HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	造影剤，局所麻酔薬が椎間板変性に与える影響についての研究
Author(s)	岩崎，浩司
Description	配架番号：2133
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11651号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11651
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58865
Type	doctoral thesis
File Information	Koji_Iwasaki.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

造影剤，局所麻酔薬が椎間板変性に与える影響についての研究
(Effects of Radiocontrast Agent and Local Anesthetic Agents on Intervertebral Disc Degeneration)

2015 年 3 月

北 海 道 大 学

岩崎　浩司
Koji Iwasaki

学　位　論　文

造影剤，局所麻酔薬が椎間板変性に与える影響についての研究
(Effects of Radiocontrast Agent and Local Anesthetic Agents on Intervertebral Disc Degeneration)

2015 年 3 月

北 海 道 大 学

岩崎　浩司
Koji Iwasaki

目　　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2 頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3 頁

実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・4 頁

実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・10 頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20 頁

総括および結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・23 頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・24 頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・25 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

1. Koji Iwasaki, Hideki Sudo, Katsuhisa Yamada, Manabu Ito, Norimasa Iwasaki

   Cytotoxic effects of the radiocontrast agent iotrolan and anesthetic agents bupivacaine and lidocaine in three-dimensional cultures of human intervertebral disc nucleus pulposus cells: identification of the apoptotic pathways

   PLOS ONE 9 (3): e92442 (2014)

2. Koji Iwasaki, Hideki Sudo, Katsuhisa Yamada, Hideaki Higashi, Takashi Ohnishi, Takeru Tsujimoto, Norimasa Iwasaki

   Effects of single injection of local anesthetic agents on intervertebral disc degeneration: *ex vivo* and long-term *in vivo* experimental study

   PLOSE ONE 9 (10): e109851 (2014)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 岩崎　浩司，須藤　英毅，山田　勝久，伊東　学，岩崎　倫政

   椎間板造影・ブロックがヒト正常髄核細胞に与える影響

   第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会
   平成 26 年 10 月 9 日
   鹿児島市

2. Koji Iwasaki, Hideki Sudo, Katsuhisa Yamada, Norimasa Iwasaki

   Is Discography or Discoblock Safe for Human Intervertebral Disc Cells?

   2014 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, New Orleans, LO, March 15-18, 2014.

緒 言

高齢者人口の増大に伴い，健康寿命の延伸を目標に筋骨格系を重視する政策が決定され，運動器の役割に注目が集まっている．体幹を支える脊椎は運動器の主要な構成要素であり，脊椎の中でも椎間板の障害は，腰痛や椎間板ヘルニア，脊柱変形の大きな原因となる．腰痛は本邦における有訴者数第一位に挙げられており，有病率は25-30％と推定されている．また椎間板ヘルニアは，椎間板の変性変化により線維輪構造が破綻し内部の髄核組織が脱出することにより近傍の神経を圧迫し疼痛や運動麻痺などの神経症状を呈する疾患である．こうした疾患の原因となる椎間板障害は，患者の生活の質（quality of life）を著しく下げ，健康的な生活を送る上での大きな障害となるため現代医学において克服すべき重要な課題であるといえる．

椎間板障害の診断には，X 線やコンピューター断層撮影 (computed tomography : CT)，核磁気共鳴画 (magnetic resonance imaging : MRI)に基づいて行われることが多いが，診断に苦慮する場合には椎間板造影・椎間板ブロックが考慮される．椎間板造影は，椎間板内に造影剤を注入し疼痛出現の有無を確認するほか，CT 画像所見と組み合わせることにより腰痛の原因となる椎間板高位の同定や椎間板ヘルニアと周囲神経根との関係を明らかにする目的で行われる検査法である．一方，椎間板ブロックは局所麻酔薬注入後の除痛効果の有無に基づき椎間板高位を同定する検査法であり，診断特異度は椎間板造影よりも高いと報告されている[1]．

椎間板ブロックに用いられる bupivacaine，lidocaine といった局所麻酔薬は，1950 年代以降に開発され現在も幅広く臨床の場で使用されている薬剤であるが，既に 1970 年代より神経毒性，心血管系への毒性が指摘されている[2]．運動器領域においても 2000 年代より関節軟骨への細胞障害性を示す研究が相次いで報告[3-8]された．近年はさらに椎間板を対象とした研究が開始され，造影剤や局所麻酔薬が実験動物椎間板細胞への細胞障害性やアポトーシスを惹起するとした基礎研究[9-12]や椎間板造影により椎間板変性が長期的に進行したとの臨床報告[13]も散見されるようになった．

このように椎間板造影･椎間板ブロックの安全性に関する注目が高まっている[14]が，現在まで，ヒト正常髄核細胞を用いた研究や *in vivo* 動物実験レベルで検討した研究はなく，造影剤や局所麻酔薬が椎間板変性に与える影響については不明な点が多い．

以上の背景から，椎間板造影・椎間板ブロックに用いられる造影剤および局所麻酔薬が椎間板髄核細胞の細胞死と椎間板の組織変性に及ぼす影響とその病態について，ヒト非変性髄核細胞を用いた *in vitro* 試験および家兎椎間板組織を用いた *ex vivo*, *in vivo* 試験を通して検証したのでここに報告する．

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

FITC	fluorescein isothiocyanate
HBSS	Hank’s balanced salt solution
PBS	phosphate buffered saline
PI	propidium iodide
PVDF	polyvinylidene difluoride
TBS-T	tris buffered saline with tween 20

実 験 方 法

1. *In vitro* 実験

ヒト髄核細胞三次元培養モデル

本研究は，北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会の承認のもと実施した．北海道大学病院において脊椎前方矯正固定術を行った思春期特発性側弯症患者（平均年齢 14.8±5.2 歳）および家族の同意の元，術中採取した非変性椎間板組織より髄核組織を取り出した． 術前に全ての椎間板は MRI を撮像し，椎間板の変性がない (Pfirrmann grade Ⅰ)[15] ことを確認した．

ヒト髄核組織を 0.25% Collagenase (Wako, Osaka, Japan) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で 37℃，4 時間処理し，髄核細胞を単離した．得られた髄核細胞を 1% penicillin/streptomycin，1.25μg/ml fungizone (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，10% fetal bovine serum (FBS; Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) を含む DMEM を培養液としてインキュベーター内で 37℃，5% CO_2 の条件下で培養した [16,17].

2 継代した細胞を分離し，4×10^6 (cells/ml)の濃度で 1.2％低粘度アルギン酸溶液 (Sigma-Aldrich)に懸濁した．アルギン酸溶液中の細胞を 22-gauge (G)の注射針を付けたシリンジから，102ｍM の塩化カルシウム溶液中に滴下して，直径約 2mm のアルギン酸ゲルビーズ内に包埋した (**Figure 1**)．塩化カルシウム溶液中に滴下してから 10 分後に出来上がったビーズ（約 40,000 細胞/ビーズ）を回収し，0.9%生理食塩水で 1 回，培養液で 2 回洗浄を行った [18]．ビーズは培養液中で 37℃，5% CO_2 の環境条件下で 7 日間培養した．

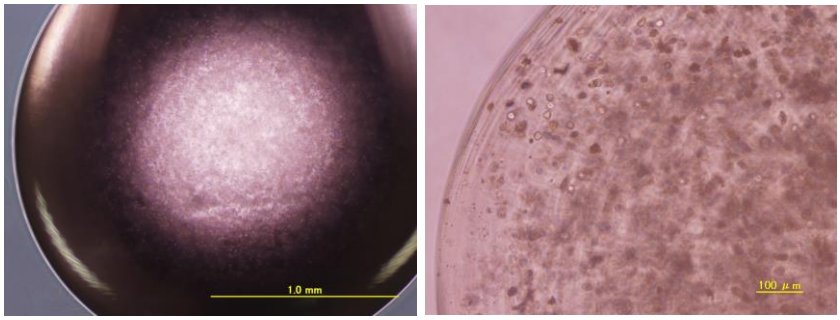

Fig. 1 髄核細胞を包埋したアルギン酸ビーズ

実験手順

7 日間培養した髄核細胞を包埋したアルギン酸ゲルビーズを，24 ウェルプレートに 5 個/ウェル入れたのち各ウェルに薬剤 0.5ml を添加した．使用した薬剤は，椎間板造影・ブロック用に臨床上使用されている造影剤として iotrolan (イソビスト®240; ヨード濃度 240mg/mL; Bayer Health Care AG, Leverkusen, Germany)，および局所麻酔薬とし

て 0.25%と 0.5% bupivacaine，あるいは 1%と 2% lidocaine (いずれも AstraZeneca, Luton, UK)を使用した. コントロールとして 0.9% saline (生理食塩水; Otsuka Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)と，薬剤に曝露しない群 (Untreated 群)を設定した．曝露時間は変性ヒト髄核細胞に対する局所麻酔薬の影響を検討した過去の報告 [10] を基に，30 分，60 分，120 分後とした.

薬剤への曝露終了後はビーズを HBSS(Wako)で 2 回洗浄を行い，インキュベーター内で 24 時間培養を行った.

蛍光染色を用いた細胞生存率評価

アルギン酸ゲルビーズに包埋された状態における髄核細胞の生存率を評価するために，calcein-AM と PI (Dojindo, Kumamoto, Japan)を使用した．calcein-AM は生細胞を緑色に，PI は死細胞を赤色に標識する蛍光染色物質である.

薬剤への曝露終了 24 時間後に，アルギン酸ゲルビーズ内に包埋された髄核細胞を 5μM の calcein-AM と 1.5μM の PI で 30 分間染色した．染色されたビーズは，HBSS で洗浄後にメスで半割してプレパラート上に静置し, 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus Fluoview FV300, Tokyo, Japan)を用いて撮像した．各々15 個以上の細胞を含む 4 視野の画像を取得し，画像を Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)で処理し生細胞と死細胞を計測した [8] (n=3).

フローサイトメトリーによる細胞生存率，アポトーシスの評価

薬剤への曝露終了 24 時間後に, アルギン酸ゲルビーズを 55μM のクエン酸ナトリウム (Wako)と 0.15M の塩化ナトリウム (Wako)混合溶液に 4℃，20 分間浸した後，遠心分離 (4℃，900rpm，10 分間)して細胞を回収した [18]．細胞は Annexin V-FITC Apoptosis detection kit Ⅱ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を使用して FITC と PI で標識し，フローサイトメーター (FACS Cant; BD biosciences)を用いて細胞分布を評価した．FITC 陽性/PI 陰性を早期アポトーシス, FITC 陽性/PI 陽性を晩期アポトーシス, FITC 陰性/PI 陰性細胞を生細胞とし，早期と晩期アポトーシスを併せたものをアポトーシス細胞として算定した [16,19] (**Figure 2**)．得られたフローサイトメトリーのデータは Flow Jo (Flow Jo, LLC, Ashland, OR, USA)を用いて解析した (n=5).

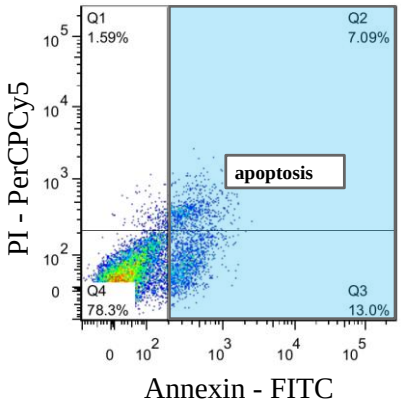

Fig. 2　フローサイトメトリーにより得られた散布図

Western blotting によるアポトーシス伝達経路の評価

回収した細胞を PBS で 2 回洗浄し，T-PER (tissue protein extraction reagent; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 100µl を加えタンパクを抽出し，Western blotting を行った．20µg のタンパクを還元処理し，SDS-PAGE (4-12% polyacrylamide gel) により分画し，PVDF メンブレンへ転写した．5% 脱脂粉乳/TBS-T（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA）にてブロッキング後，1 次抗体反応を 4°C 条件下で一晩行った．1 次抗体には抗 caspase-3 抗体 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)，抗 cleaved caspase-3 抗体 (Cell Signaling)，抗 caspase-8 抗体 (Abcam, Cambridge, MA, USA)，抗 caspase-9 抗体 (Abcam) を 1:1000 に希釈し使用した．1 次抗体反応終了後，それぞれ HRP 標識抗ウサギ・マウス IgG 抗体 (1:10000; Cell Signaling)を加え，2 次抗体反応を室温で 1 時間行った．反応終了後，メンブレンを TBS-T で洗浄し，化学発光基質 Super Signal West Dura Extended Substrate (Thermo scientific) により標識後 ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories)を用いて目的タンパク質の検出を行った．各タンパク発現量は全て β-actin の発現量により標準化した．

2. *Ex vivo* 試験

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した．5 ヶ月齢雄日本白色家兎 (3.2-3.5kg)を使用した．

家兎椎間板器官培養モデル

10,000 単位のヘパリン (Wako)を静脈投与してから 5 分後に，ペントバルビタールを静脈投与して安楽死させた．直後に清潔操作の元，第 11/12 胸椎椎間板～第 5/6 腰椎椎間板を含めて脊椎を一塊にして摘出し，椎体周囲の軟部組織を除去した [20-22]．使用した薬剤は 1% lidocaine，0.5% bupivacaine (Astrazeneka)，あるいは 0.9%生理食塩水 (Otsuka)であり，　26G 注射針とマイクロシリンジ (Hamilton, Reno, NV, USA)を用いて

椎間板腹側より椎間板内へ 15μL 投与した．椎間板は 6-ウェルプレートで，3 あるいは 7 日間培養を行った(**Figure 3**).

Fig. 3　A, B) 器官培養を行った椎間板．**C)** 軸位での切断面

椎間板は以下の各 5 群に分けて評価した.

(a)　untreated control 群; 注射針も刺さない椎間板
(b)　puncture 群 ; 注射針は刺すが，薬剤は注入しない椎間板
(c)　saline (生理食塩水)群 ; 生食を注入した椎間板
(d)　lidocaine 群 ; lidocaine を注入した群
(e)　bupivacaine 群 ; bupivacaine を注入した群

蛍光染色を用いた死細胞率評価

器官培養後，3 日，7 日目に蛍光染色を用いて細胞生存率を評価した．メスを用いて椎間板を軸位で切断して，髄核組織を摘出し蛍光染色を行った後に，プレパラート上に静置して，生死にかかわらず細胞の核を標識する Hoechst33342 (緑色; Wako) (**Figure 4A**)と，死細胞を標識する PI (赤色; Wako) (**Figure 4B**)で染色を行い，共焦点レーザー顕微鏡システム (Nikon A1 and Ti-E，対物レンズ Plan Fluor 20× objective lens (N.A., 0.45); Nikon Tokyo, Japan)を用いて死細胞率を算定した [23]．画像はランダムに 3 視野抽出し，各視野毎に 5μm 間隔で計 20 回連続撮影し ImageJ で画像の処理と細胞数の計測を行った [20,21]．　(n=6).

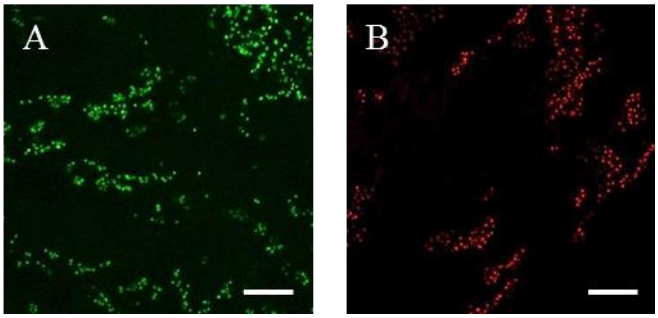

Fig. 4　髄核組織内の髄核細胞の共焦点レーザー顕微鏡像．**A)** Hoechst33342 染色，**B)** PI 染色．
スケールバー:100μm

組織切片の作成・椎間板の組織学的評価

器官培養後 7 日目に, 10%ホルムアルデヒドで椎間板を固定した. その後 10% EDTA (pH 7.5)により脱灰処理し, パラフィンに包埋した. 5μm 厚の矢状断切片を作成した後キシレンにより脱パラフィンし, アルコール処理, 水洗いした後, Hematoxylin & Eosin (HE)染色を行い, 無作為に選択した 5 視野において単位面積あたりの髄核細胞数を計測した. TUNEL 染色は, In situ Apoptosis Detection Kit (TaKaRa BIO Inc. Shiga, Japan)を用いて施行し, DAB (Dako, Glostrup, Denmark)で発色し, hematoxylin で後染色した. 無作為に選択した 5 視野において, TUNEL 性細胞数を計測した [16,17]. (n=6).

3. *In vivo* 試験

Ex vivo 実験と同様に, 本動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した. 5 ヶ月齢雄日本白色家兎 (3.2-3.5kg)を使用した.

家兎椎間板ブロックモデルの作製

ペントバルビタール (30mg/kg)よる静脈麻酔下に, 家兎椎間板に経皮的に穿刺を行った. 投与した薬剤は 1% lidocaine, 0.5% bupivacaine, あるいは 0.9%生理食塩水であり, 各溶液を 26G 注射針とマイクロシリンジを用いて 15μL ずつ, 第 2/3 腰椎椎間板と第 4/5 腰椎椎間板に投与した. 注射針の先端が椎間板中央に位置することを X 線透視装置を用いて確認した (**Figure 5**). 第 3/4 腰椎椎間板はコントロールとして, 穿刺しなかった. Sham 群として, 穿刺はするが溶液を注入しない群をおいた [16]. 穿刺, 椎間板内薬液投与後 6 ヶ月, 12 ヶ月後に評価を行った.

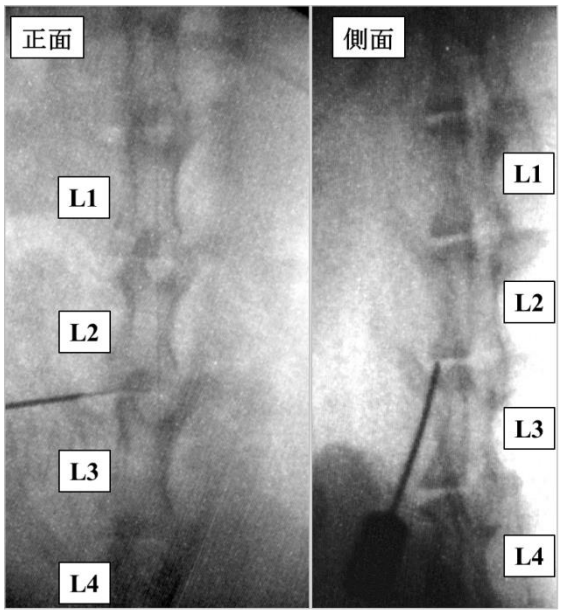

Fig. 5　経皮的家兎椎間板穿刺時における X 線透視画像.

MRI 評価

椎間板変性を評価するため, 7.0-Tesla MR scanner（Unity Inova, Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA）を用い評価した．穿刺・薬液投与後 6 ヶ月, 12 ヶ月後にペントバルビタールを静脈注射して安楽死させた後腰椎を一塊に摘出した．MRI は 63mm 径表面コイルを使用して，腰椎の T2 強調矢状断画像 (1mm-thick, 10×10 cm field of view, 512×256 matrix size, repetition time 2500 msec, time to echo 80 msec)を撮像した．椎間板変性の重症度を評価するため，Pfirrmann 分類を用いてスコア化した [15]．本分類は MRI における椎間板変性を 5 段階 (1: normal～5: highly degenerative) に評価している．

また，Analyze 10.0 software (AnalyzeDirect, Overland Park, KS, USA)を用いて，矢状断における MRI intensity (髄核の平均信号強度)を測定し定量的に評価した．穿刺．注入した椎間板における MRI intensity を，コントロールである第 3/4 腰椎椎間板の MRI intensity に対する割合で評価した [16,17].

組織切片の作製・椎間板変性の組織学的評価

MRI 撮像後，椎間板は上述の *Ex vivo* 試験と同様に矢状断 5μm 厚の切片を作成し，Hematoxylin & Eosin (HE) 染色，サフラニン-O 染色を施した．椎間板変性の重症度は Masuda の分類を用いてスコア化した [24]．本分類は 4 種類のカテゴリ (線維輪の配列, 線維輪と髄核の境界，髄核細胞数，髄核細胞外マトリックス) からなり，4 点 (normal) ～12 点 (highly degenerative) のスコアとなる．また HE 染色において，無作為に選択した 5 視野において単位面積あたりの髄核細胞数を計測した．TUNEL 染色は，In situ Apoptosis Detection Kit (TaKaRa BIO Inc.) を用いて施行し，DAB (Dako) で発色し，hematoxylin で後染色した．無作為に選択した 5 視野において，TUNEL 陽性細胞数を計測した [16,17].

統計分析

得られたデータは Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA)を用いて解析した．2 群間の比較には Student's *t* test，多群間の比較には ANOVA を用いて有意差検定を行い，判定は P 値 < 0.05 で有意差ありとした.

実 験 結 果

1. *In vitro* 実験

造影剤と局所麻酔薬がヒト髄核細胞に与える時間的，濃度依存的影響

ヒト非変性髄核細胞－アルギン酸ゲル複合体へ生理食塩水，造影剤である iotrolan，または局所麻酔薬である 1%-2% lidocaine と 0.25%-0.5% bupivacaine を添加し，髄核細胞へ与える影響を評価した.

30 分，60 分，120 分間薬剤に曝露した細胞を，calcein-AM (生細胞；緑色)と PI (死細胞；赤色)で標識し共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した (**Figure 6A**). Untreated 群の生存率は 90%-95%であった．Untreated 群と比較して生理食塩水と iotrolan の曝露により生存率は変化がなかった．一方，lidocaine, bupivacaine への曝露により時間依存的に生存率は低下した．特に 1% lidocaine と 0.25% bupivacaine に 120 分間曝露した群の生存率はそれぞれ 60%と 63%であり，曝露時間が 30 または 60 分間の群と比べて有意に低下した ($p < 0.05$) (**Figure 6B)**. 更に，両局所麻酔薬とも，濃度依存的に生存率は低下した．曝露時間が 60 分間の場合，1% lidocaine の細胞生存率は 88%であったが，2% lidocaine は 40%と有意に低下していた ($p < 0.05$). 同様に 0.25% bupivacaine の生存率は 78%であったが，0.5% bupivacaine は 39%と有意に低下していた ($p < 0.05$) (**Figure 6C**).

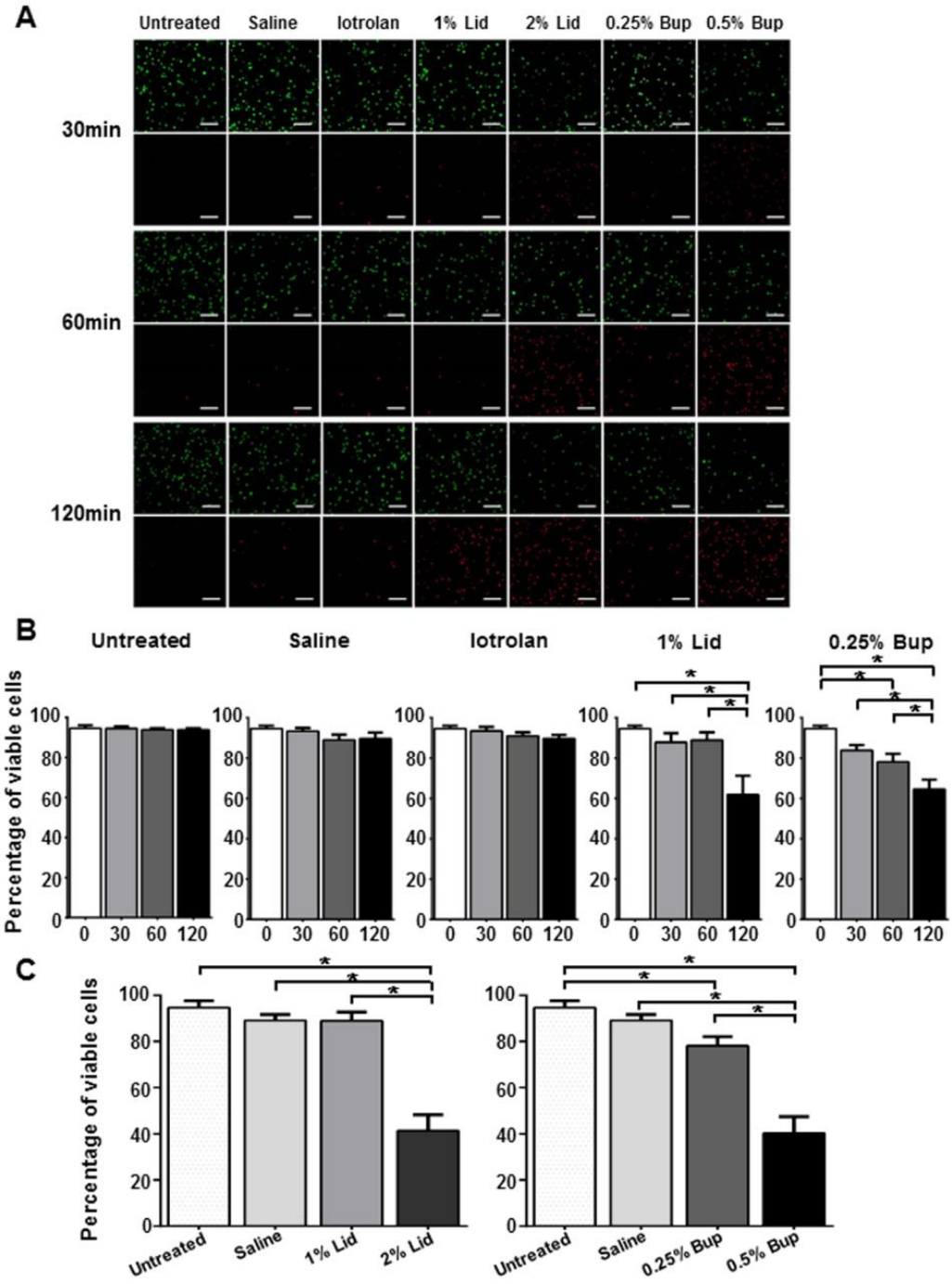

Fig. 6　造影剤と局所麻酔薬がヒト非変性髄核細胞に与える影響

ヒト髄核細胞 - アルギン酸ゲル複合体に生理食塩水，造影剤 (iotrolan)，あるいは局所麻酔薬 (lidocaine, bupivacaine)を各 30 分，60 分，120 分間曝露した．**A)** 24 時間後 calcein-AM (生細胞 ; 緑色)と PI (死細胞 ; 赤色)にて標識し共焦点レーザー顕微鏡にて撮像した．スケールバー : 100μm．**B)** 曝露時間の細胞生存率への影響．**C)** 薬剤濃度の細胞生存率への影響 (60 分間暴露後)．　(n = 5, 平均±SE, **p* < 0.05)．Lid, lidocaine; Bup, bupivacaine.

造影剤と局所麻酔薬がヒト髄核細胞に与えるアポトーシス誘導効果

造影剤と局所麻酔薬がヒト髄核細胞に与えるアポトーシス誘導効果について検討を行った．アルギン酸ゲルを溶解させ細胞を回収した後，Annexin V-FITC と PI で標識しフローサイトメトリーを用いて評価を行った (**Figure 7A**)．Untreated 群における細胞生存率は 78%-82%であった．生理食塩水と iotrolan 群では, 120 分間の曝露によっても細胞生存率に有意な変化はなかった．しかし，両局所麻酔薬への曝露により，細胞生存率は時間依存的に低下した．120 分間の曝露により 2% lidocaine と 0.5% bupivacaine 群の生存率は，各 13%，10%と有意に低かった ($p < 0.05$)．また，濃度依存的に細胞生存率は低下した (曝露時間：60 分) (**Figure 7B**)．Lidocaine の濃度が 1%から 2%に上がるとアポトーシス陽性細胞の割合は 23%から 42%へと約 2 倍に上昇した ($p < 0.05$)．同様に bupivacaine でも 0.25%から 0.5%に濃度が上がると，アポトーシス陽性細胞は 25%から 48%へと約 2 倍に上昇した ($p < 0.05$) (**Figure 7C**).

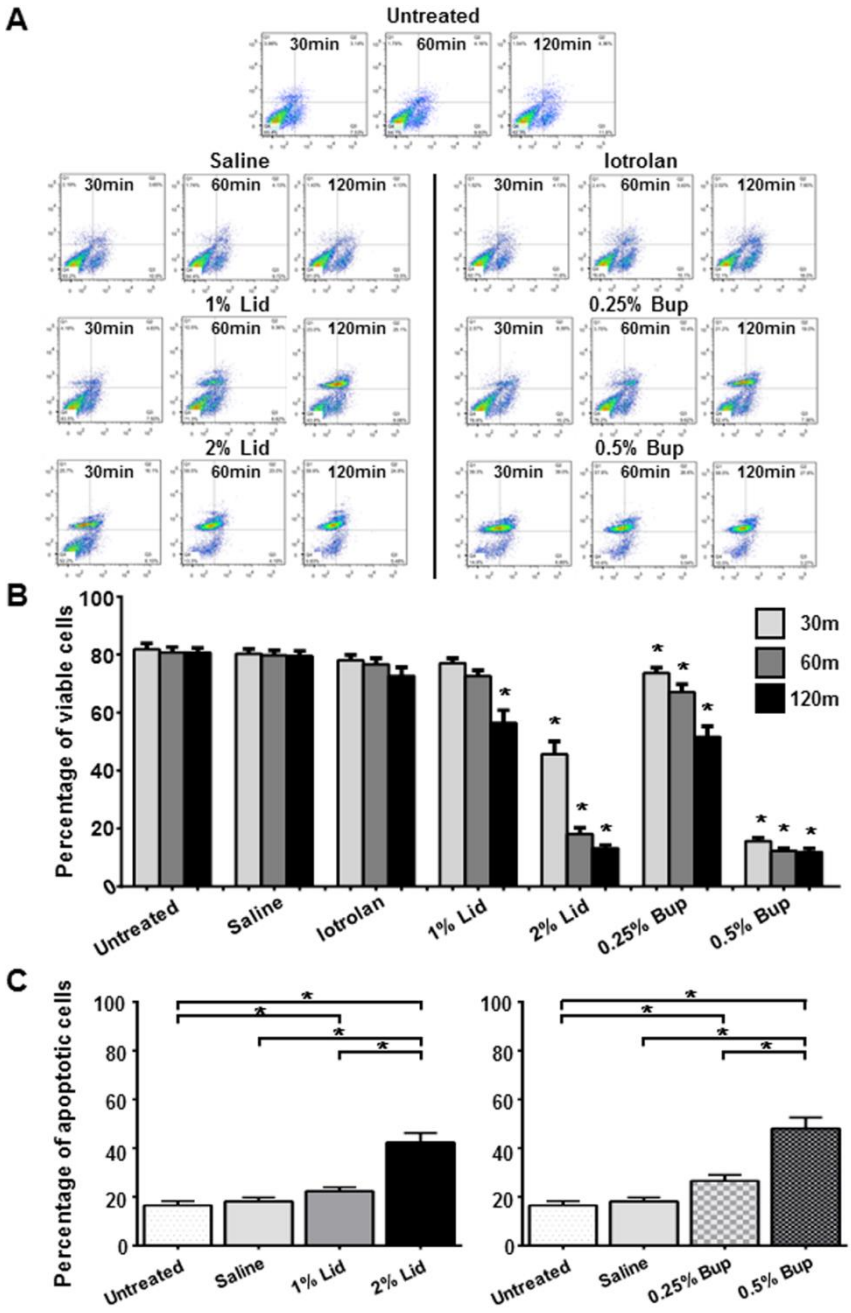

Fig. 7　フローサイトメトリーによるヒト髄核細胞の評価

ヒト髄核細胞 - アルギン酸ゲル複合体に生理食塩水，造影剤 (iotrolan)，あるいは局所麻酔薬 (lidocaine, bupivacaine)を各 30 分，60 分，120 分間曝露した．**A)** フローサイトメトリーにおける細胞分布図．**B)** 曝露時間と薬剤濃度が細胞生存率に与える影響 (*, $p < 0.05$ vs. untreated control and saline at the same exposure time)．**C)** 薬剤濃度のアポトーシスへの影響 (60 分間暴露後)．(n = 5) 平均±SE , *$p < 0.05$)．Lid, lidocaine; Bup, bupivacaine.

局所麻酔薬によって誘導されるアポトーシス伝達経路

次に，局所麻酔薬によって誘導されるアポトーシス伝達経路を解析するために，Western blotting を用いて caspase-3，caspase-8，caspase-9 の発現を調べた．暴露後 1 時間において，両局所麻酔薬は濃度依存的に cleaved caspase-3 の発現を上昇させた(**Figure 8A, B**)．また lidocaine は cleaved caspase-8 の発現を上昇させたが，bupivacaine は cleaved caspase-8 と cleaved caspase-9 どちらの発現も上昇させた(**Figure 8A, B**)．

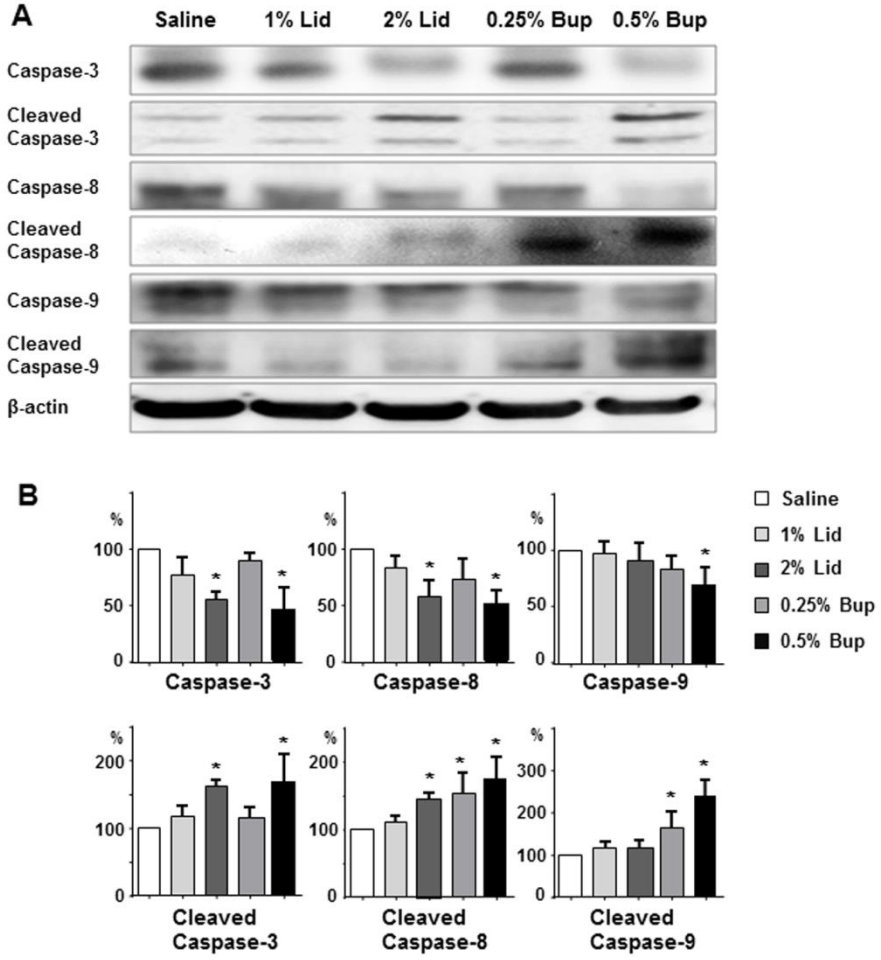

Fig. 8　局所麻酔薬によって誘導されるアポトーシス伝達経路

ヒト髄核細胞 - アルギン酸ゲル複合体に生理食塩水，あるいは局所麻酔薬 (lidocaine, bupivacaine)を 60 分間曝露した．曝露 24 時間後に，caspase-3，caspase-8，caspase-9 の発現を Western blotting を用いて調べた．internal control として β-actin を使用した．**A)** 代表的な Western blotting の結果，**B)** densitometry による定量化．(n = 5．平均 ± SD., **p* < 0.05 vs. saline)．Lid, lidocaine; Bup, bupivacaine.

2. *Ex vivo* 試験

家兎椎間板器官培養モデルにおける局所麻酔薬投与が髄核細胞に与える影響

家兎椎間板器官培養モデルにおいて，椎間板ブロックに使用される局所麻酔薬の椎

間板内投与が髄核細胞に及ぼす影響について検討した.

生理食塩水，1% lidocaine，あるいは 0.5% bupivacaine を椎間板髄核組織に投与した．投与後 3 日と 7 日後に，Hoechst33342 (生細胞と死細胞 ; 緑色)と PI (死細胞 ; 赤色)で染色し, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて髄核細胞の死細胞率を算定した (**Figure 9A**). 7 日後の時点で untreated control 群の死細胞率は 34%であったが，lidocaine 群と bupivacaine 群の死細胞率は 72%と 76%であった．3 日と 7 日後のいずれの時点においても生理食塩水群と両局所麻酔群の死細胞率は untreated control 群と puncture 群と比較して有意に高かった．また両局所麻酔群の死細胞率は経時的に上昇し，7 日後の時点で生理食塩水群と比べて有意に高かった ($p < 0.05$) (**Figure 9B**).

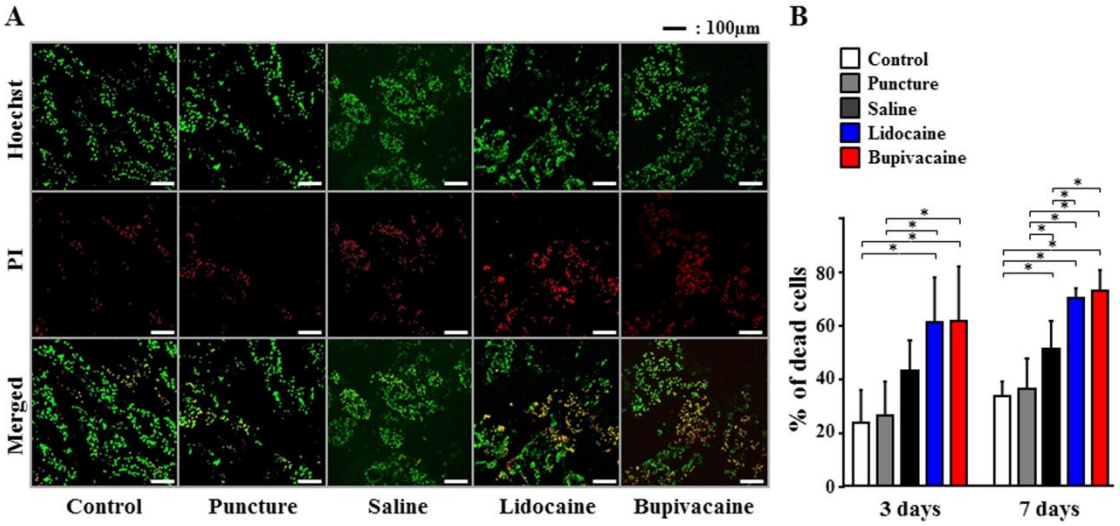

Fig. 9　椎間板器官培養モデルにおける局所麻酔薬投与が髄核細胞に及ぼす影響

髄核組織を Hoechst33342 (生細胞と死細胞 ; 緑色)と PI (死細胞 ; 赤色)により染色し，死細胞の割合を共焦点レーザー顕微鏡を用いて算定した．**A)**　7 日後の代表的な共焦点レーザー顕微鏡像．**B)** 死細胞の割合．（n = 6. 平均 ± SD ,* $p < 0.05$）

家兎椎間板器官培養モデルにおける局所麻酔薬投与が椎間板に及ぼす影響についての組織学的検討

HE 染色による組織学的評価を投与後 7 日目に行った．生理食塩水群と局所麻酔薬群において髄核細胞の空胞形成と正常なゼラチン様細胞外マトリックスの減少を認めた (**Figure 10A)**.

生理食塩水群と両局所麻酔薬群の TUNEL 染色陽性細胞の割合は，untreated control 群と puncture 群と比較して有意に増加していた ($p < 0.05$). 更に，bupivacaine 群の TUNEL 染色陽性細胞の割合は，生理食塩水群と比べて有意に増加していた (**Figure 10B**) ($p < 0.05$).

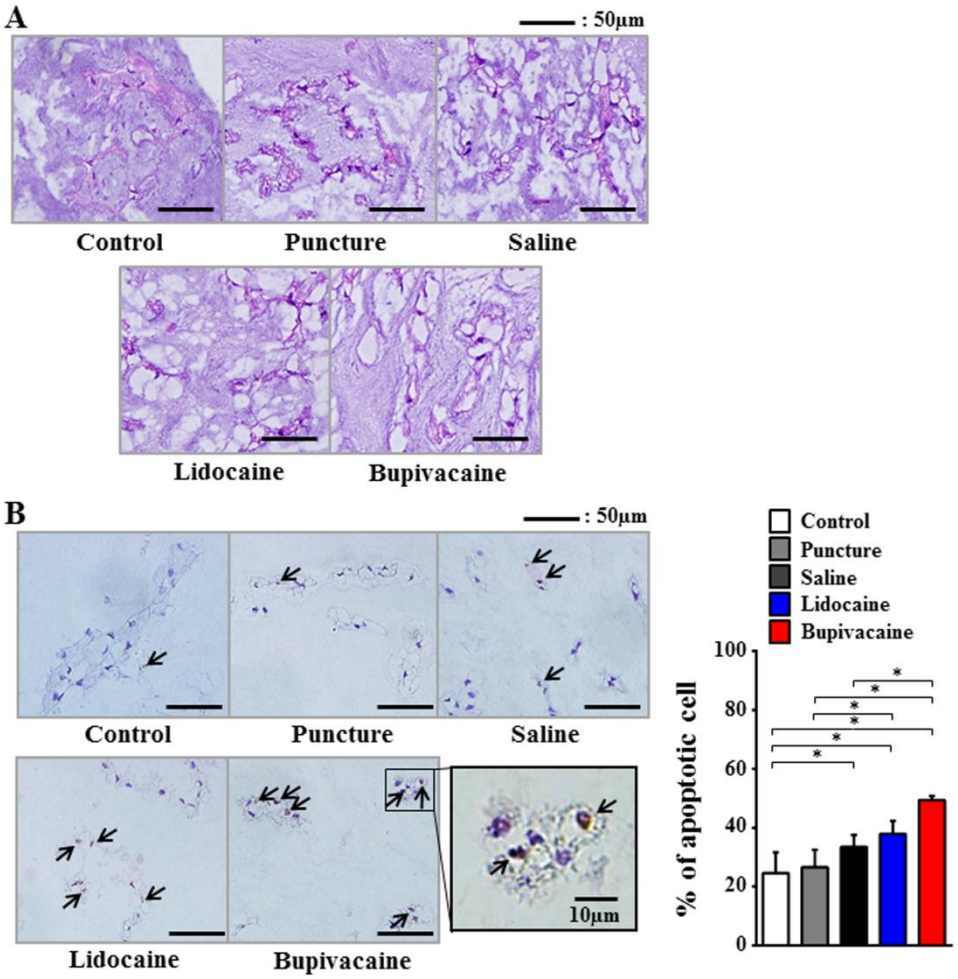

Fig. 10　家兎椎間板器官培養モデルにおける局所麻酔薬投与が椎間板に及ぼす影響についての組織学的検討

A) 髄核組織の HE 染色像，**B)** TUNEL 染色陽性細胞（矢印）とアポトーシス陽性細胞の割合．(n = 6. 平均 ± SD, * $p < 0.05$)

椎間板高位による髄核細胞密度の変化

椎間板高位と局所麻酔薬投与後の髄核細胞密度の相関関係について検討を行うために，各椎間板高位における髄核細胞密度を比較したところ，椎間高位と髄核細胞の密度に有意な相関はなかった **(Figure 11)**.

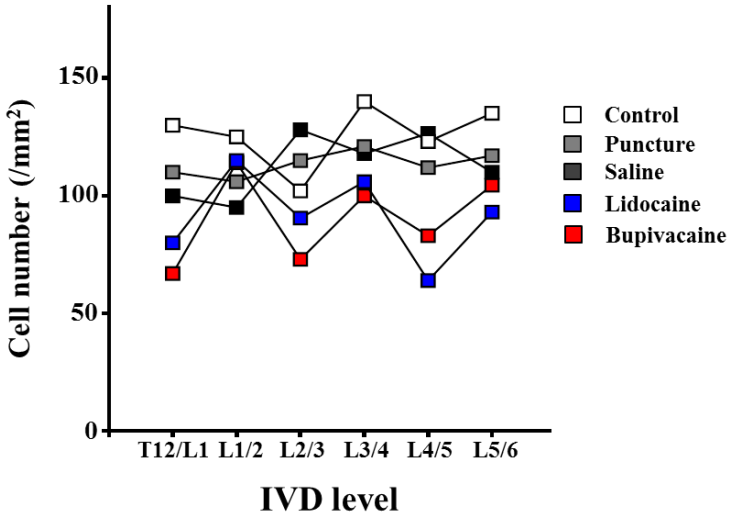

Fig. 11　椎間板レベル毎の髄核細胞の細胞密度

器官培養モデルにおける椎間板レベル毎の HE 染色における髄核細胞密度（細胞数/mm^2）.

3. *In vivo* 試験

X 線透視装置を用いて局所麻酔薬を家兎椎間板内へ投与し，6 ヶ月と 12 ヶ月後に椎間板の変性を評価した.

MRI を用いた生体家兎における局所麻酔薬投与による椎間板変性の評価

MRI を用いて矢状断，T2 強調像における椎間板の変性変化を評価した．Pfirrmann 分類のスコアは生理食塩水群と局所麻酔薬群で経時的に上昇する傾向はあったが，puncture 群，生理食塩水群，局所麻酔薬群の間に有意差はなかった (**Figure 12A)**．さらに MRI index を用いて椎間板変性を定量的に評価したが，puncture 群，生理食塩水群，局所麻酔薬群の間に有意差はなかった (**Figure 12B**).

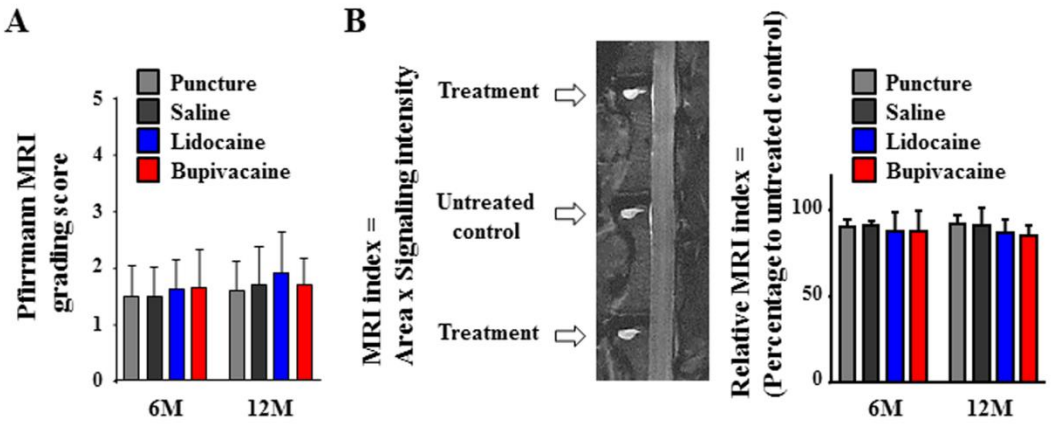

Figure 12　MRI を用いた家兎椎間板内への局所麻酔薬投与後の椎間板変性の評価

家兎椎間板内に局所麻酔薬を投与し6ヶ月と12ヶ月の時点での椎間板変性をMRIを用いて評価した．**A)** Pfirrmann grading score による椎間板変性の評価 (n = 8. 平均 ± SD. *, $p < 0.05$). **B)** 矢状断像の MRI index（髄核高信号領域の面積 x 平均信号強度）を計測し評価した．Untreated control 群に対する各群の MRI index の比較．(n = 8. 平均 ± SD, *$p < 0.05$)

家兎椎間板内への局所麻酔薬投与による椎間板変性の組織学的評価

椎間板内への穿刺・薬液投与が椎間板変性に及ぼす影響を椎間板正中矢状断面において組織学的に行った．投与後 6 ヶ月時において，生理食塩水群と局所麻酔薬群のいずれの組織標本も髄核基質の減少と髄核 - 線維輪境界の破綻を示していた．また，puncture 群では 6 ヶ月と 12 ヶ月時点を比較して椎間板変性の経時的な進行はなかったが，生理食塩水群と局所麻酔薬群では椎間板変性が経時的に進行していた (**Figure 13A**)．局所麻酔薬群の組織学的スコアは untreated control 群と puncture 群に比べて有意に上昇していたが ($p < 0.05$)，生理食塩水群との間に有意差はなかった (**Figure 13A**)．

投与後 6 ヶ月の椎間板組織の HE 染色では，untreated control 群と比べて，puncture 群，生理食塩水群，局所麻酔薬群において髄核細胞数が減少しており，lidocaine 群と bupivacaine 群ともに有意に減少していた(**Figure 13B**) ($p < 0.05$)．さらに投与後 12 ヶ月では，untreated control 群に加え puncture 群と比較しても，lidocaine 群と bupivacaine 群で有意に減少していた (**Figure 13B**)．中でも bupivacaine 群が最も減少していたが，生理食塩水群と比べて有意差はなかった(**Figure 13B**)．

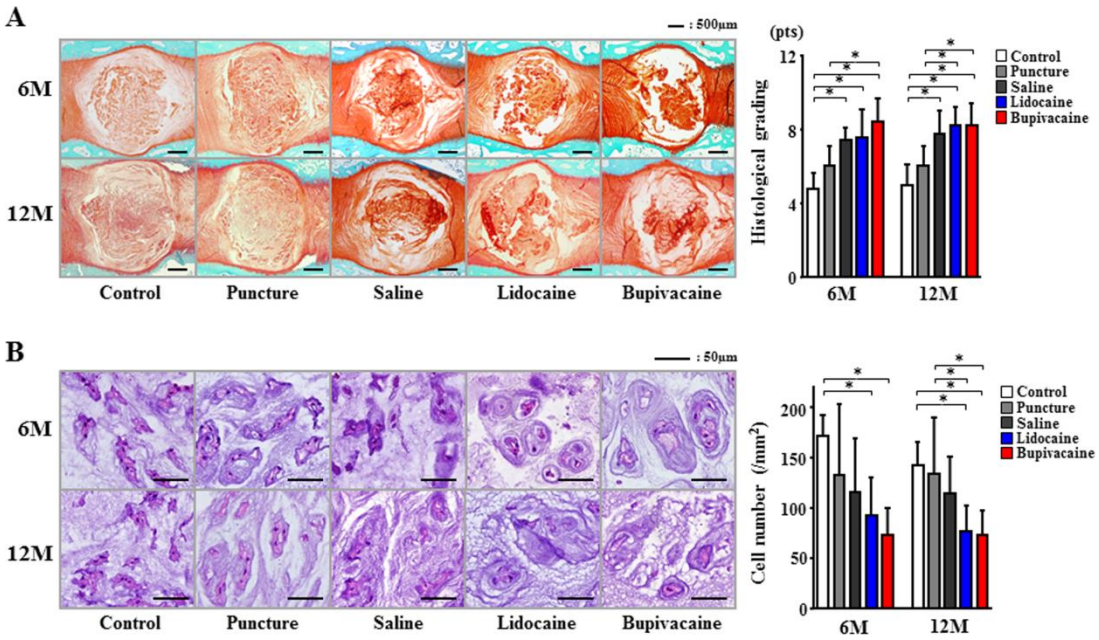

Figure 13. 局所麻酔薬投与 6 ヶ月と 12 ヵ月後における椎間板の組織学的評価

A) 代表的な Safranin-O 染色像と半定量的組織学評価. (n = 8. 平均 ± SD. *, $p < 0.05$) **B)** 代表的な HE 染色像と，髄核細胞密度. (n = 8. 平均 ± SD, *$p < 0.05$)

考 察

近年，椎間板造影・ブロックに使用される薬剤の有害性を指摘する報告が散見されるようになった[9-13]．本研究では，臨床上実際に用いられている薬剤がヒト椎間板細胞に与える影響について検証するために，3 次元培養モデルを用いた *in vitro* 試験を行った．次いで椎間板内への薬剤投与後の髄核細胞，椎間板組織への影響を検証するために家兎椎間板器官培養モデルを用いた *ex vivo* 試験と家兎を用いた *in vivo* 試験を行った．造影剤と局所麻酔薬がヒト椎間板細胞に与える影響について検討したこれまでの報告は変性腰椎から摘出した椎間板組織を用いており[9-11]，正常椎間板細胞に対する影響は不明であった．本研究はヒト非変性椎間板細胞を用いた初めての研究であり，さらに髄核細胞のみに焦点を絞った．

造影剤は，一般的に浸透圧や親水性，あるいはイオン負荷などの物理的特性による血管内皮障害や赤血球の形態異常を引き起こし，また化学的毒性による腎機能障害やアレルギー反応などの副作用を引き起こす可能性が指摘されている[25-29]．脳槽・脊髄造影に用いられる造影剤は，高浸透圧による神経損傷を回避するため血漿と同程度の浸透圧であることが望ましく，低浸透圧の非イオン性 1 量体である iopamidol や等浸透圧非イオン性 2 量体の iotrolan が使用されている．本研究結果より iotrolan はヒト髄核細胞に対して細胞毒性を示さなかったが，Gruber[9] らは iopamidol は同じ浸透圧のマンニトール溶液と比較し，ヒト線維輪細胞の増殖能を低下させ，同時にアポトーシスを誘導したと報告している．Iotrolan は iopamidol と比べて，脊髄や肺に対して細胞障害性が低いとする報告例があるが[27-29]，両造影剤の浸透圧に差はなく物理的特性が類似していることより，この細胞毒性の違いは両造影剤の化学的毒性によると考えられている．本研究の結果から，iotrolan は生理食塩水と比し細胞生存率が同程度であることからも椎間板造影に用いる薬剤として適当であることが示唆された．

これまで lidocaine と bupivacaine は，マウス等の実験動物から摘出し培養した椎間板組織やヒト変性椎間板細胞において細胞障害性やアポトーシスを誘導することが報告されてきた[10-12]．本研究結果から，lidocaine と bupivacaine は，ヒト非変性髄核細胞においても時間依存的，濃度依存的に細胞死を引き起こすことが明らかとなり，特に bupivacaine に強い細胞毒性があることが示唆された．またフローサイトメトリーと Western blotting の結果から lidocaine と bupivacaine は細胞死と同時にアポトーシスを誘導したことが示された．アポトーシスは組織の恒常性維持に重要な役割を果たしており，シグナル伝達は主に二つのカスケードにより誘導される．一つは細胞表面の death receptor を介し caspase-8 の活性化により引き起こされる extrinsic pathway と，もう一つはミトコンドリアへのストレスに続く caspase-9 の活性化により引き起こされる intrinsic pathway である．両経路とも最終的に caspase-3 が活性化されアポトーシスが起

きる．変性髄核細胞では intrinsic pathway の活性化が認められるとの報告がある[16,28]．本研究において，lidocaine は caspase-8 と caspase-3 の蛋白発現を増加させたが，bupivacaine は caspase-8，caspase-9，並びに caspase-3 の発現を増加させた．この結果から lidocaine は extrinsic pathway の活性化させ, bupivacaine は extrinsic pathway と intrinsic pathway の両経路の活性化させることが示唆された．以上の結果から，ヒト非変性髄核細胞に対して局所麻酔薬である lidocaine，bupivacaine は有害である可能性が示唆された．

次に髄核細胞への細胞毒性を示した局所麻酔薬に焦点を絞りさらに検討を行うため，家兎椎間板器官培養モデルを用いて局所麻酔薬を椎間板内へ直接投与した．Wang ら[12]はマウス椎間板器官培養で，bupivacaine は髄核細胞の生存率の低下と，細胞外マトリックスの減少を引き起こしたと報告している．しかし彼らの実験方法は，椎間板内に針を刺して局所麻酔薬を投与するのではなく，局所麻酔薬の薬液中に縦割した椎間板を浸すにとどまりっており，実際の椎間板ブロックの手技を模倣したものではなかった．本研究では臨床上の手技を再現し，椎間板内に針を刺した後に局所麻酔薬の投与を行った．その結果，局所麻酔薬投与群において時間依存的，濃度依存的に髄核細胞の生存率が低下していたが，生理食塩水群においても puncture 群と比べて有意に低下していた．この変化は，薬液の種類の他に薬液投与時に椎間板内に作用する圧力の上昇が影響していることが示唆されたため，さらに家兎生体モデルを使用して局所麻酔薬が椎間板変性に与える長期的影響について検討することにした．

Carragee ら[13]は，椎間板造影の長期的な影響を検討するために 10 年間に及ぶ臨床観察研究を行ったが，本研究では局所麻酔薬投与後 12 ヶ月間の経過観察を行った．家兎の 12 ヶ月はヒトの 7-10 年に相当するため[30]，本研究における経過観察期間は Carragee らの臨床研究と同等であると考えられる．

本研究において，MRI による評価では全ての群の間に有意差はなかったが，組織学的評価においては生理食塩水群と局所麻酔薬群で有意に椎間板変性が進行していた．しかし，局所麻酔薬群と生理食塩水群を比較した場合，局所麻酔薬群における変性変化は，生理食塩水群よりも進んでいたが両者に有意差はなかった．この結果は *in vivo* 局所麻酔薬投与によって誘導される椎間板の変性は，薬液投与時の椎間板内圧による物理的ダメージが主に引き起こしていることを示唆している．しかし，bupivacaine 群で髄核細胞の細胞数が最も減少していることから，物理的ダメージに加え局所麻酔薬の細胞障害性も椎間板変性に寄与している可能性も示唆している．

本研究の限界として，まず *in vitro* 試験での髄核細胞への薬剤曝露は，実際の椎間板内への薬剤投与を完全に反映していないことが挙げられる．椎間板内における薬物動態は分子量や蛋白結合能などで大きく異なっており，造影剤や局所麻酔薬の椎間板内

での動態は未だ明らかになっていない．今回の薬剤への曝露時間や薬剤の濃度の設定は局所麻酔薬がヒト変性椎間板に与える影響を検討した研究[10]に基づいているが，*in vitro* 試験での薬剤の設定と，実際の椎間板造影・椎間板ブロックと相関については明らかではない. この点を補うために *ex vivo* 試験と *in vivo* 試験で実際の手技を再現することで，椎間板造影・椎間板ブロックの髄核細胞への細胞障害性，椎間板変性について検討した.

次に *ex vivo* 試験と *in vivo* 試験で，正常な椎間板を用いたことが挙げられる．ウシ関節軟骨を用いた実験において，正常な関節軟骨よりも関節表面を薄く削いだ関節軟骨では，局所麻酔薬に曝露した際の軟骨細胞の細胞生存率が低いとの報告[4]がある．この結果は正常なマトリクスを有する組織には，局所麻酔薬に対する防御機構を有している可能性が示唆されている．このことより変性椎間板は正常椎間板よりも局所麻酔薬によるダメージが大きくなる可能性が示唆される．実際の臨床の場では変性椎間板に椎間板ブロックを行うことが多く，今後は細胞外マトリクスが減少し，より局所麻酔薬曝露による影響が大きいと考えられる変性椎間板を対象とした研究が必要であると考えられた.

さらに，*ex vivo* 試験と *in vivo* 試験で各椎間板に対して同量の生理食塩水，局所麻酔薬を椎間板内へ注入したことである．本研究の結果，同量の薬液を投与しても各椎間板の髄核細胞の密度に有意な差はなかった．しかし，家兎の個体差や椎間板高位が異なることで椎間板，髄核組織のサイズは異なっており，同量の薬液を注入しても投与時の圧力は異なる可能性があると考えられる．従って正確を期するためには少量の薬液を投与する場合でも圧力を測定できるような実験器具を検討する必要があると考えられる.

総括および結論

- 椎間板造影・ブロックに用いられている造影剤および局所麻酔薬が，椎間板細胞の細胞死と椎間板の組織変性に及ぼす長期的な影響とその病態について，ヒト非変性髄核細胞を用いた *in vitro* 試験および家兎椎間板組織を用いた *ex vivo, in vivo* 試験を通して検証した.

- *In vitro* 試験では，ヒト非変性髄核細胞の細胞生存率は造影剤曝露により低下しなかったが，局所麻酔薬により時間依存的，濃度依存的に生存率は低下した.

- ヒト非変性髄核細胞は局所麻酔薬への曝露により濃度依存的にアポトーシスが進行した.

- *Ex vivo* 試験において，椎間板器官培養モデルで椎間板内への局所麻酔薬投与は，髄核細胞の細胞死を引き起こし，アポトーシスを誘導した.

- *In vivo* 試験において，椎間板内への局所麻酔薬投与により，椎間板の変性が進行したが，生理食塩水投与と比べて有意な差はなかった．しかし髄核細胞の細胞数は bupivacaine の投与により最も減少し，生理食塩水投与と比べても有意に減少した.

- 以上より，細胞レベルでは局所麻酔薬は髄核細胞に対し強い細胞毒性を有するが，生体レベルでは薬液投与時の圧力による物理的ダメージが椎間板変性に最も大きく関与していることが示唆された.

- 今後臨床の場では，椎間板ブロックが椎間板変性を引き起こす可能性を考慮して椎間板ブロックを行う機会を減らすこと，さらに椎間板ブロックが必要とされる場合には 1% lidocaine といった細胞毒性の低い局所麻酔薬を必要最小量にとどめて投与する必要がある.

謝辞

本論文は，筆者が北海道大学大学院医学研究科医学専攻機能再生医学講座整形外科学分野博士課程在学中に行った研究をまとめたものです．本研究に関して終始ご指導頂きました整形外科学分野教授岩崎倫政先生に心より感謝いたします．

また本研究を行うにあたり，ご助言を頂いた北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター感染・免疫部門の東秀明教授に深い感謝の意を表します．

最後にこれまでの研究課程において直接のご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科脊椎・脊髄先端医学講座特任准教授須藤英毅先生をはじめ，整形外科学分野の諸先生方，研究に関わっていただいた皆様に心よりの感謝を申し上げます．

引 用 文 献

1 Ohtori, S. *et al.* Results of surgery for discogenic low back pain: a randomized study using discography versus discoblock for diagnosis. *Spine (Phila Pa 1976)* **34**, 1345-1348 (2009).

2 Astroem, A. Recent Advances in Local Analgesia. Some Pharmacological Properties Determining Action and Toxicity of Local Anaesthetics. *Proc. R. Soc. Med.* **58**, 415-417 (1965).

3 Chu, C. R. In Vivo Effects of Single Intra-Articular Injection of 0.5% Bupivacaine on Articular Cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* **92**, 599 (2010).

4 Chu, C. R., Izzo, N. J., Papas, N. E. & Fu, F. H. In vitro exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. *Arthroscopy* **22**, 693-699 (2006).

5 Gomoll, A. H. *et al.* Chondrolysis After Continuous Intra-Articular Bupivacaine Infusion: An Experimental Model Investigating Chondrotoxicity in the Rabbit Shoulder. *Arthroscopy* **22**, 813-819 (2006).

6 Grishko, V., Xu, M., Wilson, G. & Pearsall, A. W. Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in Human Chondrocytes Following Exposure to Lidocaine, Bupivacaine, and Ropivacaine. *J. Bone Joint Surg. Am.* **92**, 609 (2010).

7 Karpie, J. C. & Chu, C. R. Lidocaine Exhibits Dose- and Time-Dependent Cytotoxic Effects on Bovine Articular Chondrocytes In Vitro. *Am. J. Sports Med.* **35**, 1621-1627 (2007).

8 Miyazaki, T. *et al.* Lidocaine cytotoxicity to the bovine articular chondrocytes in vitro: changes in cell viability and proteoglycan metabolism. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **19**, 1198-1205 (2011).

9 Gruber, H. E. *et al.* Deleterious effects of discography radiocontrast solution on human annulus cell in vitro: changes in cell viability, proliferation, and apoptosis in exposed cells. *Spine J* **12**, 329-335 (2012).

10 Lee, H. *et al.* Effect of bupivacaine on intervertebral disc cell viability. *Spine J* **10**, 159-166 (2010).

11 Quero, L. *et al.* Bupivacaine--the deadly friend of intervertebral disc cells? *Spine J* **11**, 46-53 (2011).

12 Wang, D. *et al.* Bupivacaine decreases cell viability and matrix protein synthesis in an intervertebral disc organ model system. *Spine J* **11**, 139-146 (2011).

13 Carragee, E. J. *et al.* 2009 ISSLS Prize Winner: Does discography cause accelerated

progression of degeneration changes in the lumbar disc: a ten-year matched cohort study. *Spine (Phila Pa 1976)* **34**, 2338-2345 (2009).

14 Sowa, G. A. Commentary: Do no harm: the potential negative effects of injectates used in spinal intervention. *Spine J* **12**, 674-675 (2012).

15 Pfirrmann, C. W. *et al.* Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* **26**, 1873-1878 (2001).

16 Sudo, H. & Minami, A. Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Arthritis Rheum.* **63**, 1648-1657 (2011).

17 Yamada, K. *et al.* Caspase 3 silencing inhibits biomechanical overload-induced intervertebral disk degeneration. *Am. J. Pathol.* **184**, 753-764 (2014).

18 Masuda, K., Sah, R. L., Hejna, M. J. & Thonar, E. J. A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *J. Orthop. Res.* **21**, 139-148 (2003).

19 Sudo, H. *et al.* Global identification of genes related to nutrient deficiency in intervertebral disc cells in an experimental nutrient deprivation model. *PLoS One* **8**, e58806 (2013).

20 Gantenbein, B. *et al.* An in vitro organ culturing system for intervertebral disc explants with vertebral endplates: a feasibility study with ovine caudal discs. *Spine (Phila Pa 1976)* **31**, 2665-2673 (2006).

21 Junger, S. *et al.* Effect of limited nutrition on in situ intervertebral disc cells under simulated-physiological loading. *Spine (Phila Pa 1976)* **34**, 1264-1271 (2009).

22 Kim, J. S. *et al.* Lactoferricin mediates anti-inflammatory and anti-catabolic effects via inhibition of IL-1 and LPS activity in the intervertebral disc. *J. Cell. Physiol.* **228**, 1884-1896 (2013).

23 Mo, J. H. *et al.* Viability and Regeneration of Chondrocytes after Laser Cartilage Reshaping Using 1,460 nm Diode Laser. *Clin Exp Otorhinolaryngol* **6**, 82-89 (2013).

24 Masuda, K. *et al.* A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* **30**, 5-14 (2005).

25 Speck, U., Mutzel, W. & Weinmann, H. Chemistry, physicochemistry and pharmacology of known and new contrast media for angiography, urography and CT enhancement. In, *Contrast media in urography, angiography and computerized tomography.*, (Taenzer, V. & Zeitler, E., eds.), Thieme, Stuttgart, 1983, pp. 2-10.

26 Wolf, K. *et al.* Comparative evaluation of low osmolar contrast media in (femoral)

arteriography. In, *Contrast media in urography, angiography and computerized tomography.*, (Taenzer, V. & Zeitler, E., eds.), Thieme, Stuttgart, 1983, pp. 102-106.

27 Ringel, K., Klotz, E. & Wenzel-Hora, B. I. Iotrolan versus iopamidol: a controlled, multicenter, double-blind study of lumbar and direct cervical myelography. *Fortschr. Geb. Rontgenstrahlen Nuklearmed. Erganzungsbd.* **128**, 153-157 (1989).

28 Miyazawa, T., Sho, C., Nakagawa, H. & Oshino, N. Effect of water-soluble contrast medium on the lung in rats. Comparison of iotrolan, iopamidol, and diatrizoate. *Invest. Radiol.* **25**, 999-1003 (1990).

29 Press, W. R., Mutzel, W. & Schobel, C. Tolerance to iotrolan after subarachnoid injection in animals. *Fortschr. Geb. Rontgenstrahlen Nuklearmed. Erganzungsbd.* **128**, 126-133 (1989).

30 Sowa, G. *et al.* Characterization of intervertebral disc aging: longitudinal analysis of a rabbit model by magnetic resonance imaging, histology, and gene expression. *Spine (Phila Pa 1976)* **33**, 1821-1828 (2008).