

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462306

研究課題名(和文) 椎間板変性モデルを用いた腰痛治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of therapy for low back pain utilizing animal model of intervertebral disc disease

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板変性と腰痛の関係を直接明確にした基礎研究はなく、慢性腰痛に対する有効な治療法も確立されていない。ラット腰椎椎間関節切除ラットの歩行解析の結果、腰部や椎間板に直接損傷を加えたモデルと同様の歩行異常が出現した。また馬尾、神経根の圧迫はみられず、椎間板変性と椎間不安定性が出現した。この慢性腰痛モデルに各種薬物の経口投与、椎間板内注入をおこなったが、プレガバリン経口投与のみが歩行異常を改善した。薬物投与による椎間板の組織学的変化の改善はみられず、椎間関節切除レベルの脊椎固定にても歩行異常の改善は得られなかった。椎間板変性による腰痛発現には椎間板変性に伴う神経障害性疼痛の関連が考えられる。

研究成果の概要(英文)：There was no basic research, which directly demonstrated the relationship between degeneration of the intervertebral disc (IVD) and low back pain. We developed a rat model, in which lumbar facetectomy resulted in delayed gait abnormality seen in the low back pain models, which were induced by direct injuries of the paravertebral muscle and IVD. In our model, spinal instability and IVD degeneration were observed at the affected level, but not compression of the neural tissues such as the cauda equina and nerve roots. A variable of drugs was administered orally or into the affected IVD in this model. However, only oral administration of pregabalin resulted in improvement of gait abnormality. Intervertebral degeneration was not recovered or regenerated after any drug administrations. In addition, spine fusion at the affected level didn't improve gait abnormality. These results suggest that IVD degeneration does induce low back pain and that the mechanism is related to neuropathic pain.

研究分野：整形外科

キーワード：腰痛 椎間板変性 動物モデル 椎間関節切除 歩行解析 椎間不安定性 薬物療法 脊椎固定

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の慢性疼痛保有率は 13.4%であり、その内、慢性腰痛の占める割合は 65.7%にも及ぶ(服部正治ほか、ペインクリニック、2009;30:S3-S14.)。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)ことから、わが国でも約 1120 万人が慢性腰痛による肉体的・精神的苦痛を強いられ、社会に対して重大な経済損失を与えている可能性が高い。一方、MRI をはじめとした画像診断の発展は目覚ましいものがあり、また、新しい薬物療法や手術療法が開発されているが、最近の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をみても腰痛は男女ともに日本国民有訴者率の上位を占め、減少傾向にない。したがって、慢性腰痛に対する有効な治療法の確立が早急に望まれるところである。慢性腰痛の発現には心理社会的要因の関与が指摘されている(Kikuchi S. Eur Spine J. 2008 ;17 Suppl 4:421-7.) が、腰痛を引き起こす組織として椎間板が古くから注目され、変性椎間板による慢性腰痛に関する報告が多い。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)。したがって、心理社会的要因を排除した変性椎間板による慢性腰痛モデルを用いて有効で安全な治療法を確立する必要がある。

椎間板変性動物モデルは多く報告されている(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.)が、椎間板に何らかの侵襲を加えて作成されたもので、直接侵襲を加えない椎間板変性モデルはなかった。また、変性椎間板が痛みに関連することを示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。ラット腰椎椎間関節を切除することで、経時的に当該椎間板にすべりを伴わない不安定性と変性が発生し、処置後 7 週で疼痛関連行動がみられるモデルを確立した(Fukui D, Kawakami M. ORS 2012)。このモデルの特徴は、椎間板変性が直接侵襲ではなく、経時的に出現し、歩行解析で、歩幅・後肢接地時の光学輝度・遊脚期速度・平均歩行速度・正常歩行割合の減少と開脚歩行がみられることである。特に、後肢接地時の光学輝度低下は神経損傷モデルで出現する(Vrinten DH, et al. Pain. 2003;102:203.)ことから、馬尾、脊髄神経根の障害がみられないわれわれのモデルでの疼痛行動発現には椎間板変性による侵害性障害のみではなく、神経因性障害が混在する機序が関与している可能性があ

る。したがって、このモデルを用いれば歩行解析による疼痛関連行動を指標に治療法を検討することが可能である。

一方、慢性腰痛に対する治療法として、抗うつ薬、筋弛緩薬、非ステロイド性消炎鎮痛薬、オピオイドなどの薬物療法、運動療法、認知行動療法が推奨されている(European guideline for chronic low back pain: [http://www.backpaineurope.org/web/files/WG2\\_Guidelines.pdf](http://www.backpaineurope.org/web/files/WG2_Guidelines.pdf))。系統だった保存療法が勧められているが、それができない場合は手術療法も選択肢とされている(Mirza SK, Deyo RA. Spine. 2007;32(7):816-23.)。慢性腰痛に対するプレガバリンの有用性の報告(Romanò CL, et al. J Orthop Traum. 2009; 10: 185)があるが、その有用性、安全性を動物モデルで証明したものはない。慢性腰痛の動物モデルで各種薬剤の有用性、安全性の検討が必要である。

慢性腰痛発現には椎間板変性のみではなく不安定性も重要な因子とされ(Lotz JC, Ulrich JA. J Bone Joint Surg Am. 2006;88 S2:76-82.)、手術療法として一般に脊椎固定術が用いられている。手術療法には椎間板切除後の椎体間固定術と椎間板を温存したままでの後側方固定術がある。しかしながら、手術そのものの有効性や術式別での有用性を検討した報告は痛みを指標にしたモデルでは皆無である。

## 2. 研究の目的

慢性腰痛は身体的・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。慢性腰痛の発現には心理社会的な要因の関与が指摘されているが、腰痛を引き起こす組織として椎間板が重要視され、変性椎間板による慢性腰痛の報告が多い。しかしながら、変性椎間板と腰痛の関係は明確でなく、慢性腰痛に対する有効で安全な治療法も確立されていない。慢性腰痛発現には心理社会的な要因が関与するため、変性椎間板と痛みに焦点を当てた動物モデルが必要である。われわれが作成した変性椎間板による慢性腰痛モデルを用いて、慢性腰痛に対する有効で安全な治療法を確立することにある。

## 3. 研究の方法

### (1) 系統の異なるラットでの腰椎椎間板変性モデルの作成

椎間関節切除に伴う椎間板への影響に免疫応答が関与する可能性があるため、免疫応答の異なる 3 種類のラットでモデルを作成し、歩行障害の出現に差がでないかどうかを検討した。系統の異なる、Fisher ラット、Lewis ラット、Sprague-Dawley ラットを用いて、サイオペンタール腹腔内投与による全身麻酔下に、L4-5 両側椎間関節全切除を行い、腰椎椎間板変性モデルを作成した。椎間関節を展開するのみの sham 群をもうけ、無処置ラットを対照群とした。各群のラットを用いて、

自然歩行下にフットプリントから前後趾のプリント面積、歩行幅、前後趾の荷重分布、床への設置時間、前後趾の協調性を解析可能な CatWalk (Noldus, Wageningen, Netherlands)を用いて、行動解析 (CatWalk法) (Gabriel AF, et al. J Neurosci Methods. 2007;163: 9-16, Angeby-Moller K, et al. J Neurosci Methods. 2008;174:1-9.)をおこなった。

#### (2) 運動療法の有用性の検討

腰痛治療では運動療法の有用性が指摘されている。運動療法の有効性を検討する目的で、歩行解析で異常がみられた椎間板変性モデルに、トレッドミルでの運動負荷を強制的に1週間加えて、行動変化を経時的に行った。運動負荷を加えないラットを対照に加え、4群で比較検討した。

#### (3) 画像解析(単純 X 線およびマイクロ CTでの検討)

椎間関節切除椎間の椎間高の変化、椎間すべり、椎間可動性を単純 X 線側面像、前後屈で経時的に計測した。マイクロ CT を用いて3次元的に腰椎各椎間を定量的に観察した。

#### (4) 当該椎間板の組織学的、免疫組織化学的検討

ラットの当該椎間板を処置後経時的に摘出し、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、Safranin O-fast green 染色を行い、組織学的変性スコア (Chujo T, et al. Spine 2006, 31:2909-17.)をマイクロ CT の結果と比較検討した。免疫組織化学を用いてアグレカン、インターロイキン(IL)-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NGF の変化を観察する。椎間板変性モデルで椎間板変性が改善するかどうか、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NGF が変化するかどうかを検討し、歩行解析結果との関連性を検証した。

#### (5) 薬物療法の有用性の検討

歩行解析で異常がみられた椎間板変性モデル群、処置後同週の sham 群、対照群に、三環系抗うつ薬としてアミトリプチリン塩酸塩 1mg/kg、プレガバリン 1.5mg/kg、ロキソプロフェン 1mg/kg、アセトアミノフェン 50mg/kg、ワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液 (ノイロトロピン) を1週間連続経口投与し、歩行解析をおこない、椎間板の組織学的変化を検討した。

#### (6) 椎間板注入療法の有用性の検討

椎間板変性モデルを用いて、後腹膜アプローチで L4-5 椎間板を展開して TNF- $\alpha$  阻害剤 (エタネルセプト) 1mg/kg、抗 NGF 抗体 (タネズマブ) 50  $\mu$ g/kg、プピバカイン 0.2  $\mu$ l の椎間板内注入効果を歩行解析で検討し、椎間板の組織学的変化と比較した。

#### (7) 脊椎固定術の有用性の検討

椎間板変性モデルを用いて、尾椎椎体切除の後、L4-5 横突起を後外側アプローチで展開し、尾椎椎体を移植骨として棘突起間に骨移植し、メッシュプレートと椎弓根螺子を用

いて固定する後側方固定術群を作成し、歩行解析を経時的におこない、歩行異常が改善するかどうか検討した。

#### (8) 腰痛に対するストレスの影響

反復寒冷刺激によるストレス (specific alternation of rhythm in temperature (SART) stress) (Kita T, et al. Folia Pharmacol Japon. 1975; 71:195-210. Ohara H, et al. J Pharm Jpn.1991;57:243-50.) がこの腰痛モデルの歩容や痛み刺激に対する反応に影響するかどうかを検討した。von Frey filament を用いて痛覚過敏、機械的アロディニアを評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 系統の違うラットでの検討

Fisher ラット、Lewis ラット、Sprague-Dawley ラットでそれぞれ L4-5 椎間関節切除を行い、椎間関節を展開するのみの sham と経時的に比較解析したが、ラットの系統による有意な差は観察されなかった。どの系統のラットでも椎間関節切除後 6-8 週で、歩幅・後肢接地時の光学輝度・遊脚期速度・平均歩行速度・正常歩行割合の減少と開脚歩行がみられた。

#### (2) 運動療法の有用性の検討

椎間関節切除モデルへのトレッドミルでの運動負荷は歩行解析の結果、有意な効果が得られなかった。

#### (3) 画像解析(単純 X 線および 3D マイクロ CTでの検討)

Sprague-Dawley ラットのモデルで、X 線学的に椎間の変化を観察したが、処置後 7 週で椎間の開大、椎間の回旋不安定性、骨棘形成が認められた。動態撮影では前方椎間の動きが大きく、椎間後方を中心に回旋不安定性が存在した。椎間すべりはみられなかった。3D マイクロ CT を用いた画像解析では対照群、Sham 群では形態学的な異常はみられなかったが、切除群では全例に L4-5 椎間の終板の不整が認められ、後弯変形を伴っていた。また、前方骨棘が 69%にみられた。L4-5 レベルの椎間高は、対照群、sham 群に比し、切除群で有意な開大がみられた。逆に L3-4、L5-6 レベルの隣接椎間では、対照群と sham 群に比し、切除群で有意に狭小化していた。椎間関節切除に伴い、当該レベルのみではなく隣接椎間にまで影響することが判明した。

#### (4) 当該椎間板の組織学的、免疫組織化学的検討

切除群では L4-5 椎間板の明らかな変性がみられた。椎間板変性スコアは、切除群の L4-5 ならびに L5-6 レベルで、他の群に比し、有意に高値であった。L3-4 椎間板のスコアは切除群で高い傾向がみられたが、有意差はなかった。椎間の開大、変性、後弯変形や後方筋群の影響が隣接椎間にも変性を引き起こした可能性がある。3D マイクロ CT の結果と L4/5、L5/6 椎間では相関がみられた。椎間板内ではアグレカンの減少、インターロイキン

(IL)-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NGF の増加が免疫組織化学でみられた。

#### (5) 薬物療法の有用性の検討

歩行解析で異常がみられた椎間板変性モデル群、処置後同週の sham 群、対照群に、アミトリプチリン塩酸塩、プレガバリン、ロキソプロフェン、アセトアミノフェン、ワクシニアウイルスノイロトロピンを1週間連続経口投与し、歩行解析をおこなった結果、腰痛を示唆する歩容異常はプレガバリン投与でのみ有意な改善がみられた。椎間板の組織学的変化は投与の有無にかかわらず認められなかった。

#### (6) 椎間板注入療法の有用性の検討

椎間関節切除レベルの L4-5 椎間板内に、エタネルセプト、タネズマブ、プリパカインを注入したが、歩行解析で有意な変化はみられず、椎間板の組織学的変化もなかった。

#### (7) 脊椎固定術の有用性の検討

椎間板変性モデルを用いた後側方固定術は歩行解析の結果に影響を及ぼさなかった。

#### (8) 腰痛に対するストレスの影響

機械的刺激に対する痛覚過敏が椎間板変性モデルで認められたが、SART ストレスでの変化はなかった。しかしながら、この椎間板変性モデルでは SART ストレスを加えることで歩行障害が増悪した。

### 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 5件)

1. 著者名: Daisuke Fukui, Tomonori Matsumoto, Mitsuru Naiki, Koichi Masuda, Mamoru Kawakami  
論文標題: Psychological stress enhances gait disturbance and allodynia induced by lumbar facetectomy in the rat  
雑誌名: "Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting Abstracts" iBooks. Poster No.1747, 2016.
2. 著者名: 福井大輔、川上 守、内木 充、舛田浩一  
論文標題: ラット腰椎椎間板切除後の歩行以上に対するストレスの影響  
雑誌名: 日本整形外科学会誌 89 (8):S1787,2015.
3. 著者名: 福井大輔、川上 守、内木 充、井上 望、舛田浩一  
論文標題: 3D $\mu$ CT を用いたラット腰椎椎間板切除後の構造学的変化の検討  
雑誌名: 日本整形外科学会誌 89 (8):S1615,2015.
4. 著者名: Daisuke Fukui, Mamoru Kawakami, Munehito Yoshida, Shin-ichi Nakao,

Toshiko Matsuoka, Hiroshi Yamada  
論文標題: Gait abnormality due to spinal instability after lumbar facetectomy in the rat  
雑誌名: European Spine Journal 24(9): 2085-2094, 2015.

5. 著者名: Daisuke Fukui, Koichiro Murata, Shintaro Shoju, Kevin Cheng, Keianne Yamada, Rinoka Sato, Mitsuru Naiki, Nozomu Inoue, Koichi Masuda, Mamoru Kawakami  
論文標題: Three-Dimensional Micro-Computed Tomography Analysis for Spinal Instability after Lumbar Facetectomy in the Rat  
雑誌名: "Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting Abstracts" iBooks. Paper Number 206, 2015.

#### [学会発表](計 9件)

1. 発表者名: Daisuke Fukui, Mamoru Kawakami, Tomonori Matsumoto, Mitsuru Naiki  
演題名: Psychological stress results in mechanical allodynia, but not in low back pain in the rat  
学会名: Spine Week 2016, The International Society for the Study of the Lumbar Spine,  
発表年月日: May 16 - 20, 2016  
発表場所: Singapore
2. 発表者名: Daisuke Fukui, Tomonori Matsumoto, Mitsuru Naiki, Koichi Masuda, Mamoru Kawakami  
演題名: Psychological stress enhances gait disturbance and allodynia induced by lumbar facetectomy in the rat  
学会名: Orthopaedic Research Society 2016 Annual meeting  
発表年月日: March 5-8, 2016  
発表場所: Orlando, Florida, USA
3. 発表者名: 福井大輔、川上 守、内木 充、Koichi Masuda  
演題名: ストレス負荷がラットの行動変化に及ぼす影響  
学会名: 第23回日本腰痛学会  
発表年月日: 平成27年11月14-15日  
発表場所: 東京
4. 発表者名: 福井大輔、川上 守、内木 充、舛田浩一  
演題名: ラット腰椎椎間板切除後の歩行以上に対するストレスの影響  
学会名: 第30回日本整形外科学会基礎学術集会  
発表年月日: 平成27年10月22-23日  
発表場所: 富山市

5. 発表者名: 福井大輔、川上 守、内木 充、井上 望、舛田浩一  
演題名: 3μDCT を用いたラット腰椎椎間板切除後の構造学的変化の検討  
学会名: 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会  
発表年月日: 平成 27 年 10 月 22-23 日  
発表場所: 富山市
6. 発表者名: Daisuke Fukui, Koichiro Murata, Shintaro Shoji, Kevin Cheng, Keianne Yamada, Rinoka Sato, Mitsuru Naiki, Nozomu Inoue, Koichi Masuda, Mamoru Kawakami  
演 題 名 : Three-dimensional micro-computed tomography analysis of the intervertebral disc after lumbar facetectomy in the rat  
学 会 名 : Annual meeting of International Society for the Study of the Lumbar Spine  
発表年月日: June 8 - 12, 2015  
発表場所: San Francisco, California, USA
7. 発表者名: Daisuke Fukui, Tomonori Matsumoto, Mitsuru Naiki , Koichi Masuda , Mamoru Kawakami  
演 題 名 : Stress enhances gait disturbance induced by lumbar facetectomy  
学 会 名 : Annual meeting of International Society for the Study of the Lumbar Spine  
発表年月日: June 8 - 12, 2015  
発表場所: San Francisco, California, USA
8. 発表者名: Daisuke Fukui, Koichiro Murata, Shintaro Shoji, Kevin Cheng, Keianne Yamada, Rinoka Sato, Mitsuru Naiki, Nozomu Inoue, Koichi Masuda, Mamoru Kawakami  
演 題 名 : Three-Dimensional Micro-Computed Tomography Analysis for Spinal Instability after Lumbar Facetectomy in the Rat  
学会名: Orthopaedic Research Society 2015 Annual meeting  
発表年月日: March 28-31, 2015  
発表場所: Las Vegas, Nevada, USA
9. 発表者名: 福井大輔、川上 守、中尾慎一、石元優々、松岡淑子  
演題名: ラット腰椎椎間関節切除による腰椎不安定性モデルに生じた歩行障害の検討  
学会名: 第 21 回日本腰痛学会  
発表年月日: 平成 25 年 11 月 1-2 日

発表場所: 東京

〔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 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 なし  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者 なし  
( )

研究者番号: