

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591893  
 研究課題名（和文） 脊椎外科手術における硬膜周囲癒着防止材の創生  
 研究課題名（英文） Creation of materials preventing adhesion around the dura mater in spine surgery.  
 研究代表者  
 原 慶宏（HARA NOBUHIRO）  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：00422296

研究成果の概要（和文）：生体内、特に脊髄硬膜周囲における癒着防止材料の開発を目的として、生体適合性の高い解離性ハイドロゲル（PMBV/PVA ゲル）を作製し、ラット脊髄硬膜周囲癒着モデルを用いた硬膜外癒着防止効果および神経障害の可能性について検討した。その結果、PMBV/PVA ゲルは神経を障害することなく、硬膜外の癒着を防止することが可能と判明した。本ゲルは今後脊椎手術における硬膜癒着防止材として実用化しようと思われる。  
 研究成果の概要（英文）：Biocompatible dissociative hydrogel (PMBV/PVA gel) is the materials which can be in use as preventing adhesion around the dura mater in spine surgery.

交付決定額

（金額単位：円）

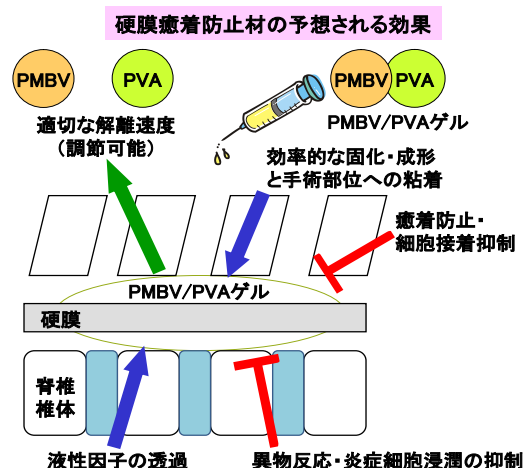
	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学  
 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学  
 キーワード：癒着防止材、脊椎手術

1. 研究開始当初の背景

高齢社会の到来に伴い、脊柱管狭窄症や椎間板ヘルニアに代表される脊椎変性疾患は増加の一途をたどっている。例えば、米国の統計では、毎年人口の1%が椎間板ヘルニアに罹患しているという報告がある。またわが国の平成16年度国民生活基礎調査によれば国民の有訴率の第1位は腰痛であることから、相当数の脊椎変性疾患罹患者がいると考えられている。脊椎変性疾患は進行するにつれて背部や上下肢の疼痛の増強や上下肢の筋力低下を生じるため、特に高齢者においてはADL・QOL低下の重要な原因と位置付けられている。また青壮年においてもこれらの疾患に

罹患すると長期間休業せざるを得ないケースが多く、この場合の社会経済的損失は計り知れないものがある。したがって、これらの



疾患への対策は社会的にも焦眉の課題となっている。

現在、脊椎変性疾患に対する治療は、鎮痛剤や各種ブロック治療、理学療法などの対症療法および、脊椎除圧術などの手術治療が一般的に行われている。手術治療は多くの場合良好な術後成績を示すものの、手術後数週間から数カ月の経過とともに再悪化する成績不良例は少なからず存在する。Burtonらは術後成績不良例の原因のうち6~8%に硬膜外の癒着性病変を認め、16%が癒着性クモ膜炎によるものだったとしている(*Clin Orthop*, 157, 191, 1980)。術中の硬膜周囲の操作に起因することが指摘されてはいるが、術中操作を極めて愛護的に実施した場合においても癒着性病変を認めることはある。また、手術時に既に硬膜周囲の癒着を認める症例では、硬膜と周囲組織の剥離操作を行ったとしても、手術後次第に癒着が再発し症状が悪化する症例がしばしば存在する。これらの癒着性病変はひとたび確立してしまうと、対症療法や手術により症状を改善することは困難であるため、硬膜周囲の癒着を防止することは整形外科・脊椎外科の領域において重要な課題である。このため、トロンビンベースの止血剤、酸化セルロース、ヒアルロン酸シート・ゲル、抗がん剤、炭化メチルセルロース・酸化ポリエチレングル複合体などを用いた癒着防止材の研究開発が行われてきたが、生体適合性や手術野での固定、生体内での解離や体外への排出などの問題があり、これまでに有効なものは実用化されていない。

## 2. 研究の目的

生体適合性の高い材料で硬膜周囲を被覆することができれば癒着を防止できると考え、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーに着目した。MPC ポリマーは研究分担者の石原らが開発した生体適合性材料で、細胞膜と同様の構造を有するため、生体内で異物として認識を受けず優れた生体適合性を発揮する(2000年 日本人工臓器学会技術賞受賞、2001年 日本バイオマテリアル学会賞受賞)(*Polymer J*, 22, 355, 1990)。また、MPC ポリマーは、液性因子の透過を妨げないこと、表面にタンパク質の吸着が起きないことが明らかになっており、これらの特質をいかし、様々な医療材料への応用研究が進んでいる(*Nature Mater*, 3, 829, 2004、*Clin Orthop Relat Res*, 453, 58, 2006、*Biomaterials*, 23, 1455, 2007) (8頁これまでに受けた研究費とその成果等に記載)。本研究では、このMPCを基盤として2液混合型の生体内解離性ハイドロゲル(PMBV/PVAゲル)の癒着防止材を創案した。これは、MPC・*n*-butyl methacrylate・*p*-vinylphenylboronic acidからなる三元系ポリマー

(PMBV)とpoly vinyl alcohol (PVA)の2液からなるものがある。2液のフェニルボロン酸基とポリオール化合物間の可逆的共有結合形成により自発的にゲル化し、粘性が高まり、手術部位に固定することができる。したがって術野に応じて瞬時に成型でき、持続して効果を発揮できる。また、ポリマーの分子設計によりゲルの解離時間を任意に制御することが期待できる。本研究の目的は、PMBV/PVAゲルを脊椎手術における硬膜癒着防止材として実用化するための基礎検討を完成させることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 癒着防止材の至適合成条件の検討

① PMBV ポリマーの合成：癒着防止材料として必要な条件として、a) 硬膜周囲への炎症細胞の浸潤を防止するためのバリアーとして機能すること、b) 材料自体に組織障害性がないこと、c) 硬膜周囲に望ましい期間残存すること、が挙げられる。PMBV/PVAゲル合成時の分子組成、分子量とその分布、疎水性・親水性ユニットの構造、ポリマー濃度などをパラメーターとして考え、これらの条件を獲得すると考えられる分子構造を検索する。

②ゲル調製の至適条件の決定：1)で形成したPMBV/PVAゲルをラット大腿筋組織に移植する。異物認識反応を評価するために7日後の異物巨細胞の出現を検討する。

### (2) *In vitro/vivo* 生体内モデルを用いた癒着防止材の物性評価

上記1.にて合成された各条件のPMBV/PVAゲルを用いて、癒着防止材料としての物性を下記①~③の実験系において評価する。

①ラット背部皮下での性状変化の観察による合成条件の検討：PMBV/PVAゲルの解離速度、微細構造、粘弾性の変化を検討するため、まず孔径0.22  $\mu\text{m}$ のmembraneを貼付したチャンバーに上記1.のパラメーターをふったゲルを封入し、ラット背側皮下に移植する。1、2、3、4週でゲルを回収し、以下の検討を行う。a) ゲルの残存状態による解離速度の評価、b) 走査型電子顕微鏡による微細構造の観察、c) レオメーターによる粘弾性の評価

②PBS内での重量変化率の測定による解離速度の検討：PMBV/PVAゲルの解離速度を定量的に検討するため、上記1.のパラメーターをふったゲルを上記2-1)と同様のチャンバーに封入し、細胞培養dishにいれたPBS

(pH=7.4)内に浸漬する。PBSは37℃で持続震盪し、24時間ごとに交換する。経時的(1、3、7、14日後)に各チャンバーの重量を測定し、重量減少率を解析することで解離速度の評価を行い、統計学的に検討する。

③脊椎硬膜周囲癒着モデルを用いた細胞接着抑制能の検討：癒着形成には線維芽細胞が

関与するといわれており、癒着を防止するためには線維芽細胞の脊椎硬膜周囲への侵入を防ぐことが必要と考えられる。そこで、PMBV/PVA ゲルが線維芽細胞の侵入を抑制するか否かを確認するため、細胞レベルでの検討を行なう。まず硬膜周囲癒着の *in vitro* モデルとして2層性細胞培養ディッシュを用い、下層に PMBV/PVA ゲルを充填し、上層に線維芽細胞の細胞株・NIH3T3 細胞を撒布する。撒布 24 時間後に下層へ侵入した細胞数をカウントし、さらに主な細胞接着分子である fibronectin、integrin ( $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ) の mRNA 発現量を real-time PCR にて定量的に評価する。下層にゲルを充填しない条件を対照群として比較検討し PMBV/PVA ゲルの細胞接着抑制能を評価する。

(3) ラット脊椎硬膜周囲癒着モデルを用いた癒着防止材の効果の検討

我々が開発したラット脊椎損傷モデルをもとに、ラット脊椎硬膜周囲癒着モデルを作製し、肉眼癒着評価、組織学的評価、画像評価、力学的評価（剥離強度試験）、生化学評価、神経学的評価を行い、癒着防止材の効果を検討する。

① ラット脊椎硬膜周囲癒着モデルの作成  
生後 7 から 8 週令（体重 200 から 220 g）の Sprague-Dawley (SD) ラットを使用する。腹腔内麻酔で全身麻酔を行った後、腹臥位で背側から侵入し第 1 腰椎 (L1) から第 4 腰椎 (L4) までを展開する。次に手術用顕微鏡下に電動ドリルとリュエルを用いて L1~L4 の椎弓切除を行い、硬膜背側を展開する。硬膜側面・前面の剥離操作を実施し硬膜表面の血管をバイポーラメスで焼灼する。実験動物は 2 群に分け、1 群は上記 1. 2. で条件を絞込んだ PMBV/PVA ゲルを硬膜周囲に注入し、他群は生理食塩水を硬膜周囲に注入した後に閉創する。手術後はゲージ内を自由に運動できるようにする。術後 4、6、8 週の群に分け、下記 2)~4) の検討を行う。

② 硬膜周囲癒着の肉眼的評価  
癒着程度の肉眼分類について Grade 0 (癒着なし)、1 (弱い引っ張り力ではがれる)、2 (中等度から強度の引っ張り力で剥離できる)、3 (鋭的な切除でのみ剥離できる) の 4 段階評価を行う。

③ 硬膜周囲の組織学的評価  
摘出した脊椎および硬膜から組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色によって組織学的に観察する。硬膜表面から癒着組織までの距離・硬膜の厚み・癒着中の炎症細胞数・クモ膜下腔の面積について測定する。同時に癒着防止材料の残存の有無・量についても評価する。

④ X 線および microCT 撮影による評価  
硬膜外腔に造影剤 (オムニパーク) を注入し、

X 線および microCT 撮影を実施し硬膜外腔の面積および形状を測定する。

⑤ 硬膜周囲癒着の力学的評価  
硬膜および周囲の癒着組織を強度測定装置の両端に設置し、最大破断強度を測定する。

⑦ 神経学的評価  
癒着防止材が脊髄・硬膜の治癒を妨げないことを確認するため、神経学的評価を行う。評価基準には、ラット後肢の運動機能評価を行う Basso, Bresnahan, and Beattie (BBB) open field locomotor rating score (*Experimental Neurology* 139, 244, 1996) と、30 分間の立ち上がり回数を使用する。

#### 4. 研究成果

1) ラット脊椎硬膜外癒着モデルの確立  
麻酔による術中・術後死例はなく、麻酔からの覚醒も安定していた。また手術中の中途覚醒はなく十分な麻酔深度が得られていた。手術用顕微鏡を用いた慎重な操作により、出血のコントロールも良好であり、手術行程を妨げたり、生命の危険が心配されたりするような出血量はなかった。また椎弓切除や硬膜の剥離操作において硬膜および脊髄神経の肉眼的損傷はなかった。

2) 硬膜周囲癒着の肉眼的評価  
コントロール群 n=12 における肉眼での観察では、術後 6 週および 8 週の時点において、硬膜周囲の癒着がみられ、鈍的剥離のみでは硬膜を周囲組織から遊離させることは困難で、剪刀による鋭的切離を必要とした。(図 1) 癒着の程度が比較的軽度であったものもあったが (図 2) 全例で何らかの癒着が確認できた。Grade 0 : 0 例、Grade 1 : 1 例、Grade 2 : 6 例、Grade 3 : 5 例

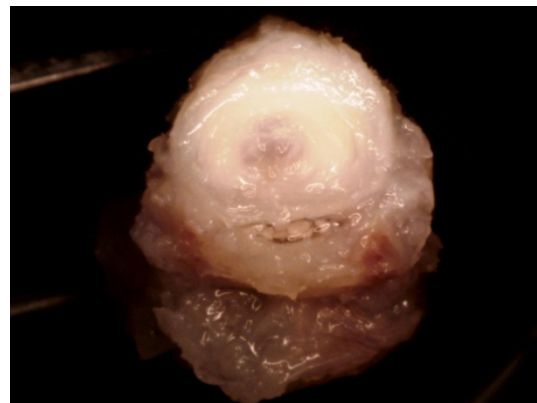


図 1. 硬膜周囲に高度の癒着が見られる：Grade 3 (コントロール群：術後 6 週)

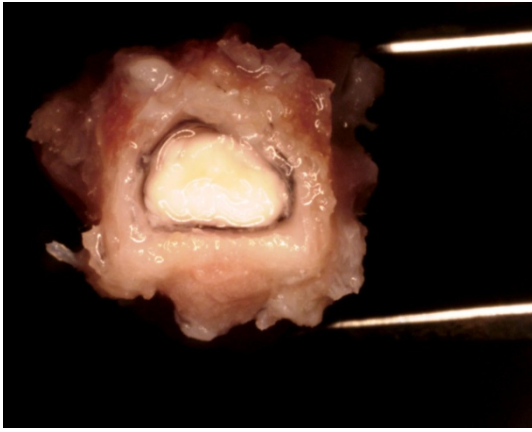


図 2. 比較的軽度の癒着 : Grade 1 (コントロール群 : 術後 8 週時点)

術後 4 週の時点では硬膜周囲に癒着の見られたものもあったが、癒着がほとんどないものもあり癒着モデルとしては適当でないと判断し、本研究では使用しなかった。

PMBV/PVA ゲル群 n=12 においても全例で何らかの癒着がみられたが、その程度はコントロール群と比較してやや軽度の傾向であった。(Grade 0 : 0 例、Grade 1 : 6 例、Grade 2 : 6 例、Grade 3 : 0 例)

### 3) 硬膜周囲の組織学的評価

コントロール群において術後 6 週および 8 週での組織学的評価を行ったところ、硬膜周囲の癒着および脊柱管の圧迫所見が見られた。椎弓切除を行った硬膜背側に肉芽組織が増生し脊柱管は圧排され扁平化していた。硬膜と肉芽組織との境界は不明瞭で高度に癒着している所見であった。(図 3) 強拡大では硬膜周囲に炎症細胞の浸潤および線維性組織の増生が見られた (図 4)

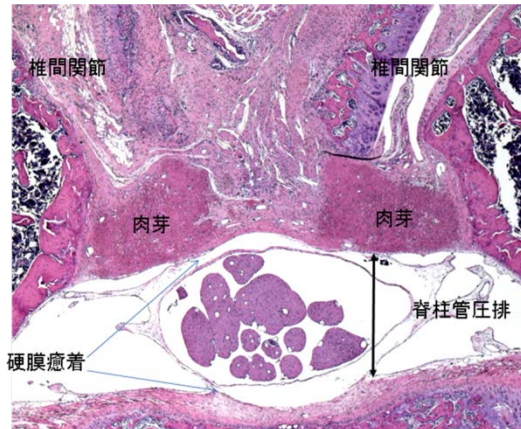


図 3. 硬膜周囲の肉芽形成および脊柱管の圧排あり (術後 6 週)

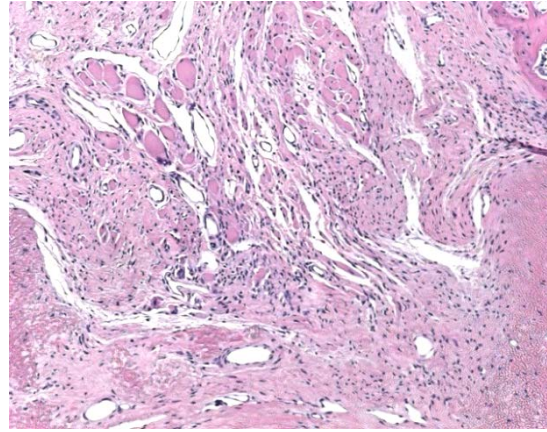


図 4. 硬膜周囲に線維性組織の増生および炎症細胞の浸潤あり (術後 6 週 : 強拡大)

術後 4 週の時点では椎弓切除部位の硬膜に癒着が見られたものと癒着が見られなかったものが混在した。

PMBV/PVA ゲル群において同様に術後 6 週および 8 週での評価を実施したところ、硬膜周囲の癒着および癒着形成は存在するものの、その層は薄く、組織内に多数の空胞形成がみられた。(図 5、6) この空胞は PMBV/PVA ゲルが存在していた部位とみられ、ゲルが脱出したために生じたと考えられる。また、空胞の上層には多数の炎症細胞および血管新生がみられたが、脊柱管との間には空胞が介在しているため、脊柱管の圧排は見られなかった。(図 7)

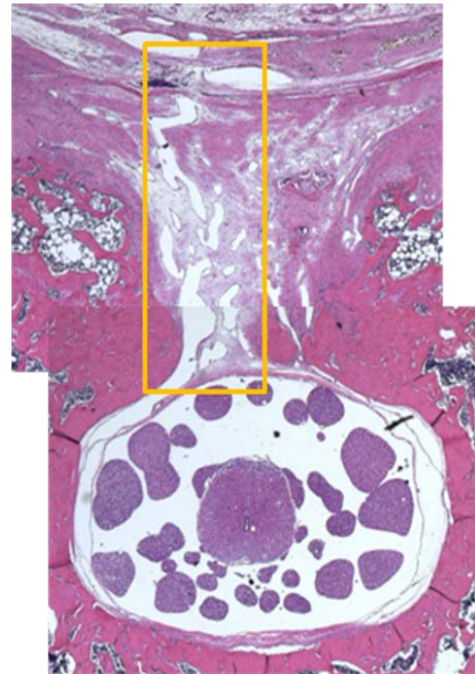


図 5. 硬膜上に多数の空胞形成あり。硬膜外の癒着は存在するも軽度 (PMBV/PVA ゲル群 : 術後 6 週)

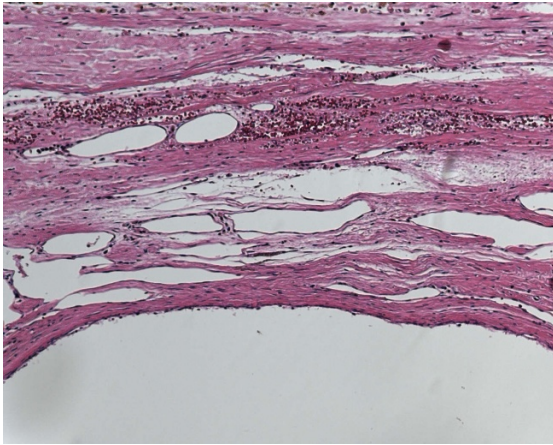


図 6. 硬膜上に空胞形成があり、その上層に炎症細胞浸潤がある (PMBV/PVA ゲル群: 強拡大: 術後 6 週)

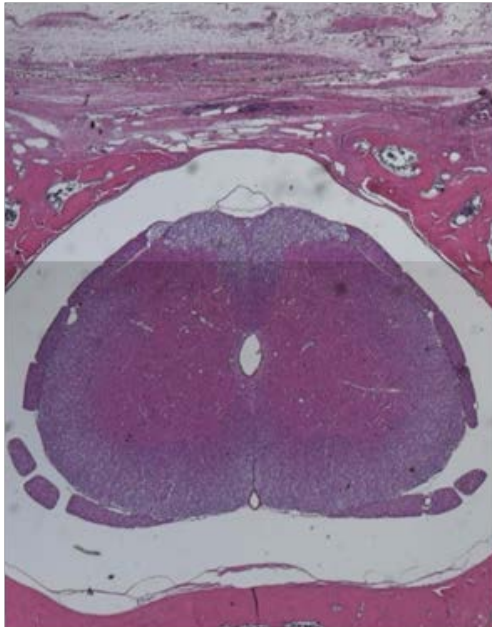


図 7. 周囲に癒着および癒痕形成はみられるが、硬膜の圧排所見はみられない (PMBV/PVA ゲル群: 術後 6 週)

癒痕中の炎症細胞数についてはゲル群がコントロール群と比較して有意に減少していた。また硬膜の厚みについては両群に有意差がなく、硬膜の菲薄化は生じないと考えられた。ゲルによる硬膜の損傷・硬膜周囲組織の異常所見・創部感染等は特にみられなかった。また、術後 6 週、8 週いずれの時点においても PMBV/PVA ゲルの残存はなかった。ただしどの時点で生体への吸収が始まり完了するかについては今後の検討を要する。

#### 4) 神経学的評価

PMBV/PVA ゲル群およびコントロール群の両群それぞれ統計学的に十分な個体数まで増やして評価したところ、いずれも、術翌日および術後 4 週、6 週、8 週の時点において BBB

score はいずれも 21 点であり神経障害は見られなかった。

#### 5) 硬膜周囲癒着の力学的評価

採取した組織の椎体および硬膜管をそれぞれエアチャックで把持し、遠位方向へ 10 mm/min の速度で硬膜と椎体とが破断するまで牽引し、最大破断強度を測定した。

コントロール群 n=3 および PMBV/PVA ゲル群 n=3 の両群において上記の方法にて牽引したところ、いずれの群においても、椎体と硬膜管との間の癒着はほとんどなく、最大破断強度は、両側の神経根の引き抜き強度とほぼ同等の強度であった。この強度は、癒着の全くない未手術のマウスにおける最大破断強度とほぼ同等であった。

今回の検討においてその組織学的評価から、硬膜の癒着は主に硬膜背側に存在し、硬膜腹側の椎体との癒着はほとんど生じていなかったことが判明した。そこで、次に背側の軟部組織と硬膜とを把持して同様の牽引試験を行ったが、背側の軟部組織の強度が牽引検査に耐えうるほどではなく、容易に破損を生じたため、正確な最大破断強度を得られることはできなかった。

すなわち硬膜と周囲の骨とを把持して張力かけるやり方では癒痕よりも硬膜の強度が弱いため途中で硬膜自体の破損が生じることが多く評価が不能であると考え、そこで硬膜それ自体を癒痕を付けたまま左右に張力かける方法で再度実験を行った。しかし本法においても両群間に有意差を見つけることはできなかった。

#### 6) X線および microCT 撮影による評価

X線および microCT 撮影を実施し硬膜外腔の面積および形状を測定では両群に有意差を認めなかった。

以上の結果は PMBV/PVA ゲルが神経を傷害することなく癒着を防止することを示唆するものであるが、癒着防止を定量的に確認するための力学的評価は十分とは言えない。しかしこれらの結果は PMBV/PVA ゲルの臨床応用に向けての研究開発を推進しうるものであると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) Kato S, Takeshita K, Matsudaira K, Tonosu J, Hara N, Chikuda H. Normative score and cut-off value of the Neck Disability Index. J Orthop Sci. 17: 687-693, 2012
- 2) Kato S, Ogiwara S, Maeda D, Matsudaira K, Fukushima M, Hara N, Yamauchi N, Nakamura K. Herniated Lumbar Disc with Calcium Deposition associated with

Epidural Gas. -A case report - J Spine Res. 3:172-175, 2012

3) Matsudaira K, Konishi H, Miyoshi K, Isomura T, Takeshita K, Hara N, Yamada K, Machida H. Potential Risk Factors for New-onset of Back Pain Disability in Japanese Workers: Findings from the Japan Epidemiological Research of Occupation-Related Back Pain (JOB) Study. Spine, 2012

4) Hara Y, Matsudaira K, Hara N, Oka H. A comparison of muscle strength testing for great toe extension. J Orthop Sci. 16:765-767, 2011

5) Hara N, Oka H, Yamazaki T, Takeshita K, Murakami M, Hoshi K, Terayama S, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H, Matsudaira K. Predictors of residual symptoms in lower extremities after decompression surgery on lumbar spinal stenosis. Eur Spine J 19:1849-1854, 2010

6) Matsudaira K, Hara N, Arisaka M, Isomura T. Comparison of physician's advice for non-specific acute low back pain in Japanese workers: advice to rest versus advice to stay active. Ind Health. 49:203-8, 2011

7) 原慶宏、竹下克志、竹林庸雄、山下敏彦、佐藤公昭、永田見生：腰部脊柱管狭窄症患者における神経障害性疼痛の頻度（多施設横断研究）。日本運動器疼痛学会誌 4：37-45 2012

8) 原慶宏、松平浩、増田和浩、森井次郎、竹下克志ほか：症候性の腰部脊柱管狭窄症患者における腰痛の実態—コントロール群との比較—。J. Spine Res. 2: 1064-1069, 2011

9) 松平浩、竹下克志、久野木順一、山崎隆志、原慶宏ほか：日本における慢性疼痛の実態 Pain Associated Cross-sectional Epidemiological (PACE) survey 2009. JP：ペインクリニック 32：1345-1356, 2011

10) 原慶宏、松平浩、寺山星、竹下克志、磯村達也、中村耕三：日本語版 Zurich Claudication Questionnaire (ZCQ) の開発：言語的妥当性を担保した翻訳版の作成。整形外科 61：159-165, 2010

[学会発表] (計 8 件)

1) 原慶宏、高橋孝喜ほか：整形外科手術における自己血クリオプレシビエートの使用実態：自己血輸血学会。東京 2012. 3

2) 原慶宏、松平浩ほか：日本語版 Zurich Claudication Questionnaire (ZCQ) の日本人標準値の測定：第 40 回日本脊椎脊髄病学会。2011. 4. Web開催

3) 原慶宏、山崎隆志ほか：多施設脊椎手術部位感染サーベイランスの試み：第 34 回

日本骨・関節感染症学会。兵庫 2011. 7. 8-9

4) 原慶宏、竹下克志ほか：腰部脊柱管狭窄症患者における神経障害性疼痛の頻度（多施設前向き研究）：第 4 回日本運動器疼痛学会。大阪 2011. 11. 19-20

5) 原慶宏、松平浩ほか：腰部脊柱管狭窄症患者における腰痛の詳細（コントロール群との比較）第 18 回日本腰痛学会。札幌 2010. 10. 30

6) 原慶宏、松平浩ほか：日本語版 Zurich Claudication Questionnaire (ZCQ) の妥当性の検証 第 18 回日本腰痛学会。札幌 2010. 10. 30

7) 原慶宏、松平、山崎隆志、森井次郎、増田和浩、寺山星、筑田博隆、竹下克志ほか：軟骨無形成症患者における胸・腰椎部脊柱管狭窄症の手術成績 第 39 回日本脊椎脊髄病学会。高知 2010. 4. 22-24

8) 原慶宏、松平浩、竹下克志ほか：本邦における腰痛有訴者の詳細—Pain Associated Cross-sectional Epidemiological (PACE) survey 2009. jpより— 第 17 回日本腰痛学会。東京 2009. 11. 21-22

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原 慶宏 (HARA NOBUHIRO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00422296

### (2) 研究分担者

茂呂 徹 (MORO TORU)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：20302698

石原 一彦 (ISHIHARA KAZUHIKO)  
東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号：90193341

竹下 克志 (TAKESHITA KATSUSHI)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：30262009

三浦 俊樹 (MIURA TOSHIKI)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：20376479

金野 智浩 (KONNO TOMOHIRO)  
東京大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授  
研究者番号：80371706

### (3) 連携研究者

なし