

## 学位論文題名

Creep Behavior of the Canine Lumbar Intervertebral Discs after Chemonucleolysis with  
Chondroitinase-ABC and Chymopapain

- A Biomechanical, radiographic and histological study -

(コンドロイチナーゼABCおよびキモパpain注入椎間板の粘弾性特性に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

## はじめに

キモパpain (Chymopapain、以下CP) はパパイヤ果実から抽出された蛋白分解酵素であり、椎間板内に注入されるとプロテオグリカン (Proteoglycan、以下PG) を分解しその水結合能を消失させ、椎間板内圧を減少させる。これを利用してヘルニアを介して伝達される神経根への圧迫を解除させ、症状をとろうとするのが化学的髄核融解術 (Chemonucleolysis) の原理である。CP注入療法ははじめて30年以上が経過し、治療例も30万人に達したが、まだに評価は定まっていない。CPによりアナフィラキシー反応と組織毒性が存在するのである。コンドロイチナーゼABC (Chondroitinase-ABC、以下CABC) は、CPと同様にPGを分解する作用があり、しかも血管神経組織に対する毒性と椎間板細胞への障害はCPより少ないと報告され、安全かつ有効な髄核溶解酵素として期待されているが、CABCが椎間板の生体力学特性に与える影響はまだ不明である。そこで、本研究では、椎間板粘弾性に対するCABCの影響をCPと比較検討した。

## 材料と方法

ビーグル成犬10頭 (雄、1歳、平均体重12.4kg) を使用し、計60個の腰椎椎間板内にCABC (2.5単位：20椎間；5.0単位：20椎間)、CP (120pKat単位：10椎間)、生理食塩水対照 (20 $\mu$ l：10椎間) をそれぞれ注入し、注入1週間後、実験動物を屠殺し、注入椎間の力学的、組織的、X線学的変化について検討した：(I) 力学試験：後方要素を切除した脊柱機能単位 (Functional Spinal Unit) を使用し、椎間板粘弾性の変化を調べるため、軸圧縮荷重下のクリープ試験を施行した。10Nのpreloadを加えた後、40N/secの荷重速度で最大210Nまで負荷した。最大荷重でのクリープ時間は1000秒とした。その後、同様の速度で荷重を10Nまで低減し、除負荷後の回復をさらに1000秒観察した。椎間板の粘性特性は最大荷重下のCreep rate ( $\Delta$ strain/ $\Delta$ creep time) を、弾性特性は40N/secの速度で荷重を加え続けた時の圧縮剛性 ( $\Delta$ load/ $\Delta$ strain) を評価した。それ以外、初期荷重時の歪み (Initial strain) と回復終了時点での残余歪み (Residual strain) も検討した。(II) 組織観察：顕微鏡と電顕を使用し、椎間板組織内のPGの変化を観察した。(III) 画像計測：注入前と注入1週間後に腰椎側面の単純X線撮影を行い、椎間板腔狭小化の程度を検討した。

## 結果

(I) 力学試験：各酵素群とも対照群に比べ最大荷重下のcreep rateは増加したが、CP群のみ対照群との有意差を認めた ( $p<0.05$ )。40N/secの荷重速度で軸圧縮荷重を加えた場合、各酵素群の椎間板圧縮剛性は対照群より低下したが、有意な変化はなかった。また、初期荷重時の椎間板変位量は各群間の有意差はなかった。除荷重後の残余歪みは、CP群とCABC両群とも対照群より有意に増加した ( $p<0.05$ )。以上すべてのパラメーター値は、CP群での変化はCABC群より著明であった。(II) 組織観察：(光顕) CABC注入椎間板では、PGの破壊を示すsafranin-O染色性の低下が髄核の周辺部のみと線維輪内側に観察され、髄核中央部では染色性が保たれていた。一方、CP注入椎間板では、染色性の完全な消失を髄核の全体と線維輪内側に認め、PGの破壊がCP群でより大きかったことを示した。(電顕) CP群、CABC群とも、線維輪内collagen線維間に存在するPGの破壊を認めた。(III) 画像計測：注入1週後、各酵素群とも、注入前より椎間板高は有意に狭小化した ( $p<0.05$ )。CP群での変化はより著明であった。本研究での統計解析は、One way ANOVAとFisher's PLSD検定を使用した。

## 考察

椎間板に及ぶもっとも重要な力学的負荷は圧縮である、この力学的負荷に対して椎間板は粘性と弾性の二つの物性を示し、粘弾性体と呼ばれる性質を示す。粘性は外力に対する反応は時間をかけて現れる現象である。椎間板に一定の荷重を加え続けた場合、椎間板の変位は時間とともに指数関数的に増加し、一定の値に至る。この現象はクリープ (creep) と呼ばれ、代表的な粘性の特徴を示している。粘性は外力変化が緩徐に進行する場合、すなわち日常生活における姿勢の変化などに対応した椎間板の物性であり、外力の変化を吸収する一つのメカニズムでもある。また、クリープの結果としては椎間板腔の狭小化、椎間板内応力の集中、小関節突起で荷重の増加を生じる。それらの力学的変化は椎間板細胞の代謝を影響し、椎間板変性にもつながる。

椎間板に一定の速度で荷重を加え続けた場合、椎間板の変位量と荷重はほぼ直線関係を保ちつつ、最後に破断に至る。これは椎間板が金属のような弾性体としての物性をも有することを意味し、この直線関係から圧縮剛性を計算できる。椎間板に加わる荷重の速度が速いほど椎間板の剛体としての性質が増す、すなわち墜落などによる速く大きな荷重変化に対しては椎間板はその剛性を増すことになる。

本研究の結果では、化学的髄核融解術により椎間板の粘性特性への影響は弾性特性への影響より大きいこと、またCPにより影響はCABCより大きいことを示した。従って、酵素注入後の椎間板は墜落など速く大きな荷重変化に対する抵抗を保っているが、日常生活の荷重変化への対応能力の低下と椎間板変性進行の増大が予想される。生体力学の見地から、CABCはCPより優れることを考えられる。

化学的髄核融解術後生じた椎間板粘弾性変化の機序は、まだ完全に解明されていない。Urbanらは椎間板のcreep変化は椎間板の脱水に関連し、creep rateは椎間板内PGの含有量により左右すると述べた。Koellerらは含水量の他、椎間板内collagen繊維とPGの構造的、生化学的变化なども椎間板粘弾性の変化に関与すると推測した。本研究では、力学試験で観察された椎間板粘弾性の変化と、組織学的検討で観察された髄核と内層線維輪内PGの破壊およびそれに伴う繊維輪組織構造の破綻に強い相関を認めた。従って、髄核と内層線維輪内PGの含有量の変化は化学的髄核融解術後生じた椎間板粘弾性変化の主な原因であると考えられる。

## 結論

CABC注入椎間板およびCP注入群ともに、対照群に比べ粘弾性の変化を認めた。粘性特徴の変化は弾

性特徴の変化より著明であった。椎間板の粘弾性変化は髄核と内層線維輪内PGの破壊およびそれに伴う線維輪組織構造の破綻に強い相関を認めた。CP注入椎間板の力学特性の変化はCABC群に比較して大きかった。従って、生体力学の観点から、CABCはCPより優れることを考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 田 清 志  
副 査 教 授 阿 部 和 厚  
副 査 教 授 宮 坂 和 男

## 学 位 論 文 題 名

### Creep Behavior of the Canine Lumbar Intervertebral Discs after Chemonucleolysis with Chondroitinase-ABC and Chymopapain

— A Biomechanical, radiographic and histological study —

(コンドロイチナーゼABCおよびキモパpain注入椎間板の粘弾性特性に関する研究)

キモパpain (Chymopapain、以下CP) による化学的髄核融解術 (Chemonucleolysis) は、腰椎椎間板内の治療法として臨床応用されているが、CPによるアレルギー反応と血管、神経障害など重篤な合併症が存在する。コンドロイチナーゼABC (Chondroitinase-ABC、以下CABC) は、CPと同様にproteoglycan (以下PG) を分解する作用があり、しかも組織毒性はCPより少ないと報告され、安全かつ有効な髄核溶解酵素として期待されている。しかし、臨床応用するためには、脊柱の生体力学特性に与える影響も究明する必要がある。本研究では、椎間板粘弾性に対するCABCの影響をCPと比較検討した。

材料と方法：ビーグル成犬10頭を使用し、計60個の腰椎椎間板内にCABC (2.5単位：20椎間；5.0単位：20椎間)、CP (120pKat単位：10椎間)、生理食塩水対照 (20 $\mu$ l：10椎間) をそれぞれ注入し、注入1週間後、実験動物を屠殺し、注入椎間の力学的、組織学的、X線学的変化について検討した。(I)力学試験：軸圧縮荷重下脊柱motion segmentの圧縮剛性、Creep rateと除荷後の残余歪み (Residual strain) を検討した。(II)組織観察：Safranin-OとHE染色による光顕検索を行った。(III)画像計測：注入前と注入1週間後に腰椎側面のX線撮影を行い、椎間板腔狭小化の程度を検討した。

結果：(I)力学試験：各酵素群とも対照群に比べ最大荷重下のcreep rateは増加したが、CP群のみ対照群との有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。各酵素群の椎間板圧縮剛性は対照群より若干低下したが、有意差を認めなかった。除荷後の残余歪みは、CP群とCABC両群とも対照群より有意に増加した ( $p < 0.05$ )。(II)組織観察：CABC注入椎間板では、PGの破壊を示すsafranin-O染色性の低下が髄核の周辺部のみと線維輪内側に観察され、髄核中央部では染色性が保たれていた。一方、CP注入椎間板では、染色性の完全な消失を髄核の全体と線維輪内側に認め、CP群においてPGの破壊程度は大きかった。HE染色による観察では、

CABC注入椎間板で繊維輪の弛緩、CP注入椎間板で繊維輪の弛緩と内側繊維輪の髄核方向への膨隆を認め、椎間板内圧の低下が示唆された。(Ⅲ)画像計測：注入1週後、各酵素群とも、注入前より椎間板高の有意な狭小化を認めた ( $p < 0.05$ )。CP群での変化はより著明であった。本研究での統計解析は、One way ANOVAとFisher's PLSD検定を使用した。

考察：本研究より、酵素注入後の椎間板は、高速荷重に対する脊柱の支持性を示す圧縮剛性が維持されるが、粘性の低下により衝撃緩衝機能の低下も示した。さらに、椎間板狭小化と椎間不安定性の増加に伴う椎間関節突起荷重の増加、椎間板内応力の分布変化も予想され、これらの力学的変化は椎間板細胞の代謝と椎間板変性に関連することは従来から報告されている。CABCが椎間板の力学特性に与える影響はCPより少ないため、椎間板の再生に有利と考えられる。

Chemonucleolysisの臨床作用機序は、椎間板内圧を規定している髄核中のPGが分解され、髄核の抱水能力が減少し内圧が低下するためと考えられている。椎間板腔の狭小化は神経根除圧をもたらすと同時に、椎間不安定性増加の原因にもなる。さらに、PG抱水能力の低下により組織内の水分が容易に滲出し、組織の圧縮速度が上昇する。水分再吸収能力の低下により椎間板高の回復能力が低下する。従って、本研究で観察された力学変化の主な原因はPGの破壊であると考えられる。また、CABCの椎間板に与える力学的影響がCPより少なかったという結果は、CABCがPGに与える破壊がCPより小さかったことの力学的側面への反映と考える。

結論：酵素注入後の椎間板は、対照群に比べ、持続荷重下の粘性が有意に低下し、高速荷重時の圧縮剛性は有意な変化を認めなかった。CP群での変化はCABCより著明であった。CABCが確実な椎間板腔狭小化作用が認められ、椎間板に与える力学的影響はCPより少なく、椎間板組織の再生に有利と考え、今後とも研究を進める価値がある。

公開発表において、副査の宮坂教授より「*ノドニチーゼ* ABC注入後椎間板高変化の量依存性(dose dependent)の有無、臨床的な最適量の確立、神経根除圧に関与するfactor、*ノドニチーゼ* ABCとキバインの効果発見に時間的な差の有無について、阿部教授より髄核と繊維輪の力学的役割の相違、Safranin-O染色法の機序、Rethenium Red染色法のテクニクについて質問があった。さらに、阿部教授から電子顕微鏡の組織採取方法についてのコメントがあった。また、整形外科の鑑先生より組織破壊と椎間不安定性の関係についての質問があった。申請者は概ね妥当な回答を行った。

以上、本研究は、髄核融解酵素である*ノドニチーゼ* ABCが腰椎椎間板に与える影響を力学的、組織学的、X線学的変化を総合的に評価し、その特性を明確に示した。また、*ノドニチーゼ* ABCの力学作用における最初の報告として、将来の臨床応用に大きく寄与するものと思われる。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、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)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。