

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592185

研究課題名(和文)腰痛・関節痛の機序・診断・新規治療法の開発

研究課題名(英文) Patho-mechanism and new diagnosis tool of low back and joint pain. Investigation of new treatment for low back and joint pain.

研究代表者

大鳥 精司(Ohtori, Seiji)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40361430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：局所骨もしくは人工骨は脊椎固定に使用できる材料であるが、明らかに腸骨に比し骨癒合の点で劣る。本研究はこの課題に対して多血小板血漿(PRP)を使用する事で骨癒合促進効果を検討する事である。腰椎すべり症を伴う腰部脊柱管狭窄症39症例(2群に)に本試験を行った前向き非盲検ランダム化試験で(1)インプラント+局所骨群(2)インプラント+局所骨+自己血400mlから作成したPRP群であった。インプラント+局所骨群の骨癒合までの期間は平均 9.8 ± 0.53 ヶ月、インプラント+局所骨+PRP群では平均 7.8 ± 0.67 ヶ月であった。有意にインプラント+局所骨+PRP群で短縮していた($p < 0.05$)。

研究成果の概要(英文)：We prospectively evaluated the effect of PRP on bone union in human posterolateral lumbar fusion (PLF) surgery. Thirty-nine patients undergoing 1- or 2-level instrumented PLF for lumbar degenerative spondylosis with instability were randomized to receive either PRP or control groups. All patients in both groups showed significant bone union at final follow-up. The average period for union was 7.8 months in the PRP group and 9.8 months in the control group ($p < 0.05$). The platelet count and growth factor concentrations in PRP were 7.7- and 50-times greater than those in plasma, respectively ($p < 0.05$). PRP-treated patients showed more rapid bone union after spinal fusion surgery than the control.

研究分野：脊椎外科

キーワード：腰痛 関節痛

1. 研究開始当初の背景

米国では4000万人以上が腰痛、関節痛を訴えており、年間2000億ドル以上の医療費がその治療に費やされている。腰痛、関節痛を含む慢性痛への対策として、米国議会は2000年より痛み研究の10年を宣言した。腰痛、関節痛の生涯罹患率は85-90%とされ、本邦厚生労働省の報告では、共に男性、女性1位にランクされる国民愁訴である。腰痛は病因を確定できない非特異的腰痛が85%を占めると報告されている。このような腰痛は、筋膜、椎間板、椎間関節、骨粗鬆症、神経根性などが含まれる。一方、関節痛での局所診断は可能であるが、その病理学的疼痛機序に関する研究は殆どない。腰痛、関節痛疾患の最も困難な点は、慢性化し治療に難渋する点である。また労働における慢性腰痛の経済損失は社会問題となっている。我々は慢性腰痛の疼痛発生機序として、腰椎椎体終板や椎間板線維輪周囲の疼痛伝達神経が椎体終板・椎間板内部に進入(*Nerve ingrowth*)することを世界で始めて報告し(*Shinohara et al., Nihonseikeigekagakkaisi 1970*)、約30年後、Freemontらによって追試された(*Freemont et al., Lancet 1997*)。その*Nerve ingrowth*には神経栄養因子(NGF)や腫瘍壊死因子(TNF alpha)等のサイトカインが影響していることを報告した(*Ohtori et al., Spine 1999-2007*)。また、腰痛を惹起する脊椎変形にある種の遺伝子が関与することも報告した(*Okawa et al., Nature Genet. 1998*)。疫学調査では、千葉県労働者に対する大規模調査にて喫煙、肥満、職種が、慢性腰痛に関連していることを明らかにした(*Inoue et al., ISSLS 2007*)。関節痛に関しても、ラット膝、股関節の疼痛機序に関して、その感覚支配高位、感覚神経の特性について報告した(*Ochiai et al., Osteoarthritis Cartilage. 2007, Nakajima et al., JBJS-Br 2008*)。ヒト変形性関節症患者から摘出した標本を詳

細に検討し、サイトカインの発現増強と、感覚神経の増生を認めた(*Ogino et al., Clin Rheumatol. 2009*)。膝関節痛モデルや腰痛モデルに多血小板血漿(platelet-rich plasma: PRP)を添加する事で軟骨、椎間板再生が促進され、疼痛を有意に減少させる事に成功した(*Nakagawa et al., 2009, Yamashita et al., 2009*)。画像診断として、椎間板変性や軟骨変性をMRI T2マッピングを用いその変性を詳細に検討し、更に神経根障害に対する拡散MRIの方法を開発した(*Watanabe et al., AJR2007, Eguchi et al., 2009*)。以上から、基礎研究から臨床応用へのトランスレーショナルリサーチとして1)変性すべり症への脊椎固定術への多血小板血漿の使用と2)慢性椎間板性腰痛、神経根性疼痛へのTNF alpha阻害剤注入試験は千葉大学医学部附属病院にて平成21年に認可済みであり、現在稼働中である。神経根ブロックでのエタネルセプト直接注射はステロイドより有意に疼痛、痺れに有効である事が判明した(*Ohtori et al., Spine 2011*)。しかしながら、整形外科疼痛疾患へのアプローチは依然として断片的であり、十分に解明されていない。また、これら動物から見出された知見は殆ど臨床へ還元されていない。一方で、薬物療法として一般の消炎鎮痛剤の効果は少なく、効果のある薬剤は、抗不安薬、抗うつ薬、オピオイドであるがその副作用が懸念される。近年、椎間板や関節軟骨の治療として再生医療的アプローチなどが試みられているが、確実性や侵襲の点、またこれらの治療により、十分な除痛が得られるかは不明であり、多くの問題が残されている。以上の点から、整形外科疾患である、慢性腰痛、膝関節痛の診断、治療は社会的問題点である。我々は今までの腰痛、関節痛研究を更に推進すべく、機序の解明とそれを有効に臨床に還元することが重要と考えられている。すなわち、ヒト(画像診断を含む)

動物、培養細胞を用いた基礎的疼痛研究（主に腰痛、膝関節痛）を行い、これら疼痛に関する因子を検討する。また治療的観点からこれらから導き出された成果について、臨床応用を含めた治療を推進するために本研究費を申請した。

2. 研究の目的

(1) 動物を用いた基礎的研究

対象動物モデルは腰痛モデル（椎間板変性、骨粗鬆症、腰部脊柱管狭窄）、関節痛モデル（変形性膝関節症、変形性股関節症）である。様々なモデルに対し、疼痛行動を検討する。また支配神経の高位、特性を免疫組織学的、電気生理学的手法を用いて調べる。現時点で、全てのモデルは作成済みであり、準備段階は整っていると考える。

(2) ヒトを用いた臨床的研究（画像診断を含む）

検討項目は慢性椎間板性腰痛（摘出椎間板）、腰部脊柱管狭窄（髄液）、変形性膝、股関節症（関節液、滑膜、人工関節時の骨軟骨）である。各当痛スコアリングと、疼痛因子の検討を行う。ELISA、免疫組織化学を予定している。現時点で、変形性膝関節症の関節液、滑膜、人工関節時の骨軟骨に関してはELISA、免疫組織化学を一部終了しており他の部位も同様の手法で可能であると考え。画像診断として、MRI T2、T1 マッピングによる椎間板、関節軟骨の変性と疼痛の関連、拡散MRIを用いた神経根障害の検討を行う。手術前後の疼痛改善の程度と、脳でのMRスペクトロスコピーを検討する。これらも、過去に報告している手法を用い、準備段階は十分と考える。

(3) 培養細胞を用いた基礎的疼痛研究

一般に神経因性疼痛（動物の坐骨神経結紮等）は疼痛学的行動を評価する事は容易であ

るが、腰痛や関節痛の行動学的評価を行うのは困難であるとされる。我々は、腰痛、関節痛の培養細胞を用いた疼痛系を報告した

（*Yamauchi et al., Spine 2009*）ヒトから取り出した疼痛椎間板や膝滑膜と生後ラットから摘出した後根神経節細胞を共培養し、その感覚神経の活性化により疼痛を評価するモデルである。このモデルを使用し、腰痛、関節痛に関連する疼痛神経誘導因子、受容体、サイトカイン等を検討する。

(4) 新たな薬物治療（遺伝子治療を含む）の開発

現在トランスレーショナルリサーチとして当大学病院で進行中の疼痛治療であるが、前述の如く1) 腰椎手術における多血小板血漿使用による骨癒合促進効果と除痛に関する多施設・前向きランダム化・臨床研究がある。現在30症例を終了しており残り120症例である。2) 慢性椎間板性腰痛、神経根性疼痛に対する抗TNF、IL6阻害剤（エンブレル、アクテムラ）を使用した椎間板内注入、神経根ブロックが現在100症例、今後100症例予定である。また、新たな遺伝子治療を用いた疼痛抑制として、サイトカイン産生を上流で阻害する因子（NFκB デコイ、IKKB 阻害剤）を動物で検討中である。更に、炎症性疼痛疾患に対する脳内モルヒネのエンドルフィン安全で副作用のない状態で遺伝子導入し、除痛を確認しており、今後、腰痛、関節痛モデルの応用予定である（*Yamashita et al., Spine 2009*）。腰痛に対する日本独自の抗NGF抗体を作成し、動物モデルでの有効性を確認中である（小野薬品との共同研究）。以上の研究は予備研究、既発表論文の基盤があり、十分可能と考えている

3. 研究の方法

(1) 動物を用いた基礎的研究

モデル作成は腰痛モデル（椎間板変性、

骨粗鬆症、腰部脊柱管狭窄) 関節痛モデル (変形性膝関節症、変形性股関節)である(マウス、ラット、家兎)。椎間板変性は腰椎椎間板穿刺モデル、尾椎椎間板穿刺、圧迫モデルを用いる (Orita et al., Spine 2009)。脊柱管狭窄症モデルは伊藤の方法に従い作成する (Ito et al., Spine 2007)。骨粗鬆症モデルは卵巣摘出後 27 週齢である (Orita et al., Spine 2010)。関節痛モデルは半月板、前十字靭帯を切離し、3 ヶ月のものを使用する (Ochiai et al., Osteoarthritis Cartilage. 2007)。変形性股関節は炎症物質を投与して作成する (Nakajima et al., JBJS-Br 2008)。様々なモデルに対し、疼痛行動を検討する。疼痛行動は新規キャットウォーク XT8.0(ノルダス社)システムを使用する。局所のサイトカイン量は ELISA にて、また支配神経の高位、特性を免疫組織学的、脊髄での in vivo パッチクランプの電気生理学的手法を用いて調べる。再生医療と疼痛の関連を調べるため、家兎変性椎間板、軟骨に対しては軟骨移植を行い、疼痛のマーカーと MRI T2、T1 マッピングを用いその相関を検討する。現時点で、全てのモデルは作成済みであり、準備段階は整っていると考える。

(2) ヒトを用いた臨床的研究(画像診断を含む)
我々はヒト慢性椎間板性疼痛、膝関節痛の機序として、椎間板や膝関節軟骨下骨内部へその変性に伴い、神経発芽が神経栄養因子の一つである nerve growth factor をトリガーとして生ずることを報告した。しかしながら様々な問題点を残した。神経発芽のみに注目し、その土壌である組織のサイトカインや、伸長因子の検討が不十分であり、また、患者数が少なく有意性の判定が困難であることが挙げられる。以上を踏まえて以下の研究を予定とした。

ヒト腰椎椎間板、膝関節、股関節標本の採

取(ヒト標本の採取等に関しては千葉大学医学部倫理委員会にて承認済み)する。炎症性サイトカインである tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), IL-1,6, COX-1, 2、疼痛伝達物質 (substance P, CGRP)、神経栄養因子(NGF, BDNF, NT-3)、神経発芽の増加を計測する。これらは ELISA、免疫組織化学を予定している。

千葉県内参加の病院における患者承諾のもとに検討を行い症例数を増加させる。疼痛強度、保存療法・手術療法を含めた成績、合併症、薬物療法・運動療法の選択と効果も検討する。さらに、画像診断として、椎間板変性や軟骨変性を MRI T2、T1 マッピングを用いその変性を詳細に検討し、疼痛との関連を調べる。更に神経根障害に対する拡散 MRI の方法を基礎に診断に困難とされる椎間孔部狭窄と疼痛との関連を検討する。慢性疼痛患者に対する、プロトン 1.5T または 3.0T MR スペクトロスコピー(以下:¹H-MRS)を用いて前頭前野、前帯状回の局所脳神経機能を測定することによって、慢性疼痛の病態を評価する。前帯状回、前頭前野の NAA 濃度を LC model を用いて解析を予定している

(Watanabe et al., AJR2007, Eguchi et al., 2009)

(3) 培養細胞を用いた基礎的疼痛研究
我々は動物モデルで腰痛、膝関節痛、骨粗鬆症性疼痛を検討してきた (Ohtori et al., Spine 1999-2007)。しかしながら in vivo での動物モデルでは詳細な検討が出来ないことが明らかになった。そこで、ヒト、動物椎間板や滑膜、軟骨細胞、骨細胞と神経細胞の共培養での腰痛、関節痛の機序の解明を試みる予定である。現段階でヒト慢性腰痛患者の椎間板から摘出した椎間板細胞との共培養は終了しており、他の組織でも十分可能であると考えている (Yamauchi et al., Spine 2009)

ラット、マウス腰椎椎間板、滑膜、軟骨、骨、後根神経節、ヒト椎間板、滑膜、軟骨、

骨を取り出し、混合培養する。

培養椎間板、滑膜、軟骨、骨に炎症性サイトカインである tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), IL-6 を投与し、疼痛伝達物質 (substance P, CGRP) 神経栄養因子 (NGF, BDNF, NT-3) の増加を免疫組織学的手法、ELISA にて計測する。また椎間板、軟骨細胞が産生するプロテオグリカン量は DMMB 法にて定量する。

活性化されたそれらの神経細胞の培養椎間板、滑膜、軟骨、破骨細胞への神経突起伸長度を検討する。細胞体のどの受容体が関与しているのかも検討する (p55, p75 neurotrophic receptors, p55, p75 TNF receptors, Trk A, Trk B)。

神経細胞における疼痛伝達物質 (substance P, CGRP) の増減について免疫組織学的手法、ELISA にて計測する。TNF alpha, IL-6 を抑制するために、椎間板、滑膜、軟骨、破骨細胞へその産生阻害因子である、Nuclear Factor-kappa B decoy (Anges 社、Osaka より提供済み)、リセドロネート (味の素より提供済み) を導入し効果を判定する。

(4) 新たな薬物治療 (遺伝子治療を含む) の開発

サイトカイン阻害する因子 (NFkB デコイ、IKKB 阻害剤)

近年その疼痛伝達の主要なサイトカインとしてインターロイキンや腫瘍壊死因子 (TNF-) が挙げられてきた。しかし、一つの因子を抑制しても、十分な除痛が得られない。そこで今回 RNA レベルでこれらすべてのサイトカインの上流に位置する転写因子 nuclear factor kappa B decoy、IKKB 阻害剤 (Anges 社、Osaka より提供済み) を用いて抑制し、*in vivo*, *in vitro* にて検討を行う。NFkB デコイはヒトアトピー性皮膚炎での有効性が確かめられており、疼痛領域への治療を予定している。

ヒト臨床試験：脊椎固定術に対する多血小板血漿 (PRP) 使用による骨癒合、除痛の効果

臨床試験責任医師の外来を受診した腰椎手術予定で同意を得られた患者で、腰椎すべり症、変性側弯症である。160 症例 (2 群に) に本試験を行い、骨癒合効果、除痛、副作用等の検討を行う非盲検ランダム化試験である。手術後の骨癒合能、臨床成績、血中サイトカインアッセイ、副作用を検討する。前日に自己血 400ml 採取し、PRP を作成、無菌状態で 4 度にて保存する。PRP 作成時の血球成分は術後戻し輸血とする。

ヒト臨床試験：難治性神経根性疼痛に対する抗 TNF、IL6 阻害剤 (エンブレル、アクテムラ) の神経根ブロックの効果の臨床試験
難治性神経根性疼痛で明らかな神経根圧迫症例の患者を対象とする。インフォームド・コンセントにより同意を得られた患者で、NSIADs 無効例である。ステロイド注射との RCT 研究である。除痛効果と、手術回避率の検討である。現在 100 症例実施済みであり、今後 100 症例予定である (Ohtori et al., Spine 2011)。

4. 研究成果

局所骨もしくは、人工骨は脊椎固定に使用できる材料であるが、明らかに腸骨に比し骨癒合の点で劣るのは周知の事実である。本研究はこの課題に対して多血小板血漿 (PRP) を使用する事で骨癒合促進効果を検討する事である。2009 年我々はトランスレーショナルリサーチとして、前向き RCT による、脊椎外科手術における PRP と局所骨を用いた骨癒合促進効果と副作用に関する臨床試験を 2013 年に終了した。その結果を記載したい。疾患名は腰椎すべり症を伴う腰部脊柱管狭窄症であった。ほぼ全例が骨粗鬆症を併発していた。39 症例 (2 群に) に本試験を行った前向き非盲検ランダム化試験である。臨床試験部により、割付因子* (年齢、性別) を用いた最小化法により症例を以下の 2 群に割り

付けた。

- (1) インプラント+局所骨群、
- (2) インプラント+局所骨+自己血 400ml から作成した PRP 群であった。

当日に自己血 400ml 採取し、遠心分離(800G : 3分、3750G : 6分)で PRP を採取した。手術時に作成した一部の PRP5ml を -80 で保存し ELISA にて成長因子を測定した。成長因子は PDGF の各種アイソフォーム、TGF- であった。手術後の骨癒合能、臨床成績(腰痛、下肢痛)、有害事象を検討した。

結果として、両群 39 症例で年齢、症状、画像所見において有意差はなかった ($p>0.05$)。PRP 中の血小板濃度は、血液中の約 8 倍と有意に増加していた ($p<0.01$)。また、サイトカインアッセイを測定した結果、PRP 中の骨形成に關与する PDGF-AA、AB、BB、TGF- は血中濃度の 50 倍以上であった ($p<0.01$)。骨癒合は全例に認められた。インプラント+局所骨群の骨癒合までの期間は平均 9.8 ± 0.53 ヶ月、インプラント+局所骨+PRP 群では平均 7.8 ± 0.67 ヶ月であった。有意にインプラント+局所骨+PRP 群で短縮していた ($p<0.05$)。VAS による疼痛の評価では両群に有意差はなかった ($p>0.05$)。有害事象では、両群共に感染、発熱、臓器機能障害等はなかった。

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 1 件) 査読有

Seiji Ohtori. No acceleration of intervertebral disc degeneration after a single injection of bupivacaine in young age group with follow-up of 5 years. Asian Spine J 2013;3:212-7

[学会発表](計 1 件)

Seiji Ohtori. Patho-Mechanism and

Treatment of Low Back Pain.日本脊椎精髓病学会(招待講演) 2013年4月10日~12日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

[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:

出願年月日:

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

大鳥 精司(Ohtori Seiji)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号: 40361430

(2)研究分担者

高橋 和久(Takahashi Kazuhisa)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 20179477

井上 玄(Inoue Gen)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号: 80594209