

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：24701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591640
 研究課題名（和文） 疼痛関連行動解析からみた慢性腰痛モデルの確立とその発痛機序の
 解明
 研究課題名（英文） Development of a new animal model of chronic low back pain utilizing
 analysis of pain behaviors and elucidation of pain mechanisms
 研究代表者 川上 守 (Kawakami Mamoru)
 和歌山県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号：20195051

研究成果の概要（和文）：

脊椎後方支持組織である腰椎椎間関節を切除することで、椎間板変性、すべりを伴わない椎間不安定性が出現することをラットで証明した。このモデルを用いて、自然歩行下で行動解析の結果、疼痛関連行動が処置後7週で認められた。後根神経節で疼痛関連伝達物質、炎症性サイトカインの増加がみられ、行動異常には、侵害受容性ならびに神経障害性疼痛が関与している可能性が判明した。椎間板そのものの変性過程がこの疼痛行動に寄与しているのか、椎間不安定に伴う脊髄、馬尾、神経根の障害によるものかは今後の検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that bilateral resection of the facet joints results in intervertebral disc degeneration and segmental instability without spondylolisthesis in the rat. In this animal model, behavioral analysis utilizing CatWalk revealed pain-related behaviors 7 weeks after operation and increase in neurotransmitter related to pain and proinflammatory cytokines were seen in the affected dorsal root ganglia. In addition, we found that the pain-related behaviors were related to nociceptive and neurogenic pain. Further studies are needed to elucidate if the pain-related behaviors result from degenerative process of the intervertebral disc itself influence or irritation of the cauda equina and/or the nerve root secondary to segmental instability in this animal model.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 平成22年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 平成23年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 平成24年度 | 100,000 | 30,000 | 130,000 |
| 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

キーワード：A 脊椎脊髄病学

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

腰痛による就労喪失が経済的、社会的問題を引き起こしている (Druss BG, et al., Health Aff. 2002;21:105-11)。急性腰痛患者の 3 分の 1 以上に 1 年以上腰痛が持続し (Costa Lda C, et al. BMJ. 2009;339:b3829.)、腰痛の慢性化が患者個人の肉体的・精神的苦痛の原因にとどまらず、社会に対して重大な経済損失を与えている。厚生労働省大臣官房統計情報部社会統計課国民生活基礎調査によれば腰痛は男女ともに日本国民有訴者率の上位を占めているため、本邦においても慢性腰痛は看過できない病態であると言える。腰痛発症のメカニズムのひとつとして椎間板変性が注目され、多くの研究がなされてきたが、椎間板変性は加齢に伴い増加することから、高齢化社会を迎えた現在ではさらに椎間板変性を基盤とした腰痛発症が危惧される (Dionne CE, et al. Age Ageing 2006;35:229-34)。椎間板変性の機序を解明する目的で、多くの椎間板変性モデルの報告がある (Kaapa E, et al. Spine 1995; 20:59-66. Hutton WC, et al. Spine 1998; 23:2524-37. Lotz JC, et al. Spine 1998; 23:2493-506. Iatridis JC, et al. Spine 1999; 24:996-1002. Masuda K, et al. Spine. 2005 Jan 1;30:5-14. Sobajima S, et al. Spine. 2005 Jan 1;30:15-24.)。しかしながら、これらのモデルは椎間板そのものに外傷を加え、その変性過程を検討したもので、椎間板変性と疼痛の関連性は不明のままである。また、椎間板細胞を再生させる目的として骨髄幹細胞 (Sakai D, et al. Biomaterials. 2006;27:335-45. Sakai D, et al. Spine. 2005;30:2379-87. Acosta FL Jr, et al. Neurosurg Focus. 2005;19:E4. Steck E, et al. Stem Cells. 2005;23:403-11. Zhang YG, et al. Clin Orthop Relat Res. 2005;430:219-26.)、BMP-7 (Kawakami M, et al. Spine. 2005;30:1933-9, Takegami K, et al. Spine J. 2005;5:231-8, Zhang Y, et al. Am J Phys Med Rehabil. 2005;84:322-9.)、TGF- β (Zhan Z, et al. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2004;24:599-601, 624.)、BMP-2 (Park JS, et al. Clin Calcium. 2004 Jul;14:76-8.)、IGF-1 (Walsh AJ, et al. Spine. 2004;29:156-63.) の有用性が示されているが、疼痛との関連に注目した報告はわれわれの報告 (Kawakami M, et al. Spine. 2005;30:1933-9.) のみである。われわれの報告も変性椎間板による脊髄神経根障害の疼痛を評価したもので、変性椎間板そのものの疼痛評価ではない。障害が生じた椎間板が慢性の疼痛を惹起するかどうかは不明であ

る。われわれはラットを用いて、腰髄神経根上に髄核を留置することで後枝に出現する疼痛関連行動のひとつである痛覚過敏が出現するモデルを確立した (Kawakami M, et al. Clin Orthop. 2000;376:268-77.)。また、われわれは慢性機械的圧迫を加え作成したラット尾椎変性椎間板の髄核を腰髄神経根上に留置すると痛覚過敏が正常髄核に比し、高度に出現することを示した (Kawakami M, et al. J Orthop Res 2003; 21: 535-9.)。このモデルの変性椎間板へ BMP-7 を注入することによりプロテオグリカンやコラーゲンなどの細胞外基質産生の増加、interleukin-1 β 、tumor necrosis factor- α の発現抑制、痛覚過敏の消失がみられることを報告した (Kawakami M, et al. Spine. 2005;30:1933-9. Chubinskaya S, et al. J Orthop Res. 2007;517-30.)。これらのモデルは神経根性疼痛のモデルになり得るが、局所痛、すなわち腰痛の評価には適切でない。疼痛関連行動解析を用いて、慢性腰痛モデルを確立することが本研究の目的である。

2. 研究の目的

慢性腰痛の発現には社会的、精神心理的な要因も指摘されているが、急性腰痛からの慢性化も決して稀でない。腰痛を惹起する組織として「椎間板」が重要視され、椎間板損傷に伴う急性腰痛や変性椎間板による慢性腰痛の報告が多い。損傷椎間板に治癒機転が働けば腰痛は消失すると考えられるが、慢性腰痛に移行する症例も多々存在する。この慢性化の機序が解明できれば、慢性腰痛の新しい診断、治療法が確立可能である。そのためには精神社会的な要因が除外できる慢性腰痛の動物モデルが必要であるが、腰痛を評価することの困難さから再現性のある信頼できるモデルはない。本研究の目的は、ラットの腰椎椎間板に直接損傷を加えずに椎間板負荷が加わる種々のモデルを作成し、処置後の疼痛行動を観察することで再現性のある信頼できる慢性腰痛モデルを確立する。また、経時的に椎間板を採取し、分子生物学的に疼痛行動との関連を検討し、慢性疼痛発現の機序を解明することにある。

3. 研究の方法

(1). ラット椎間板負荷モデルの作成

脊椎の後方要素である、椎間関節は生体力学的に重要な要素である。椎間関節を含む後方要素の機能障害は椎間板に負荷が生じる。そこで Sprague-Dawley ラットを用いて、両側 L4-5 椎間関節を切除した群 (切除群) を作成し、椎間板への直接侵襲を加えない、椎

間板負荷モデルを作成した。椎間関節を展開したのみの Sham 群を作成し作成し、経時的に定量的に行動解析を行った。

(2). 行動解析

疼痛行動を評価するには自然歩行下での運動能力や痛みに関するデータの収集が不可欠であるため、ラットに負荷をかけずにフットプリントをダイナミックに解析可能なインテグレート型システム (CatWalk XT) を用い微細な行動を評価した。切除群と椎間関節を展開したのみの Sham 群、無処置ラットを対照群とし、経時的に定量的に行動解析を行った。

(3). X線学的評価

腰椎前後屈単純 X 線を撮影し、椎間不安定性の有無を評価した。

(4). 組織学的検討

L4/5 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 染色を行い、組織学的変性を各群間で比較観察した。

(5). 疼痛発現物質の組織学的、分子生物学的検討

疼痛行動の出現した時点で、椎間板 (L4/5) を採取し、Leukocyte Common Antigen、マクロファージ、インターロイキン (IL)-1 β 、一酸化窒素合成酵素 (NOS)、Tumor necrosis factor (TNF)- α 、ケモカイン (IL-8、mochrophage chemotactic factor-1 (MCP-1))、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、Caveolin-1 を免疫組織化学で検討した。Ultra-sensitive TNF- α ELISA kit を用いて、TNF- α を定量する。Protainase と collagenase を用いて細胞成分を酵素的に分離し、37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ の条件下に DMEM で培養し、IL-1 β 、NOS、TNF- α 、IL-8、MCP-1、BDNF、Caveolin-1 の mRNA 発現に差があるかどうかを Reverse transcription/polymerase chain reaction (RT-PCR) 法、Western blotting 法にて観察した。

(6). 椎間板負荷モデルでの後根神経節の神経伝達物質、炎症性サイトカインの変化

L4-5 椎間高位の腰部後根神経節で、substance P、calcitonin gene related peptide、IL-1 β 、NOS、TNF- α 、IL-8、MCP-1 ならびに BDNF を免疫組織学的に観察し、疼痛関連行動との関係を検討する。疼痛関連行動が後根神経節での疼痛関連物質発現に関係することを証明し、モデルの信頼性を確認した。

(7). 疼痛関連行動に関連する生理活性物質

の投与ならびに拮抗薬あるいは阻害薬投与による疼痛関連行動の変化

椎間関節切除に伴う椎間板変性あるいは椎間不安定性による疼痛関連障害が、侵害受容性疼痛か、神経障害性疼痛かどちらに起因するかを検討する目的に、薬物投与を行い、疼痛関連行動がどのように改善するか検討した。疼痛関連行動に関連する生理活性物質の拮抗薬あるいは阻害薬を椎間板内投与し、疼痛関連行動の変化を観察した。

4. 研究成果

(1). ラット椎間板負荷モデルの作成と自然歩行下での行動解析

腰椎椎間関節 (L4-5 レベル) 切除群と展開のみの sham 群、無処置の対照群を用いて、処置後経時的に CatWalk XT を用いて自然歩行下での行動解析をおこなった。処置後 3 週では切除群で、手術侵襲によると思われる正常歩行パターン率と歩行速度の変化量の減少がみられたが、その後回復した。処置後 7 週で、切除群において、歩幅、最大接地面積、最大接地光学的輝度、速度、毎秒あたりのステップ数の有意な減少がみられた。Sham 群、対照群では明らかな歩行パターンに変化は認められず、各群ともに明らかな下肢の運動麻痺はなかった。切除群で、処置後 7 週で、疼痛関連行動が認められた。

(2). X線学的評価

前後屈側面画像を用いて X 線学的検討をおこなった。処置後 7 週の切除群で、L4-5 椎間の拡大と可動性の増大が、他の群に比して有意に認められ、椎体前方の骨棘形成が 80% に存在した。椎間のすべりは認められなかった。

(3). 組織学的検討

組織学的には、術後 7 週の処置群で明らかな細胞外基質産生の減少がみられ、プロテオグリカン、コラーゲン量の減少が認められた。すなわち、有意な椎間板変性が出現していた。しかしながら、Sham 群、対照群では有意な変化はなかった。

(4). 疼痛発現物質の組織学的、分子生物学的検討

椎間関節切除高位の椎間板は椎間高が増大し、sham 群、対照群に比し、プロテオグリカン、1 型コラーゲンの減少がみられた。さらに終板近くの線維輪に亀裂が生じ、椎間後方で軟骨基質の増大、2 型コラーゲンの増加が認められた。椎間不安定性の認められた椎間板の interleukin (IL)-1 β 、Tumor necrosis factor (TNF)- α 、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の免疫染色では軽度の染色性の増加がみられたが、Reverse

transcription/polymerase chain reaction (RT-PCR)法、Western blotting 法を用いて観察した IL-1 β 、TNF- α 、BDNF の mRNA 発現には明らかな差異は認められなかった。

(5). 椎間板負荷モデルでの後根神経節の神経伝達物質、炎症性サイトカインの変化

L5 後根神経節を採取し、免疫組織化学を用いて calcitonin gene related peptide (CGRP)、IL-1 β 、TNF- α 、BDNF の発現を、切除群、sham 群、対照群で比較検討した。処置後 7 週の椎間関節切除群の腰部後根神経節で、CGRP、IL-1 β 、TNF- α 、BDNF の発現増加が認められ、疼痛関連行動との関連性が示された。

(6). 疼痛関連行動に関連する生理活性物質の投与ならびに拮抗薬あるいは阻害薬投与による疼痛関連行動の変化

腰椎椎間関節切除後、歩行解析装置を用いて、疼痛関連行動の出現したラットを用いて、椎間板変性による疼痛関連障害が、侵害受容性疼痛か、神経障害性疼痛かどちらに起因するかを検討する目的で、非ステロイド性抗炎症薬、プレガバリン、ノイロトロピンを経口投与し、歩行機能を解析した。非ステロイド性抗炎症薬の投与では、速度、毎秒あたりのステップ数の改善が、プレガバリン、ノイロトロピンの投与では、歩幅、最大接地面積、最大接地光学的輝度の改善が得られた。今回作成したモデルでの歩行障害は侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛に関連した歩行機能障害であることが判明した。インターロイキン (IL)-1 β 、Tumor necrosis factor (TNF)- α の拮抗薬、抗体の椎間板注入を試みたが、処置後 7 週でのラットでは、手技的に困難であり検討することができなかった。

このモデルで認められた歩行パターンの障害の一部は疼痛関連行動として報告されている。このモデルで認められた行動異常には、侵害受容性ならびに神経障害性疼痛に関連していた。しかしながら、椎間板そのものの変性過程がこの疼痛行動に寄与しているのか、椎間不安定に伴う脊髄、馬尾、神経根の障害によるものかは今後の検討が必要である。

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 Fukui D, Kawakami M, Nakao S. A pain related behavior and intervertebral disc degeneration after lumbar facetectomy - Animal model for degenerative disc disease.

Transaction of Orthopedic Research Society 37: 1192, 2012. (査読有り)

② 川上 守. 神経伝達物質、炎症物質と神経根性疼痛のメカニズム. 脊椎脊髄ジャーナル 25(4):351-354, 2012. (査読無し)

③ 福井大輔、川上 守、中尾慎一、森下詔子、松岡淑子. 脊椎手術術後患者に対するプレガバリンの有用性-前向き比較研究. 中部整災誌. 55:1129-1130, 2012. (査読無し)

④ Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, Suzuki M, Murakami K, Shibayama M, Orita S, Eguchi Y, Arai G, Sakuma Y, Kubota G, Oikawa Y, Ozawa T, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K, Inoue G, Kawakami M, Ohtori S. Disk dynamic compression in rats produces long-lasting increases in inflammatory mediators in disks and induces long-lasting nerve injury and regeneration of the afferent fibers innervating discs: A pathomechanism for chronic discogenic low back pain. Spine 37 (21):1810-1818, 2012. (査読有り)

⑤ 福井大輔、川上 守、中尾慎一、松岡淑子. ラット腰椎椎間関節切除による変性椎間板モデルの作成. 日整会誌 86(8):S1399, 2012. (査読有り)

⑥ Okada M, Minamide A, Yoshida M, Kawakami M, Enyo Y, Endo T. Observations in the diagnosis of cervical myelopathy in patients suffering from diabetes mellitus. Spinal Cord. 50(12):878-81, 2012. (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

① Fukui D, Kawakami M, Nakao S, Matsuoka T. A new animal model of degenerative disc disease seen in human. Annual meeting of International Society for the Study of the Lumbar Spine, Spine Week 2012, Amsterdam, Netherlands, May 28 - June 1, 2012.

② 福井大輔、川上 守、中尾慎一、松岡淑子. ラット腰椎椎間関節切除による変性椎間板モデルの作成. 第 27 回日整会基礎学術集会, 名古屋市, 平成 24 年 10 月 26-27 日

[図書] (計 1 件)

① 川上 守. III 薬で痛みをコントロールする 12 プロスタグランジン E1 はどのように使用すればよいですか? 運動器の痛みをとる・やわらげる 現場で使えるペインコントロール, 宗圓 聡、紺野慎一編集, メディカルビュー, 東京, p127-129, 2012.

[産業財産権] なし

○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 川上 守
(Kawakami Mamoru)
和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20195051

(2) 研究分担者 延與 良夫（平成22年度）
(Enyo Yoshio)
和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80105430

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：