

# 腰椎椎間板ヘルニアの臨床症状に対する年齢の影響

## —ラット髄核細胞とマクロファージの共培養を用いた免疫学的検討—

勝野雷二郎

腰椎椎間板ヘルニア (LDH) の疼痛発生機序には、機械的圧迫因子と化学的因子の関与が挙げられる。機械的圧迫因子に関しては、前方圧迫要素、後方圧迫要素、不安定性の三つの組み合わせが考えられる。一方、化学的因子に関しては一酸化窒素 (NO)、炎症性サイトカインなどの関与が示されている。また、LDH の臨床像は若年者と高齢者では異なっており、この違いに関する化学的因子の解明は未だなされていない。

今回われわれは、LDH によって惹起される免疫炎症反応は年齢によって異なるという仮説を立てた。本研究の目的は、炎症細胞中のマクロファージに注目し、髄核細胞とマクロファージの相互作用によって生じる NO およびサイトカイン産生能への、年齢が及ぼす影響を検討することによって、年齢による LDH の臨床症状の違いの原因を解明することである。

実験には、生後3週齢、12週齢、32週齢の Sprague Dawley ラット (雄) 各15匹、計45匹を用いた。ラットの髄核細胞と炎症性マクロファージの単培養と両細胞の共培養を行い、培養開始2, 24, 48, 72時間後の培養液中の NO 値、および培養開始後7日目の培養液中の炎症性サイトカインを各週齢において測定し、年齢が及ぼす影響を単培養と共培養とで比較検討した。

その結果、NO に関して共培養では、培養開始24時間後から有意に上昇し、さらに週齢が増すにつれ NO の有意の上昇を認めた。しかし単培養においては、髄核細胞、マクロファージ共に培養時間、週齢による NO 産生量に有意差を認めなかった。NO 産生量から、LDH においては加齢に伴い炎症が強くなることが示された。

一方、サイトカインに関して共培養では、週齢を増すにつれて TIMP-1 ならびに IFN-gamma が減少しており、IL-10 は上昇していた。この TIMP-1 の変化は、週齢によって侵害因子に対して髄核細胞の防御反応が変化していることが示唆された。さらに免疫応答の観点から IFN-gamma と IL-10 に着目し解析を行った。IFN-gamma は週齢が増すと減少し、IL-10 は週齢が増すと高値を示すというサイトカインバランスの逆転が起きていた。

以上から、ラットを用いた髄核細胞とマクロファージの共培養においては、加齢に伴い炎症および免疫応答が変化した。この結果は LDH の臨床症状が加齢に伴い変化するという臨床的事実に対する原因の一つを示したものと考えられる。

(平成18年3月7日受理)

## Age-related Influences of Clinical Features of the Lumbar Disc Herniation — Immunological Evaluation on Co-cultured Rat Nucleus Pulposus Cells and Macrophages —

Raijiro KATSUNO

There have been only a few number of reports on the effects of aging on the immunoinflammatory response in intervertebral disc herniation. The purpose of this study was to evaluate the effects of aging on nitric oxide (NO) and cytokine production in an *in vitro* model in which rat nucleus pulposus cells and macrophages were co-cultured.

Male Sprague Dawley rats ( $n = 45$ ), including 15 animals from three different age groups (3-, 12- and 32-weeks of age), were used in this study. Coccygeal nucleus pulposus (NP) cells ( $4 \times 10^5$  cells/well) and exudated peritoneal macrophages ( $4 \times 10^6$  cells/well) were co-cultured in serum-free medium. The controls consisted of NP cells or macrophages cultured alone. NO levels in the culture medium were measured at 2, 24, 48, and 72 hours by the Griess method. A cytokine array was done on the culture medium after seven days to evaluate the production of interferon-gamma (IFN-gamma) and interleukin-10 (IL-10) and tissue inhibitor metalloproteinase-1 (TIMP-1).

At 24 hours, NO levels had statistically increased in co-cultures of cells derived from the 32-week-old rats compared with younger rats (3-week-old:  $9.02 \mu\text{mol/l}$ , 12-week-old:  $10.18 \mu\text{mol/l}$ , 32-week-old:  $12.13 \mu\text{mol/l}$ ) ( $p < 0.001$ ). After seven days of co-culture, TIMP-1 levels of the 3-week-old rats were statistically higher than those from the 12- and 32-week-old rats (3-week-old:  $302.83 \times 10^3/\text{control}$ , 12-week-old:  $121.51 \times 10^3/\text{control}$ , 32-week-old:  $107.15 \times 10^3/\text{control}$ ) ( $p < 0.001$ ). IFN-gamma levels in media from cells from the 3-week-old rats were statistically higher than those from the 12- and 32-week-old rats (3-week-old:  $75.01 \times 10^3/\text{control}$ , 12-week-old:  $62.49 \times 10^3/\text{control}$ , 32-week-old:  $41.21 \times 10^3/\text{control}$ ) ( $p < 0.01$ ). IL-10 levels from the 3-week-old rats were statistically lower than those from the 12- and 32-week-old rats (3-week-old:  $45.12 \times 10^3/\text{control}$ , 12-week-old:  $89.46 \times 10^3/\text{control}$ , 32-week-old:  $94.34 \times 10^3/\text{control}$ ) ( $p < 0.001$ ).

In this study, age-related NO levels of the co-culture increased. The results show that inflammation increased along with aging. The outcomes of several diseases, such as aging, infections, and allergic and autoimmune disorders, have been linked to the balance between T helper (Th) 1 cells and Th2 cytokine production by Th cell-subsets. Th1 cells produce IFN-gamma, which activates cell-mediated immunity, while Th2 cells secrete IL-10, which activates humoral immunity. The results of this study show that the effects of aging on cytokine secretion related to the Th-type on co-cultures of rat NP cells and macrophages differ. In this study, an age-related imbalance between the levels of the cytokines, IFN-gamma and IL-10, was seen. In the younger rats, IFN-gamma levels were statistically higher while IL-10 levels were statistically lower. This suggests that this process may be caused by external stress and aging. Aging and stress are thought to affect the extracellular matrix and change the immunologic response. The younger



rat NP cells had higher cell-mediated immunity activity, while the older rat NP cells had higher humoral immunity activity. These results show that aging has an effect of age on the immunologic responses attributable to NP cells. Further studies are needed to elucidate the mechanism of this newly observed phenomenon and ultimately to apply these findings clinically. (Accepted on March 7, 2006) *Kawasaki Igakkaishi* 32(3):99-109, 2006

**Key Words** ① Nucleus pulposus ② Macrophage ③ Co-culture  
④ Nitric oxide ⑤ Cytokine balance

## はじめに

腰椎椎間板ヘルニア (Lumbar Disc Herniation, LDH) の症状発現には、機械的圧迫因子と化学的因子の関与が示されている。化学的因子に関して、Nachemson ら<sup>1)</sup>は椎間板ヘルニアとその周囲組織の pH 値が低下していることを報告し、この酸性化が神経根周囲で生じる炎症反応の原因であると推測した。その後、この炎症反応に関与する化学的因子として、Glycoprotein<sup>2)</sup>、Immunoglobulin G<sup>3)</sup>、Phospholipase A<sub>2</sub><sup>4)</sup>、Stromelysin<sup>5)</sup>、Nitric oxide (NO)<sup>6)</sup>、Prostaglandin E<sub>2</sub><sup>7)</sup>などが報告されている。これらの中で NO 産生は脱出椎間板周囲の組織反応によるものが主で、NO は椎間板ヘルニアによる神経炎の一因となっているという報告<sup>8)</sup>もある。これまで LDH における下肢痛の発生機序には炎症反応が主に関与していると指摘されてきた<sup>9-13)</sup>。椎間板は人体内で最大の無血管組織であり、髄核が血流の豊富な硬膜外腔に脱出すると髄核は異物とみなされ、自己免疫反応による炎症が発生すると考えられている<sup>9),10)</sup>。

一方、椎間板ヘルニアの臨床像は年齢によって異なっている。若年期では腰痛を約85%に伴い、知覚低下は10~21%、筋力低下は32~40%と成人よりも低いと言われている。逆に高齢期では知覚障害や筋力低下を呈する症例は64%と高率で、さらに強い下肢痛を伴うことが多いと言われている<sup>14),15)</sup>。また Hasegawa ら<sup>16)</sup>は、犬を用いた組織学的検討から脱出髄核周囲には成年では若年に比べてマクロファージやリンパ球の浸潤を多く認め、炎症反応を強く惹起し神

経細胞に及ぼす障害も大きいことを報告している。

これらの背景をもとに、LDH の年齢による症状の違いは、引き起こされる炎症とそれに対する免疫応答の違いに影響され、その反応にはマクロファージが重要な役割を演じているという仮説を立てた。本研究の目的は、髄核細胞とマクロファージの相互作用によって生じる NO およびサイトカイン産生能が年齢によりどう変化するかを両者の共培養モデルを用いて、免疫応答の違いを検討し、年齢による LDH の臨床症状の違いの原因を解明することである。

## 材料と方法

生後3週齢、12週齢、32週齢の雄 Sprague Dawley ラットを各15匹、計45匹使用した。

### 1. マクロファージ採取培養法

3%チオグリコレート培地を腹腔内投与し腹膜炎を誘発させ、3日後に腹腔内を冷 phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄しながら腹水を回収する。これを4℃、1000rpmで5分遠心にかける。得られた白色沈殿は、10%牛血清含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium を用いて直径0.4 μm の孔を多数有する Cell Culture Insert 裏面に  $4 \times 10^6$  個/well となるようにまく。37℃、CO<sub>2</sub> 5%条件下で2時間培養した後、培地を捨て PBS で2~3回洗浄する。洗浄後 Cell Culture Insert 裏面に張り付いている細胞がマクロファージとなる。得られたマクロファージを Opti-Modified Eagle's Medium (Opti-MEM) を用いて37℃、CO<sub>2</sub> 5%条件下で培養する。

## 2. 髄核細胞採取培養法

マクロファージを採取した同ラットの尾椎から髄核組織を無菌的に摘出後、0.025%トリプシン含有EDTAにて5分間酵素処理して細胞に分離する。得られた細胞はMesenchymal Stem Cell Mediumで37℃、CO<sub>2</sub> 5%条件下に24時間培養する。

## 3. 髄核細胞とマクロファージの共培養方法

培養開始2日目に髄核細胞がしっかりと接着していることを確認した後、マクロファージを張り付かせておいたCell Culture Insert内面に髄核細胞を $4 \times 10^5$ 個/wellとなるようにOpti-MEMを用いてまき、共培養開始とする(Fig. 1)。

実験には1)髄核細胞とマクロファージの共培養 2)髄核細胞の単培養 3)マクロファージの単培養の3種の培養系を用いた。

【実験1】培養開始2, 24, 48, 72時間後の培養液上清中の一酸化窒素を、NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-C II (Colorimetric) Griess Reagent Kit1 (同仁化学研究所, 日本)を使用し、Griess法にて測定した。測定結果は一元配置分散分析法のNewman-Keuls法 (STATMATE, AVICE, Japan)を用いて統計学的処理を行った。

【実験2】培養開始7日目の培養液上清中のtissue inhibitor

metalloproteinase-1 (TIMP-1), interferon-gamma (IFN-gamma), interleukin-10 (IL-10), を, Cytokine Antibody Array 1.1, for Rat (R & D Systems 社, アメリカ)を使用し, ケルミニ撮影装置 (ライトキャプチャーATTO 社, 日本)にて撮影した。この際, 各週齢にわけて髄核細胞単培養, マクロファージ単培養, 両者の共培養を並べて撮影した (Fig. 2)。さらに得られた画像を専用解析ソフト (CS Analyzer ATTO 社, 日本)を用いて解析した。その解析結果は, Positive controlを1000の光度として他のスポットを計測した。計測結果は一元配置分散分析法のNewman-Keuls法を用いて統計学的処理を行った。

## 結 果

### 【実験1】NO測定結果

①髄核細胞の単培養におけるNO産生量の経時的变化 (Table 1)

培養開始2時間では, 3週齢 $7.23 \pm 1.05 \mu\text{mol/l}$ , 12週齢 $7.58 \pm 0.62 \mu\text{mol/l}$ , 32週齢 $7.73 \pm 0.61 \mu\text{mol/l}$ であり, 各週齢間の統計学的有意差を

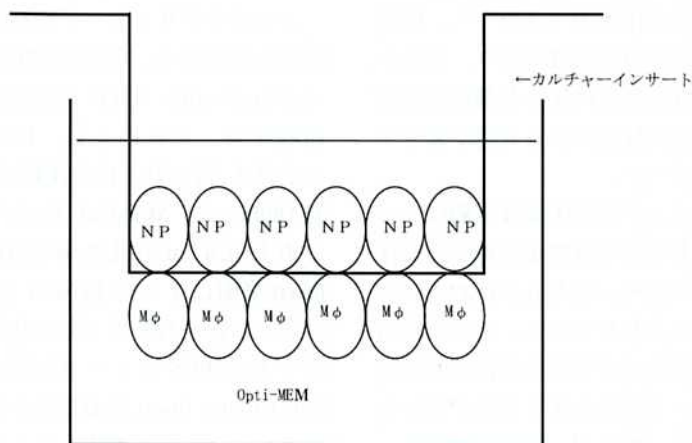
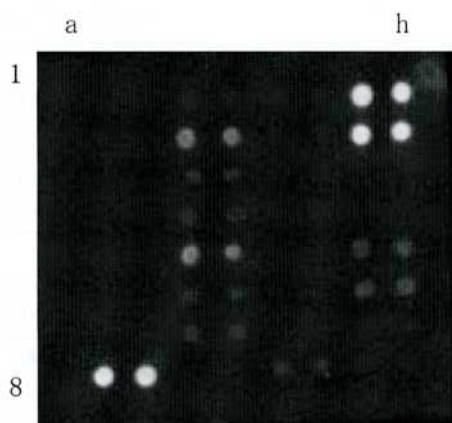


Fig. 1. カルチャーインサートを用いた共培養法

NP: 髄核細胞

Mφ: マクロファージ

Opti-MEM: Opti-Modified Eagle's Medium



	a	b	c	d	e	f	g	h
1	BLANK	BLANK	Leptin	Leptin	GM-CSF	GM-CSF	Pos	Pos
2	BLANK	BLANK	MCP-1	MCP-1	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$	Pos	Pos
3	BLANK	BLANK	MIP-3 $\alpha$	MIP-3 $\alpha$	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\alpha$	Neg	Neg
4	BLANK	BLANK	$\beta$ -NGF	$\beta$ -NGF	IL-1 $\beta$	IL-1 $\beta$	Neg	Neg
5	BLANK	BLANK	TIMP-1	TIMP-1	IL-4	IL-4	CINC-2	CINC-2
6	BLANK	BLANK	TNF- $\alpha$	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-6	CINC-3	CINC-3
7	BLANK	BLANK	VEGF	VEGF	IL-10	IL-10	CNTF	CNTF
8	Pos	Pos	BLANK	BLANK	LIX	LIX	Fractalkine	Fractalkine

Pos : positive control

Neg : negative control

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MIP-3 $\alpha$  : macrophage inflammatory protein-3 alpha

$\beta$ -NGF : beta-nerve growth factor

TIMP-1 : tissue inhibitor of metalloproteinase-1

TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor-alpha

VEGF : vascular endothelial growth factor

GM-CSF : granulocyte/macrophage-colony stimulating factor

IFN- $\gamma$  : interferon-gamma

IL-1 $\alpha$  : interleukin-1 alpha

IL-1 $\beta$  : interleukin-1 beta

IL-4 : interleukin-4

IL-10 : interleukin-10

LIX : lipopolysaccharide-inducible chemokine

CINC-2 : cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2

CINC-3 : cytokine-induced neutrophil chemoattractant-3

CNTF : ciliary neurotrophic factor

Fig. 2. サイトカインアレイ撮影写真と各スポットが示すサイトカインシグナル  
Positive control を1000の光度として他のスポットを計測した。

Table 1. 髄核細胞単培養における NO 産生量  
( $\mu\text{mol/l}$ )の経時の変化

	3 週齢	12 週齢	32 週齢
2 時間後	7.23 $\pm$ 1.05	7.58 $\pm$ 0.62	7.73 $\pm$ 0.61
24 時間後	8.56 $\pm$ 1.27	9.14 $\pm$ 0.5	9.43 $\pm$ 0.55
48 時間後	9.67 $\pm$ 1.63	10.24 $\pm$ 0.71	10.88 $\pm$ 1.02
72 時間後	11.07 $\pm$ 1.05	11.68 $\pm$ 1.41	11.92 $\pm$ 1.61

認めなかった。

培養開始24時間では、3週齢8.56 $\pm$ 1.27 $\mu\text{mol/l}$ 、12週齢9.14 $\pm$ 0.5 $\mu\text{mol/l}$ 、32週齢9.43 $\pm$ 0.55 $\mu\text{mol/l}$ であり、各週齢間の統計学的有意差を認めなかった。

培養開始48時間では、3週齢9.67 $\pm$ 1.63 $\mu\text{mol/l}$ 、12週齢10.24 $\pm$ 0.71 $\mu\text{mol/l}$ 、32週齢10.88 $\pm$ 1.02 $\mu\text{mol/l}$ であり、各週齢間の統計学的有意差を認めなかった。

培養開始72時間では、3週齢11.07 $\pm$ 1.05 $\mu\text{mol/l}$ 、



**Table 2.** マクロファージ単培養におけるNO産生量( $\mu\text{mol/l}$ )の経時的变化

	3週齢	12週齢	32週齢
2時間後	8.04 $\pm$ 0.57	8.04 $\pm$ 0.21	8.06 $\pm$ 0.15
24時間後	8.15 $\pm$ 1.44	8.21 $\pm$ 1.05	8.83 $\pm$ 1.27
48時間後	9.14 $\pm$ 0.63	8.84 $\pm$ 1.08	9.36 $\pm$ 1.02
72時間後	10.61 $\pm$ 0.94	10.35 $\pm$ 0.8	10.52 $\pm$ 1.26

**Table 4.** 髓核細胞単培養における各サイトカイン値( $\times 1000/\text{control}$ )

	3週齢	12週齢	32週齢
TIMP-1 <sup>§</sup>	229.93 $\pm$ 13.32	67.29 $\pm$ 10.91*	45.51 $\pm$ 17.97*
IFN- $\gamma$ <sup>†</sup>	55.75 $\pm$ 27.67	59.69 $\pm$ 9.61	50.78 $\pm$ 7.44
IL-10 <sup>‡</sup>	41.99 $\pm$ 13.65	54.95 $\pm$ 7.40	24.66 $\pm$ 5.38

§ : tissue inhibitor of metalloproteinase-1

† : interferon-gamma

‡ : interleukin-10

\* : p&lt;0.001

12週齢11.68 $\pm$ 1.41 $\mu\text{mol/l}$ , 32週齢11.92 $\pm$ 1.61 $\mu\text{mol/l}$ であり, 各週齢間の統計学的有意差を認めなかった。

### ②マクロファージの単培養におけるNO産生量の経時的变化 (Table 2)

培養開始2時間では, 3週齢8.04 $\pm$ 0.57 $\mu\text{mol/l}$ , 12週齢8.04 $\pm$ 0.21 $\mu\text{mol/l}$ , 32週齢8.06 $\pm$ 0.15 $\mu\text{mol/l}$ であり, 各週齢間の統計学的有意差を認めなかった。

培養開始24時間では, 3週齢8.15 $\pm$ 1.44 $\mu\text{mol/l}$ , 12週齢8.21 $\pm$ 1.05 $\mu\text{mol/l}$ , 32週齢8.83 $\pm$ 1.27 $\mu\text{mol/l}$ であり, 各週齢間の統計学的有意差を認めなかった。

培養開始48時間では, 3週齢9.14 $\pm$ 0.63 $\mu\text{mol/l}$ , 12週齢8.84 $\pm$ 1.08 $\mu\text{mol/l}$ , 32週齢9.36 $\pm$ 1.02 $\mu\text{mol/l}$ であり, 各週齢間の統計学的有意差を認めなかった。

培養開始72時間では, 3週齢10.61 $\pm$ 0.94 $\mu\text{mol/l}$ , 12週齢10.35 $\pm$ 0.8 $\mu\text{mol/l}$ , 32週齢10.52 $\pm$ 1.26 $\mu\text{mol/l}$ であり, 各週齢間の統計学的有意差を認めなかった。

### ③髓核細胞とマクロファージの共培養におけるNO産生量の経時的变化 (Table 3)

培養開始2時間では, 3週齢8.1 $\pm$ 0.97 $\mu\text{mol/l}$ ,

**Table 3.** 髓核細胞とマクロファージの共培養におけるNO産生量( $\mu\text{mol/l}$ )の経時的变化

	3週齢	12週齢	32週齢
2時間後	8.10 $\pm$ 0.97	8.26 $\pm$ 0.72	8.35 $\pm$ 0.74
24時間後	9.02 $\pm$ 1.04	10.18 $\pm$ 0.50*	12.13 $\pm$ 1.16*
48時間後	11.12 $\pm$ 1.16	13.18 $\pm$ 0.95*	14.26 $\pm$ 0.76*
72時間後	13.65 $\pm$ 0.71	16.67 $\pm$ 0.61*	18.35 $\pm$ 0.7*

(\*p&lt;0.001)

**Table 5.** マクロファージ単培養における各サイトカイン値( $\times 1000/\text{control}$ )

	3週齢	12週齢	32週齢
TIMP-1 <sup>§</sup>	176.69 $\pm$ 21.94	78.38 $\pm$ 17.39*	57.51 $\pm$ 6.67*
IFN- $\gamma$ <sup>†</sup>	57.36 $\pm$ 23.00	58.06 $\pm$ 18.28	52.07 $\pm$ 3.14
IL-10 <sup>‡</sup>	45.54 $\pm$ 23.90	58.49 $\pm$ 21.33	35.49 $\pm$ 7.05

§ : tissue inhibitor of metalloproteinase-1

† : interferon-gamma

‡ : interleukin-10

\* : p&lt;0.001

12週齢8.26 $\pm$ 0.72 $\mu\text{mol/l}$ , 32週齢8.35 $\pm$ 0.74 $\mu\text{mol/l}$ であり, 各週齢間の統計学的有意差を認めなかった。

培養開始24時間では, 3週齢9.02 $\pm$ 1.04 $\mu\text{mol/l}$ , 12週齢10.18 $\pm$ 0.5 $\mu\text{mol/l}$ , 32週齢12.13 $\pm$ 1.16 $\mu\text{mol/l}$ であり, 3週齢と12週齢, 3週齢と32週齢, 12週齢と32週齢すべての週齢間の比較において統計学的有意差(p<0.001)をもって高週齢のほうが高値であった。

培養開始48時間では, 3週齢11.12 $\pm$ 1.16 $\mu\text{mol/l}$ , 12週齢13.18 $\pm$ 0.95 $\mu\text{mol/l}$ , 32週齢14.26 $\pm$ 0.76 $\mu\text{mol/l}$ であり, 3週齢と12週齢, 3週齢と32週齢, 12週齢と32週齢すべての週齢間の比較において統計学的有意差(p<0.001)をもって高週齢のほうが高値であった。

培養開始72時間では, 3週齢13.65 $\pm$ 0.71 $\mu\text{mol/l}$ , 12週齢16.67 $\pm$ 0.61 $\mu\text{mol/l}$ , 32週齢18.35 $\pm$ 0.7 $\mu\text{mol/l}$ であり, 3週齢と12週齢, 3週齢と32週齢, 12週齢と32週齢すべての週齢間の比較において統計学的有意差(p<0.001)をもって高週齢のほうが高値であった。

#### 【実験2】サイトカイン測定結果

##### ①髓核細胞の単培養 (Table 4)

TIMP-1値は, 3週齢229.93 $\pm$ 13.32 $\times 1000/$

control, 12週齢 $67.29 \pm 10.91 \times 1000/\text{control}$ , 32週齢 $45.51 \pm 17.97 \times 1000/\text{control}$ で, 3週齢と12週齢, 3週齢と32週齢との間において統計学的有意差 ( $p < 0.001$ ) をもって3週齢のほうが高値であった。しかし, 12週齢と32週齢との間においては統計学的有意差を認めなかった。

IFN- $\gamma$  値は, 3週齢 $55.75 \pm 27.67 \times 1000/\text{control}$ , 12週齢 $59.69 \pm 9.61 \times 1000/\text{control}$ , 32週齢 $50.78 \pm 7.44 \times 1000/\text{control}$ で, 3週齢, 12週齢, 32週齢の各週齢間の比較においては統計学的有意差を認めなかった。

IL-10 値は, 3週齢 $41.99 \pm 13.65 \times 1000/\text{control}$ , 12週齢 $54.95 \pm 7.4 \times 1000/\text{control}$ , 32週齢 $24.66 \pm 5.38 \times 1000/\text{control}$ で, 3週齢, 12週齢, 32週齢の各週齢間の比較においては統計学的有意差を認めなかった。

#### ②マクロファージの単培養 (Table 5)

TIMP-1 値は, 3週齢 $176.69 \pm 21.94 \times 1000/\text{control}$ , 12週齢 $78.38 \pm 17.39 \times 1000/\text{control}$ , 32週齢 $57.51 \pm 6.67 \times 1000/\text{control}$ で, 3週齢と12週齢および32週齢において統計学的有意差 ( $p < 0.001$ ) をもって3週齢のほうが高値であった。しかし, 12週齢と32週齢との間においては統計学的有意差を認めなかった。

IFN- $\gamma$  値は, 3週齢 $57.36 \pm 23 \times 1000/\text{control}$ , 12週齢 $58.06 \pm 18.28 \times 1000/\text{control}$ , 32週齢 $52.07 \pm 3.14 \times 1000/\text{control}$ で, 3週齢, 12週齢, 32週齢の各週齢間の比較において統計学的有意差を認めなかった。

IL-10 値は, 3週齢 $45.54 \pm 23.9 \times 1000/\text{control}$ , 12週齢 $58.49 \pm 21.33 \times 1000/\text{control}$ , 32週齢 $35.49 \pm 7.05 \times 1000/\text{control}$ で, 3週齢, 12週齢, 32週齢の各週齢間の比較において統計学的有意差を認めなかった。

#### ③髄核細胞とマクロファージの共培養 (Table 6)

TIMP-1 値は, 3週齢 $302.83 \pm 17.97 \times 1000/\text{control}$ , 12週齢 $121.51 \pm 32.52 \times 1000/\text{control}$ , 32週齢 $107.15 \pm 8.1 \times 1000/\text{control}$ で, 3週齢と12週齢, 3週齢と32週齢との間において統計学的有意差 ( $p < 0.001$ ) をもって3週齢のほうが

**Table 6.** 髄核細胞, マクロファージ共培養における各サイトカイン値 ( $\times 1000/\text{control}$ )

	3週齢	12週齢	32週齢
TIMP-1 <sup>§</sup>	302.83 $\pm$ 17.97	121.51 $\pm$ 32.52*	107.15 $\pm$ 8.10*
IFN- $\gamma$ <sup>†</sup>	75.01 $\pm$ 8.21	62.49 $\pm$ 14.12*	41.21 $\pm$ 11.83*
IL-10 <sup>‡</sup>	45.12 $\pm$ 20.67	89.46 $\pm$ 30.65*	94.34 $\pm$ 8.69*

§ : tissue inhibitor of metalloproteinase-1

† : interferon-gamma

‡ : interleukin-10

\* :  $p < 0.001$

高値であった。しかし, 12週齢と32週齢の間には統計学的有意差を認めなかった。

IFN- $\gamma$  値は, 3週齢 $75.01 \pm 8.21 \times 1000/\text{control}$ , 12週齢 $62.49 \pm 14.12 \times 1000/\text{control}$ , 32週齢 $41.21 \pm 11.83 \times 1000/\text{control}$ で, 3週齢と12週齢, 3週齢と32週齢との間において統計学的有意差 ( $p < 0.001$ ) をもって3週齢のほうが高値であった。しかし, 12週齢と32週齢との間には統計学的有意差を認めなかった。

IL-10 値は, 3週齢 $45.12 \pm 20.67 \times 1000/\text{control}$ , 12週齢 $89.46 \pm 30.65 \times 1000/\text{control}$ , 32週齢 $94.34 \pm 8.69 \times 1000/\text{control}$ で, 3週齢と12週齢, 3週齢と32週齢との間において統計学的有意差 ( $p < 0.001$ ) をもって3週齢のほうが低値であった。しかし, 12週齢と32週齢の間には統計学的有意差を認めなかった。

## 考 察

腰椎椎間板ヘルニアの年齢による臨床症状の違いについて動物を用いて検討する場合には, 使用動物の年齢を人の年齢と対応させる必要がある。しかし, 動物年齢に関するラットと人を対比させた明確な報告はない。一般的に動物年齢の設定には性成熟を目安に行っており, ラットでは9~14週齢が性成熟年齢に当たるとされている<sup>17)</sup>。本研究では3, 12, 32週齢のラットを使用した。このことは, 人における性成熟前期, 中期, 後期との相関性をもつ妥当なモデルと考えられる。

NOは炎症の指標<sup>18)</sup>とされており, 腰椎椎間板ヘルニアによる神経根炎の一因はNOが関



与しているという報告<sup>8)</sup>もある。本研究では、共培養モデルにおけるNO発生量を週齢比較することで腰椎椎間板ヘルニアにおける年代による臨床症状の変化を化学的側面から解析した。

サイトカインは主に免疫システムの制御を担う生体内情報伝達物質の総称であり、その免疫システムの中でもヘルパーT (Helper T; Th) 細胞は免疫系の特異的反応を司っている<sup>19)</sup>。そして、マクロファージはTh細胞にシグナルを送る抗原提示細胞であり、サイトカイン産生において重要な役割を演じている<sup>20)</sup>。in vivoの実験においてHasegawaら<sup>16)</sup>は、組織学的にマクロファージを中心とした炎症細胞の出現率が年齢によって異なっている事を報告している。つまり、年齢によって髄核周囲に生じる炎症の程度が異なっており、このことは炎症に伴うサイトカインを中心とした免疫応答にも影響があるものと考えられる。今回は炎症細胞中のマクロファージに注目し、髄核細胞によって惹起される炎症および免疫反応を検討するモデルとして髄核細胞とマクロファージとの共培養モデルを開発した。

今回の共培養モデルの開発にあたり、細胞間レベルでの解析を行うという点からYamamotoら<sup>21)</sup>の共培養法を用いた。Yamamotoらは、髄核細胞とストローマ細胞をCell Culture Insertを用いて細胞レベルでの共培養を行った。この方法は異なる細胞同士が接着し、なおかつ液性因子を介した細胞同士の相互反応を調べる共培養法としては非常に有用であると提唱している。われわれはこの原理を用いて髄核細胞とマクロファージの共培養モデルを作製した。

腰椎椎間板ヘルニアのNOに関する研究は、Kangら<sup>22)</sup>が人の摘出ヘルニア組織を用いた生化学的検討においてNO産生を認めたと報告して以来、ヘルニア発生時の炎症性因子の解析が行われてきている。Brisbyら<sup>18)</sup>は、髄核が硬膜外腔にさらされると髄核組織からNOが産生され、このNOは神経因性疼痛の発生に関与すると報告している。さらに門<sup>23)</sup>は神経組

織が髄核にさらされた場合、それが神経因性疼痛になり得ることを脊髄後角レベルでc-fos陽性細胞を確認することによって証明している。本研究においては髄核の週齢が増すにつれてNO値の増加を認めた。このことは週齢が増すほど強い炎症が起り、同時に強い疼痛を伴っていると考えられる。この結果は、高齢者においては若年者に比べて強い下肢痛や知覚障害が特徴的であるという年齢による臨床症状の違い<sup>14, 15)</sup>と一致していた。このことから神経組織周囲のNO値が臨床症状の違いに影響する因子の一つであることが示された。

さらに、炎症時に発生するNOは免疫機能の調節に関与<sup>24)</sup>しているため、週齢によるNOの違いは炎症の違いという解釈だけでなく、髄核細胞がマクロファージにさらされた際におきる免疫応答に違いが生じている可能性も考えられた。また、炎症時に生成されるNOは酸化反応を経て様々な反応性窒素酸化物を生じ、NOの2あるいは3電子酸化物であるNO<sub>2</sub>やペルオキシニトライト(ONOO-)はアポトーシスを誘導するとの報告がある<sup>25, 26)</sup>。つまり週齢をかさねるにつれてNOの産生が多くなり、結果として髄核細胞のアポトーシスを誘発し、週齢によって髄核細胞の生化学的および免疫学的性質が変化している可能性が考えられる。しかし、この点に関しては今後さらなる検討が必要である。

本研究では、TIMP-1に関して若週齢の方が高週齢に比べて高値を示していた。TIMP-1は細胞外基質を破壊する働きのあるmatrix metalloproteinase (MMP) 阻害因子<sup>27)</sup>といわれており、さらにTIMP-1は細胞増殖活性因子<sup>28)</sup>であるともいわれている。このことから若週齢共培養モデルにおけるTIMP-1の高値は、若週齢髄核細胞における細胞外基質の破壊抑制作用および細胞増殖能といった侵害因子に対する自己防御反応が強いことを示していると考えられる。

1986年にMosmannら<sup>29)</sup>は、産生するサイトカインの種類によってTh細胞が2種類の集



団、すなわち細胞性免疫を活性化する IL-2 や IFN- $\gamma$  を分泌する 1 型 Th (Th1) 細胞と体液性免疫を活性化する IL-4, 5, 10 などを産生する 2 型 Th (Th2) 細胞に分類できることを提唱した。この Th1 細胞と Th2 細胞は本来均衡状態にあるもので、感染防御や自己免疫など様々な病態はサイトカインバランスの不均衡によるものと考えられるようになった。これが生体防御の免疫系において、加齢をはじめ栄養不全、ストレス、慢性疾患などの要素が存在すると Th2 型細胞への分化が亢進し Th1 型細胞が抑制されることが知られている<sup>30), 31), 32)</sup>。さらに Sandmand ら<sup>33)</sup>は、人の血液においてサイトカインバランスが、加齢に伴い Th1 型優位の状態から Th2 型優位の状態に傾くことを報告している。本研究は髓核細胞とリンパ球の共培養モデルではないが、今回の結果に関してサイトカインバランスに着目すると、IFN- $\gamma$  高値の Th1 型細胞優位の状態から IL-10 高値の Th2 型細胞優位の状態になっていることが示された。すなわち、共培養モデルにおける髓核細胞の免疫応答は、3 週齢モデルでは細胞性免疫優位で 12 週齢以降では体液性免疫優位へと変化していると考えられる。

以上、本研究における髓核細胞とマクロファージの共培養モデルは、腰椎椎間板ヘルニアにおけるマクロファージにさらされた脱出髓核を *in vitro* で再現したものである。この研究結果から、腰椎椎間板ヘルニアにおいて年齢によって臨床症状が異なる原因の一つとして NO が関与していることが示された。さらに、週齢によってサイトカインバランスの逆転が起きていることから、髓核細胞によって生じる免疫応答は年齢によって異なることが示された。しかし、免疫応答の変化がもつ臨床的意義については、今後さらなる検討が必要である。

## ま と め

週齢の異なるラットをもちいて、髓核細胞とマクロファージの相互作用によって生じる

NO およびサイトカイン産生能について、年齢が及ぼす影響を検討した。

1. 単培養における NO 産生量は、各週齢間の統計学的有意差を認めなかったが、共培養における NO 産生量は、週齢とともに統計学的有意差をもって増加した。
2. 単培養および共培養における TIMP-1 値は、3 週齢のほうが統計学的有意差をもって高値を示したが、12 週齢と 32 週齢との間においては統計学的有意差を認めなかった
3. 単培養における IFN- $\gamma$  値、IL-10 値は各週齢間の統計学的有意差を認めなかったが、共培養における IFN- $\gamma$  値は 3 週齢のほうが統計学的有意差をもって高値を示し、IL-10 値は 32 週齢のほうが統計学的有意差をもって高値を示した。

すなわち、単培養と異なり共培養においては、週齢が増すと炎症が強くなり週齢が増すとサイトカインバランスが逆転することが示された。

これは、腰椎椎間板ヘルニアにおいて年齢によって臨床症状が異なる原因の一つとして NO が関与していることを示しており、髓核細胞によって生じる免疫応答は年齢によって異なることが示された。しかし、免疫応答の変化がもつ臨床的意義については今後の検討が必要である。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御高閲を賜りました川崎医科大学整形外科教室 三河義弘教授、ならびに直接の御指導と御助言を賜りました同 長谷川徹助教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に多大なるご支援をいただきました東海大学整形外科教室 持田譲治教授に感謝申し上げます。

本研究の要旨は、第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2005 年 10 月 21 日、三重) において発表した。また第 33 回 International Society for the Study of the Lumbar Spine (2006 年 6 月 15 日、ノルウェー) において発表予定である。

なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (16-513K) の援助によって行なわれた。

本実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承認

(04-077) と東海大学動物実験委員会の承認 (041081) 物実験指針に基づき実施された。  
を受け、川崎医科大学動物実験指針および東海大学動

## 引用文献

- 1) Nachemson A : Intradiscal measurements of pH in patients with lumbar rhizopathies. *Acta Orthop Scand* 40(1) : 23-42, 1969
- 2) Marshall LL, Trethewie ER, Curtain CC : Chemical radiculitis. A clinical, physiological and immunological study. *Clin Orthop Relat Res* 129 : 61-37, 1977
- 3) Pennington JB, McCarron RF, Laros GS : Identification of IgG in the canine intervertebral disc. *Spine* 13(8) : 909-912, 1988
- 4) Saal JS, Franson RC, Dobrow R, Saal JA, White AH, Goldthwaite N : High levels of inflammatory phospholipase A<sub>2</sub> activity in lumbar disc herniations. *Spine* 15(7) : 674-678, 1990
- 5) Liu J, Roughley PJ, Mort JS : Identification of human intervertebral disc stromelysin and its involvement in matrix degradation. *J Orthop Res* 9(4) : 568-575, 1991
- 6) Kawakami M, Tamaki T, Hashizume H, Weinstein JN, Meller ST : The role of phospholipase A<sub>2</sub> and nitric oxide in pain-related behavior produced by an allograft of intervertebral disc material to the sciatic nerve of the rat. *Spine* 22(10) : 1074-1079, 1997
- 7) O'Donnell JL, O'Donnell AL : Prostaglandin E<sub>2</sub> content in herniated lumbar disc disease. *Spine* 21(14) : 1653-1656, 1996
- 8) Hashizume H, Kawakami M, Nishii H : Histochemical demonstration of nitric oxide in herniated lumbar discs. *Spine* 22(10) : 1080-1084, 1997
- 9) Bobechko WP, Hirsh C : Auto-immune response to nucleus pulposus in rabbit : *J Bone Joint Surg* 47B, 574-580, 1965
- 10) Gertzbein SD, Tail M, Gross A, Falk R : Autoimmunity in degenerative disc disease of the lumbar spine. *Orthop Clin North Am* 6(1) : 67-73, 1975
- 11) Jaffray D, O'Brein JP : Isolated intervertebral disc resorption. A source of mechanical and inflammatory back pain? *Spine* 11(4) : 397-401, 1986
- 12) McCarron RF, Wimpee MW, Hudkins PG, Laros GS : The inflammatory effect of nucleus pulposus. A possible element in the pathogenesis of low back pain. *Spine* 12(8) : 760-764, 1987
- 13) Olmarker K, Rydevik B, Nordborg C : Autologous nucleus pulposus induces neurophysiologic and histologic changes in porcine cauda equine nerve roots. *Spine* 18(11) : 1425-1432, 1993
- 14) DeLuca PF, Mason DE, Weiand R, Howard R, Bassett GS : Excision of herniated nucleus pulposus in children and adolescents. *J Pediatr Orthop* 14(3) : 318-322, 1994
- 15) DeOrto JK, Bianco AJ : Lumbar disc excision in children and adolescents. *J Bone and Surg* 64(7) : 991-996, 1982
- 16) Hasegawa T, An HS, Inufusa A, Watanabe R : The effect of age on inflammatory responses and nerve root injuries after lumbar disc herniation. an experimental study in a canine model. *Spine* 25(8) : 937-940, 2000
- 17) 西村徳光 : 動物実験の基本. 第1版. 新潟, 西村書店. 1986, pp39
- 18) Brisby H, Byrod G, Olmarker K, Miller VM, Aoki Y, Rydevik B : Nitric oxide as a mediator of nucleus pulposus-induced effects on spinal nerve roots. *J Orthop Res* 18(5) : 815-820, 2000
- 19) Okamoto Y, Nishida M : Cytokine balance in pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ikamen-ekigaku* 121(3) : 131-138, 2001
- 20) Ziegler K, Unanue ER : Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted



- antigen presentation to T lymphocytes. *J Immunol* 127(5) : 1869–1875, 1981
- 21) Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D : Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells. *Spine* 29(14) : 1508–1514, 2004
  - 22) Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson WF 3rd, Evans CH : Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, prostaglandin E<sub>2</sub>. *Spine* 21(3) : 271–277, 1996
  - 23) 門 知生 : 髄核の末梢神経に対する侵害作用. *川崎医学会誌* 27(1) : 59–65, 2001
  - 24) Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V : Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 113(2) : 147–156, 1998
  - 25) Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tanura F, Miyamoto Y, Maeda H : Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br J Cancer* 88(6) : 902–909, 2003
  - 26) Akaike T : Mechanisms of biological S-nitrosation and its measurement. *Free Radic Res* 33(5) : 461–469, 2000
  - 27) Chromek M, Tullus K, Lundahl J, Brauner A : Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 activates normal human granulocytes, protects transmigration during inflammation. *Infec Immun* 72(1) : 82–88, 2004
  - 28) Mostafa Mtairang E, Chollet-Martin S, Oudghiri M, Laquay N, Jacob MP, Michel JB, Feldman LJ : Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. *Cardiovasc Res* 49 : 882–890, 2001
  - 29) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL : Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136(7) : 2348–2357, 1986
  - 30) Greenstein JL, Foran JA, Gorga JC, Burakoff SJ : The role of T cell accessory molecules in the generation of class II-specific xenogeneic cytolytic T cells. *J Immunol* 136(7) : 2358–2363, 1996
  - 31) Pope M, Chung SW, Mosmann TR, Leibowitz JL, Gorczynski RM, Levy GA : Resistance of native mice to murine hepatitis virus strain 3 requires development of a Th1, but not a Th2, response, whereas pre-existing antibody partially protects against primary infection. *J Immunol* 156 : 3342–3349, 1996
  - 32) Lucey DR, Clerici M, Shearer GM : Type1 and type2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 9(4) : 532–562, 1996
  - 33) Sandmand M, Bruunsgaard H, Kemp K, Andersen-Ranberg K, Pedersen AN, Skinhoj P, Pedersen BK : Is ageing associated with a shift in the balance between Type 1 and Type2 cytokines in humans? *Clin Exp Immunol* 127 : 107–114, 2002