

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 岩崎 浩司

学位論文題名

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)

【背景と目的】

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. 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.

椎間板障害の診断は, X線や核磁気共鳴画像法(magnetic resonance imaging: MRI)等による画像検査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・椎間板ブロックは, 椎間板内に造影剤や局所麻酔薬を注入してその画像所見や疼痛の変化を調べる検査法である.

しかし, 近年本検査法により椎間板の変性が長期的に進行したとの臨床報告が発表され, また, 使用される造影剤や局所麻酔薬が実験動物椎間板細胞のアポトーシスを惹起するとの基礎研究も散見されるようになった. しかしながら現在まで, 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, 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.

本研究の目的は, 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, 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* 試験を通して明らかにすることである.

【対象と方法】

まず *in vitro* 試験として, 北海道大学病院において脊椎前方矯正固定術を要した思春期特発性側弯症患者より供与を受けた非変性椎間板組織より髄核細胞を単離培養し, 2 継代後に 4×10^6 (cells/ml)の濃度でアルギン酸ゲルビーズに包埋し3次元培養を行った. 1週間の3次元培養後に, 椎間板造影・椎間板ブロックに使用される造影剤である iotrolan(イソピスト®240), 局所麻酔薬である0.25%と0.5%の bupivacaine, 1%と2%の lidocaine を曝露した(30分, 60分, 120分間). コントロールとして0.9%生理食塩水を用いた. 曝露24時間後に calcein-AM と propidium iodide (PI)により2重染色し, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞生存率を評価した. またアポトーシスの評価はゲルから回収した髄核細胞を Annexin-V と PI により染色後フローサイトメリーにより行った. さらにウェスタンブロット法によりアポトーシスのシグナル伝達経路を評価した.

次いで *ex vivo* 試験として, 日本白色家兎椎間板を摘出し functional spinal unit(機能的脊椎単

位:椎体-椎間板-椎体)とした後に、0.5% bupivacaine あるいは1% lidocaine 15ulを26G注射針を用いて椎間板内に投与し器官培養を行った。投与後3日と7日目に髓核組織をPIとHoechst33342を用いて2重染色し、共焦点レーザー顕微鏡により死細胞率を評価した。さらに椎間板組織の組織学的変性評価及びTUNEL assayによりアポトーシス細胞陽性率を算定した。

最後に *in vivo* 試験として、0.5% bupivacaine もしくは1% lidocaine 15ulをX線透視下に日本白色家兎腰椎椎間板内に直接投与した。投与後6ヶ月と12ヶ月後にMRIによる変性評価を行い、さらにMRI撮影後に椎間板組織を摘出し組織学的評価も行った。

【結果】

In vitro 試験では、アルギン酸ゲル3次元培養下のヒト非変性髓核細胞の細胞生存率はiotrolan曝露では変化しなかったが、bupivacaineとlidocaine両局所麻酔薬への曝露により濃度依存的に低下した。両局所麻酔薬はいずれも髓核細胞のアポトーシスを有意に誘導したが、0.5% bupivacaineによるアポトーシス誘導効果が最も高かった。ウェスタンブロット法によるアポトーシス関連タンパク質の発現評価では、両局所麻酔薬への曝露により濃度依存的にcaspase-3の発現が上昇した。さらにlidocaineにより活性型caspase-8の発現が上昇していたが、bupivacaine曝露では活性型caspase-8と活性型caspase-9のいずれの発現も上昇していた。

Ex vivo 試験では局所麻酔薬はともに経時的に髓核細胞の細胞死を引き起こした。投与7日目ではbupivacaine投与群では生理食塩水投与群と比較し髓核細胞のTUNEL陽性細胞が有意に増加していた。

In vivo 試験において、MRIの評価では各群間で有意な変性の進行は認めなかった。組織学的評価では、椎間板穿刺単独群と比較して生理食塩水投与群と局所麻酔薬群で椎間板変性が有意に進行していたが、局所麻酔薬群と生理食塩水群の間に有意差はなかった。

【考察】

椎間板造影・椎間板ブロックは椎間板障害を診断する上で有用な検査であるが、その安全性については未だ明らかになっていない。本研究では、3次元培養下のヒト非変性髓核細胞に対しては造影剤の細胞毒性は確認されなかったが、局所麻酔薬は時間依存性、濃度依存性に細胞毒性並びにアポトーシスの誘導が認められた。また椎間板器官培養モデルを用いた椎間板内への局所麻酔薬投与でも細胞毒性を強く認めた。しかし、生体の椎間板内への局所麻酔薬投与は長期的に椎間板の変性を進行させたが、生理食塩水投与と比較して有意差はなかった。この結果は正常椎間板組織を有する生体レベルでは、局所麻酔剤自体の組織毒性よりも薬液投与時の椎間板内圧上昇による物理的ダメージが椎間板変性にもっとも大きく関与していることが示唆された。今後は細胞外マトリクスが減少し、より局所麻酔剤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。

【結論】

局所麻酔剤による椎間板ブロックが椎間板組織変性に及ぼす影響を生体レベルで初めて検討した。*in vitro*, *ex vivo* レベルでは細胞毒性が強くみられたが、*in vivo* レベルでは生理食塩群と比較し有意差はなかった。この結果は正常椎間板組織を有する生体レベルでは局麻剤自体の影響よりも薬液投与時の圧力が変性に大きく関与していることを示唆していると考えられた。