p < 0.05$ )。すべての酵素群でNZは減少し、対照群との有意差を認めなかった。また屈曲-伸展、軸回旋、左右側屈の6方向において、すべての酵素群におけるROMおよびNZは、1週時および53週時で有意差を認めた( $p < 0.05$ )。

#### (X線学的評価)

1週時、すべての酵素群で対照群に比べて有意に狭小化した( $p < 0.05$ )。その後の椎間板高の経時的な変化では、chymopapain群およびchondroitinase ABC群いずれにおいても、有意な回復は認めなかった。53週時の残存率はchymopapain群で75.5%、chondroitinase ABCのhigh dose群で85.1%、low dose群で87%であった。またchymopapain群の狭小化は、chondroitinase ABC両群と比較して有意であった( $p < 0.05$ )。

#### (組織学的評価)

1週時では、すべての酵素群ともに、髄核のsafranin-O染色性が消失した。53週時では、chondroitinase ABCを注入した椎間板は、髄核のsafranin-O染色性は回復したが、本来のnotochordal cellは消失し、線維性に富む基質内にchondrocyte類似細胞が出現していた。chymopapainを注入した椎間板はchondrocyte類似細胞は散在するが、chondroitinase ABC群と比較し髄核の線維化は著明であった。免疫組織学的には、53週時、いずれの酵素を注入した椎間板とも、髄核基質はtype II collagen抗体に反応し、type I collagen抗体に反応しなかった。

#### [考察]

酵素注入後1週時、両酵素群で椎間の可動性の指標であるROMおよびNZの増加を認め、本研究における化学的髄核融解術の効果を示唆した。その後53週時にはROMおよびNZは対照群と同等となり剛性の回復を認めた。これは酵素による侵襲に対して、生体における椎間板内の反応が、椎間運動を安定化させた可能性がある。しかし生体力学特性の回復と異なり、chymopapainならびにchondroitinase ABCのどちらにおいても、椎間板高は明らかな回復を認めなかった。本実験の注入酵素の用量は、その臨床予想使用量を考慮して、髄核の重量で厳密に補正して決定したが、ブタ椎間板は、臨床用量の酵素注入にて、注入前の椎間板高は回復しないことが示された。組織学的には酵素注入後1週時、両酵素ともに椎間板髄核のsafranin-O染色性を消失させたが、53週時には、線維性に富む髄核基質が再構築され、そのsafranin-O染色性は回復していた。免疫組織学的所見から再構築された髄核基質は主にtype II collagenにて構成されており、それらはchondrocyte類似細胞によってつくられた可能性がある。したがって化学的髄核融解術後、破壊された椎間板基質は単に癒痕組織によって埋められていくのではなく、何らかの再生のメカニズムが働いていることが示唆された。Chymopapainおよびchondroitinase ABCの比較においては椎間板高の狭小化はchymopapainにおいて顕著であり、注入後53週時の椎間板変性もchymopapainにおいて高度であった。

[結語] Chondroitinase ABCによる化学的髄核融解術は、chymopapainに替わりえる組織障害性の少ない新しい椎間板内療法として今後の臨床応用が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 杉 原 平 樹

副 査 教 授 安 田 和 則

学 位 論 文 題 名

## コンドロイチナーゼ ABC が椎間板に与える長期的影響

コンドロイチナーゼABC (CABC) は、椎間板髄核に含まれるプロテオグリカンの特異的に分解し、椎間板周囲の神経血管組織への毒性がchymopapainに比べて著しく少ないことが報告されている。本研究では、ブタ椎間板を用いて、両酵素による髄核融解術の長期的な影響を、生体力学的、形態学的に検討することを目的とした。成熟豚11頭を使用し、CABCは、4.0 unit/0.05 ml/discの低用量群と、12.5 unit/0.05 ml/discの高用量群の二群に分け、22椎間ずつに経皮的に注入した。Chymopapainは400pKU/0.05 ml/discで、対照用生理食塩水は0.05 ml/discでそれぞれ11椎間に注入した。注入1週後に36椎間板を摘出し、53週後に30椎間板を摘出した。屈曲伸展、軸回旋、左右側屈の6方向のモーメントを負荷する生体力学試験を行い、以下の2つのパラメーターを算出した。1. Range of Motion (ROM) : 最大負荷時の回旋角度。2. Neutral Zone (NZ) : 0Nm負荷時の残余変位。また経時的にX線側面像を撮影し、椎間板高を計測しBrandnerの disc indexを用いて評価した。注入前のIndexから注入後の椎間板高の残存率を算出した。また、非破壊力学試験後に各椎間板のsafranin-O染色による組織学的検査を行った。免疫組織化学的検討として、二次抗体を用いた間接法を行い、type I collagenとtype II collagenの局在を調べた。生体力学試験では、酵素注入後1週時、両酵素群で椎間の可動性は増加し、その後53週時には対照群と同等となり剛性が回復した。これは酵素による侵襲に対して、生体における椎間板内の反応が、椎間運動を安定化させた可能性がある。しかし生体力学特性の回復と異なり、両酵素群とも、椎間板高は明らかな回復を認めなかった。本実験の注

入酵素の用量は、その臨床予想使用量を考慮して、髄核の重量で厳密に補正して決定したが、ブタ椎間板は、臨床用量の酵素注入にて、注入前の椎間板高は回復しないことが示された。組織学的には酵素注入後1週時、両酵素ともに椎間板髄核のsafranin-O染色性を消失させたが、53週時には、線維性に富む髄核基質が再構築され、そのsafranin-O染色性は回復していた。免疫組織学的所見から再構築された髄核基質は主にtype II collagenにて構成されており、それらはchondrocyte類似細胞によってつくられた可能性がある。ChymopapainにおいてCABCと比較すると、椎間板高の狭小化および椎間板変性が高度であった。CABCによる化学的髄核融解術は、chymopapainに替わりえる組織障害性の少ない新しい椎間板内療法と考える。

審査にあたり、副査杉原教授よりCABC群の群間で差が無かった理由についての質問があり、用量は臨床用量から計算されたため、低用量群においても酵素による十分な効果があった可能性があることを回答した。また、今後解決すべき問題についての質問に対し、臨床応用において、必然的に治療効果が重要であり、現在、多施設で臨床試験が行われていることを回答した。副査安田(和)教授より対照群の生理食塩水注入の影響についての質問があり、組織学的に炎症性細胞の浸潤などの変化は認められず、影響はないと判断したことを回答し、酵素の有効性についての質問に対し、本実験の結果から有効性についての評価は難しい事を回答した。また、主査三浪教授より椎間板ヘルニアのタイプによって臨床適応が変わるかについて、CABCを担体と併に使用することの可能性についての質問があり、CABCは椎間板周囲の組織に対しての障害が少ない酵素のため、protrusionタイプのヘルニアだけでなく、chymopapainでは危険である脱出髄核への適応の可能性があること、その際には、安定して酵素が働くために、適当な担体の使用が有効と考えられる事を回答した。

この論文は、CABCによる髄核融解術の長期的な影響を検討した独創的な研究であり、すでに臨床応用されているchymopapainと比較し組織障害性の少なく、椎間板運動機能を温存することを明らかにした点で脊椎の椎間板内治療分野に大きく寄与した。CABCによる化学的髄核融解術は、chymopapainに替わりえる組織障害性の少ない新しい椎間板内療法として今後の臨床応用が期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受ける資格を有するものと判定した。