

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591796
 研究課題名（和文） 同系ラット慢性疼痛モデルに対する骨髄幹細胞移植の効果
 研究課題名（英文） The effect of bone marrow stem cell transplantation for chronic pain model in the rat
 研究代表者
 皿田 和宏（SARADA KAZUHIRO）
 広島大学・病院・理学療法士
 研究者番号：20423353

研究成果の概要：

複合性局所疼痛症候群(Complex Regional Pain Syndrome:以下CRPS)の実験系としてラットの疼痛過敏モデルであるChungモデルを作製した。Chungモデルを無作為に骨髄細胞移植群と対照群に分けた。骨髄細胞移植群には骨髄幹細胞を、対象群には生理食塩水をくも膜下腔に注入した。注入後から痛覚過敏の評価を経時的に実施した。経時的な疼痛抑制効果において、有意に骨髄幹細胞移植群で痛覚過敏の早期低下を認めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：CRPS, 骨髄幹細胞移植, 神経因性疼痛, 慢性疼痛

1. 研究開始当初の背景

複合性局所疼痛症候群(Complex Regional Pain Syndrome:以下CRPS)は説明のできない痛覚異常やallodynia、血流変化、浮腫、関節拘縮を主症状とする原因不明の難治性疾患である。CRPSに対して薬物療法や神経ブロック、物理療法、心理療法などが行われるが、標準的で確実な治療法はない。CRPSの発症機序は最近まで不明であったが2003年Tsudaらが脊髄内microgliaのP2X4レセプター異常によりCRPSの痛覚過敏allodyniaを生じることを発見し、CRPSは神経因性疼痛である事が確認された。以後、

CRPSの治療として、P2X4レセプターやmicrogliaの機能是正が研究されており、CRPSの原因として脊髄の機能異常が問題となっている。

Tateishiらは、虚血肢に自家骨髄幹細胞移植を行った症例で疼痛が軽減することを示しており、この理由として幹細胞から産出されるサイトカインによる作用と推測しているが、明確な鎮痛機序は不明である。Hessは幹細胞が損傷された細胞に融合し細胞機能を刷新・改善することを示しており、骨髄幹細胞が損傷された神経細胞に融合し、機能障害を改善することが予測される。

我々は、CRPSモデルを作製し下肢筋肉内に自家骨髄幹細胞を注入する先行研究を行ったが、ラットの疼痛に関する行動学的評価で有意差を認めなかった。この理由として注射部位の問題があった。臨床で下肢筋肉内に注射し除痛効果が得られたため、実験でも筋肉内注射を選択したが、病因論的には脊髄近傍に注射すべきであった。この結果を踏まえて、骨髄幹細胞を脊髄内、特にくも膜下腔に移植することで疼痛過敏の早期改善に至るのではないかと推察された。

2. 研究の目的

CRPSは難治性で、外傷だけでなく注射や手術などの一般医療によっても発症し、発症原因から説明できないほど重篤となるため医療訴訟になることもある。本研究では、CRPSに対する骨髄幹細胞移植の疼痛抑制効果を検証する。

- ①CRPSの実験系として同系LewisラットによるChungモデルを作製する。
- ②他の同系ラットの骨髄から骨髄幹細胞を採取し、Chungモデルのくも膜下腔に骨髄幹細胞を移植する実験系を確立する。
- ③疼痛抑制効果をラットの行動学的分析によって経時的に評価する。

3. 研究の方法

(1)同系Lewisラット (LEWラット) を用いた Chungモデルの作製。

ネブタール腹腔内注射による麻酔施行後、腹臥位にて体幹中央から殿部周囲までを剃毛し、第4～6腰椎棘突起左側に沿って皮膚および筋を切開した。第5腰椎横突起を露出させた後、これを切除し第5腰椎神経を同定した。5-0絹糸にて一カ所をしっかりと結紮した後、筋および皮膚を縫合し、飼育ケージに戻した。ラットは広島大学医学部附属動物実験施設において12時間の明暗サイクル、温度 $23.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ の条件下にて飼育し、餌と水は自由に与えた。



写真1: 第5腰椎神経に絹糸をかけたところ

(2)Chungモデルラット作製の確認と群分け。

同系Lewisラット12匹に対して手術を行った。術前および術後1週間後に痛覚過敏の評価を実施した。痛覚過敏の評価は機械的刺激過敏検査としてダイナミックプランター・エステシオメータ (UGO BASILE社製) およびモノフィラメント (von Frey filament) を利用して逃避反応の50%閾値をup-down法により評価した。術後10日後の痛覚過敏の評価において、Chungモデルであることを確認し、無作為に骨髄幹細胞移植群6匹と対照群6匹の2群に分けた。群分けを行った際の骨髄幹細胞移植群の平均体重は、 $205.66 \pm 8.72\text{g}$ 、対照群の平均体重は、 $196.22 \pm 6.32\text{g}$ であった。

(3)同系Lewisラットの骨髄から骨髄幹細胞 (図1) 採取。

同系Lewisラットにネブタール腹腔内注射による麻酔施行後、側臥位にて両大腿部を剃毛し皮膚を切開して、両大腿骨を露出させる。両大腿骨より灌流法および吸引法にて骨髄を採取した。

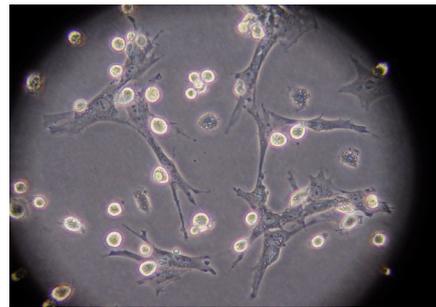


図1: 骨髄幹細胞

(4)採取した骨髄幹細胞の脊髄くも膜下腔への注入。

2群とも腹臥位として体幹中央から殿部周囲までを剃毛し、第4～6腰椎棘突起左側に沿って皮膚を切開した。ラットの腰椎がしっかりと後弯し、椎間腔が開大するように保持した。椎間腔から骨髄幹細胞を注射器でくも膜下腔に注入した。対象群として生理食塩水をくも膜下腔に注入した。両群とも皮膚を縫合し、飼育ケージに戻した。



写真2: 脊髄くも膜下腔への注入の様子

(5) ラットの疼痛刺激として、ダイナミック・プランター・エステシオメータとモノフィラメントによる触覚刺激評価。

疼痛抑制効果をラットの行動学的分析により評価した。痛覚過敏の評価方法は、機械的刺激過敏検査としてダイナミックプランター・エステシオメータ (UGO BASILE 社製) およびモノフィラメント (von Frey filament) を利用して Chaplan らの方法に準じて逃避反応の 50% 閾値を up-down 法により評価した。up-down 法で使用するフィラメントは 8 本 (刺激加重 (g) : 0.41、0.70、1.20、2.00、3.63、5.50、8.50、15.10) で、まず 2.00g のフィラメントより開始し、軽度にフィラメントが弯曲する程度の力で足底に対し垂直に当て、後趾が逃避反応を示した場合を陽性反応とする。陽性反応があった場合は 1 つ下の、反応が無かった場合は 1 つ上の強さのフィラメントで刺激を行う。反応が陰性から陽性へ、または陽性から陰性へと変化した時点を最初の 2 反応とし、その後 4 回連続して up-down 法により刺激を行った。合計 6 回の刺激に対する反応パターンを用いて、次の計算式により 50% 反応閾値を計算した。

$$50\% \text{ 反応閾値 (g)} = (10^{[Xf+kd]}) / 10,000$$

Xf = 最後の刺激で用いたフィラメントの log 値 (フィラメント番号)

k = 反応パターンによって得られた定数
d = 各フィラメント間の刺激の差 (g) の平均 log 値 (今回用いたフィラメントの場合 : 0.224)

尚、陽性反応が無いまま 15.10g の刺激まで行った場合は 15g、陽性反応が 0.41g まで続いた場合は 0.25g をそれぞれの閾値と設定した。

疼痛過敏の評価は、くも膜下腔注入後、1 日目、2 日目、3 日目、4 日目、1 週間目、2 週間目、4 週間目、6 週間目に実施した。

(6) 統計学的解析

骨髄幹細胞移植群と対照群の比較は、繰り返しのある二元配置分散分析を用いた。続いて術後どの時期で有意差があるかを、Post hoc test (Bonferroni 法) で比較した。統計は全て SPSS 16.0J for Windows を使用し、検定は有意水準 5% で有意差ありとした。



(a)



(b)



(c)



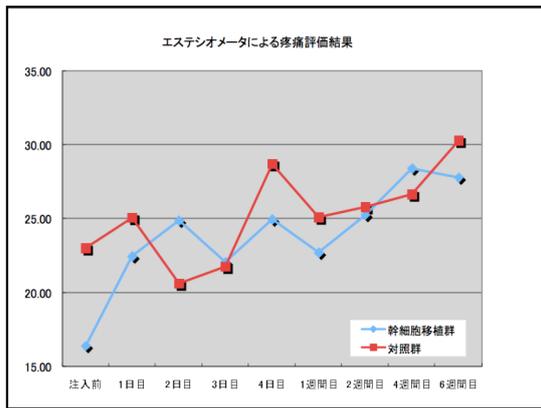
(d)

(a): ダイナミック・プランター・エステシオメータ: UGO BASILE 社 (イタリア、パレーゼ) 製

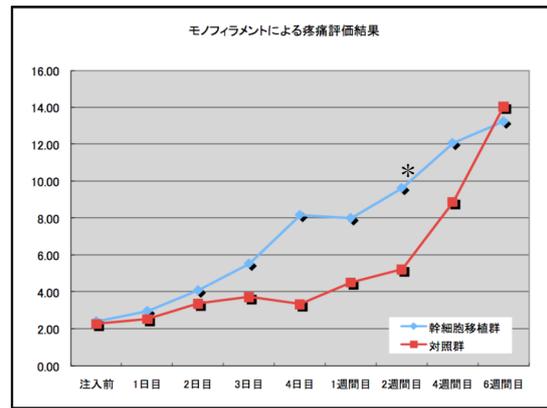
(b): 刺激グローブ

(c): von Frey filament

(d): モノフィラメントを利用した疼痛過敏評価の様子



グラフ1: エステシオメータによる評価結果



グラフ2: モノフィラメントによる評価結果

4. 研究成果

(1) 研究結果

①ダイナミックプランター・エステシオメータによる評価 (グラフ1)。

グラフ1に骨髄幹細胞移植群と対照群のダイナミックプランター・エステシオメータによる疼痛閾値評価に関する経時的変化を示す。2群間において二元配置分散分析およびPost hoc testともに有意差は認められなかった。

②モノフィラメントによる評価 (グラフ2)。

グラフ2に骨髄幹細胞移植群と対照群のモノフィラメントによる疼痛閾値評価に関する経時的変化を示す。2群間における二元配置分散分析により有意差が認められた ($p=0.006$)。またPost hoc testにより有意差の認められた評価時期は2週間目であった。

(2) 今後の展望について

CRPSの病態として脊髄microgliaのP2X4レセプター異常が報告され、痛覚過敏となる機序が明らかとなりつつあるが、未だ治療法は確立していない。本研究により、CRPSに対する新しい治療方法として自家骨髄幹細胞移植の有用性の可能性が示された。

また、幹細胞は、分化による組織再生と細胞融合による組織刷新により、生体の修復機構として働いている可能性がある。組織修復について、実際に四肢の虚血性疾患の血行再建のため自家骨髄幹細胞移植が臨床応用されているが、CRPSの様な機能異常について幹細胞移植が施行された報告はない。

神経因性疼痛は、CRPSや虚血肢の疼痛だけでなく、脊髄損傷後の疼痛や帯状疱疹後神経痛、癌組織の神経組織浸潤による疼痛など、従来の鎮痛剤が無効な疼痛であり治療に難渋する。本研究により、神経因性疼痛に対する新たな治療方法として自家骨髄幹細胞移植の有用性を惹起できる可能性があり、臨床

に直接役立つ画期的な研究であったと考える。

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)

[学会発表] (計 1件)

木村浩彰, Intrathecal administration of bone marrow for the treatment of neuropathic pain, ISPRM, 2009年6月13-17日、イスタンブール、トルコ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

皿田 和宏 (SARADA KAZUHIRO)
広島大学・病院・理学療法士
研究者番号：20423353

(2) 研究分担者

伊藤 義広 (ITO YOSHIHIRO)
広島大学・病院・理学療法士
研究者番号：60397958

木村 浩彰 (KIMURA HIROAKI)
広島大学・病院・講師
研究者番号：60363074

島田 昇 (SHIMADA NOBORU)
広島大学・病院・理学療法士
研究者番号：20467773

(3) 連携研究者