

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19591731
研究課題名（和文） 変性椎間板症モデルの作成とその疼痛制御のための生物学的アプローチ
研究課題名（英文） <b>Biologic manipulation for pain control in degenerative disc disease</b>
研究代表者 川上 守 (MAMORU KAWAKAMI) 公立大学法人和歌山県立医科大学 医学部医学科 教授 20195051

研究成果の概要：椎間板性疼痛を評価し得る椎間板変性モデルをラット尾椎で作成した。このモデルでは椎間板変性に伴いコラーゲン、アグレカン、プロテオグリカンの減少が認められ、疼痛行動と関連してインターロイキン-1 $\beta$ 、tumor necrosis factor- $\alpha$ の増加がみられた。骨形成蛋白などを椎間板に注入したラットでは尾部に鎮痛効果が得られ、これらのサイトカインの発現減少と細胞外基質の産生亢進が観察された。変性椎間板を痛みなく再生させる安全な生物学的治療法が確立可能である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
20 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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 7305

キーワード：脊椎脊髄病学、椎間板、疼痛、再生、腰痛モデル、骨形成蛋白、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

腰痛の約8割は非特異的腰痛で、その原因を的確に捉えることができない。非特異的腰痛の原因として椎間板の変性が重要な因子と考えられている。椎間板障害による腰痛の発現機序についての報告は散見されるが、変性椎間板そのものやその変性過程と腰痛発現についての詳細な報告はない。一方、従来に対症療法や非生理的手術法では、腰痛に対して確実な効果が得られていない。

椎間板変性は髄核に始まことから髄核細胞やその細胞外基質を増殖させることで変性椎間板を再生させ得る可能性がある。近年、椎間板を再生させる様々な方法が試みられているが、臨床上安全で、簡便で、有効なものでなければならない。これまでに、培養髄核細胞あるいは骨髄幹細胞、骨形成蛋白

(bone morphogenetic protein (BMP)-2、BMP-7)、transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 、insulin-like growth factor (IGF)などの成長因子が椎間板の生物学的機能の維持に有効であるとの報告が散見されている。さらに最近ではplatelet rich plasma (PRP)がin vitroで椎間板の再生に効果がある可能性が示されている。PRPはplatelet-derived growth factor (PDGF)、TGF- $\beta$ 、epidermal growth factor (EGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)などの成長因子を含有するため生物学的治療法として臨床応用できる可能性がある。

一方、椎間板組織、特に髄核細胞は炎症を誘発させることが示されている。したがって、脊髄神経根に作用した場合に疼痛を引き起こさない再生髄核が望まれる。また、椎間板変性そのものが腰痛の原因であり、腰痛治療

に椎間板再生が有効であることを明確に示した報告はない。ラット尾椎の神経支配は仙尾髄節であり、その椎間板への負荷が髄節での感作により、尾部に疼痛に関連した痛覚過敏、アロディニアが出現する可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は(1)尾椎に種々の椎間板変性モデルを作成し、どのモデルが尾部に痛覚過敏、アロディニアを惹起するか、(2)椎間板の変性の程度と疼痛は関連するかどうか、(3)椎間板変性による疼痛発現物質は何か、(4)骨髄幹細胞椎間板内移植、BMP-2、BMP-7、TGF- $\beta$ 、IGF、PRPの椎間板内注入により慢性機械的圧迫により作成した変性椎間板が再生し、疼痛は改善するかを検討することにある。変性椎間板そのものと疼痛の関係を明確にし、変性椎間板を痛みなく再生する安全な生物学的アプローチを検討することで、変性疾患による腰痛患者の新しい治療法の確立に基礎的研究である。

## 3. 研究の方法

本研究をおこなうにあたり、公立大学法人和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得た(承認番号39)。

### 方法1. 椎間板性疼痛モデルの作成

#### 1. 椎間板変性モデルの作成

Sprague-Dawley ラット (250g、雄) を用いて、サイオペンタール (50mg/kg) 腹腔内投与による全身麻酔下に尾椎第 4/5 椎間板外縁を露出し、以下の椎間板障害モデルを作成した。

- (1) sham 群 : 尾椎第 4/5 椎間板外縁の露出のみ (n = 8)
- (2) G16 群 : 16 ゲージの針で線維輪を穿刺した群 (n = 8)
- (3) G20 群 : 20 ゲージの針で線維輪を穿刺した群 (n = 8)
- (4) G23 群 : 23 ゲージの針で線維輪を穿刺した群 (n = 8)
- (5) 非圧迫群 : 第 4、5 尾椎椎体に直径 0.7 mm のキルシュナー鋼線を刺入し、アルミ製リングで刺入したキルシュナー鋼線を締結し、自家製のイリザロフタイプの創外固定器を装着し、圧迫を加えない群 (n = 8)
- (6) 圧迫群 : 第 4、5 尾椎椎体に直径 0.7 mm のキルシュナー鋼線を刺入し、アルミ製リングでキルシュナー鋼線を締結し、イリザロフタイプの創外固定器を装着し、椎間腔の角状変形がおこるまで圧迫を加えた群 (n = 8)
- (7) ゴムバンド群 (n = 8) : 圧迫群では圧迫力の定量が困難であり、創外固定器の重量のため下記に示す詳細な行動薬理的検討が不十分になる可能性があるため作成

した。第 4、5 尾椎椎体に直径 0.7 mm のキルシュナー鋼線を刺入し、No 8 の輪ゴム (Dykema Rubber Band Co. McKees Rocks, PA) を襷がけにして固定した。約 150-200 グラムの圧迫力がキルシュナー鋼線に加わっている。

- (8) K 鋼線群 : 第 4、5 尾椎椎体に直径 0.7 mm のキルシュナー鋼線を刺入したのみ (n = 8)
- (9) ゴムバンド+23G 群 : 第 4、5 尾椎椎間板線維輪を 23 ゲージの針で穿刺し、第 4、5 尾椎椎体に直径 0.7 mm のキルシュナー鋼線を刺入し、輪ゴムで固定した群 (n = 10)

対照群として無処置ラット (n = 8) を用いた。

#### 2. 行動薬理的検討

上記で作成した椎間板障害モデルを用いて、どの椎間板障害が疼痛を惹起するかを検討した。

術前ならびに術後経時的に同一時間帯に以下の項目を観察した。

##### 1) 運動機能障害の評価

無拘束状態で 10 分間、尾椎の持ち上げ回数を計測した。

##### 2) 圧刺激に対する尾部の感受性変化

尾部の処置部ならびに尾部先端への圧刺激に対する感受性変化を IITC 2500 Digital Paw Pressure Meter (IITC Life Science) を用いて計測した。処置部は外側の創を避けて、腹側に、尾椎先端は先端から 2 cm の部位に刺激を加えて、尾部を逃避させる重量を、それぞれ 3 回計測し、その平均値を採用した。

##### 3) 熱刺激に対する尾部の感受性変化

尾部の処置部ならびに尾部先端に Tail-Flick Unit, Cat. No. 37360 (UGO BASILE, Comerio, Italy) を用いた熱刺激を加えて、逃避反応時間を同様に無拘束状態で測定した。処置部は外側の創を避けて、腹側に、尾椎先端は先端から 2 cm の部位に刺激を加えて、尾部を逃避させるまでの潜時を、それぞれ 3 回計測し、その平均値を採用した。

運動障害の有無、圧、熱による侵害刺激に対する尾部の感受性変化を処置後 3 日、5 日、1 週以降毎週、術後 4 週まで経時的に観察した。処置前の値に対する変化量として以下のごとく計測した。

(処置後の圧刺激、熱刺激に対する重量、潜時) / (処置前の圧刺激、熱刺激に対する重量、潜時) X 100%

### 方法2. 椎間板性疼痛モデルの椎間板変性の評価

#### 1. 組織学的検討

対照群、非圧迫群、圧迫群、K 鋼線群、ゴムバンド+G23 群を作成し、処置後 3 日、1 週、2 週、4 週で、サイオペンタール大量腹

腔内投与により屠殺し、処置した尾椎椎間板を採取した（各群 n = 8、それぞれ 2 匹ずつ経時的に採取）。摘出した椎間板をホルマリン固定し、パラフィン包埋の後、矢状面での 0.6 $\mu$ m の切片を作成し、組織学的にヘマトキシリンエオジン染色、Elastica-Van Gieson 染色、Alcian Blue 染色、Safranin O 染色を行い、Pfeiffer 等に準じて組織学的変性スコア（正常 0 から高度変性 5 に分類して点数化）を各群間で経時的に比較観察する。

免疫組織化学を用いて、コラーゲン（タイプ 1、タイプ 2）、アグレカン、matrix metalloproteinase (MMP)-13、Aggrecanase-1 (ADAMTS-4) の変化を各群間で、経時的に比較検討した。

## 2. 分子生物学的検討

非圧迫群、圧迫群、K 鋼線群、ゴムバンド + G23 群の処置したレベルから尾椎髄核を、処置後 3 日、1 週、2 週、4 週で摘出し、wet weight を測定し、凍結真空乾燥後、dry weight を測定した。各群 3 例ずつ経時的に採取した。プロテオグリカン合成能は [<sup>35</sup>S]-sulphate (20  $\mu$ Ci/ml) でラベルし、rapid filtration assay で計測し、プロテオグリカン蓄積量の測定は dimethylmethylene blue (DMMB) assay を用いた。DNA 合成は [<sup>3</sup>H]-thymidine の取り込みを計測し、DNA 量測定は Hoechst 33258 dye method を用いた。コラーゲン量の測定は ELISA 法に基づき抗体を用いて段階希釈法を用い濃度を分け、ELISA リーダーにて測定を行った。なお、対照として第 2-3 尾椎椎間板髄核を用い、対照に対する比として経時的変化を検討した。

組織学的、分子生物学的検討結果と方法 1 で得られた結果を比較し、痛覚過敏発現と椎間板変性の関係を検討した。

## 方法 3. 変性椎間板モデルにおける疼痛発現物質の同定

椎間板変性に伴って発現する炎症性生理活性物質が痛覚過敏の出現、維持に関与するとの仮説のもと以下の検討をおこなった。

### 1. 組織学的、免疫組織化学的検討

非圧迫群、圧迫群、K 鋼線群、ゴムバンド + G23 群の処置したレベルから尾椎髄核を、処置後 3 日、1 週、2 週、4 週で採取し、ヘマトキシリンエオジン染色で炎症細胞を、Leukocyte Common Antigen、マクロファージ、インターロイキン(IL)-1 $\beta$ 、一酸化窒素合成酵素 (NOS)、Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、ケモカイン (IL-8、mochophage chemotactic factor-1 (MCP-1))、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) を免疫組織化学で比較検討した。各群

それぞれ 8 匹作成し、経時的に 2 匹ずつから採取した。

## 2. 分子生物学的検討

非圧迫群、圧迫群、K 鋼線群、ゴムバンド + G23 群の処置したレベルから尾椎髄核を、処置後 3 日、1 週、2 週、4 週で採取し、ultra-sensitive TNF- $\alpha$  ELISA kit を用いて、TNF- $\alpha$  を定量した。当初予定していた Reverse transcription/polymerase chain reaction (RT-PCR) 法、Western blotting 法による観察とフローサイトメトリーを用いた IL-1 $\beta$ 、NOS、TNF- $\alpha$ 、IL-8、MCP-1 ならびに BDNF の産生を同定し、細胞形質の発現の観察は進行中である。

これらのモデルにおける疼痛発現とこれらの生理活性物質との関係を検討し、椎間板変性に伴う疼痛を発現させる生理活性物質を同定した。

## 方法 4. 変性椎間板モデルにおける椎間板再生と疼痛制御

### 1. 椎間板再生モデルの作成

圧迫群を用いて、尾部先端部に痛覚過敏が発現した処置後 1 週で、変性椎間板内に以下の処置を加えた。

#### 1) 椎間板内骨髄幹細胞移植

ラット腸骨稜から骨髄液を採取し、血清分離後、37 $^{\circ}$ C、5% 炭酸ガス気相下で DMEM で 2 週間培養し、骨髄幹細胞 (MSC) を作成した。圧迫群を作成し、処置後 1 週で痛覚過敏が出現したラットの変性椎間板を露出し、骨髄幹細胞 (MSC) ( $1 \times 10^3/1\mu$ l) をハミルトン注射器で注入した (圧迫-MSC 群、n = 4)。

#### 2) Platelet rich plasma (PRP) 注入

SD ラット末梢血と sodium citrate 1 を 2000g で 3 分、遠心分離し、その血清を 5000g、5 分で再度遠心分離し、血小板と platelet poor plasma (PPP) を分離する。PPP に 1/9 量の自己血清を加え、PRP を作成した。1 $\mu$ l PRP を両群の処置後 1 週で、変性椎間板に同様にハミルトン注射器で注入した (圧迫-PRP 群、n = 4)。

#### 3) 成長因子の注入

BMP-2、BMP-7、TGF- $\beta$ 、insulin-like growth factor (IGF) をそれぞれ同様に 0.2  $\mu$ g/1 $\mu$ l 注入した群を作成した。圧迫-BMP2 群、圧迫-BMP7 群、バンド-BMP7 群、圧迫-TGF 群、圧迫-IGF 群、をそれぞれ 4 匹作成した。

それぞれのサブグループで変性椎間板が再生し、疼痛が制御されるかどうかを形態学的、分子生物学的に検討した。対照として圧迫群に生理食塩水 1 $\mu$ l 注入したラットを用いた。

## 2. 行動薬理学的検討-疼痛関連の感覚障害

の計測

方法1と同様に、圧刺激、熱刺激に対する尾部の感受性変化を注入前、注入後3日、5日、1週、2週、3週で観察した。変性作成前の感受性に対する比として計測し、どのサブグループで痛覚過敏が改善されるか検討した。

#### 方法5. 椎間板注入モデルでの組織学的、分子生物学的検討

圧迫群で、MCS、PRP、BMP-2、BMP-7、TGF- $\beta$ 、IGF 注入後、椎間板を注入後1週、3週で摘出し、椎間板再生の有無、炎症性生理活性物質の変化を検討した（各n=2）。方法2、3と同様に、プロテオグリカン合成能ならびに蓄積量、DNA合成、DNA量、コラーゲン量の変化を検討し、変性椎間板の再生を評価した。さらに、コラーゲン、アグレカン、MMP-13、ADAMTS-4、IL-1 $\beta$ 、NOS、TNF- $\alpha$ 、ケモカイン、BDNFの発現を免疫組織化学にて検討した。方法4で得られた結果と比較検討し、椎間板再生と疼痛制御に有効な物質の同定を試みた。

#### 方法6. BMP-7の神経に対する安全性の検討

椎間板内注入物質が硬膜外に漏出した場合に神経損傷や異所性骨化などの有害事象がおこらないかどうかを検討することに臨床重要である。ラットを用いて、L5腰神経根上にBMP-7(0.2  $\mu$ g/1 $\mu$ l)を含侵させたGel foam(8mm<sup>3</sup>)を留置し、圧刺激に対する感受性変化を足部で観察し、行動薬理学的に神経障害の有無を観察した。さらに処置後、1週、6週で、L4/5レベルで脊柱管を含めて摘出し、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、substance P、substance P receptor NK-1、bradykinin、bradykinin receptor  $\beta$ 1、 $\beta$ 2、コラーゲン(タイプ1と2)を免疫組織化学で検討した。異所性骨化の有無も評価した。

### 4. 研究成果

#### 結果1. 行動薬理学的検討

全身的な影響はみられなかったが、飼育ケージの清掃時に圧迫群、ゴムバンド群、ゴムバンド+23G群で、易刺激性の亢進がみられた。非圧迫群の1例、ゴムバンド+23G群の2例で経過中に感染がみられた。感染例を除外して以下の評価を行った。

#### 1) 尾部の運動機能評価

対照群、sham群、G16群、G20群、G23群、K鋼線群では尾部の持ち上げ回数に処置後も変化はなかった。一方、非圧迫群、圧迫群、ゴムバンド群、ゴムバンド+G23群のラットでは10分間の尾椎の持ち上げ回数が有意に

減少していた。

#### 2) 圧刺激に対する尾部の感受性変化

処置後圧刺激に対する感受性は処置部、尾部先端ともに対照群、sham群、G20群、G23群では変化はみられなかった。処置部ではG16群、K鋼線群、ゴムバンド群、ゴムバンド+G23群のラットで処置後3、5日に痛覚過敏が認められたが、G16群、K鋼線群では処置後1週で、ゴムバンド群、ゴムバンド+G23群では処置後2週で、圧刺激に対する痛覚過敏は消退した。圧迫群、非圧迫群では痛覚鈍麻が観察された。尾部先端では、圧迫群、ゴムバンド群、ゴムバンド+G23群のラットに、処置後1週から3週にかけて痛覚過敏が認められるものが存在した。それぞれ8匹中3匹、3匹、4匹に認められた。各群で平均すると統計学的には圧迫群、ゴムバンド+G23群のみが尾部先端部で痛覚過敏が認められ、処置後4週では改善傾向がみられた。

#### 3) 熱刺激に対する尾部の感受性変化

処置後熱刺激に対する感受性は処置部、尾部先端ともに対照群、sham群、G16群、G20群、G23群、K鋼線群では変化はみられなかった。処置部ではゴムバンド群、ゴムバンド+G23群のラットで処置後3日のみ痛覚過敏がそれぞれ3匹、4匹に認められた。圧迫群、非圧迫群では逃避潜時の遅延、すなわち、痛覚鈍麻が観察された。尾部先端では、圧迫群、ゴムバンド群、ゴムバンド+G23群のラットに、処置後1週から3週にかけて痛覚過敏が認められるものが存在した。それぞれ8匹中4匹、3匹、5匹に認められた。各群で平均すると統計学的には圧迫群、ゴムバンド+G23群のみが尾部先端部で痛覚過敏が認められ、処置後4週では改善傾向がみられた。

#### 小括1. 椎間板性疼痛モデルの作成について

注射針による椎間板穿刺ではG16群のみに処置部に術後一過性の痛覚過敏をみたのみであった。椎間板穿刺モデルでは疼痛発現が乏しいことが判明した。創外固定を用いたラットでは、圧迫群、非圧迫群ともに尾部の運動機能障害がみられ、創外固定装置の重量に起因する可能性がある。一方、ゴムバンドを用いたラットでは処置部に圧刺激に対する痛覚過敏がみられ、疼痛評価が可能なモデルである。処置後経過とともに尾部先端に出現する痛覚過敏は、創外固定をもちいたラットおよび23Gで線維輪を穿刺し、ゴムバンドで固定したラットに認められた。これは椎間板障害に伴う脊髄を含む中枢神経系での感作による痛覚過敏の出現であると考えられる。椎間板性疼痛モデルとして自家製の創外固定器による椎間板圧迫モデル、圧迫群とゴムバンド+G23群を用いて、以下の研究をおこなった。

## 結果2

### 1. 組織学的検討

対照群、非圧迫群、K 鋼線群では髄核、線維輪の細胞形態や細胞外基質に経時的な変化は認められなかったが、圧迫群では角状変形がみられ、線維輪の内側へのたわみ込みが経時的に認められ、髄核細胞の減少、紡錘形変形ならびに細胞外基質の染色性低下が認められた。ゴムバンド+G23 群は処置後経時的に髄核細胞数の減少がみられ、細胞外基質の染色性の著しい低下が認められた。特に処置後4週では、椎間板変性が他の群に有意にみられた。コラーゲン(タイプ1、タイプ2)、アグレカンの免疫組織化学では、対照群、非圧迫群、K 鋼線群には明らかな差は認められなかったが、圧迫群、ゴムバンド+G23 群ともに免疫染色性の低下が髄核、線維輪ともに認められた。MMP-13、ADAMS-4 は圧迫群、ゴムバンド+G23 群で対照群、非圧迫群、K 鋼線群に比し、染色性の増加が見られた。

### 2. 分子生物学的検討

プロテオグリカン合成能、プロテオグリカン蓄積量、DNA 合成能、DNA 量ならびにコラーゲン量は、対照群、非圧迫群、K 鋼線群で経時的な変化に有意なものはなかった。圧迫群はプロテオグリカン合成能、DNA 合成能に有意な変化はなかったが、プロテオグリカン蓄積量、DNA 量ならびにコラーゲン量の減少がみられた。ゴムバンド+G23 群ではプロテオグリカン合成能、プロテオグリカン蓄積量、DNA 合成能、DNA 量ならびにコラーゲン量の経時的な有意な減少が認められた。

各群の処置部、尾部先端部に観察された痛覚過敏発現と椎間板変性の組織学的、分子生物学的所見とは明らかな関連が認められなかった。

### 小括2. 椎間板性疼痛モデルの椎間板変性の評価について

圧迫群、ゴムバンド+G23 群ともに椎間板変性が経時的に認められた。圧迫群は漸次変性の進行がみられたが、ゴムバンド+G23 群では処置後急激な変性がみられ、線維輪穿刺による外傷が要因と考えられた。椎間板変性と尾部処置部、尾部先端部で認められた痛覚過敏との関係は認められなかった。椎間板変性に伴う疼痛発現には椎間板変性に伴うプロテオグリカン、コラーゲンや髄核、線維輪の細胞そのものの変化が関与しないことが判明した。また、ゴムバンド+G23 群は線維輪穿刺という外傷が加わっているため変性

進行が早く、ヒトの加齢に伴う椎間板変性モデルとは異なる可能性がある。

## 結果3

非圧迫群、圧迫群、K 鋼線群では炎症細胞の浸潤はみられなかったが、ゴムバンド+G23 群では、白血球、リンパ球の浸潤が軽度認められた。いずれの群にも IL-1 $\beta$ 、NOS、TNF- $\alpha$ 、IL-8、MCP-1 ならびに BDNF の発現が認められたが、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の染色性の増加が圧迫群、ゴムバンド+G23 群の処置後3日、1週、2週、4週で増加していた。TNF- $\alpha$  の定量ではゴムバンド+G23 群で処置後増加が認められた。

### 小括3. 変性椎間板モデルにおける疼痛発現物質の同定

ゴムバンド+G23 群で炎症細胞の浸潤が認められたことは、線維輪損傷に起因する可能性がある。非圧迫群、圧迫群、K 鋼線群、ゴムバンド+G23 群の髄核には IL-1 $\beta$ 、NOS、TNF- $\alpha$ 、IL-8、MCP-1 ならびに BDNF の発現が認められた。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の染色性の増加が圧迫群、ゴムバンド+G23 群でみられるのみであった。痛覚過敏の発現がみられなくなった処置後4週でも染色性の増加が認められたことから、痛覚過敏の維持には関与していない可能性がある。この痛覚過敏発現機序を解明するためには、今後は脊髄を含む中枢神経系の関与を検討する必要がある。また、ゴムバンド+G23 群では炎症細胞浸潤がみられたため疼痛発現機序は圧迫群と異なる可能性がある。尾部先端部の痛覚過敏を指標とすることとし、以下の検討には圧迫群を用いた。

## 結果4

運動機能に明らかな変化はみられなかった。圧刺激に対する痛覚過敏は、MSC、PRP、BMP-2、IGF 注入群では変化が乏しかったが、BMP-7、TGF- $\beta$  注入群では痛覚過敏の改善が認められた。熱刺激に対する痛覚過敏も同様に、BMP-7、TGF- $\beta$  注入群で改善する傾向が認められた。

### 小括4. 変性椎間板モデルにおける疼痛制御

椎間板変性モデルにおける処置部より末梢に出現した痛覚過敏は BMP-7、TGF- $\beta$  注入により改善した。一方、MSC、PRP、BMP-2、IGF の注入ではその傾向は認められなかった。BMP-7 注入のみが動物数が少ないものの有意差がみられた。各群の匹数を増やしてさらに検討する必要があるが、BMP-7 注入が疼痛

制御に有用である可能性がある。

#### 結果 5

プロテオグリカン合成能ならびに蓄積量、DNA 合成、DNA 量、コラーゲン量は MCS、PRP、BMP-2、BMP-7、TGF- $\beta$ 、IGF 注入後に増加が認められた。MCS、PRP、BMP-2、TGF- $\beta$  では細胞数の増加が認められた。コラーゲン、アグレカンの染色性増加と MMP-13、ADAMTS-4 の減少がみられた。IL-1 $\beta$ 、NOS、TNF- $\alpha$ 、ケモカイン、BDNF の発現は減少傾向がみられた。

#### 小括 5. 椎間板注入モデルでの組織学的、分子生物学的検討

MCS、PRP、BMP-2、BMP-7、TGF- $\beta$ 、IGF 注入は変性椎間板の再生には有用である。いずれも anti-catabolic、anabolic 効果を有すると考えられる。結果 4 でみられたように痛覚過敏の改善が有意にみられたのは BMP-7 であり、その組織学的、分子生物学検討では有意な anti-catabolic、anabolic 効果を変性椎間板にもたらすことが判明した。しかしながら、匹数が少ないため他の物質の有用性については今後検討する必要がある。ゴムバンド+G23 群では髄核細胞数の減少と軽度の炎症細胞浸潤がみられた。このモデルでは細胞数を増加させる MCS、PRP、BMP-2、TGF- $\beta$  が有用である可能性もあり、今後の検討が待たれるところである。

#### 結果 6

異所性骨化の形成は認められなかった。タイプ 2 コラーゲンの染色性が増加していたが、硬膜管への癒痕組織の増生はなかった。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、substance P、substance P receptor NK-1、bradykinin、bradykinin receptor  $\beta$ 1、 $\beta$ 2 の染色性には明らかな変化はみられなかった。

#### 小括 6. 有効注入製剤の神経に対する安全性の検討

椎間板内注入療法の合併症で危惧される重篤なものは神経損傷に伴う麻痺である。BMP-7 が硬膜外に漏出したことを想定して、このモデルで検討した。痛みや運動麻痺といった神経損傷はみられず、組織学的にも異所性骨化や炎症性生理活性物質の産生増加は認められなかった。臨床の場で安全に使用することができる可能性を示唆した。

#### 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 2 件)

1. Susan Chubinskaya, Mamoru Kawakami, Lev Rappoport, Takuji Matsumoto, Nami Migita, David C Rueger. Anti-catabolic effect of OP-1 in chronically compressed intervertebral discs. J Orthopaedic Research. 2007;26: 517-30.

2. Mamoru Kawakami, Hiroshi Hashizume, Takuji Matsumoto, Yoshio Enyo, Motohiro Okada, Munehito Yoshida, Susan Chubinskaya. Safety of epidural administration of Osteogenic Protein-1 (OP-1/BMP-7): Behavioral and macroscopic observation. Spine. 2007;32:1388-93.

[学会発表] (計 1 件)

1. Mamoru Kawakami, Takuji Matsumoto, Hiroshi Hashizume, Susan Chubinskaya. A possible mechanism of pain abolished by biological manipulation of OP-1 for degenerative intervertebral disc. World Forum for Spine Research The Intervertebral Disc First Japanese Meeting. 2008.1.24-26, Kyoto

[図書] (計 1 件)

1. Mamoru Kawakami, Takuji Matsumoto, Hiroshi Hashizume, Munehito Yoshida, Koichi Kuribayashi, Susan Chubinskaya. Chapter 17. Biological manipulation for degenerative disc disease utilizing intradiscal osteogenic Protein-1 (OP-1/BMP-7) injection - An animal study. In: Spinal Reconstruction: Clinical Examples of Applied Basic Science, Biomechanics, and Engineering. Kai-Uwe Lewandrowski, Michael J. Yaszemski, Iain H. Kalfas, Paul Park, Robert F. McLain and Debra J. Trantolo eds, Informa Healthcare, New York, USA, pp 179-189, 2007.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

川上 守 (KAWAKAMI MAMORU)

公立大学法人和歌山県立医科大学・医学部  
医学科・教授

研究者番号：20195051

##### (2)研究分担者

(平成 19 年度)

南出 晃人 (MINAMIDE AKIHITO)

公立大学法人和歌山県立医科大学・医学部  
医学科・講師

研究者番号：40372867

(平成 20 年度)

中根 康博 (NAKANE YASUHIRO)

公立大学法人和歌山県立医科大学・医学部  
医学科・助教

研究者番号：40382345

##### (3)連携研究者：なし