

## Chondroitinase ABC를 이용한 수핵용해술

연세대학교 원주의과대학 정형외과학교실

안재인 · 박진수 · 오덕일

### - Abstract -

### Chemonucleolysis using Chondroitinase ABC

#### -An Experimental Study-

Jae-In Ahn, M.D., Jin-Soo Park, M.D. and Duck-Il Oh, M.D.

*Department of Orthopedic Surgery, Yonsei University Wonju College of Medicine*

Chymopapain and collagenase are well known chemonucleolytic agents for lumbar disc herniation. However, these enzymes have serious problems occasionally, such as severe neurotoxicity or anaphylaxis even fatal to patients. Chondroitinase ABC, a metabolic product of *Proteus vulgaris*, has a specific action on the proteoglycans of the nucleus pulposus, but rarely no effect on the intrathecal nerve tissues of vessels.

Seventy eight rabbit lumbar discs were evaluated radiographically and histologically after injection of chondroitinase ABC 40U/ml per disc and compared with buffer injected group and noninjected control group. There was considerable disc space narrowing of the chondroitinase ABC injected group which was verified radiographically and histologically ( $p < 0.01$ ). A zone of Safranin O depletion was present in the ventral annulus fibrosus adjacent to the nucleus pulposus in all treated discs, indicating proteoglycan loss. On electron microscopic findings there were collapse of chondrocytes and notochordal cells. All of these findings are corresponding to the evidence that chondroitinase ABC may be another chemonucleolytic agent by decreasing disc volume and thereby decompressing spinal cord or nerve roots. All histologic effects of chondroitinase ABC were confined to intervertebral disc tissues. Chondroitinase ABC deserves to be a study object for the alternative of chemonucleolysis.

**Key Words :** Chemonucleolysis, Chondroitinase ABC

※ 본 논문의 요지는 1993년 4월 대한정형외과학회 춘계 학술대회에서 구연되었음.

※ 이 논문은 1993년도 연세대학교 원주의대 학술연구비에 의하여 연구되었음.

## 서 론

Chymopapain이나 Collagenase를 이용한 수핵 용해술은 요추 추간판탈출증에서 후궁판절제술과 수핵제거술(laminectomy and discectomy)등의 수술적치료를 대신할수있는 치료방법의 하나로 인정되고 있다.

하지만, 이러한 효소들은 이따금씩 문제를 일으키는 것으로 보고되고 있는데<sup>31, 32)</sup>, Chymopapain으로 인한 부작용으로는 신경독작용(neurotoxicity)과 전신적인 과민반응 등이 보고되고 있으며<sup>1, 5, 6, 8, 10, 13, 27, 34)</sup>, Collagenase는 주입후 심한동통(post-injection pain)과 신경독작용 및 수핵의 구조의 용해등을 일으킨다고 한다<sup>2, 7, 11, 24, 28, 34)</sup>. 따라서, 수핵용해술에서 사용가능한 다른 대체효소의 필요성이 대두되었으며<sup>23)</sup>, 이번 연구는 chondroitinase ABC<sup>16, 34)</sup>에 중점을 두었다.

Chondroitinase ABC는 *Proteus vulgaris*의 대사산물로서, 수핵의 proteoglycan에 선택적으로 작용하며, proteoglycan molecule의 주요부분을 차지하는 chondroitin-4-sulfate, chondroitin-6-sulfate 그리고 dermatan sulfate를 거의 완전하게 용해시킨다<sup>23, 34)</sup>. 반면에 chymopapain은 chondroitinase ABC에 비해 비특이적으로 작용하며 단지 proteoglycan의 central protein chain만을 자른다고 하며, 더우기 다른 비교원성 단백질까지<sup>14)</sup> 용해시켜서 요추 추간판탈출증의 치료에 있어 이용범위가 매우 제한되게 하였다.

Chondroitinase ABC는 척수강내 신경조직이나 혈관에 대한 영향이 밝혀진바 없고, 따라서 이는 보다 광범위한 임상적이용 가능성을 시사한다고 할수 있다<sup>25, 26)</sup>.

본 연구의 목적은 정상토끼의 요추간판에 대한 chondroitinase ABC의 영향을 조직학적, 조직화학적 분석과 방사선상으로 요추간강의 협착을 계측하여, 앞으로의 임상 응용에 대한 지식을 얻고자 함이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험재료로는 10-12개월 된 20마리의 척추 추간판이 파괴되지 않은 한국산 흰토끼를 사용하였으며 몸무게는 평균 300g 이었다.

### 2. 수술방법

pentobarbital sodium(Entobar, 10mg/kg)으로 근육 주사하여 마 한후에, 측와위에서 요추부 및 복부를 면도한 후에 povidone-iodine으로 소독하였다.

사행의 복부 절개로 후복막 도달법을 시행하여 두부 쪽으로 향해 있는 요추의 횡돌기를 제거하고 추간강을 노출시켰다.

섬유륜(annulus fibrosus)에 손상을 주지않도록 주의하며 정중앙에서 28gauge 주사바늘을 사용하여 추간강 내 주입을 시행하였다.

제 1-2요추간부터 제 6-7요추간강까지 각각의 토끼에서 다음과 같은 시약 0.05ml-0.10ml를 한마리당 4개에서 6개의 척추간강내에 주입하였다.

(1) 0.05M phosphate buffered solution pH 7.2(N=21)

(2) 40U/ml chondroitinase ABC(Sigma)(N=27)

phosphate buffer 용액은 chondroitinase ABC의 dilution을 위해 사용하였으며 31례의 주입하지 않은 추간판은 대조군으로 사용하였다.

22 gauge 주사바늘 끝을 추체에 고정하여 방사선학적인 지표로 삼았다. 수술후 매일 신경학적 및 이학적 검사를 시행하였으며, 각각의 토끼를 수술후 2일과 1주에 나누어, 과량의 Entobar를 주사하여 희생시켰다.

### 3. 방사선학적 계측

수술전 요추부측면 방사선을 촬영하여 정상 방사선상 구조와 추간강의 폭을 측정하였다. 수술직후 측면방사선을 촬영하였고, 제 3-4요추간에 쏠점을 두어, 방사선의 divergence와 추간강의 인위적인 협착소견을 피하도록 노력하였다.

이러한 사진은 술후 2일, 1주에 다시 촬영하였으며 모든촬영은 magnification error를 줄이기 위하여 tube로 부터 같은 거리에서 시행하였다.

추간판 폭의 변화비율을 구하기 위해 아래와 같은

$$\text{폭 변화율}(\%) \Delta w = \frac{(L_A + L_P) - (L_{A'} + L_{P'})}{L_A + L_P} \times 100$$

공식을 사용하였다.

$L_A$ 와 $L_{A'}$ 는 각각 인접한 추체의 술전, 술후의 전방높이 이고,  $L_P$ 와 $L_{P'}$ 는 각각 술전과 술후 후방 높이이다(Fig. 1).

**Table 1.** Number of discs involved in experiments

Delay in days (Injection to examination)	2days	7days
Number of disc for radiographic examination	39	40
Number of discs for histologic examination		
control group	15	16
Buffer group	11	10
Enzyme group	13	14

하였다.

수핵과 섬유륜과의 이행부를 정상 추간판과 chondroitinase ABC를 주입한 추간판에서 각각 분리하여 전자현미경적 검사를 위해 1mm<sup>2</sup> 크기로 떼 내어 4% glutaraldehyde로 4시간동안 고정한 후 다시 1% osmium tetroxide로 2시간동안 고정한 후 ethanol로 탈수하였다. 이렇게하여 얻어진 조직은 epoxy resin mixture에 심어 절삭하여 uranyl-acetate와 lead citrate로 염색하여 전자현미경(JEOL 1200-ZXII, Japan)으로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 방사선적 소견

20마리 토끼에서 20례의 척추를 방사선학적으로 계측하였다. 실험적 범주와 조사된 기간에 따른 분류는 표 1에 도시되어 있다.

contingency table method를 사용한 초기 방사선적 분석에서 sample source는 특이한 차이를 보이지 않았다.

Chondroitinase ABC주입군과 Saline을 주입한 대조군에서 각각의 가토에서 주입한 추간판의 level이 서로 다르기에, matched pair분석을 이용한 방사선적 계측을 하였다.

Paired student t-test를 이용하여 분석한 결과, 완충용액 주입군에서 추간판의 폭(intervertebral disc width)은 술후 2일째 약간 증가하였다(술전 2.1mm-술후 2.3mm; 8.7%증가), 술후 7일 째에 술전 범위로 회복 되었다.

Chondroitinase ABC를 주입한 군에서는 술후 2일째 추간강 폭의 증가가 관찰되지 않았으며(술전 2.1mm-술후 2.0mm), 술후 7일에 주목할만한 감소가 있었다(술전 2.1mm-술후 7일 1.0mm; 52%감소)(p

**Fig. 1.** Radiographic measurement of disc space width.

$$\% \text{change in width } \Delta w(\%) = \frac{(L_A + L_P) - (L_{A'} + L_{P'})}{L_A + L_P} \times 100$$

### 4. 조직학적 계측

요추부를 harvest하여, 추간판을 분리하여 10% neutral buffered formalin으로 고정하고, 탈석회화후 microtome을 사용, 6μm 두께로 절삭하였다. hematoxylin-eosin 염색과 saframin-O fast green(SOFG)염색을 하여, 형태와 추간판내 proteoglycan과 교원조직량을 광학현미경 하에서 조사

<0.01) (Fig. 2).

## 2. 조직학적 소견

토끼의 정상 추간판에서는 수핵과 섬유륜이 명확하게 구분되었다. 다수의 척삭세포가 수핵에서 관찰되었으며, 섬유륜은 섬유조직과 적은수의 방추형 모양의 연골세포로 구성되어 있었다(Fig. 3, 4, 5).

Chondroitinase ABC를 주입한 모든 추간판에서 Eurell 등에 의해 명명된 "halo zone"이 전방섬유륜의 수핵주변부위에 바로 인접하여 있는 소견이 관찰되었으며, 감소된 safranin-O 염색 소견을 보였다(Fig. 3).

Chondroitinase ABC를 주입한 추간판에서 술 후 2일째 수핵의 농축을 동반한 추간판 폭의 감소가 몇례에서 관찰되었으며, 술 후 7일째에는 더욱 명확하게 관찰되었다.

수핵내의 세포괴사는 술 후 2일째 모든예에서 관찰되었다(Fig. 3, 4).

술 후 7일째까지의 관찰결과 세포괴사는 섬유륜까지 혹은 그이상으로는 진행되지 않았다(Fig. 5).

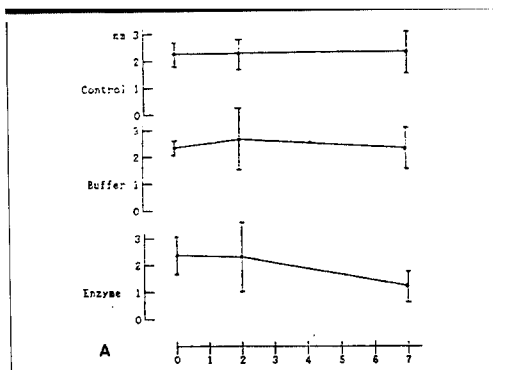
수핵의 Safranin-O염색시에 반점양상을 보이며

세포보다 기질에 더 강하고 고르게 염색되었다. Chondroitinase ABC를 주입한 군에서의 세포핵과 세포주변은 술 후 2일째에 염색되지 않았고 이러한 변화는 술 후 7일째에 더욱 광범위해지고 명확해졌고, 섬유륜의 내측면도 어느정도 염색의 감소가 보였다. 섬유륜은 chondroitinase ABC 주입군, 완충용액 주입군, 비교군에서 모두 강한 호염기성인, 방추형의 정상적인 세포모양을 나타냈다(Fig. 5).

## 3. 전자현미경 소견

토끼의 정상적인 추간판에서는 척삭세포들이 특징적으로 진하게 염색되는 핵과 밀집된 세포질내의 큰 공포가 보였다. 연골세포는 척삭세포 보다 작으며 따로따로 떨어져 있다. 또한, 넓게 염색되는 핵을 가지며 halo와 비슷한 territorial matrix에 의해 둘러싸여있었다.

Chondroitinase ABC 주입 후 7일째에 연골세포의 territorial matrix는 두께와 밀도가 모두 감소되었으며(Fig. 6), 이러한 소견은 연골기질이 chondroitinase ABC에 의해 분해되었음을 시사하였다. 세포기질내의 공포의 출현은 세포의 퇴행성



**Fig. 2-A.** Change in lumbar disc width(mm mean S.D.) at 2 days and 7 days is shown for each treatment group.

**B.** Lateral radiograph of Rabbit spine with relative even space of intervertebral discs.

**C.** Seven days after CABC 40 U injection. There are definite narrowings of enzyme injected disc spaces compared with control or buffer injected disc, where C means control group, B means buffer injected group, and E means CABC injected groups.

**Fig. 3.** Low power photomicrographs of discs.

- A.** Low power photomicrograph of normal rabbit disc showing well defined nucleus pulposus and annulus fibrosus and deep staining of proteoglycan(safranin O,  $\times 20$ ).  
**B.** CABC 40 U injected discs, 7 days postinjection. More large halo formation, dense condensation of nucleus, more narrowing of disc space and loss of stainings are seen(Safranin O,  $\times 20$ )

**Fig. 4.** Medium and High power photomicrographs of discs.

- A.** Control discs showing uniform cellular distribution in the matrix of nucleus pulposus(Safranin O  $\times 100$ ).  
**B.** CABC 40 U/ml-injected disc. Note the irregular cellular distribution & dense condensation of cells due to depletion of intercellular peptidoglycan matrix of nucleus pulposus(Safranin O  $\times 100$ )

변화를 의미하며, halo로 싸인 위축된 세포도 볼수 있었으며 이는 연골세포의 괴사를 시사하였다. 광학 현미경 하에서도 볼수있듯이 척삭세포는 정상외 그것과 모양이 달랐으며 이는 퇴행성 변화를 의미한다고 할수있다. 전자현미경소견으로 퇴행된 척삭세포와 연골세포를 구별하기는 어려웠다.

## 고 찰

Chondroitinase ABC는 1968년 Yamagata에 의해 *Proteus vulgaris*에서 분리된 효소이다. 이

효소는 keratan sulfate, heparan과 heparan sulfate를 제외한 모든 GAG에 작용한다. 이 효소는 GAG을 glucuronic acid와 N-acetylgalactosamine 또는, N-acetylglucosamine을 포함한, 여러개의 불포화 이당류(unsaturated disaccharides)로 분리한다<sup>9,12,15,19,29)</sup>.

추간판의 연골기질은 다량의 수분을 함유한 collagen과 proteoglycan의 망상구조로 구성되어 있다<sup>9)</sup>. 이런 사실에 비추어 보면, chondroitinase ABC는 선택적으로 proteoglycan의 다당류 고리에 작용하므로 수핵용해술에의 이용을 고려할 수 있다

**Fig. 5.** Cells from the ventral annulus near the nucleus pulposus.

- A. Uninjected control disc which shows regular concentric distribution of cells & collagen fibers(Safranin O,  $\times 100$ ).  
B. CABC injected disc. There are slight distribution of fibrillar distribution but rarely difference compared with normal disc(Safranin O,  $\times 100$ )

droitinase ABC가 수핵의 proteoglycan의 major glycosaminoglycan component를 분해 시킬 수 있음이 보여졌고 이러한 과정으로 chondroitinase ABC는 술후 7일째에 proteoglycan content와 수핵 양의 주목할만한 감소에 영향을 나타냈다. 이 과정은 진행성으로 생각되며 술후 2일째에는 부분적인 반응을 나타내었다<sup>23)</sup>.

효소를 주입한 추간판 혹은 완충용액을 주입한 추간판의 분포는 균등하였고, 비주입군의 경우는 안전한 외과적 접근의 제한으로 인해 요추의 한쪽으로 치우친 경향이 있다. 이는 어느정도의 분산에 대한 설명이 될수 있다<sup>20, 23)</sup>.

술전과 술후의 방사선 분석에 의하면 추간판 폭의 변화를 보여준다. 완충용액 주입군에서는 술후 2일째에 부피의 증가를 보여 주었고, 효소주입군에서는 술후 2일째에도 특별한 변화가 없었다. 완충용액 주입군에서는 후에 정상범위로 돌아왔지만, 반면에 효소주입군에서는 유의할만한 감소를 보였다<sup>23)</sup>.

Chondroitinase ABC 주입군 추간판의 조직학적 변화는 술후 2일째의 경우는 다양하였으며, 술후 7일째에는 일정한 양상을 보였다. 후자의 경우는 간질조직에서 proteoglycan의 소실이 safranin-O 염색에 의해 증명되었다. 이러한 변화들은 chymopain주입후에 생기는 변화와 유사하며<sup>4, 5, 6, 17, 18, 19)</sup>, 하지만 chondroitinase ABC의 경우 효소의 작용영역이 술후 7일째에도 수핵내부에만 국한되어 있다는 점이 중요한 점이다<sup>23)</sup>.

**Fig. 6.** Collapsed & destroyed chondrocyte in electro-microscopic findings of the postchemonucleolytic nucleus pulposus whth CABC(uranylacetate & lead citrate,  $\times 6,000$ )

고 하겠다.

Proteoglycan의 다당류 고리의 분해는 추간판의 연골기질의 분해, 수분의 감수, 그리고 추간판 내압의 감소등을 가져올수 있다<sup>9)</sup>. 이번 연구에서 chon-

Kato<sup>9)</sup> 등에 의하면 chondroitinase ABC는 chymopapain 처럼 수핵용해술에 효과적이라고 하며, chondroitinase ABC에 의한 것이 chymopapain에 의한 수핵용해술 보다 약하다고 보고하였다<sup>9)</sup>. 수핵용해술의 초기단계에서 chymopapain은 수핵을 거의 완전히 괴사시키는데 반해 chondroitinase ABC의 작용은 주로 기질에 국한되어 나타난다. 비록 수핵내의 세포들에서 부분적인 퇴행이 일어나지만 많은 수의 세포들은 남아있게 된다<sup>9, 17, 18)</sup>. 수핵용해술의 초기단계에 chymopapain에 의해 연골단판의 연골기질이 분해되는데, chondroitinase ABC의 경우 형태적인 변화를 보이지는 않는다<sup>4, 9, 33)</sup>.

여러 저자들에 의해 chondroitinase ABC 주입 후의 생화학적인 변화에 대해 보고된 바 있으며<sup>3, 9, 22, 23)</sup>, Henderson에 의하면 비교군과 비교한 결과에서 수핵내 수분함량을 일정하게 유지하면서 중량과 건조중량 모두 감소하는 양상을 보였다고 하며 수핵 양의 감소를 보인다고 보고하였다. 또한 주입 후에 proteoglycan 양의 직접적인 지표가 될수있는 hexuronic acid의 감소가 보였다고 한다<sup>23)</sup>. 효소 주입후 12주 내에 GAG 양의 회복이 chymopapain 주입군에서 약 50%이하인데 반해서, chondroitinase ABC 주입군에서는 거의 정상범위로 회복된다고 한다<sup>9, 33)</sup>.

정확한 수핵용해술의 기전은 아직 알려져있지 않고 있으며, 많은 저자들은 chymopapain이 proteoglycan을 가수분해 시키고 추간판 성분을 용해시켜 추간판 내압을 떨어뜨리는 것으로 보고하고 있다<sup>4, 6, 9, 30)</sup>. Collagenase의 경우, Brown, Sussman<sup>6)</sup>과 Sussman, Man<sup>6)</sup> 등은 collagen의 용해에 의해 추간판내압이 감소한다는 사실에 대해 의견을 제시하였다.

만약 수핵용해술의 작용기전이 추간판내압의 감소와 연이은 수핵의 재생과정 이라면, GAG에 대해 선택적이 작용을 나타내는 chondroitinase ABC는 수핵용해술에 사용될수 있다.

Chondroitinase ABC를 이용한 수핵용해술의 초기과정에서, 이 효소적 분해는 추간판 기질중의 GAG에 국한되어 작용하고 수핵내의 연골세포에는 미약한 영향을 준다고 하며, 따라서 남은 다량의 연골세포에 의해 즉시 새로운 기질을 합성 할수있을 것으로 기대할수 있다. 일반적으로 수핵용해술의 초

기과정에서는 기질의 분해와 용해에 의한 추간판 내압의 감소와 남은 세포들에 의한 즉각적인 새로운 기질과 수핵의 합성이 중요하다.

Chondroitinase ABC는 기질의 분해와 용해에 의해 추간판 내압을 감소시킬 뿐만 아니라 남은 연골세포가 즉시 새로운 기질을 합성하도록 유도한다.

이러한 새로운 기질의 초기 합성은 초기 수핵재생이 용이하게 해준다<sup>9, 18, 21)</sup>.

Chondroitinase ABC의 proteoglycan에 작용은 chymopapain 보다 더욱 선택적이다. 비록 이번 연구에 수핵 용해작용에 대해 연구되었지만, chymopapain과 비교하여 chondroitinase ABC의 특징이나 잇점등에 대해서는 아직 더 많은 연구가 필요하다.

Core protein의 보존으로 proteoglycan과 수핵의 재생이 가능한 것으로 보이며, 이번연구에서 사용된 정도의 효소용량으로 신경독작용이나 과민반응은 관찰되지 않았으며 앞으로의 임상이용을 위해 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Agre K, Wilson PR, Brim M, McDermott DJ : *Chymodiactin postmarketing surveillance. Spine*, 9 : 479-485, 1984.
- 2) Artigas J, Brock M, Mayer HM : *Complications following chemonucleolysis with collagenase. J. Neurosurg.*, 61 : 679-685, 1984.
- 3) Bernard JS : *Experimental intervertebral discolysis. A critique of collagenase and chymopapain applications. Clin. Orthop.*, 80 : 181-190, 1971.
- 4) Bradford DS, Cooper KM, Oegema TR : *Chymopapain, chemonucleolysis, and nucleus pulposus regeneration. J. Bone & Joint Surg.*, 65-A : 1220, 1983.
- 5) Branemark PI, Ekholm R, Lundsroeg J, Hirsch C : *Tissue response to chymopapain in different concentrations. Clin. Orthop.*, 67 : 52-67, 1969.
- 6) Brown MD : *Intradiscal therapy-chymopapain or collagenase. Year Book Medical Publishers, Chicago pp123*, 1983.
- 7) Brown MD, Tompkins JS : *Pain response post-chemonucleolysis or disc excision. Spine*, 14 : 321-326, 1989.

- 8) Dyck P : *Paraplegia following chemonucleolysis. A case report and discussion of neurotoxicity. Spine, 10 : 359-362, 1985.*
- 9) Fumihiko K, Hisashi I, Kentarou M, Takayuki M : *Experimental chemonucleolysis with chondroitinase ABC. Clin. Orthop., 253 : 301-308, 1990.*
- 10) Garvin PJ, Jennings RB, Smith L, Gesler RH : *Chymopapain. A pharmacologic and toxicologic evaluation in experimental animals. Clin. Orthop., 41 : 204-223, 1965.*
- 11) Garvin PJ : *Toxicity of collagenase. The relation to enzyme therapy of disc herniation. Clin. Orthop., 101 : 286-291, 1974.*
- 12) Gesler RM : *Pharmacologic properties of chymopapain. Clin. Orthop., 67 : 47-51, 1969.*
- 13) Grammer LC, Schafer M, Bernstein D, et al : *Prevention of Chymopapain anaphylaxis by screening chemonucleolysis candidates with cutaneous chymopapain testing. Clin. Orthop., 221 : 202-206, 1987.*
- 14) Heinegard D, Paulsson M : *Extracellular matrix biochemistry edited by KA Diez. AH Reddi. New York, Elsevier, pp. 277-328, 1984.*
- 15) Iwata H : *The determination and the fine structure of chondroitin sulfate isomers of human cartilage and pathological tissue. J. Jpn. Orthop. Assoc., 43 : 455, 1969.*
- 16) Jo ACE, Mark DB, Maria R : *The effects of chondroitinase ABC on the rabbit intervertebral disc. A roentgenographic and histologic study. Clin. Orthop., 256 : 238-243, 1990*
- 17) Kato F, Iwata H, MiMatsu K, Miura T : *Chemonucleolysis with chondroitinase ABC, comparative study with chymopapain. Orthop. Trauma Surg., 31 : 63, 1988.*
- 18) Kikuchi T, Shinmei M, Yamagishi M, Fujita K, Nemoto O, Shimomura Y : *Effects of chymopapain(Discase) on cultured disc cells of immature rabbit. J. Jpn. Orthop. Assoc., 61 : S35, 1987.*
- 19) Krempen JF, Minning D, Smith BS : *Experimental studies on the effects of chymopapain on nerve root compression caused by intervertebral disc material. Clin. Orthop., 106 : 336-349, 1975.*
- 20) Lewis, R.E. : *Roentgen signs of spine. Vet. Clin. North Am., 4 : 647-661, 1974.*
- 21) McCulloch JA, Macnab I : *Sciatica and chymopapain. Williams & Wilkins, Baltimore, 1983.*
- 22) Neil K, Steven PA, Frederick K : *The comparative biochemical, histologic, and radiographic analysis of canine lumbar discs treated by surgical excision or chemonucleolysis. Spine, 10 : 178-183, 1985.*
- 23) Nigel H, Victor S, Jean O : *Nucleolysis of the rabbit intervertebral disc using chondroitinase ABC. Spine, 16 : 203-208, 1991.*
- 24) Olmarker K, Rydevik B, Dahlin LB, Danielsen N, Nordborg C : *Effects of epidural and intrathecal application of collagenase in the lumbar spine : An experimental study in rabbits. Spine, 12 : 477-482, 1987.*
- 25) Olmarker K, Danielsen N, Nannmark V, Sennerby L, Rydevik B : *Microvascular effects of chondroitinase ABC and chymopapain. An in vivo experimental study on hamsters and rabbits. Clin. Orthop., 257 : 274-279, 1990.*
- 26) Olmarker K, Danielson N, Nordborg C, Rydevik B : *Effects of chondroitinase ABC on intrathecal and peripheral nerve tissue. An in vivo experimental study on rabbits. Spine, 16 : 43-45, 1991.*
- 27) Peter D : *Paraplegia following chemonucleolysis. A case report and discussion of neurotoxicity. Spine, 10 : 359-362, 1985.*
- 28) Rydevik B, Brown MD, Ehira T, Nordberg C : *Effects of collagenase on nerve tissue. An experimental study on acute and long-term effects in rabbits. Spine, 10 : 562-566, 1985.*
- 29) Saito H, Yamagata T, Suzuki S : *Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfate. J. Biol. Chem., 243 : 1536, 1968.*
- 30) Smith L, Garvin JP, Gesler RM, Jennings RB : *Enzyme dissolution of the nucleus pulposus. Nature, 198 : 1311-1312, 1963.*
- 31) Sussman BJ : *Intervertebral discolysis with collagenase. J. Natl. Med. Assoc., 60 : 184, 1968.*



- 32) Sussman BJ, Mnn M : *Experimental intervertebral discolysis with collagenase. J. Neurosur., 31 : 628, 1969.*
- 33) Takata S : *Chemonucleolysis-an experimental histopathological study, J. Jpn. orthop. Assoc., 64 : 427, 1988.*
- 34) Thomas RF, Jo ACE, Ann LG, Mark DB, John ML, David JS : *Radiographic and histologic effects of chondroitinase ABC on normal canine lumbar intervertebral disc. Spine, 16 : 816-819.*
- 35) Yamagata T, Saito H, Habuchi O, Suzuki S : *Purification and properties of bacterial chondroitinase and chondrosulfatases. J. Biol. Chem, 243 : 1523, 1968.*