椎間板ヘルニアの自然吸収について

—基礎研究の視点から—

熊本大学整形外科

菊池 太朗・中村 孝文
池田 天史・藤本 徹
坂本 吉弘・成尾 政一郎
高木 克公

Spontaneous Regression of Herniated Disc — Experimental Study —

Taro Kikuchi, Takafumi Nakamura, Takashi Ikeda,
Toru Fujimoto, Yoshihiro Sakamoto Seiichirou Naruo,
and Katsumasa Takagi

Department of Orthopaedic Surgery,
Kumamoto University School of Medicine

Many authors have reported that disc herniation can be resorbed by monocytic phagocytosis. However, how the recruitment of monocytes is triggered is still unknown.

We investigated monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by using the experimental rat model *in vivo* and rabbit model *in vitro* to ascertain the precise mechanism of macrophage recruitment in the early phase of disc resorption.

The autologous intervertebral discs from tails of Wistar rat were subcutaneously implanted into the abdomen. These discs were used for immunohistochemical study. Additionally, we employed tissue culture models of rabbit's discs, and the quantification of MCP-1 in these media was performed.

MCP-1 positive disc chondrocytes were observed in the nucleus pulposus and the inner annulus fibrosis on the third day. Monocyte derived macrophages were considerably observed around the intervertebral disc by the seventh day. The MCP-1 induced by $rrIL-1\beta$ or $rrTNF\alpha$ indicated its peak volume at 12 hours and at 18 hours after incubation.

Our study suggests that intervertebral disc chondrocytes have chemotactic properties and play an active role in the recruitment of monocytes involved in disc resorption. Moreover, inflammatory cytokines induce and regulate the production of MCP-1 in the intervertebral disc cells.

Key words : intervertebral disc (椎間板), macrophages (大食細胞), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)

はじめに

整形外科領域において椎間板ヘルニアは激しい疼痛、四肢機能不全を呈する代表的な疾患であり、その頻度の高さと青壮年期という最も社会的活動が要求される時期に多発することから、本疾患による社会的、経済的損失は甚大である。しかし、本疾患に対する治療法の認識は一定しておらず、そのため、不必要な外科治療や、また逆に長期の保存療法によって好ましくない結果を残す症例がある。このような混乱の最大の原因は、第一に本疾患の解剖生理学的分類が確立されていないこと、第二にその分類に基づく自然経過の病態説明が未だなされていないことにある。

当教室で調査した症例についてヘルニア塊周辺の造影タイプを3群に分類した²⁾。造影効果が全く起らないA群、ヘルニア辺縁が軽度の造影効果を示すB群、ヘルニア全周囲が造影され、いわゆる Wrapped disc の像を示すC群である。本分類によるヘルニアの吸収反応発生率を見ると、A群は0%、B群は57.1%、C群は100%であった。ヘルニア周辺に造影効果の強いもの、即ち血管の新生を含め、貪食細胞を中心とした炎症反応の存在を認めるものが吸収されやすいことが推察される。

目的

なぜ吸収反応の起こりやすいタイプと起こりにくいタイプが存在するのか。また、脱出椎間板にどのような

機序が働くか、吸収反応の開始となり、炎症細胞はどのような機序で浸潤するのか、またそれが何によって制御されているかは不明であった。

以上について動物椎間板を用いた基礎的研究の結果を報告する。

方法 1

椎間板の吸収モデルとして、ラット尾椎椎間板皮下移植モデルを作製した。以下 Disc group とする。一方椎間板の上下に終板軟骨を付けたまま採取し、椎間板内部が皮下組織に暴露されていないモデルも作製した。以下 E-D-E group とする (図1)。

結果 1

移植椎間板体積を経時的に測定したところ、Disc group では14日後には椎間板の体積は50%に減少していた。一方 E-D-E group の椎間板体積は不変であった。

両グループについて皮下移植、即ち、皮下の血行、種々の外部環境に暴露させたあと、3日後の標本についてケモカインの一種である monocyte chemoattractant protein-1、以下 MCP-1、に対する抗体を用い免疫組織化学染色を行った (図2)。Disc group では椎間板内層線維輪、髄核に、通常の椎間板軟骨細胞よりやや膨化した軟骨細胞を認め、本細胞に陽性所見を多数認めた。一方 E-D-E group では椎間板軟骨細胞に陽性細胞は認めなかった。即ち、なんらかの

図1 方法1の実験群。ラットの尾椎椎間板を腹壁皮下に自家移植した群 (Disc group)。ラット尾椎椎間板の上下に終板軟骨を付けたまま腹壁皮下に自家移植した群 (E-D-E group)。

図2 Disc group の移植後3日目の髄核から内層線維輪にかけての免疫組織染色。MCP-1 陽性の椎間板軟骨細胞を認める (A)。E-D-E group の移植後3日目の免疫組織染色。MCP-1 陽性細胞は存在しない (B)。

図3 Disc group の移植後7日目の免疫組織染色。TRPM-3 陽性のマクロファージを多数認める (A)。E-D-E group の移植後7日目の免疫組織染色。TRPM-3 陽性のマクロファージの侵入は認めない (B)。

Cytokines

Rabbit recombinant IL-1 β (rrIL-1 β)
Rabbit recombinant TNF δ (rrTNF α)

Medium

S-Clone (SF-O) containing rabbit
albumin 10 μ g/ml

Control group

rrIL-1 β group (rrIL-1 β 3ng/ml)

rrTNF δ group (rrTNF α 100ng/ml)

図4 方法2の実験群。無血清培地 (S-Clone: SF-0) に兔正常血清 (10 μ g/ml) を添加した。培地だけの群 (control group), rabbit recombinant IL-1 β (rrIL-1 β) 添加群 (rrIL-1 β group), rabbit recombinant TNF α (rrTNF α) 添加群 (rrTNF α group), をそれぞれ作製した。

因子に髄核，内層線維輪の椎間板軟骨細胞が暴露されると MCP-1 が発現すると考えられる。

MCP-1 が産生されるため続いてマクロファージの集簇が起こることが予想される。移植後 7 日目の monocyte derived macrophage に対する抗体である TRPM-3 による染色結果を示す (図 3)。Disc group の髄核，内層線維輪には多数のマクロファージの浸潤が見られ，リンパ球，好中球などはほとんど存在しなかった。さらにこのマクロファージは移植後 2～3 日目にはすでに椎間板周辺に集簇が開始されていた。一方 MCP-1 が産生されていない E-D-E group ではマクロファージの浸潤は見られなかった，

よって，外層線維輪，終板軟骨がバリアーとなり，MPC-1 によるマクロファージの誘導が行なわれなかった可能性が示唆された。

椎間板組織，特に髄核，および線維輪内層が皮下組織の環境，つまり，血行を含めなんらかの因子が作用した場合，椎間板軟骨細胞からケモカインの一種である MPC-1 が産生される。続いて椎間板内部へ血行中に存在する単球由来のマクロファージを直接誘導していると考えられる。また，終板軟骨，外層線維輪は椎間板内部を外部環境から隔絶するバリアーである。臨床的にも外層線維輪や，後縦靱帯に覆われたままのヘルニアである central extrusion や，protrusion

図5 rrIL-1 β group の MCP-1 は培養開始後 12 時間で 35.88ng/ml/g と産生のピークを示した (A)。rrTNF α group は 18 時間で 120.46ng/ml/g の MCP-1 産生を示した (B)。

type のヘルニアは吸収され難いことが判明しているが、これは外層線維輪や、後縦靱帯によって椎間板内部が、外部環境にさらされないため貪食細胞の誘導が起らないからであろう。また、誘導されるマクロファージは移植後早期から認められ、1～2週に渡って、椎間板へ集簇を続ける。逆に、好中球や、リンパ球は、ごく少数しか認められないため、椎間板処理の担当細胞は初期にはマクロファージと考えられる。

方 法 2

外部環境のうち椎間板軟骨細胞に作用し、MCP-1を誘導するシグナルとなりうるものは何であろうか。ウサギの椎間板を用い組織培養系を用いて実験を行った。完全無血清培地を用い炎症サイトカインの関与を探るため、rabbit recombinant IL-1 β , rabbit recombinant TNF α をそれぞれ添加して椎間板組織のMCP-1産性能を検討した。実験群は、1、培地のみのcontrol group. 2、培地に3 ng/mlのIL-1 β を添加した、rrIL-1 β group. 3、100 ng/mlのTNF α を添加したrrTNF α group. の3群である(図4)。

結 果 2

rrIL-1 β 群は、3 ng/mlと低濃度でMCP-1の産生を誘導し、また、培養開始後、12時間で産生のピークを示した。rrTNF α 群は、培養初期にはピークを示さず、18時間以降にMCP-1産生のピークが存在する(図5)。またrrTNF α 群は、rrIL-1 β 群よりも約3倍のMCP-1を誘導した。以上より、椎間板軟骨のMCP-1産生の引き金となる外部環境の一部に、IL-1 β とTNF α が関与していると考えられた。まずIL-1 β によってMCP-1が誘導され、続いて強力な炎症性サイトカインであるTNF α により更に長時間、強力にMCP-1の誘導が行われると考えられる。

考 察

椎間板ヘルニアの臨床的意義を初めて明らかにしたのは1934年のMixerとBarr⁴⁾に遡り、以来60年ほどになる。椎間板、並びに椎間板ヘルニア組織に対する基礎的研究は、1950年代には死体を用いた観察

がすでに行われており³⁾、ヘルニアがあったと思われる椎間板への肉芽組織の侵入や、白血球の浸潤を報告している。後に、ヘルニア組織への貪食細胞を中心とした炎症細胞の浸潤が高頻度に観察されることが判明し、脱出椎間板に対する局所的な炎症反応がヘルニア塊吸収反応の主座ではないかと考えられるようになった。そこで、椎間板組織に対する炎症反応の誘導について、Olmarkerら⁵⁾の豚椎間板皮下移植モデルなどによる髄核への炎症細胞誘導の実験が発表されている。摘出椎間板の分析も進み、ヘルニア組織がある種の刺激もとにサイトカインや、プロテアーゼ、などを能動的に産生することが報告された¹⁾。今回我々の実験で、椎間板組織、特に髄核、内層線維輪に炎症性サイトカインなどの刺激によって、走化性サイトカインの産生能があることが確認され、近年では椎間板軟骨細胞の培養、解析によって次々と新たな知見が報告されている。

ま と め

①脱出椎間板の吸収には、椎間板の内部成分(髄核、内層線維輪)が外部環境に暴露されることが必要。②脱出椎間板は初期にはマクロファージによって分解貪食される。③椎間板軟骨細胞(髄核、内層線維輪)により産生されるMCP-1が貪食細胞の集簇に関与している。④椎間板軟骨細胞のMCP-1産生にはIL-1 β 、TNF α などのサイトカインが関与している。

参 考 文 献

- 1) Doita, M. et al.: Immunohistologic study of the ruptured intervertebral disc of the lumbar spine. Spine, 21 : 235-241, 1996.
- 2) 池田天史ら：腰椎椎間板ヘルニアの自然縮小とその臨床的意義について。整形外科と災害外科, 46 : 1087-1091, 1997.
- 3) Lindblom, K., Hultqvist, G.: Absorption of protruded disc tissue. J. Bone Joint Surg., 32A : 557-60, 1950.
- 4) Mixer, W.J. et al.: Rupture of the intervertebral disc with involvement of the spinal canal. New Engl. J. Med., 211 : 210-215, 1934.
- 5) Olmarker, K. et al.: Inflammatory properties of nucleus pulposus. Spine., 20 : 665-669, 1995.