

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：12501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790638
 研究課題名（和文） 股関節における疼痛の発生・増強機序に関わる生理活性物質の解明と臨床への応用
 研究課題名（英文） Biological substances associated with pain transmission in the hip joint and clinical application
 研究代表者
 中村 順一（NAKAMURA JUNICHI）
 千葉大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：80507335

研究成果の概要（和文）：

疼痛性股関節 443 股の疼痛発現部位は鼠径部 89%、殿部 38%、大腿前面 33%、膝 29%、大転子部 27%、腰部 17%、下腿 8%に分布し、大腿前面及び膝、膝または腰部への放散痛を 55%に認めた。変形性股関節症 50 股の股関節滑膜組織の免疫染色は TuJ-1 46%、CGRP 54%、NF- κ B 68%、TNF- α 58%陽性であったが、対照 12 股では全て陰性であった。TuJ-1 陽性線維における CGRP 二重陽性率は 78%、NF- κ B 陽性細胞における TNF- α 二重陽性率は 76%であった。疼痛発症機序にこれらの因子の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the distribution of hip pain, 443 hips with osteoarthritis were studied. Distribution of pain originating in the hip was 89 % to the groin, 38 % to the buttock, 33 % to the anterior thigh, 29 % to the knee, 27 % to the greater trochanter, 17 % to the low back, and 8 % to the lower leg. When the anterior thigh, knee, lower leg, and low back were combined as the referral region, 55 % showed referred pain.

To clarify the sensory innervation and inflammatory cytokines in hypertrophic synovia associated with pain transmission, a piece of the synovium was extracted in 50 patients with osteoarthritis of the hip as an inflammatory synovium and in 12 patients with femoral neck fracture as a normal synovium. In the inflammatory synovium, TuJ-1 was positive in 46%. Of those positive for TuJ-1, 78% were also positive for CGRP. NF- κ B was positive in 68%. Of those positive for NF- κ B, 76% were also positive for TNF- α . In normal synovia, all four substances were negative.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：疼痛の発生・増強機序

1. 研究開始当初の背景

股関節の疼痛機序に関しては、股関節の感覚神経支配や神経特性・疼痛伝達物質など不明な点が多い。変形性関節症は骨関節疾患の中で最も発症頻度が高く、本邦では約 1,000 万人の患者がいると推定されている。関節の

痛みや歩行障害のために中・高齢者の生活の質を低下させる原因となっている。末期変形性股関節症は一般に消炎鎮痛剤が無効で保存的治療に抵抗性である場合が多く、人工股関節置換術は有効な手術療法の 1 つであるが、年間数百億円の医療損失を生じているとき

れる。また、人工股関節置換術は脱臼や再置換術など、依然として多くの問題が残されている。変形性股関節症の病態を明らかにすることができれば、画期的医療につながることを期待される。

従来、股関節の痛みに関する研究は主に解剖学的な手法に基づくものであった。股関節は大腿神経、閉鎖神経、坐骨神経に支配されており、股関節痛が大腿部や膝付近の痛みとして出現するのは股関節内側を支配する閉鎖神経を介した関連痛と考えられてきた。当教室では末期変形性股関節症患者 49 例 55 関節の疼痛発現部位を調査し、単径部 85%、殿部 36%、膝 22%、大腿 16%、腰部 11%であることを報告した(中村順一. 臨床整形外科 2006)。

一方、分子生物学の視点から股関節の感覚神経支配や神経線維の特性、疼痛伝達物質について研究した報告は少ない。当教室は免疫染色法を駆使した疼痛機序の解明に取り組んでおり、基礎研究の成果を英文誌に多数報告している。当教室ではラット股関節内の感覚神経は第 2 腰椎から第 4 腰椎を主とする後根神経節由来であり、表層の鼠径部皮膚の感覚神経は第 1 腰椎から第 3 腰椎を主とする後根神経節由来であることを明らかにした。また神経線維は深層では CGRP 陽性線維が多く、表層では IB4 陽性線維が多いことを明らかにした(Nakajima T. J Bone Joint Surg Br 2008, Clin Orthop Relat Res 2008)。また、予備的研究としてヒト股関節の滑膜および関節唇の免疫染色を行い、変形性股関節症患者 6 例中 5 例に滑膜組織への神経線維の進入を認めた(Shirai C. Neurosci Lett 2009)。

これらを基盤としてヒト股関節の神経支配や疼痛物質の解明への応用が期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は炎症性サイトカインをはじめとして、股関節の疼痛機序に関わる生理活性物質を同定することである。これらの生理活性物質の発現を抑制することにより除痛効果が得られれば、難治性疼痛に対する治療法となりうる。また、感覚神経支配の特性を明らかにできれば、特異的に神経ブロックを行うことなどにより除痛効果が期待できる。これらは新しい保存的治療法となる可能性を秘めている。以上の経緯により、本研究費を申請した。

3. 研究の方法

研究 1 ヒト正常例及び股関節症での股関節組織の疼痛物質及び神経線維の局在の検討

ヒト正常股関節群として、大腿骨頸部骨折

のために人工骨頭置換術を施行した 12 股を対象とした。選択基準は 1) 受傷前は股関節症状がなく、歩行可能であった方、2) 先天性股関節脱臼および臼蓋形成不全の既往歴がなく、X 線学的にも変形を認めない方、3) 受傷後 1 ヶ月以内に手術を施行した方、4) 術中所見で関節軟骨の変性を認めない方とした。ヒト疼痛性股関節群として、末期変形性股関節症のために人工股関節置換術を施行した 50 股を対象とした。選択基準は 1) 先天性股関節脱臼または臼蓋形成不全に続発した二次性変形性股関節症、2) 著しい疼痛のために手術を施行し除痛が得られた方とした。正常股関節及び疼痛性股関節の除外基準は 1) 外傷性股関節症、大腿骨頭壊死症、関節リウマチ、急速破壊型股関節症等、股関節の変形をきたしうる疾患の既往歴のある方、2) 過去に股関節の手術歴を有する方。3) 重篤な心不全、呼吸不全、肝不全、腎不全等を有し全身状態が不良の方とした。ヒト標本の採取については千葉大学大学院医学研究院倫理委員会の承認と被験者の同意を得た。

手術施行時に股関節の滑膜を採取した。正常股関節群では関節包を一部含めて削ぐように採取した。疼痛性股関節群では頭頸移行部の増生した滑膜組織を採取した。採取した滑膜組織は 4%パラフォルムアルデヒド溶液で一晩固定した。次に 20%グルコースを含む 0.01M リン酸緩衝液 (PBS; pH 7.4) で一晩保存した。10 μ m 厚の凍結標本を作製し、免疫組織化学染色を行った。一次抗体は神経線維のマーカー-neuron-specific class III beta-tubulin (TuJ-1)、疼痛伝達感覚神経のマーカー、calcitonin gene-related peptide (CGRP)、炎症性サイトカイン tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) 及びそのサイトカイン産生因子である nuclear factor-kappa beta (NF κ B) を用いた。前記 2 つ、後記 2 つの抗体に関しては同一切片に対する二重染色とし、二次抗体は一つの標本に対し 2 つの蛍光抗体 (赤色と緑色) を用いた。蛍光顕微鏡により各切片を無作為に選択し、陽性細胞及び陽性線維の定性的な評価を行った(図 1-2)。

検討項目は正常股関節群及び疼痛性股関節群の手術時年齢、疼痛性股関節群の術前後の日本整形外科学会股関節機能判定基準 (JOA スコア)、正常股関節群及び疼痛性股関節群の滑膜組織における各抗体の陽性率である。それぞれ Mann-Whitney の U 検定、Wilcoxon の順位和検定、Fisher の直接確率法を用い、p 値 < 0.05 を有意とした。

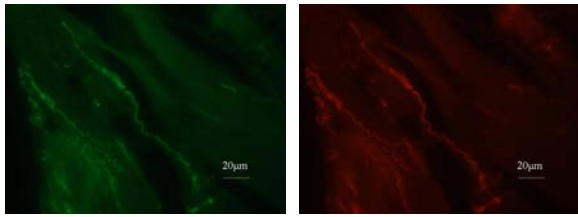


図1 滑膜組織中の CGRP 陽性線維 (左) 及び TuJ-1 陽性線維 (右) 同一切片で二重染色される神経線維を認める。

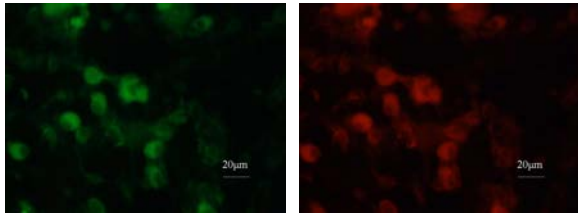


図2 滑膜組織中の TNF- α 陽性細胞 (左) 及び NF κ B 陽性細胞 (右) 同一切片で二重染色される炎症細胞を認める。

研究2 股関節痛の疼痛発現部位の検討

1999年から2010年までに当施設で施行した初回人工股関節症例946例のうち、臼蓋形成不全による二次性末期変形性股関節症を対象とした。大腿骨頭壊死症236例、外傷77例、関節リウマチ61例、急速破壊型股関節症47例、一次性変形性股関節症5例、その他の疾患32例、股関節手術の既往あり47例、不明72例を除外した。またすでに股関節疾患と診断され骨切り術を受けていた4股も除外して、369例443股について後方視的に調査した。年齢は平均61.0歳であった。

直接検診または郵送にて術前の疼痛部位を調査した。疼痛部位は以下の7部位に分類した。鼠径靭帯から大腿近位1/3までを鼠径部(1)、大腿近位1/3から遠位1/3までを大腿前面(2)、大腿遠位1/3から脛骨結節までを膝前面(3)、脛骨結節から遠位を下腿(4)、肋骨弓から腸骨稜までを腰部(5)、腸骨稜から殿溝までを殿部(6)、大転子周囲を大転子部(7)とし、複数箇所にもたがる場合はそれぞれを評価した(図3)。また、Charnley分類を用いて片側股関節症をA群、両側股関節症をB群、多関節症をC群とした。

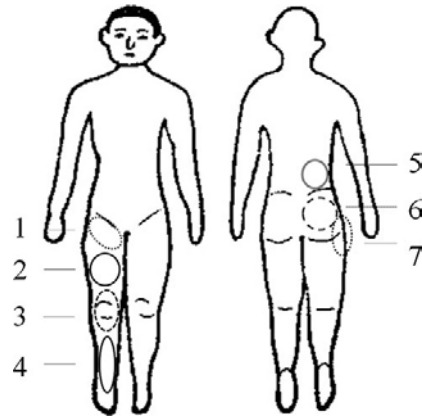


図3 股関節の疼痛発現部位

研究3 ラット正常・股関節症モデルでの股関節組織の疼痛物質及び神経線維

8週齢雄性SDラットの左股関節に逆行性神経トレーサーFluoro-gold (FG)と生食30 μ lを注入した sham 群、FG+nerve growth factor (NGF: 神経成長因子)(50 μ g/ml、30 μ l)を投与した NGF 50 群、FG+NGF (100 μ g/ml、30 μ l)を投与した NGF 100 群の3群に対して、術1週後(各群n=6)、術2週後(各群n=3)にTh13からL6高位の左後根神経節を摘出し、炎症性疼痛ペプチドである CGRP にて免疫組織化学染色を施行した。また各群の左股関節滑膜の組織学的検討を行った。

研究4 股関節痛に対する体外衝撃波照射の除痛効果の検討

本研究は第I相試験に相当する前向き介入研究であり、安全性の確認を主目的とした。千葉大学大学院医学研究院倫理委員会の承認のもと行った。

被験者の選定方針について、適格基準は厚生労働省特発性大腿骨頭壊死症研究班の診断基準を満たすステロイド性大腿骨頭壊死症患者であり、病型分類は type C1 及び C2 の広範囲の壊死であり、病期分類は stage 3B 及び 4 の進行期から末期の症例とした。症例の振り分けは症例・対照とし、体外衝撃波療法の説明を全例に行い、衝撃波照射の同意を得られた場合に衝撃波群とし、同意が得られない場合もしくは担当医師が不適切と判断した場合は経過観察のみを行い、自然経過群とした。

体外衝撃波の条件設定について、体外衝撃波装置は Dornier EposTM (Dornier 社、ドイツ)を用いた。本装置は、電磁誘導式衝撃波発生装置で、焦点領域は 4 \times 25mm、衝撃波レベルは7段階の可変式でエネルギー密度は 0.03~0.36mJ/mm² である。1回の照射数を5000発とし、1~2ヶ月間隔で3回の照射を行った。衝撃波の焦点は、事前に透視下に大

腿骨頭壊死部及び圧潰部を同定し、マーキングした。照射時の体位は仰臥位で、前方から後方に向けて衝撃波を照射した。衝撃波レベルはレベル1 (0.03mJ/mm²)から開始し、患者が耐えうる範囲で最大でレベル7 (0.36mJ/mm²)まで出力を上げた。パルス間隔は240回/分とした。局所麻酔は行わず、体外衝撃波照射の刺激により、大腿骨頭壊死症による痛みの再現性が得られるかどうかを確認しながら行った。

評価項目として、登録時に衝撃波群・自然経過群ともに単純X線、MRI、CTによる画像検査を行い、大腿骨頭壊死症の分類を行った。臨床評価としてJOAスコア、Pain detect痛みの質問票(PDスコア)、Visual Analogue Scale (VAS)を評価した。

4. 研究成果

研究1

滑膜組織におけるTuJ-1陽性神経線維は疼痛性股関節群で46%(23股)に認めたが、正常股関節群では0%(0股)であり、2群間に有意差を認めた($p=0.002$)。CGRP陽性感覚神経線維は疼痛性股関節群で54%(27股)に認めたが、正常股関節群では0%(0股)であり、2群間に有意差を認めた($p=0.001$)。TuJ-1陽性を示した23股のうち、78%(18股)はCGRPと二重陽性を認めた。

NF κ B陽性細胞と線維は疼痛性股関節群で68%(34股)に認めたが、正常股関節群では0%(0股)であり、2群間に有意差を認めた($p=0.001$)。TNF- α 陽性細胞と線維は疼痛性股関節群で58%(29股)に認めたが、正常股関節群では0%(0股)であり、2群間に有意差を認めた($p=0.001$)。NF κ B陽性を示した34股のうち、76%(26股)はTNF- α と二重陽性を認めた。

以上より、変形性股関節症の滑膜組織に炎症性サイトカイン及び感覚神経線維の増生を認め、疼痛伝達に参与することが示唆された。本研究はRheumatology (Oxford)に掲載された。

研究2

股関節の疼痛発現部位は鼠径部89%(393股)、殿部38%(170股)、大腿前面33%(144股)、膝29%(130股)、大転子部27%(118股)、腰部17%(76股)、下腿8%(34股)に分布していた。95%(421股)は鼠径部及び殿部、大転子部からなる股関節部に生じる一方、55%(242股)に大腿前面及び膝、膝または腰部への放散痛を生じることが明らかになった。股関節の痛みが大腿部や膝への放散痛として出現するのは、神経支配が多高位にわたるためと考えられた。

Charnley C群はA群及びB群より有意に高齢であった(それぞれ66.5歳、61.7歳、59.0

歳、 $p=0.011$ 及び $p=0.001$)。またCharnley C群はA群及びB群より有意に膝痛を多く認めた(それぞれ65%、28%、27%、 $p=0.001$ 及び $p=0.001$)。さらにCharnley C群はA群より有意に腰痛を多く認めた(39%対14%、 $p=0.005$)。結果としてCharnley C群はA群より有意に放散痛を多く認めた(83%対50%、 $p=0.004$)。

以上より、変形性股関節症の臨床症状が示唆された。本研究はMod Rheumatolに掲載された。

研究3

全FG陽性細胞中のFGとCGRPで二重標識される細胞の割合はSham群11%に対して、術1週後でNGF50群18%、NGF100群36%と有意に高値を示した。さらに、術2週後においてもNGF50群22%、NGF100群35%と有意に高値を示した。またNGF50群とNGF100群はSham群に比し滑膜炎の所見を認めた。

以上より、ラット股関節へのNGF投与により滑膜炎が惹起され、炎症性疼痛ペプチドの支配感覚神経での発現が有意に上昇したことから、NGFが疼痛発現に深く関与することが示唆された。本研究成果は英文雑誌に投稿中である。

研究4

体外衝撃波療法の同意が得られた衝撃波群は10股(男性3股、女性7股)であり、自然経過群は10股(男性5股、女性5股)であった。年齢は有意差を認めなかった。登録時JOAスコア、PDスコア、VAS現在、VAS最大、VAS平均はいずれも、衝撃波群が自然経過群より高い傾向を示したが、有意差は認めなかった。

衝撃波群の経時的変化に関して、JOAスコアは、有意差はないものの経時的に改善傾向を示した。VAS平均は登録時67.5mmから3回目(最終観察時)39.1mmに有意に改善した($p=0.048$)。一方、VAS最大及びVAS平均は改善傾向を認めなかった。

自然経過群の経時的変化に関して、JOAスコアは悪化傾向を示したが、有意差は認めなかった。VAS現在及びVAS最大は悪化傾向を示したが、有意差は認めなかった。

最終観察時における衝撃波群と自然経過群の変化量を比較すると、衝撃波群は、JOAスコアとVAS現在について、自然経過群よりも有意な改善を示した。

有害事象に関して、衝撃波群で中止となった症例が2例あった。1例はSLE患者で体外衝撃波療法開始後に下腿潰瘍が出現したが、直接的な因果関係を認めなかった。もう1例は衝撃波による除痛効果は認めたものの、男性の肉体労働者であったために早期のTHAを希望された。衝撃波療法により明らかに関節

症性変化が進行した症例はなかった。

以上より、ステロイド性大腿骨頭壊死症に対する体外衝撃波療法の安全性と除痛効果が示唆された。本研究成果は英文雑誌に投稿中である。

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6件)

(1) Nakamura J, Oinuma K, Ohtori S, Watanabe A, Shigemura T, Sasho T, Saito M, Suzuki M, Takahashi K, Kishida S. Distribution of hip pain in osteoarthritis patients secondary to developmental dysplasia of the hip. *Mod Rheumatol*. 査読有、23巻、2013、119-24.

DOI: 10.1007/s10165-012-0638-5.

(2) Takeshita M, Nakamura J, Ohtori S, Inoue G, Orita S, Miyagi M, Ishikawa T, Takahashi K. Sensory innervation and inflammatory cytokines in hypertrophic synovia associated with pain transmission in osteoarthritis of the hip: a case control study. *Rheumatology (Oxford)*. 査読有、51巻、2012、1790-1795.

DOI:10.1093/rheumatology/kes173

(3) Shigemura T, Kishida S, Eguchi Y, Ohtori S, Nakamura J, Kojima M, Masuda Y, Takahashi K. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of the Thalamus in Patients with Osteoarthritis of the Hip Joint. *Bone Joint Res*. 査読有、1巻、2012、8-12.

DOI: 10.1302/2046-3758.1.1.2000018

(4) 中村順一、重村知徳、竹下宗徳、高澤誠、岸田俊二. ステロイド性大腿骨頭壊死症に対する体外衝撃波療法の安全性と除痛効果. *Hip Joint*. 査読有、38巻、2012、775-779.

DOI:なし

(5) Shigemura T, Ohtori S, Kishida S, Nakamura J, Takeshita M, Takazawa M, Harada Y, Takahashi K. Neuropathic pain in patients with osteoarthritis of hip joint. *Eur Orthop Traumatol*. 査読有、2巻、2011、73-77.

DOI: 10.1007/s12570-011-0070-x

(6) 中村順一、竹下宗徳、重村知徳、高澤誠、岸田俊二、中嶋隆行、白井周史、原田義忠、宮坂健、神川康也. 変形性股関節症における炎症性滑膜の免疫組織学的検討. *Hip Joint*

査読有、37巻、2011、70-74,

DOI:なし

[学会発表] (計5件)

(1) 中村順一、落合信靖、山崎博範、萩原茂生、重村知徳、西須孝、大鳥精司、見目智紀、高澤誠、高橋和久、岸田俊二. 特発性大腿骨頭壊死症に対する体外衝撃波療法の安全性と除痛効果. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会. 名古屋. 2012.10.26-27.

(2) 中村順一、大鳥精司、中嶋隆行、岸田俊二、神川康也、原田義忠、井上玄、折田純久、重村知徳、鈴木昌彦、高橋和久. 変形性股関節症の疼痛伝達には炎症性滑膜への神経線維の侵入と炎症性サイトカインが関与する. 第85回日本整形外科学会学術総会. 京都. 2012.5.17-20.

(3) 中村順一、竹下宗徳、大前隆則、萩原茂生、宮本周一、李泰鉉、小林達也、鈴木昌彦、勝呂徹. 股関節痛の疼痛伝達には滑膜組織への感覚神経線維の侵入と炎症性サイトカインの発現が関与する. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会. 東京. 2012.4.26-28.

(4) Shigemura T, Kishida S, Ohtori S, Nakamura J, Takeshita M, Takazawa M, Miyasaka T, Harada Y, Takahashi K. The Relationship between Neuropathic Pain and Pain from Osteoarthritis of Hip Joint. 12th Annual Meeting of European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (EFORT) 2011. 6. 1-4 Copenhagen, Denmark.

(5) Nakamura J, Kishida S, Harada Y, Kamikawa K, Ohtori S, Takeshita M, Shigemura T, Takazawa M, Takahashi K. Distribution of hip pain in osteoarthritis secondary to developmental dysplasia of the hip. 78th Annual Meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons 2011.2.15-19 San Diego, CA.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 順一 (NAKAMURA JUNICHI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80507335

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし