

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 年 ~2010 年

課題番号：20500439

研究課題名 (和文) 腰痛での細胞内伝達経路の役割に関する研究

研究課題名 (英文) Patho-mechanism of transmission of low back pain

研究代表者 大鳥 精司

(Ohtori Seiji)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：40361430

研究成果の概要 (和文)：

ラット腰椎椎間板傷害モデルにおける椎間板の炎症性サイトカインの動向と脊髄・後根神経節 (DRG) 細胞での免疫組織学的変化の関係を経時的に検討した。椎間板局所は NGF、TNF α 、IL-6 の定量評価を、脊髄後角、DRG は免疫組織化学染色を行った。処置後早期には上昇する椎間板内の炎症性サイトカインは、処置後 2 週で沈静化するのに対し、脊髄後角・後根神経節といった感覚神経レベルでの感作は 8 週間持続していた。

研究成果の概要 (英文)：Study Design: Immunohistological analysis in an injured intervertebral disk (IVD) model. Objective: To elucidate and compare in rats the behavior of the sensory nervous system and inflammatory mediators in experimentally-injured IVDs. Summary of Background Data: Multiple human and animal studies have verified the presence of sensory nerve fibers in intervertebral disks or investigated the behavior of inflammatory mediators in injured IVDs, but no in vivo study to date has examined the relationship between the two. Methods: Eight-week-old female rats were used. In the disk-injured group, L5/6 disks were injured with a 24-gauge needle; simultaneously, the neurotracer Fluoro-gold (FG) was injected into the L5/6 IVD. The L5/6 IVD, dorsal root ganglia (DRGs) from the L1 to L6 levels, and the spinal cord were resected at several time points after surgery. Nerve growth factor (NGF), tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interleukin (IL)-6 production in the IVDs were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). DRGs were immunostained for calcitonin gene-related peptide (CGRP), and spinal cord sections were immunostained for ionized calcium-binding adaptor molecule-1 (iba1) and glial fibrillary acidic protein (GFAP). Results: NGF, and TNF-alpha levels (through 1 week) and IL-6 levels (through 4 days) were significantly higher in the disk-injured group than in the non-injured group ($p < 0.05$). However, starting at 2 weeks (NGF and TNF-alpha) or 1 week (IL-6), the differences in inflammatory mediator levels between the two groups no longer were significant. In contrast, the percentage of CGRP-immunoreactive (IR) neurons among FG-labeled DRG neurons, and the numbers of iba1-IR microglia and GFAP-IR astrocytes in the spinal dorsal horn remained significantly higher in the injured group than in the non-injured group at all time points ($p < 0.05$). Conclusion: Disk injury in rats produces persistent increases in neuropeptides in DRGs and glia in the spinal cord, but only transient increases in inflammatory mediators in IVDs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1, 900, 000	570, 000	2, 470, 000
2009 年度	1, 000, 000	300, 000	1, 300, 000
2010 年度	700, 000	210, 000	910, 000
年度			
年度			
総計	3, 600, 000	1, 080, 000	4, 680, 000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学、福祉工学

キーワード：椎間板，腰痛，細胞内シグナル，サイトカイン，グリア

1. 研究開始当初の背景

椎間板性腰痛の基礎研究は 1970 年に教室の篠原がヒト変性椎間板内への deep nerve ingrowth を報告して以来、椎間板内の炎症性サイトカインの上昇や、後根神経節 (DRG) における炎症性疼痛ペプチドの増加が報告された。しかし、脊髄後角におけるグリアの動向に関する報告はなく、さらにはこれらの関係を検討した報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的はラット腰椎椎間板傷害モデルにおける椎間板の炎症性サイトカインの動向と脊髄・DRG 細胞での免疫組織学的変化の関係を、経時的に検討することである。

3. 研究の方法

まず椎間板内の炎症性サイトカインの評価のため、8 週齢雌性の SD ラットを使用。L5/6 椎間板を前方より露出し 24G 針にて 10 回穿刺することにより椎間板傷害モデルを作成した。これらを処置後 1 日、4 日、1 週、2 週、4 週、8 週後に L5/6 椎間板を摘出し、非傷害群として無処置の L5/6 椎間板とともに ELISA 法にて NGF、TNF α 、IL-6 の定量評価を行った。さらに感覚神経の評価を行うため、同様にして椎間板傷害を行った後、逆行性神経トレーサーであるフルオロゴールド (FG) を同時に注射した。非傷害群として FG を注射のみ行った群も用した。これらを処置後 1 週、2 週、4 週、8 週後に還流固定した後、脊髄の腰膨大部と L1 から L6 までの左右後根神経節を摘出し、DRG は CGRP で、脊髄は Iba-1 (マイトログリアのマーカー) GFAP (アストロサイトのマーカー) で免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

炎症性サイトカインの定量結果では、NGF は処置後 1 日でピークとなり 1 週まで有意な上昇を認めましたが、2 週以降は非傷害群と比し有意な上昇は認められなかった。また、

TNF α 、IL-6 の結果はどちらも処置後 4 日でピークとなり有意な上昇を認めたが、TNF α は 2 週以降、IL-6 は 1 週以降非傷害群と比し有意な上昇は認めなかった。DRG の免疫組織化学染色の結果では、FG と CGRP で二重標識される細胞の割合を算出し、検討を行ったところ、非傷害群と比し CGRP 陽性細胞の割合が有意に上昇しており、それが 8 週にわたり継続していた。脊髄の免疫組織化学染色の結果では、1 ミリ平方メートルあたりの Iba-1、GFAP 陽性細胞数をカウントし検討したところ、全期間において傷害群で非傷害群と比し、Iba-1、GFAP 陽性細胞数が共に増加していた。本研究では椎間板傷害により椎間板内の炎症性サイトカインは傷害後 1 日から 1 週間という急性期に上昇し、以後低下していた。Burke らはヒト慢性椎間板性腰痛患者の椎間板の炎症性サイトカインの上昇を報告している。障害後 2 週以降に椎間板局所での炎症が沈静化した本研究結果と異なるのは動物種の違いや処置の違いによるものと考えられた。本研究で、傷害後早期に炎症性サイトカインが増加し、DRG での炎症性疼痛ペプチドや脊髄後角でのグリアの増加が認められたが、急性期を過ぎると炎症性サイトカインが低下しているのに対し、感覚神経系での変化は 8 週にわたり持続していた。この検討は本研究が初めてであり、このメカニズムの詳細はまだ不明であるが、本モデルにおいて局所での炎症が鎮静化しても、感覚神経レベルでの感作は長期間持続することがわかった。ラット腰椎椎間板傷害モデルにおいて局所での炎症が鎮静化した後も、感覚神経レベルでの感作は長期間持続していた。

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 14 件)

1. Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Okada T, Fukushima K, Ueno M, Saito W, Shintani R, Sakagami H, Takahashi K, Yamazaki M, Ohtori S, Kotani T. Less invasive and less technically demanding decompressive procedure for lumbar spinal stenosis—appropriate for general orthopaedic surgeons? *Int Orthop*. 2011;35:67-73
2. Sugiura A, Ohtori S, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Suzuki M, Norimoto M, Orita S, Eguchi Y, Kuniyoshi K, Ochiai N, Kishida S, Takaso M, Aoki Y, Ishikawa T, Arai G, Miyagi M, Kamoda H, Nakamura J, Takahashi K. Effect of applying p75NTR saporin to a punctured intervertebral disc on calcitonin gene-related peptide expression in rat dorsal root ganglion neurons. *J Orthop Sci*. 2010;15:407-13.
3. Wakai K, Ohtori S, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Suzuki M, Orita S, Eguchi Y, Ochiai N, Kishida S, Takaso M, Fukui Y, Hayashi Y, Aoki Y, Kuniyoshi K, Nakamura J, Ishikawa T, Arai G, Miyagi M, Kamoda H, Takahashi K. Primary sensory neurons with dichotomizing axons projecting to the facet joint and the low back muscle in rats. *J Orthop Sci*. 2010;15:402-6.
4. Akagi R, Aoki Y, Ikeda Y, Nakajima F, Ohtori S, Takahashi K, Yamagata M. Comparison of early and late surgical intervention for lumbar disc herniation: is earlier better? *J Orthop Sci*. 2010;15:294-8.
5. Hirose K, Iwakura N, Orita S, Yamashita M, Inoue G, Yamauchi K, Eguchi Y, Ochiai N, Kishida S, Nakamura J, Takaso M, Ishikawa T, Arai G, Miyagi M, Kamoda H, Aoki Y, Hiwatari R, Kakizaki J, Kunishi T, Kono M, Suzuki T, Toyone T, Takahashi K, Kuniyoshi K, Ohtori S. Evaluation of behavior and neuropeptide markers of pain in a simple, sciatic nerve-pinch pain model in rats. *Eur Spine J*. 2010;19:1746-52.
6. Ohtori S, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Koshi T, Suzuki M, Orita S, Eguchi Y, Ochiai N, Kishida S, Takaso M, Aoki Y, Ishikawa T, Arai G, Miyagi M, Kamoda H, Nakamura J, Takahashi K. Low back pain after lumbar discectomy in patients showing endplate modic type 1 change. *Spine*. 2010;35:E596-600.
7. Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Okada T, Toyama M, Ueno M, Fukushima K, Saito W, Minatani A, Miyajima G, Fukuda M, Takahira N, Takahashi K, Yamazaki M, Ohtori S, Okamoto H, Okutomi T, Okamoto M, Masaki T. Two-year results for scoliosis secondary to Duchenne muscular dystrophy fused to lumbar 5 with segmental pedicle screw instrumentation. *J Orthop Sci*. 2010;15:171-7.
8. Orita S, Ohtori S, Taniguchi A, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Suzuki M, Eguchi Y, Ochiai N, Kishida

- S, Takaso M, Aoki Y, Takahashi K, Kawakami M. Direct evidence for sensory innervation of the dorsal portion of the Co5/6 coccygeal intervertebral disc in rats. *Spine*. 2010;35:1346-52.
9. Nakamura J, Ohtori S, Sakamoto M, Chuma A, Abe I, Shimizu K. Development of new osteonecrosis in systemic lupus erythematosus patients in association with long-term corticosteroid therapy after disease recurrence. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28:13-8.
 10. Takahashi Y, Ohtori S, Takahashi K. Sclerotomes in the Thoracic and Lumbar Spine, Pelvis, and Hindlimb Bones of Rats. *J Pain*. 2010;11:652-662.
 11. Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Ueno M, Saito W, Shintani R, Takahashi K, Yamazaki M, Ohtori S, Okamoto M, Masaki T, Okamoto H, Okutomi T, Ishii K, Ueda Y. Can the caudal extent of fusion in the surgical treatment of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy be stopped at lumbar 5? *Eur Spine J*. 2010;19:787-96.
 12. Ohtori S, Koshi T, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Suzuki M, Takaso M, Orita S, Eguchi Y, Ochiai N, Kishida S, Kuniyoshi K, Nakamura J, Aoki Y, Ishikawa T, Arai G, Miyagi M, Kamoda H, Takahashi K. Existence of pyogenic spondylitis in Modic type 1 change without other signs of infection: 2-year follow-up. *Eur Spine J*. 2010;19:1200-5.
 13. Ohtori S, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Koshi T, Suzuki M, Orita S, Eguchi Y, Ochiai N, Kishida S, Takaso M, Kuniyoshi K, Ishikawa T, Arai G, Miyagi M, Kamoda H, Nakamura J, Aoki Y, Takahashi K. Change in Modic Type 1 and 2 signals after posterolateral fusion surgery. *Spine*. 2010;35:1231-5.
 14. Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Okada T, Fukushima K, Ueno M, Takahira N, Takahashi K, Yamazaki M, Ohtori S, Okamoto H, Okutomi T, Okamoto M, Masaki T, Uchinuma E, Sakagami H. Surgical management of severe scoliosis with high risk pulmonary dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: patient function, quality of life and satisfaction. *Int Orthop*. 2010;34:695-702.
- [学会発表] (計2件)
1. Miyagi M, Ishikawa T, Orita S, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Suzuki M, Ohtori S, Takahashi K Disk injury produces transient increase of inflammatory cytokines in disks, whereas long-lasting increase painful neuropeptide in sensory nerve innervating disks in rats. Patho-mechanism of chronic diskogenic low back pain. Oral Presentation WFSR (World Forum for Spine Research) 2010. 7. 10 Montreal, Canada
 2. Miyagi M, Ishikawa T, Orita S, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Suzuki M, Inoue G, Ohtori S, Takahashi K Disk injury produces transient increase of inflammatory cytokines in disks, whereas long-lasting increase painful neuropeptide in sensory nerve innervating disks in rats. Special Poster ISSLS (International Society for the Study of the Lumbar Spine) 2010. 4 . 10 Auckland, NZ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大鳥精司

(Ohtori Seiji)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：40361430

(2) 研究分担者

高橋和久

(Takahashi Kazuhisa)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20179477

高相 晶士

(Takaso Masashi)

北里大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90439117

(H21年度のみ)

(3) 連携研究者

なし

()

研究者番号：