



Title	高純度硬化性ゲルが髄核摘出術後の腰痛に与える影響
Author(s)	浦, 勝郎
Description	配架番号 : 2596
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14480号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14480
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96777
Type	doctoral thesis
File Information	Katsuro_Ura.pdf



学位論文

高純度硬化性ゲルが髄核摘出術後の腰痛に与える影響

(Effects of ultra-purified alginate gels on low back pain after discectomy)

2021 年 3 月

北海道大学

浦 勝郎

Katsuro Ura

学位論文

高純度硬化性ゲルが髄核摘出術後の腰痛に与える影響

(Effects of ultra-purified alginate gels on low back pain after discectomy)

2021 年 3 月

北海道大学

目 次

発表論文目録および学会発表目録	・ ・ ・ ・ ・ 1 頁
要旨	・ ・ ・ ・ ・ 3 頁
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 5 頁
略語表	・ ・ ・ ・ ・ 7 頁
第一章 変性椎間板組織において局所麻酔薬が椎間板変性を与える影響	
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 8 頁
実験方法	・ ・ ・ ・ ・ 10 頁
実験結果	・ ・ ・ ・ ・ 15 頁
考察	・ ・ ・ ・ ・ 22 頁
第二章 高純度硬化性ゲルが髄核摘出術後の腰痛に与える影響	
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 24 頁
実験方法	・ ・ ・ ・ ・ 26 頁
実験結果	・ ・ ・ ・ ・ 30 頁
考察	・ ・ ・ ・ ・ 38 頁
総括および結論	・ ・ ・ ・ ・ 41 頁
謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 42 頁

引用文献

・・・・・・・・・・・・・・ 43 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の学術誌に掲載された。

Katsuro Ura, Hideki Sudo, Koji Iwasaki, Takeru Tsujimoto, Daisuke Ukeba, Norimasa Iwasaki.

Effects of Intradiscal Injection of Local Anesthetics on Intervertebral Disc Degeneration in Rabbit Degenerated Intervertebral Disc.

Journal of Orthopaedic Research 37 (9): 1963-1971, 2019

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

Katsuro Ura, Katsuhisa Yamada, Daisuke Ukeba, Norimasa Iwasaki, Hideki Sudo

Ultra-purified alginate gel implantation decreases inflammatory cytokine levels, prevents intervertebral disc degeneration, and reduces acute pain after discectomy

Scientific Reports (Under Review)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 浦勝郎, 須藤英毅, 笠場大介, 辻本武尊, 岩崎倫政

椎間板ブロックが変性椎間板細胞・組織に与える影響
第33回日本整形外科学会基礎学術集会, 奈良春日野国際フォーラム
2018年10月12日 9:40~10:40 (口演)

2. Katsuro Ura, Hideki Sudo, Daisuke Ukeba, Norimasa Iwasaki

Is Discoblock Safe for Degenerated Intervertebral Discs?

Orthopaedic Research Society 2019 Annual Meeting, Austin, Texas, USA, February 2-5, 2019. (Poster session)

3. 浦勝郎, 須藤英毅, 筈場大介, 辻本武尊, 岩崎倫政

椎間板ブロックが変性椎間板細胞・組織に与える影響

第 48 回日本脊椎脊髄病学会

2019 年 4 月 19 日 17:15～17:45 (ポスター)

パシフィコ横浜

4. 浦勝郎, 須藤英毅, 筈場大介, 辻本武尊, 岩崎倫政

ソフトバイオマテリアルによる椎間板性疼痛の抑制効果

第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会

2020 年 10 月 15 日 17:20～18:20

オンライン開催

要旨

【背景と目的】

椎間板は体幹を支える主要な構成要素であり、腰椎椎間板ヘルニアに代表される椎間板障害に起因した腰痛は、自立した健康的な生活を大きく損なう。現在、腰椎椎間板ヘルニアに対する標準的手術治療として脱出髄核を摘出する髄核摘出術が一般的に行われるが、摘出後に更に椎間板組織の変性変化を進行させ、慢性的な腰痛を生じさせる可能性が指摘されている。これまでに我々が開発した高純度硬化性アルギン酸ゲル (Ultra-purified alginate gel; UPAL) は、無細胞条件下での椎間板組織修復能が示されており、髄核摘出術後の腰痛軽減にも有効であると考えられる。しかし、これまでの動物実験では UPAL ゲルの疼痛緩和効果は検討されてこなかった。また、UPAL ゲルを用いた治療に際し、X 線透視下に少量の局所麻酔薬 (局麻薬) を注入する椎間板ブロックが選択されうるが、変性椎間板に局麻薬を注入した場合の影響については検討されていない。そこで我々は、局麻薬が変性椎間板組織に与える影響 (テーマ①) と UPAL ゲルが椎間板性疼痛に与える影響 (テーマ②) を明らかにすることを目的に本研究を実施した。

【材料と方法】

テーマ①：家兎椎間板線維輪を 18G 針で経皮穿刺し 4 週後の変性椎間板を器官培養した。生理食塩水 (NS)、lidocaine (LD)、bupivacaine (BP) を 26G 針で局所投与 3、7 日後に共焦点レーザー顕微鏡による死細胞率評価を、7 日後に組織学的評価及び TUNEL assay を行った (*ex vivo* 試験)。更に同局麻薬を家兎変性椎間板内に X 線イメージ下に局所投与し、24、48 週後に MRI と組織学的評価を行った (*in vivo* 試験)。

テーマ②：ラット尾椎椎間板針穿刺モデルと日本白色家兎腰椎椎間板髄核吸引モデルに UPAL ゲルを埋植した (各椎間板 $n=6$)。埋植 1、4、7、28 日後に炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-6 と神経成長因子受容体 TrkA に対する免疫組織化学染色を実施し、髄核と線維輪における陽性細胞率を算定した。また、埋植 28 日後に椎間板の組織学的評価を行った。ラットモデルでは、さらに、疼痛関連行動分析として Hargreaves test, von-Frey test, Tail flick test を実施した (各 $n=6$)。

【結果】

テーマ①：(*ex vivo* 試験) 培養 3 日後の死細胞率は NS、LD、BP 各群で未投与変性椎間板群よりも有意に高かったが、7 日目では BP 群のみが他群より有意に高い死細胞率・TUNEL 陽性細胞率を示した。BP 以外の群間差はなかった。(*in vivo*

試験) MRI による変性評価では群間差はなかった。組織学的評価では NS、LD、BP 各群で未投与変性椎間板群よりも細胞数が減少していたが、変性スコアでは群間差はなかった。

テーマ②：髄核と線維輪いずれにおいても、家兎、ラットモデル共に、ゲル群は吸引または穿刺単独群に比べて TNF- α 、IL-6、TrkA 陽性細胞率が有意に低値であった。また、ラットにおいてゲル群では穿刺単独群に比べて組織変性が抑制された。ラット疼痛関連行動分析では、ゲル群は穿刺単独群に比べて Hargreaves test と von-Frey test では潜時が有意に長く、Tail flick test では有意に短縮した。

【考察】

局麻薬が変性椎間板組織に与える影響について、*ex vivo* レベルでは、BP が細胞毒性を惹起していたが、NS でも組織障害性が確認されたことは正常椎間板では見られない結果であった。但し、*in vivo* 試験の結果からは、正常椎間板と同様に生体レベルでは局麻薬自体の影響よりも薬液投与時の圧力が変性に大きく関与していることが示唆された。また、UPAL ゲルが椎間板障害に起因する炎症性サイトカインや神経成長因子受容体の発現、および、椎間板組織変性を抑制することで術後疼痛の軽減にも有用である可能性が示唆された。

【結論】

局麻薬を変性椎間板椎間板内に注入することは、生理食塩水注入と同程度の組織障害性しか示さず、局麻薬自体が変性を進行させるという証拠は示されなかった。UPAL ゲル埋植は、椎間板組織変性の予防のみならず、椎間板部分切除術後の疼痛の軽減にも有用であると考えられ、椎間板ヘルニアなどの疾患に対する画期的な新しい治療法となり得ることが示唆された。

緒言

体幹を支持する脊柱において椎間板は重要な構成要素であるが、その変性は腰痛の主たる原因となり、多様な脊柱変性疾患をも惹起する(Schwarzer et al., 1995, Luoma et al., 2000)。これらの疾患は鎮痛剤投与や手術療法によって治療されるが、いずれも対症療法の域を出ない(Iwasaki et al., 2014a, Ohtori et al., 2009)。手術療法では、変性椎間板を部分切除したり、罹患椎間に対して固定が施されたりするが、椎間板部分切除後の変性進行や、固定術後の固定隣接椎間障害など、術後に新たな問題が生じることが課題である(Tobert et al., 2017, Bailey et al., 2013, Barth et al., 2008, McGirt et al., 2009)。このため、椎間板変性と椎間板性疼痛を共に制御する新たな治療法の確立が期待されている。

椎間板性疼痛においては、損傷によって生じた椎間板内の炎症が神経成長因子である nerve growth factor (NGF)の発現を増加させ(Lotz and Ulrich, 2006, Aoki et al., 2004, Woolf et al., 1997)、その特異的受容体である high-affinity tyrosine kinase A (TrkA)受容体と NGF が結合して椎間板への神経新生が生じる(Mohd Isa et al., 2018)。また、Tumour necrosis factor- α (TNF- α) や interleukin-6(IL-6) などの炎症性サイトカインの有痛性椎間板における発現増加が示されている(Burke et al., 2002, Weiler et al., 2005, Hayashi et al., 2008)。

これまでに我々が開発した高純度硬化性アルギン酸ゲル(Ultra-purified alginate gel; UPAL)は、無細胞条件下での椎間板組織修復能が示されており(Tsujimoto et al., 2018)、髄核摘出術後の腰痛軽減にも有効であると考えられる。しかし、これまでの動物実験では UPAL ゲルの疼痛緩和効果は検討されてこなかった。

UPAL ゲルを用いた治療に際し、麻酔方法についても局所麻酔などの低侵襲化が図れば理想的である。現在、椎間板性疼痛の診断的治療法として、X 線透視下で椎間板の髄核に少量の局所麻酔薬を注入する椎間板ブロックが広く行われており(Ohtori et al., 2009)、UPAL ゲルを用いた新しい治療を行う際に麻酔方法として選択され得る。しかし、過去の *in vitro* レベルの報告では局所麻酔薬の椎間板髄核細胞に対する毒性が指摘されていた(Iwasaki et al., 2014b)。我々はウサギ正常椎間板に局所麻酔薬を注入する *in vivo* 研究を行い、局所麻酔薬が椎間板組織変性に与える影響は生理食塩水と同等であることを示した(Iwasaki et al., 2014a)。しかしながら、臨床では変性椎間板に対して局所麻酔薬を注入するため、変性椎間板に局所麻酔薬を注入した場合の影響について検討を加える必要がある。

本研究は 2 つの仮説から成る。1 つ目は、局所麻酔薬の椎間板内注入は変性椎間板組織の組織障害に直接関与しないということ、2 つ目は、椎間板部分摘出後の UPAL ゲル埋植が椎間板性疼痛を軽減するということである。本研究の目

的は、変性椎間板において局所麻酔薬が椎間板変性に及ぼす影響を家兎変性椎間板器官培養モデル(*ex vivo*)ならびに家兎 *in vivo* 変性椎間板モデル用いて検討すること、ならびに、UPAL ゲル埋植が炎症性サイトカイン産生、TrKA 発現、椎間板組織変性を抑制し、侵害刺激に対する疼痛関連行動を減少させるか、動物モデルを用いて評価するということである。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AF	annulus fibrosus
CT	computed tomography
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FSU	functional spinal unit
G	gauge
HA	hyaluronic acid
HE	Hematoxylin & Eosin
IL-6	interleukin-6
IHC	immunohistochemistry
IVD	intervertebral disc
MRI	magnetic resonance imaging
NGF	nerve growth factor
NP	nucleus pulposus
NS	not significant
PBS	phosphate buffered saline
PI	propidium iodide
SE	standard error
SO	safranin O
TNF- α	tumour necrosis factor- α
TrkA	high-affinity tyrosine kinase A
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
UPAL	ultra-purified alginate gel

第一章 変性椎間板組織において局所麻酔薬が椎間板変性に与える影響

緒言

椎間板性腰痛は世界で最も一般的な障害の一つであり、一般的に加齢や外傷に伴う進行性の椎間板変性が原因である(Brayda-Bruno et al., 2014)。椎間板変性は椎間板ヘルニアや脊柱変形に代表される様々な脊椎疾患を惹起する(Schwarzer et al., 1995, Luoma et al., 2000)。これらの疾患は鎮痛剤投与や手術療法によって治療されるが、いずれも対症療法の域を出ない(Iwasaki et al., 2014a, Ohtori et al., 2009)。手術療法では、変性椎間板を部分切除したり、罹患椎間に対して固定が施されたりするが、椎間板部分切除後の変性進行や、固定術後の固定隣接椎間障害など、術後に新たな問題が生じることが課題である(Tobert et al., 2017, Bailey et al., 2013, Barth et al., 2008, McGirt et al., 2009)。このため、椎間板変性と椎間板性疼痛を共に制御する新たな治療法の確立が期待されている。

我々はソフトバイオマテリアルを用いて椎間板変性を制御する新しい治療法を開発し、現在、医師主導型治験を実施している。将来的には治療の低侵襲化を目標としており、治療における麻酔方法についても局所麻酔などの低侵襲化が図れば理想的である。現在、椎間板性疼痛の診断的治療法として、X線透視下で椎間板の髄核に少量の局所麻酔薬を注入する椎間板ブロックが広く行われており(Ohtori et al., 2009)、新しい低侵襲治療を実施する際の麻酔方法として選択され得る。一方で、椎間板細胞に対する局所麻酔薬の細胞毒性を指摘する *in vitro* 研究が散見され(Lee et al., 2010, Chee et al., 2014, Iwasaki et al., 2014b, Moon et al., 2012, Quero et al., 2011)、また、椎間板に針を穿刺する行為自体が椎間板変性を引き起こす可能性について指摘する報告もある(Masuda et al., 2005, Elliott et al., 2008)。

椎間板変性に対する局所麻酔薬の影響を調査した臨床研究もいくつか報告されている。Ohtoriらは、若年椎間板性疼痛患者の椎間板内にbupivacaineを注入しても椎間板変性の進行は認められなかったと報告している(Ohtori et al., 2013b)。Strubeらは、0.5% bupivacaineを使用して椎間板ブロックを実施した場合、対照群と比較して椎間板ブロック実施群における髄核組織1 mm²あたりの平均細胞数が有意に減少したことから、bupivacaineがヒトの生体内において椎間板細胞毒性を有することや髄核細胞のアポトーシス増加を引き起こす可能性があると報告している(Strube et al., 2017)。このように、局所麻酔薬を用いた椎間板ブロックが椎間板変性にどのような影響を与えるかについては一定の見解が得られていない。

我々は以前、lidocaineまたはbupivacaineを健常椎間板内に注入した場合に局所

麻酔薬が椎間板変性に与える影響について、初めて*ex vivo*および*in vivo*レベルで検討し、報告した(Iwasaki et al., 2014a)。この健常椎間板を用いた検討においては、*lidocaine*および*bupivacaine*が*ex vivo*モデルでは髄核細胞のアポトーシスを誘導するものの、*in vivo*モデルでは生理食塩水を注入する場合と同等の組織毒性しか認められず、局所麻酔薬自体の組織毒性は指摘できなかった(Iwasaki et al., 2014a)。

軟骨細胞を*bupivacaine*に暴露した*in vitro*実験では、細胞生存率は変性細胞よりも健常細胞の方が高いことが示されており、健常組織と変性組織では局所麻酔薬から受ける影響が異なることが示唆されている(Chu et al., 2006)。通常、臨床においては変性椎間板に対して椎間板ブロックが行われるため、変性椎間板における局所麻酔薬の組織毒性を確認することが重要である。そこで、本研究では、家兎変性椎間板器官培養モデル (*ex vivo*) と*in vivo*変性椎間板モデルを用いて、ウサギ変性椎間板組織において*lidocaine*と*bupivacaine*が椎間板組織変性に与える影響について検討した。

実験方法

1. ウサギ髄核穿刺モデルの作成

本研究のために行った動物実験は北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。ウサギ髄核穿刺モデル(Iwasaki et al., 2014a, Iwasaki et al., 2014b)は、局所麻酔薬が変性椎間板に与える影響に関する実験のために作成した。計47羽 (*ex vivo* 15羽、*in vivo* 32羽) の4-5か月齢雄日本白色家兎 (3.2-3.5 kg) を使用した。手術の15分前にcarprofen (5 mg/kg) を皮下投与した。ketamine (10 mg/kg) と xylazine (3 mg/kg) の混合液の静脈内注射にて麻酔導入し、自然換気下でsevoflurane (2 ~ 3 %) を混合した酸素と空気(3.0 l/min)による吸入麻酔で麻酔を維持した。局所麻酔薬 (1 % lidocaine) を皮下注射した後、X線透視装置で確認した標的椎間板 (*ex vivo* ; T12/L1 -L5/6、*in vivo* ; L2/3 -4/5) の直上で皮膚を小切開し、筋肉を鈍的に剥離して低侵襲内視鏡的椎間板切除術 (METRx; Medtronic Sofamor Danek) に使用するダイレータを標的椎間板の線維輪に向けて挿入した。次に、18 G針をダイレータに通して椎間板を穿刺した (初期穿刺、深さ5 mm) 。ダイレータおよび穿刺針を抜去し、創部を生理食塩水で洗浄後に筋膜と皮膚を縫合閉鎖した。椎間板変性は穿刺後4週後に完成するため(Masuda et al., 2003)、*ex vivo* および *in vivo* 実験は初期穿刺の1ヶ月後に開始した。

2. *ex vivo*

2.1 ウサギ変性椎間板器官培養

ウサギは、heparin (10,000単位) を静脈内注射した後(Iwasaki et al., 2014a)、pentobarbital sodiumを静脈内注射で過量投与し、安楽死させた。脊椎全体 (T12/L1-L5/6) を摘出し、無菌条件下で軟部組織、脊椎後方要素、椎体、および終板を除去して椎間板のみを採取した。採取した椎間板を、control群 (処置なし)、puncture-only群 (穿刺のみ追加)、saline群 (生理食塩水注入)、lidocaine群 (1 % lidocaine 注入)、bupivacaine群 (0.5 % bupivacaine注入) に無作為に割り付けた。追加穿刺や薬液の注入には26 G針を取り付けたマイクロシリンジ (Hamilton, Reno, NV, USA) を使用し、モデル作成時の初期穿刺とは異なる部位から穿刺を行った。生理食塩水 (0.9 %, Otsuka Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) 、1 % lidocaine (Astrazeneka, Luton, UK) 、0.5 % bupivacaine (Astrazeneka) は15 μ l注入された。次に、10 % ウシ胎児血清 (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) 、1 % penicillin/streptomycin、および、1.25 μ g/ml fungizone (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を添加したDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 8 mlを各wellに満たした6 well plateを用いて変性椎間板を器

官培養した(Gantenbein et al., 2006, Jünger et al., 2009, Haschtmann et al., 2006, Leckie et al., 2012)。培地は2日ごとに交換し、この際に椎間板をphosphate buffered saline (PBS) で洗浄した。培養開始から3ないしは7日後に椎間板を分析した(各時点・各群n=6)。

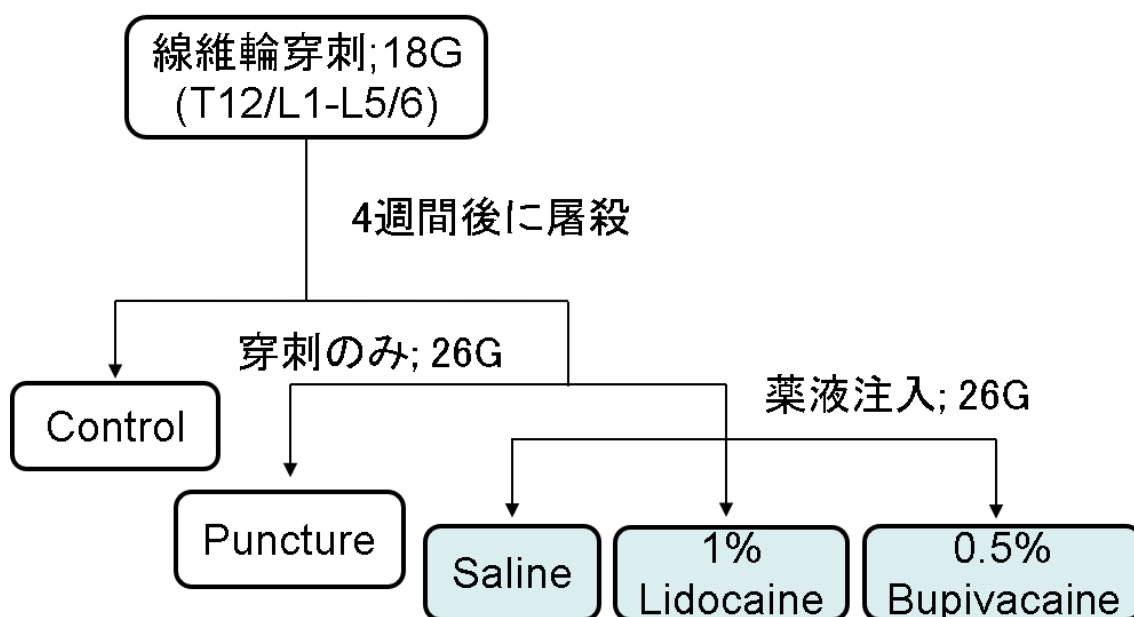


Figure 1. *ex vivo*実験のプロトコール. 各群・各時点でn=6.

2.2 髓核細胞死分析

培養開始から3または7日後に髓核細胞の死細胞率を分析した(Iwasaki et al., 2014a, Gantenbein et al., 2006, Jünger et al., 2009, Mo et al., 2013)。軟骨終板はメスで切除し、生検パンチを用いて髓核組織を採取した。4 μ lのHoechst 33342 (Dojindo, Kumamoto, Japan) およびヨウ化プロピジウム (PI) を髓核組織に添加して1時間培養した。視野中の全細胞(生細胞および死細胞)をHoechst 33342を用いて青色に、死細胞はPIを用いて赤色にそれぞれ染色し、共焦点レーザー走査顕微鏡(Nikon A1 and Ti-E, Tokyo, Japan)で観察・撮影した。無作為に選択した髓核組織の独立した5視野において、各視野の全髓核細胞数に対する死細胞の割合を百分率で算出した。細胞数のカウントは、ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて行った。全ての画像評価は、盲検化された2人の独立した観察者によって行われた。1つのサンプルに対し3回の観察が行われ、それらの平均値をサンプルごとに算出し、各群間の比較を行った(各群n=6)。

2.3 組織学的分析およびTUNEL分析

培養開始から7日後に、組織学的分析に加えて、NP細胞のアポトーシスを評価する目的でTUNEL分析を実施した(Iwasaki et al., 2014a, Yamada et al., 2014, Sudo and Minami, 2011)。10 % formaldehydeで椎間板を固定した後、10 % EDTA (pH 7.5) で脱灰処理を行って、パラフィンに包埋し、矢状断正中切片 (厚さ5 μ m) を得た。組織学的分析に使用する切片はxyleneにより脱パラフィン化し、アルコール処理および水洗いの後、Hematoxylin & Eosin (H&E) ないしはSafranin-O (SO) 染色を施した(Iwasaki et al., 2014a)。TUNEL分析に使用する切片は、メーカーの推奨に従い、パラフィン包埋切片にIn Situ Apoptosis Detection Kit (TaKaRa Bio, Otsu, Japan) を使用した。無作為に選択した髄核組織の独立した5視野において、各視野の全髄核細胞数に対するTUNEL陽性髄核細胞の割合を百分率で算出した。全ての画像評価は、盲検化された2人の独立した観察者によって行われた。1つの切片に対し3回の観察が行われ、それらの平均値をサンプルごとに算出し、各群間の比較を行った (各群n=6)。

3. *in vivo*

3.1 実験プロトコール

上記の通り、*in vivo*試験においてはL2/3とL4/L5に対して初期穿刺を行い、L3/L4は未処置コントロールとして温存した(Iwasaki et al., 2014a, Sudo et al., 2013, Yamada et al., 2014)。ウサギは、puncture- only群 (穿刺のみ追加)、saline群 (生理食塩水注入)、lidocaine群 (1 % lidocaine注入)、bupivacaine群 (0.5 % bupivacaine注入) に無作為に割り付けられた。初期穿刺から1か月後に、初期穿刺と同様のアプローチをウサギの右側から行い、26 G針を取り付けたマイクロシリンジ (Hamilton) を用いて標的椎間板内に薬液を注入した。生理食塩水 (0.9 %, Otsuka)、1 % lidocaine (Astrazeneka)、0.5 % bupivacaine (Astrazeneka) を15 μ l注入した。puncture- only群では26 G針で穿刺のみを行った。ウサギは、2回目の注射から6ヶ月または12ヶ月後に、前述の方法で安楽死させた。

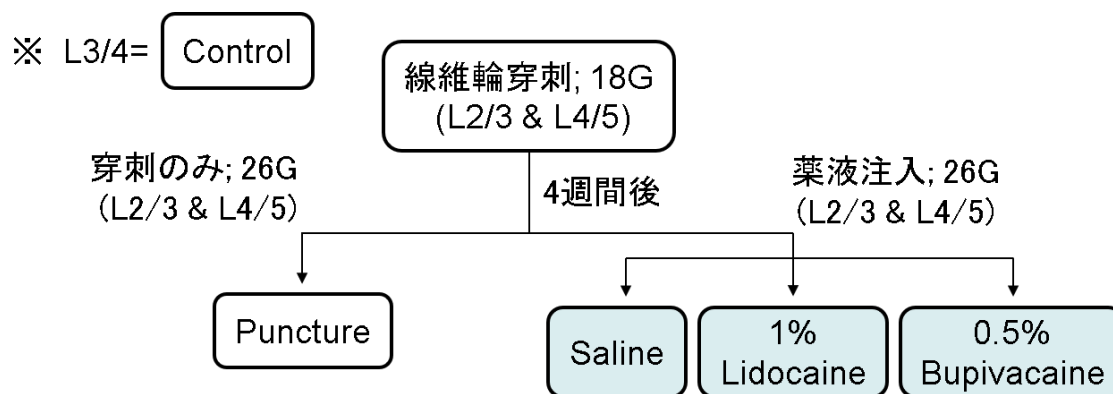


Figure 2. *in vivo*実験のプロトコール. 各群・各時点でn=8.

3.2 MRI評価

7.0-Tesla MR scanner (Varian Unity Inova, Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA) を使用して、椎間板組織変性を定量的に評価した(Iwasaki et al., 2014a, Sudo et al., 2013, Yamada et al., 2014)。ex vivo実験と同様の方法でウサギを安楽死させ、L2/3- L4/5を脊椎全体および傍脊柱筋が付着したFunctional spinal unit (FSU) として摘出した。FSUをMRI装置に設置し、T2強調、矢状断正中画像における椎間板組織の信号強度によって変性度を評価した (Pfirrmann分類) (Pfirrmann et al., 2001)。本分類は椎間板変性度を5段階(1: normal～5: highly degenerative) で評価するものである。また、椎間板髄核組織の信号強度をAnalyze 10.0 software (AnalyzeDirect, Overland Park, KS, USA)を使用して定量化し(Iwasaki et al., 2014a, Sudo et al., 2013, Yamada et al., 2014)、MRI index (髄核組織の面積と平均信号強度の積) を算出した。次に、L2/3ないしはL4/5のMRI indexを未処置コントロールであるL3/4のMRI indexで除して、健全椎間板髄核組織に対する変性椎間板髄核組織の相対的信号強度 (relative MRI index) を評価した(Iwasaki et al., 2014a, Sudo et al., 2013, Yamada et al., 2014, Tsujimoto et al., 2018)。全ての画像評価は、盲検化された2人の独立した観察者によって行われた。1つの椎間板に対し3回の計測が行われ、それらの平均値を椎間板ごとに算出し、各群間の比較を行った (各群n=8)。

3.3 組織学的分析およびTUNEL分析

MRI評価で使用したFSUから軟部組織および椎体を切除してL2/3- L4/5椎間板のみを摘出した。ex vivo実験と同様の方法で椎間板をパラフィンに包埋し、矢状断正中切片 (厚さ5 μ m) に対してH&EおよびSO染色を施した。H&E染色標本の無作為に選択された独立した5視野において、髄核細胞数を計数した(Iwasaki et al., 2014a)。椎間板組織変性はMasudaら (Masuda et al., 2003)やNishimura・Mochida(Nishimura and Mochida, 1998)らによって考案された椎間板組織変性度の半定量的評価分類を用いて評価された。Masudaらの分類は、線維輪 (AF)、線維輪組織と髄核組織の境界、髄核の細胞形態、髄核組織の細胞外基質の4つのカテゴリーに対して0-3点を加え、その合計点によって0点 (正常椎間板) から12点 (重度変性椎間板) を評価するものである。Nishimura・Mochidaらの分類は、線維輪組織の変性を1 (破断を伴う軽度の蛇行) から5 (不明瞭) までの尺度で評価するものである。また、ex vivo実験と同様の方法でTUNEL分析を行い、髄核細胞のアポトーシスを評価した。標本の無作為に選択された独立した5視野において、髄核細胞の総数に対するTUNEL陽性細胞の割合を算出し、評価した。全ての画像評価は、盲検化された2人の独立した観察者によって行われた。1つの椎間板に対し3回の観察・計測が行われ、それらの平均値を椎間板ごとに算出し、各群間

の比較を行った（各群 $n=8$ ）。

4. 統計分析

全てのデータは、平均 $\pm$ 標準誤差（SE）として表記した。多群間比較にはone-way ANOVAを使用した。2群比較には対応のないStudent-t検定を用いた。すべてのANOVAの結果は、Tukey-Kramer post-hoc検定またはKruskal-Wallis検定を用いてさらに評価した。差については、5%の有意水準で統計的に有意とみなした（ $P < 0.05$ ）。

実験結果

Bupivacaine は変性椎間板器官培養において髄核細胞のアポトーシスを引き起こす

器官培養開始から 3 ないしは 7 日後に共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて髄核細胞死を分析した (Fig.3a)。器官培養開始から 3 日後の時点では、control 群および puncture-only 群と比較して、saline 群および bupivacaine 群では有意に死細胞率が増加していた (control vs. saline ; $P = 0.01$ 、control vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、puncture-only vs. saline ; $P = 0.03$ 、puncture-only vs. bupivacaine ; $P = 0.01$)。lidocaine 群は、control 群と比較して死細胞率が有意に増加した ($P = 0.03$)。器官培養開始から 3 日後の時点では、saline 群、lidocaine 群、および bupivacaine 群の間で差はなかった (Fig.3b)。器官培養開始から 7 日後の時点では、bupivacaine 群のみが control 群および puncture-only 群と比較して死細胞率が有意に増加したが (control vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、puncture-only vs. bupivacaine ; $P = 0.02$)、control 群、puncture-only 群、saline 群、lidocaine 群の間には差はなかった (Fig.3b)。

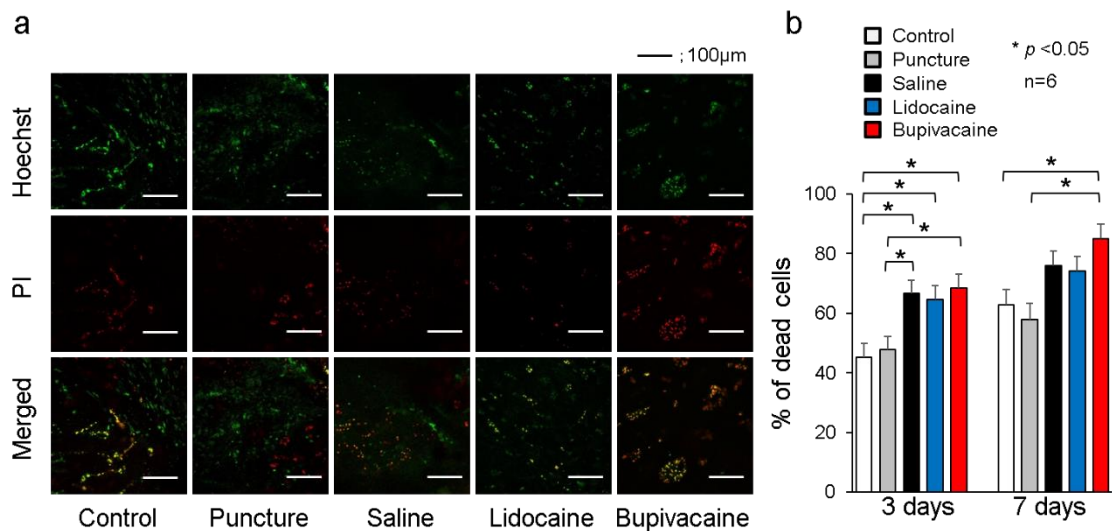


Figure 3. ウサギ変性椎間板を器官培養し、髄核細胞の死細胞率を評価した. **a)** 器官培養開始から7日後の代表的な共焦点レーザー走査顕微鏡画像. 全細胞 (生細胞および死細胞) をHoechst 33342を用いて青色に、死細胞はPIを用いて赤色にそれぞれ染色した. スケールバー : 100 μm. **b)** 死細胞率評価. (n = 6, 平均±SE, * $P < 0.05$).

組織学的解析では、H&E 染色で髄核細胞のクラスター形成、髄核細胞の空胞の消失、細胞外基質の消失が全群で認められた (Fig.4a)。bupivacaine 群では、control 群、puncture-only 群、saline 群、lidocaine 群と比較して、髄核細胞数の有

意に減少していた (control vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、puncture-only vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、saline vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、lidocaine vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、Fig.4b)。control 群、puncture-only 群、saline 群、および lidocaine 群の間には差はなかった (Fig.4b)。TUNEL 分析では、bupivacaine 群の TUNEL 陽性髄核細胞の割合は、control 群、puncture-only 群、saline 群、および lidocaine 群と比較して有意に増加していた (control vs. bupivacaine ; $P = 0.04$ 、puncture-only vs. bupivacaine ; $P = 0.02$ 、saline vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、lidocaine vs. bupivacaine ; $P = 0.04$ 、Fig.4c, d)。control 群、puncture-only 群、saline 群、lidocaine 群の間には差はなかった。

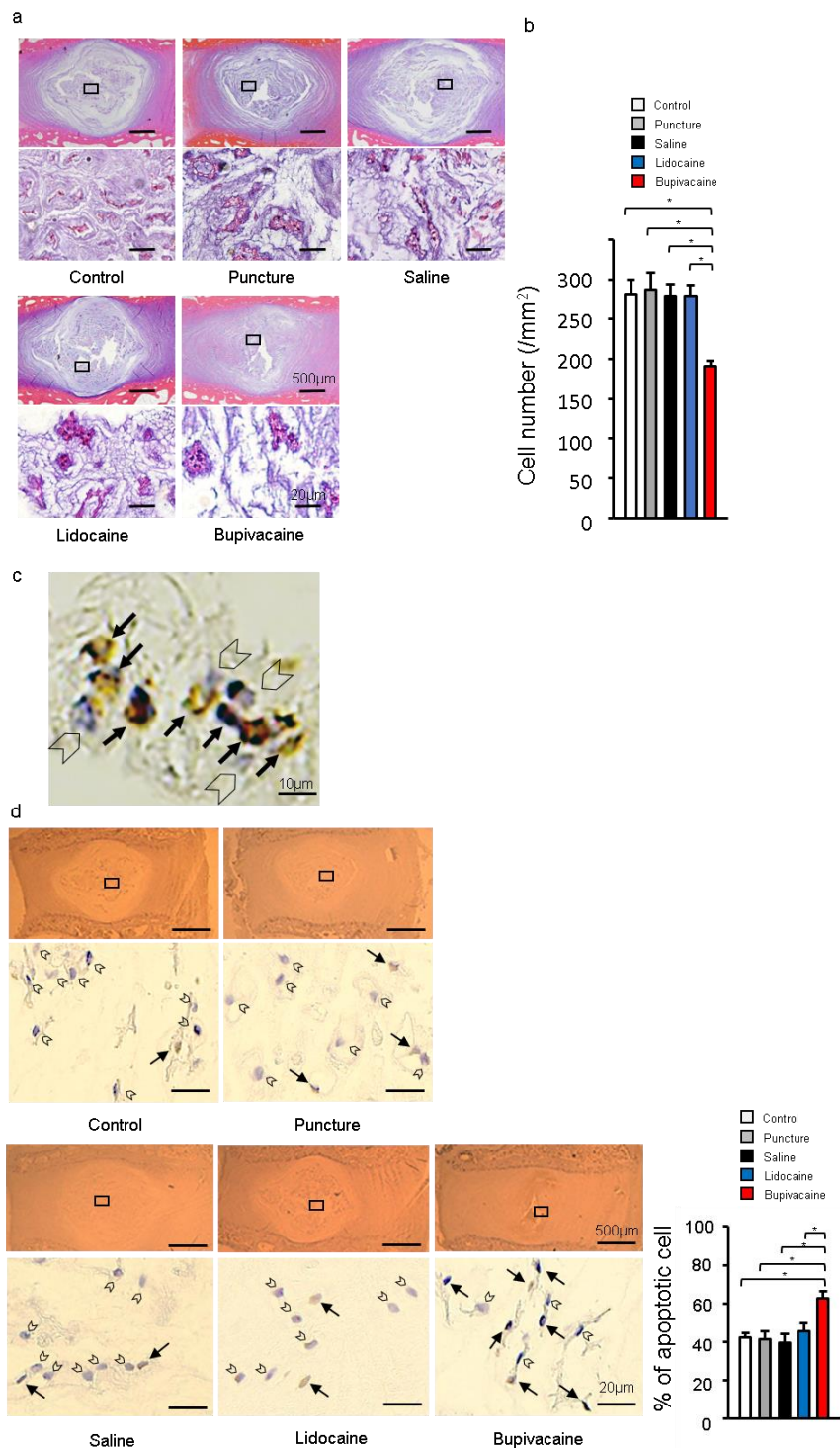


Figure 4. ウサギ変性椎間板を器官培養し、髄核細胞数、椎間板組織の変性、および TUNEL陽性髄核細胞率を評価した。 **a)** 器官培養開始から7日後の代表的な組織像 (H&E 染色)。 スケールバー：500 µm。 **b)** 髄核細胞数評価。 **c)** TUNEL陽性細胞の例。 矢頭； TUNEL陰性細胞、矢印；TUNEL陽性細胞。 **d)** TUNEL陽性細胞率の評価。 (n = 6, 平均±SE, * $P < 0.05$)。

局所麻酔薬が変性椎間板組織の変性に与える影響は生理食塩水と同等である

変性変化の定量的解析には、Pfirrmann 分類(Pfirrmann et al., 2001)を用いた。髄核組織の変化は、相対的 MRI index を用いて定量化した(Iwasaki et al., 2014a, Sudo et al., 2013, Tsujimoto et al., 2018, Yamada et al., 2014)。Pfirrmann 分類と相対 MRI index については、6 ヶ月後と 12 ヶ月後共に、全ての群間に有意差はなかった (Fig.5)。

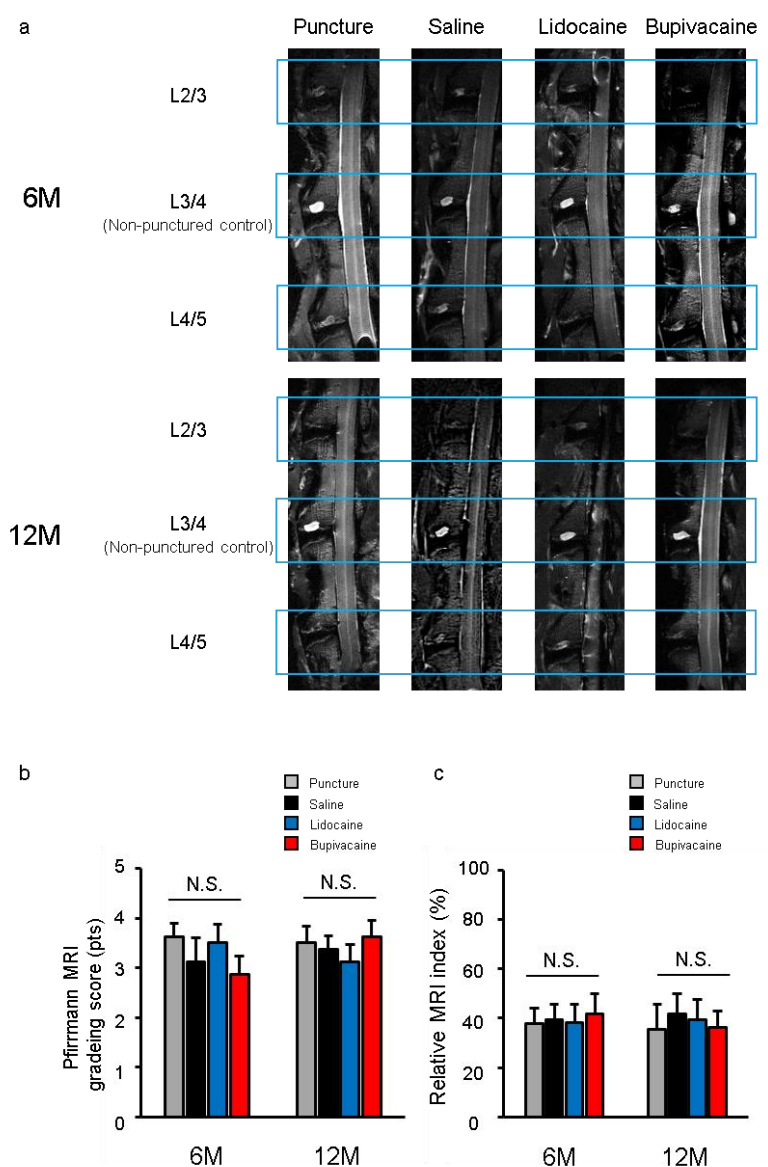


Figure 5. *in vivo* ウサギ変性椎間板モデルにおける6および12ヵ月後のMRI評価. **a)** 代表的MRI画像 (T2強調画像、矢状断正中). **b)** Pfirrmann分類の評価. **c)** 相対的MRI index の評価. (n = 6, 平均±SE, * $P < 0.05$).

組織学的評価では、puncture-only 群、saline 群、lidocaine 群、bupivacaine 群において 6 および 12 ヶ月後の両時点に変性変化が認められた (Fig.6a)。6 か月後の時点では、saline 群、lidocaine 群、bupivacaine 群で control 群および puncture-only 群と比較して有意に髄核細胞数が減少していた (control vs. saline ; $P < 0.01$ 、control vs. lidocaine ; $P < 0.01$ 、control vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、puncture-only vs. saline ; $P = 0.01$ 、puncture-only vs. lidocaine ; $P < 0.01$ 、puncture-only vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、Fig.6b)。また、12 か月後の時点においても、saline 群、lidocaine 群、bupivacaine 群で control 群および puncture-only 群と比較して有意に髄核細胞数が減少していた (control vs. saline ; $P < 0.01$ 、control vs. lidocaine ; $P < 0.01$ 、control vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、puncture-only vs. saline ; $P < 0.01$ 、puncture-only vs. lidocaine ; $P = 0.01$ 、puncture-only vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、Fig.6b)。6 および 12 か月後の両時点において、saline 群、lidocaine 群、bupivacaine 群の間には差はなかった (Fig.6b)。

Masuda らの分類(Masuda et al., 2005)の評価では、6 および 12 か月後の両時点において、puncture-only 群、saline 群、lidocaine 群、bupivacaine 群は control 群と比較して有意に得点が高かった (6 および 12 か月後共に、control vs. puncture-only ; $P < 0.01$ 、control vs. saline ; $P < 0.01$ 、control vs. lidocaine ; $P < 0.01$ 、control vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、Fig.6c, d)。また、得点は 6 か月後と 12 か月後で差がなかった (Fig.6d)。Nishimura と Mochida らの分類(Nishimura and Mochida, 1998)の評価では、Masuda らの分類(Masuda et al., 2005)の評価と同様の傾向を示し、6 および 12 ヶ月後の両時点において、puncture-only 群、saline 群、lidocaine 群、bupivacaine 群は control 群と比較して有意に得点が高かった (6 および 12 か月後共に、control vs. puncture-only ; $P < 0.01$ 、control vs. saline ; $P < 0.01$ 、control vs. lidocaine ; $P < 0.01$ 、control vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、Fig.6c, d)。

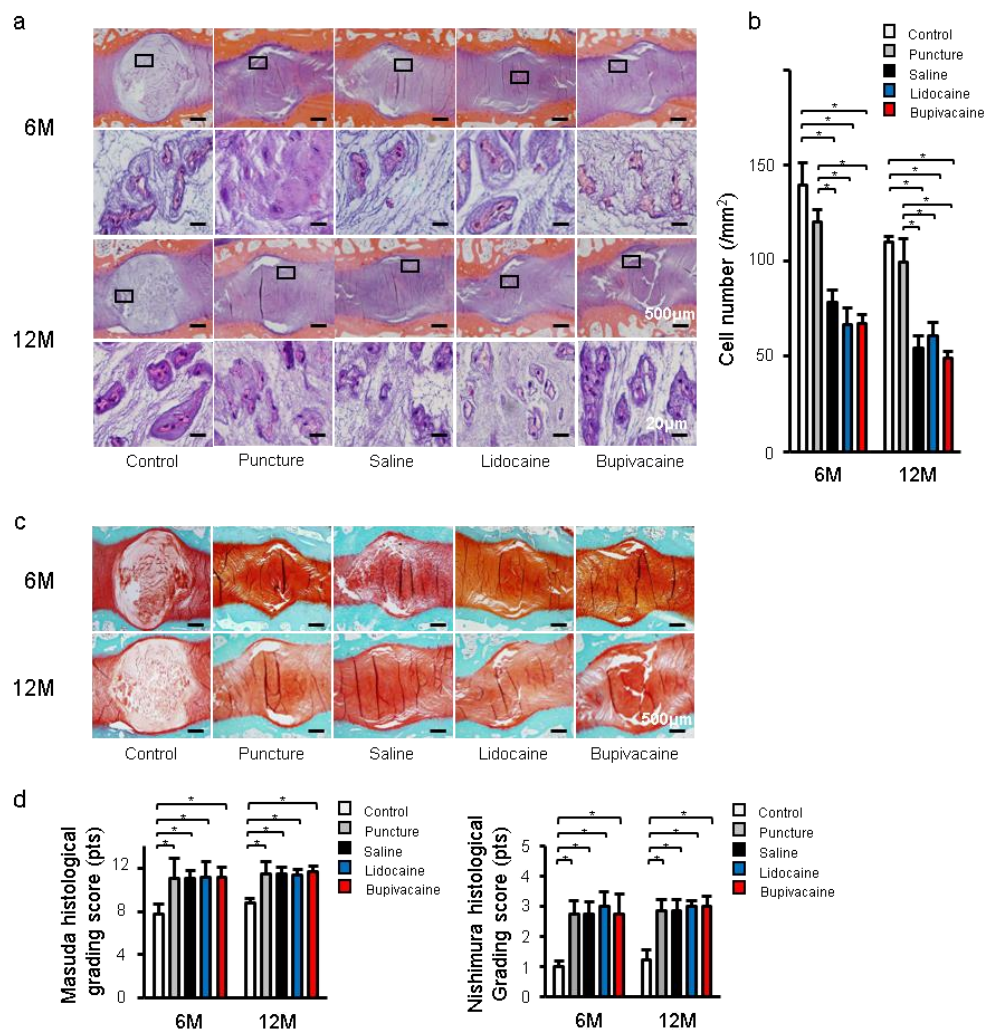


Figure 6. *in vivo* ウサギ変性椎間板モデルにおける6および12ヵ月後の組織学的評価。 **a)** 代表的H&E染色画像。スケールバー：上段 500 µm、下段 20 µm。 **b)** 髓核細胞数評価。 **c)** 代表的Safranin O染色画像。スケールバー：500 µm。 **d)** Masudaらの分類および Nishimura・Mochidaらの分類の評価。(n = 8, 平均±SE, * $P < 0.05$).

TUNEL 分析では、6 ヶ月後の時点において、saline 群、lidocaine 群、bupivacaine 群で control 群および puncture-only 群と比較して有意に TUNEL 陽性髓核細胞数が増加していた (control vs. saline ; $P < 0.01$ 、control vs. lidocaine ; $P < 0.01$ 、control vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、puncture-only vs. saline ; $P = 0.01$ 、puncture-only vs. lidocaine ; $P < 0.01$ 、puncture-only vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、Fig.7)。また、12 か月後の時点においても、saline 群、lidocaine 群、bupivacaine 群で control 群および puncture-only 群と比較して有意に TUNEL 陽性髓核細胞数が増加していた (control vs. saline ; $P < 0.01$ 、control vs. lidocaine ; $P < 0.01$ 、control vs. bupivacaine ; $P < 0.01$ 、puncture-only vs. saline ; $P < 0.01$ 、puncture-only vs.

lidocaine ; $P=0.01$ 、puncture-only vs. bupivacaine ; $P<0.01$ 、Fig.7)。また、6 および 12 ヶ月後の両時点において、saline 群、lidocaine 群、bupivacaine 群の間に差はなかった (Fig.7)。

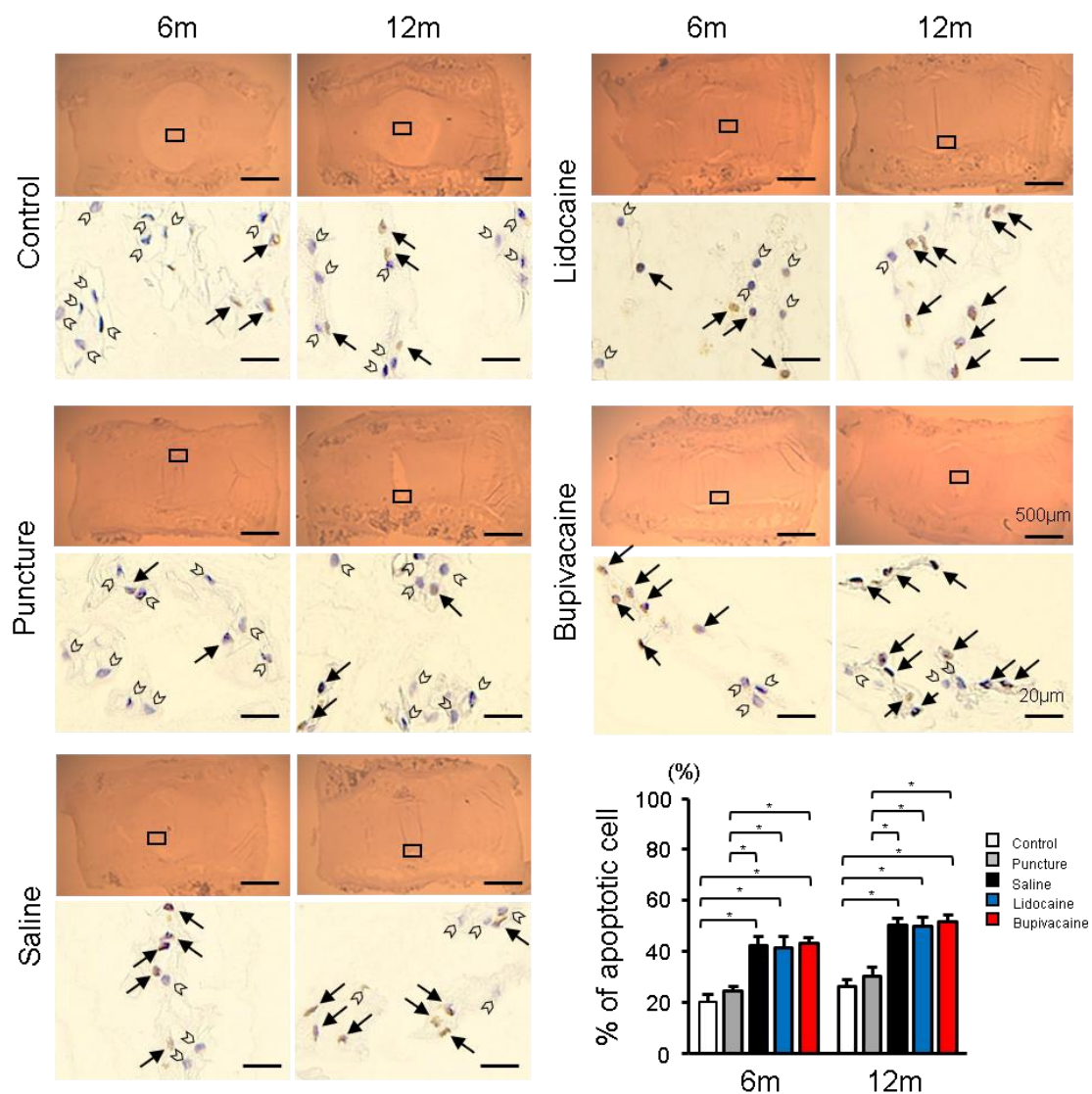


Figure 7. *in vivo* ウサギ変性椎間板モデルにおける6および12ヵ月後のTUNEL分析。スケールバー：上段 500 μm、下段 20 μm。矢頭；TUNEL陰性細胞、矢印；TUNEL陽性細胞。(n = 8, 平均±SE, * $P < 0.05$).

考察

椎間板ブロックは椎間板性疼痛の診断的治療法として用いられる代表的な手技である。我々が目標とする椎間板性疼痛に対する新しい低侵襲治療においては、椎間板ブロックによる局所麻酔下での実施が、侵襲度の観点から理想的である。しかし、椎間板ブロックに使用される局所麻酔薬の潜在的な組織毒性効果については、完全には理解されておらず(Iwasaki et al., 2014b)、安全性とその長期的な影響について懸念がある(Iwasaki et al., 2014a, Gantenbein et al., 2006)。Carrageeらは、10年間の追跡調査で、小径針を用いた椎間板造影検査は、より広範囲の椎間板変性に関連していることを報告した(Carragee et al., 2009)。しかし、Carrageeら(Carragee et al., 2009)の研究では、対照コホートとして募集された患者は椎間板造影を受けていないため、椎間板造影を受けた患者と生理食塩水注入などの対照手技を受けた患者を比較していない。

本研究の *ex vivo* モデルでは、bupivacaine 群は他の群と比較して明確な髄核細胞毒性を示し、器官培養後 7 日目には髄核細胞のアポトーシス増加を示した。髄核細胞死は、control 群、puncture-only 群、saline 群、lidocaine 群では差がなかった。しかしながら、*in vivo* モデルでは、saline 群、lidocaine 群、bupivacaine 群では、control 群、puncture-only 群と比較して、髄核細胞数が有意に減少していた。注目すべき点は、saline 群では、puncture-only 群と比較して有意な細胞毒性が示されたことである。一方、saline 群、lidocaine 群、bupivacaine 群では、髄核細胞数および髄核細胞のアポトーシスに有意差はなかった。また、椎間板変性スコアについては、puncture-only 群と saline 群、lidocaine 群、bupivacaine 群の間に有意差はなかった。これらの薬剤の効果は長期にわたる追跡期間中にマスクされている可能性がある。おそらく、椎間板変性を促進する局所麻酔薬の効果は、より早期に明らかになると考えられる。しかし、Carragee らが長期的な椎間板造影検査の影響を評価するために 10 年間の縦断的な臨床研究を行ったことを受け(Carragee et al., 2009)、我々は、人間の 7~10 年に相当する期間として、ウサギ *in vivo* モデルを 12 ヶ月まで追跡した(Iwasaki et al., 2014a)。また、健常椎間板を用いた *in vivo* 研究(Iwasaki et al., 2014a)と同じ期間を設定するために、本研究においても 6 および 12 か月を追跡期間として選択した。本研究では、*ex vivo* と *in vivo* の椎間板組織において髄核細胞数に大きな差が見られ、長期追跡期間中の椎間板変性進行に伴って髄核細胞数が減少していることが示唆された。しかし、本研究の結果は、局所麻酔薬は臨床的環境において椎間板変性に影響を与えないことを示唆している。

本研究の結果は、健常椎間板を用いた先行研究(Iwasaki et al., 2014a)と異なり、生理食塩水の注入が変性椎間板器官培養モデルにおいて lidocaine と同様の細胞

毒性を示した。また、健常椎間板を用いた先行研究(Iwasaki et al., 2014a)では、組織学的スコアは **saline** 群と **control** 群で有意差を示したが、細胞数には有意差はなかった。一方で、本研究では、組織学的スコア、細胞数ともに **saline** 群と **control** 群で有意差が認められた。これらの結果から、変性椎間板では生理食塩水の注入により変性が促進される傾向があり、椎間板の変性には椎間板内への注入圧が関与している可能性が考えられ、変性椎間板は健常椎間板に比べて椎間板内注入圧の影響を受けやすい可能性が示唆された。変性椎間板は健常椎間板に比べて流体の流れが制限されるため(Nikkhoo et al., 2018)、変性椎間板にかかる機械的圧力は健常椎間板よりも高い可能性がある。また、変性したヒト椎間板髄核細胞、健常椎間板髄核細胞よりも機械的損傷を受けやすい可能性がある。

本研究にはいくつかの **limitation** がある。第一に、液体注入時の椎間板内の圧力を測定しなかったことである。生理食塩水または局所麻酔薬を注入した際に加わった椎間板への圧力は、全ての椎間板が同じ大きさではなかったため、異なっていた可能性がある(Iwasaki et al., 2014a)。第二に、今回の研究では、髄核細胞数の評価では **puncture-only** 群と局所麻酔薬注入群の間で有意差が認められたが、局所麻酔薬注入群は、**puncture-only** 群と同様の組織学的スコアを示した。組織学的スコアは、我々の先行研究(Iwasaki et al., 2014a)と比較して本研究では明らかに重症化していたが、本家急の対象が変性椎間板であることを反映していると考えられる。組織学的スコアは健常椎間板における変性を評価する目的で考案されていることから、これらのスコアの限界と考えられる。しかしながら、変性椎間板の組織変性に適用可能な組織学的スコアは現状存在しないため、本研究では、健常椎間板を用いた先行研究(Iwasaki et al., 2014a)と同様の組織学的スコアを用いた。

結論として、**lidocaine** または **bupivacaine** の椎間板内局所注射による変性椎間板に対する組織障害効果を、変性椎間板器官培養モデルと *in vivo* ウサギ変性椎間板モデルを用いて検討した。変性椎間板器官培養モデルでは **bupivacaine** は髄核細胞のアポトーシスを誘導したが、*in vivo* モデルでは、局所麻酔薬の椎間板内注入において、加圧注入による初期の機械的損傷以外に椎間板変性を促進する可能性があることを示す、決定的な証拠は示されなかった。

第二章 高純度硬化性ゲルが髄核摘出術後の腰痛に与える影響

緒言

腰椎椎間板ヘルニアは若年層に多く (Andersson, 1999, Seki et al., 2005)、重度の腰痛のために社会活動に参加できず、経済的・精神的負担が大きい (Stolworthy et al., 2015, Ohnishi et al., 2019)。椎間板ヘルニアに対するヘルニア摘出術は、変性した椎間板組織を除去し、神経圧迫を緩和するという点で有効であるが、椎間板内に生じた組織欠損は椎間板変性をさらに進行させる可能性があり、結果として、臨床成績と慢性的な腰痛の両方を悪化させる (Bailey et al., 2013, Barth et al., 2008, McGirt et al., 2009)。椎間板ヘルニアや椎間板変性に関連した腰痛の治療は、椎間板切除術後の課題となっている (Ohnishi et al., 2019)。これまでのところ、椎間板切除術後に切除された髄核組織に代わる充填材として臨床的要求を満たす生体材料は開発されておらず、また、腰痛のコントロールに臨床的に有効であることが示されている材料もない。そのため、椎間板の変性を抑え、疼痛を改善する新しい治療法が必要とされている。

腰痛は急性期腰痛、亜急性期腰痛、慢性期腰痛に分類され、急性期腰痛は発症後 4 週間以内の腰痛、亜急性期腰痛は発症後 4 週間以降 12 週間以内の腰痛、慢性期腰痛は発症後 12 週間以上の腰痛と定義されている (Buchner et al., 2007, Chou et al., 2007)。急性期腰痛の最も重要な要素の一つは椎間板内の炎症である (Miyagi et al., 2012, Burke et al., 2002)。慢性期では、椎間板内の炎症と *neoinnervation* と呼ばれる線維輪深部内層への感覚神経の浸潤が重要な要素である (Freemont et al., 2002)。椎間板ヘルニアでは Tumour necrosis factor- α (TNF- α) を含むいくつかの炎症性サイトカインの発現が亢進している (Liu et al., 2017, Willburger and Wittenberg, 1994, Ohtori et al., 2013a, Kraychete et al., 2010)。痛みを伴う椎間板変性に関しては TNF- α 、interleukin-6 (IL-6)、nerve growth factor (NGF) などの炎症性サイトカインが無症状者よりも高いレベルで存在することが実証されている (Burke et al., 2002, Weiler et al., 2005, Hayashi et al., 2008)。TNF- α と IL-6 は特定のシグナル伝達経路を活性化し NGF 産生を増加させることで痛みの発生に重要な役割を果たしている (Lotz and Ulrich, 2006, Aoki et al., 2004, Woolf et al., 1997)。NGF は高親和性受容体である high-affinity tyrosine kinase A (TrkA) 受容体と低親和性受容体を介して作用するが、特に NGF/TrkA シグナルは末梢標的野の神経支配や感覚神経の完全分化を制御することから、*neoinnervation* のマーカーとして解釈されてきた (Patel et al., 2000)。したがって、TNF- α および IL-6 産生を阻害することは、椎間板内炎症および *neoinnervation* の抑制し椎間板切除術後の急性期および慢性期腰痛の椎間板原性疼痛の抑制につながる可能性がある。

最近、ラット椎間板損傷モデルにおいてヒアルロン酸 (hyaluronic acid ; HA) ハイドロゲルを埋植することにより、炎症抑制を介してラット疼痛関連行動が減少することが示された(Mohd Isa et al., 2018)。我々は以前、ウサギとヒツジの椎間板部分切除モデルにおいて、高純度アルギン酸 (ultra-purified alginate; UPAL) ゲルの損傷組織に対する修復効果を報告した(Tsujimoto et al., 2018)。いずれのモデルにおいても、UPALゲルを埋植することで、組織学的およびMRI上の椎間板変性所見が減少し、免疫組織化学 (immunohistochemistry ; IHC) 的にもII型コラーゲンの発現が増加することが示された(Tsujimoto et al., 2018)。また、UPALゲルを埋植したウサギモデルでは、髄核前駆細胞のマーカーであるGD2/Tie2二重陽性細胞の割合が椎間板切除単独に比べて増加することを示した(Tsujimoto et al., 2018)。UPALゲルは、従来のアルギン酸塩と比較してその生体毒性が1/10,000以下に抑えられた高純度のアルギン酸であり、様々な動物モデルに応用することができる(Baba et al., 2015, Igarashi et al., 2010, Sukegawa et al., 2012)。UPALは、CaCl₂と反応して極めて速やかにゲル化するため、埋植後に組織表面を縫合するといった被覆処置の必要なく様々な形状の欠陥に適合することができ、それによって潜在的に移植物質の逸脱リスクを低減することが可能である(Tsujimoto et al., 2018)。現在、椎間板切除術に続いてUPALゲルを埋植するヒト初の臨床試験を実施している(Sudo, 2019)。しかし、これまでの動物実験ではUPALゲルの疼痛緩和効果は検討されてこなかった。

本研究の仮説は、UPALゲル埋植は椎間板損傷後の疼痛を軽減させる、である。本研究の目的は、UPALゲル埋植がラットおよびウサギ椎間板損傷モデルにおいて椎間板内の炎症、neoinnervation、および、椎間板組織変性を抑制するかどうか、また、ラット椎間板損傷モデルにおいて侵害刺激に対する疼痛関連行動を減少させるかどうかを評価することである。

実験方法

1. ラット髄核穿刺モデルの作成

ラット髄核穿刺モデル(Mohd Isa et al., 2018)は、UPALゲル埋植に関わる実験(IHC分析、組織学的分析、疼痛関連行動分析)で使用した。計45匹の12週齢雌SDラット(260-300 g)を、皮膚切開のみの群(sham群)、髄核穿刺のみの群(punch群)、および、髄核穿刺後にUPALゲルを埋植する群(gel群)に無作為に割り付けた(n=3、各時点・各群)。ラットは、5 % isoflurane吸入による麻酔導入の後、ketamineとmedetomidineの混合物(ketamine : medetomidine = 75 mg/kg : 0.5 mg/kg)の腹腔内注射によって麻酔を維持された。鉗子を用いた尾部つまみ試験で麻酔深度を確認した後、Co4/5 -5/6の背側皮膚を切開した。結合組織を剥離してCo4/5 -5/6を露出し、19 G針を用いてCo4/5 -5/6の髄核を線維輪越しに穿刺して損傷した(径1 mm、深さ2 mm)。乾燥した繊維状のUPAL (400–600 mPa/s, Mochida Pharma Co. Ltd., Tokyo, Japan) を生理食塩水 (0.9 %, Otsuka) に溶解して2 % (w/v) に調製し、4 μ l のUPAL溶液を26 G針を取り付けたマイクロシリンジ(Hamilton)を用いて髄核組織欠損部に直ちに注入した(Tsujimoto et al., 2018)。次に、102mM CaCl₂ (1 ml) をUPAL溶液上に滴下してゲル化した。5分後、手術部位を生理食塩水で洗浄し、ゲル化を確認した後、筋膜、結合組織、皮膚を縫合閉鎖した。

2. ウサギ髄核吸引モデルの作成

ウサギ髄核吸引モデル(Tsujimoto et al., 2018)は、UPALゲル埋植に関わる実験(IHC分析)に使用した。計24羽の4-5か月齢雄日本白色家兎 (3.2-3.5 kg) を、吸引のみの群(Aspiration群)とUPALゲル移植群(Gel群)に無作為に割り付けた。ウサギ髄核穿刺モデルと同様の方法で麻酔した後、後腹膜アプローチでL2/3 -4/5を露出した。18 G針を用いて線維輪穿刺を行い、10 mlシリンジを用いてL2/3 およびL4/5椎間板から内容物が吸引できなくなるまで髄核組織を吸引した。L3/4 は、controlとしてとして扱い、処置を施さなかった(Iwasaki et al., 2014a, Yamada et al., 2014, Sudo et al., 2013)。Gel群においては髄核組織の吸引後に、20 μ lのUPAL溶液をラットの場合と同様に埋植・ゲル化した。5分後、手術部位を生理食塩水で洗浄し、ゲル化を確認した後、筋膜、結合組織、皮膚を縫合閉鎖した。

3. 免疫組織学的評価

ラットおよびウサギ椎間板のIHCを実施し、術後1、4、7および28日後のTNF- α 、IL-6およびTrkA陽性細胞を検出した。ラット(各時点・各群n=3)をisoflurane吸入によって深く麻酔し、頸椎脱臼で安楽死させた。ウサギ(各時点・各群n=3)は、heparin (10,000単位)を静脈内注射した後(Iwasaki et al., 2014a)、pentobarbital

sodiumを静脈内注射にて過量投与し、安楽死させた。

ラットモデルでは、尾全体 (Co 4/5-Co 5/6) を外科的に摘出し、無菌条件下で軟部組織を除去して尾椎と椎間板のみを採取した。ウサギモデルでは、脊椎 (L2/3-L4/5) 全体を外科的に摘出し、無菌条件下で軟部組織と椎骨を除去して椎間板のみを採取した。採取した椎間板 (ラット、ウサギ) は、4% (w/v) パラホルムアルデヒドで固定し (室温で48時間)、パラフィンに包埋した (Mohd Isa et al., 2018, Xia et al., 2019, Tsujimoto et al., 2018)。椎間板中央で検体を横断し、冠状断中央の横断面切片 (厚さ5 μ m) を得た。切片をxyleneで脱パラフィン化した後、proteinase K (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 中で培養した (37°C、15分間)。続いて、1%過酸化水素メタノール (w/v) でブロッキングし (37°C、30分間)、2% (w/v) ウシ血清アルブミン中で培養 (室温、30分間) した後、一次抗体と4°Cで一晩培養した。ウサギ椎間板には、抗TNF- α マウスモノクローナル抗体 (NBP2-34372、Novus Biologicals、Centennial、Colorado、USA)、抗IL-6マウスモノクローナル抗体 (MAA079Rb21、Cloud-Clone Corp.、Houston、Texas、USA)、および抗NTRK1/TrkAヒトポリクローナル抗体 (aa342-361、LSBio、Seattle、US) を用いた。ラットモデルには、抗TNF- α マウスモノクローナル抗体 (ab220210、Abcam)、抗IL-6マウスモノクローナル抗体 (ab9324、Abcam)、抗TrkAウサギモノクローナル抗体 (ab86474、Abcam) を用いた。発色には、TNF- α 分析ではHistofine® Fast Red II (Nichirei Bioscience)、IL-6分析ではHistoGreen Substrate kit for Peroxidase (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)、TrkA分析ではHistofine® DAB (Nichirei Bioscience) を用いた。視認性を向上させる目的で細胞核の対比染色を行い、TNF- α またはTrkA染色ではヘマトキシリンを、IL-6染色ではファストレッドをそれぞれ使用した。顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて、TNF- α 、IL-6、またはTrkA陽性細胞を無作為に選択された5視野で個別に計数し、各染色における陽性NPまたはAF細胞数を、視野中の全NPまたはAF細胞数に対する百分率として計算した (Sudo and Minami, 2011)。全評価は、盲検化された2人の独立した観察者によって行われた。各観察者は、1検体について3回の評価を実施して検体ごとの平均値を算出し、各群間の比較を行った。

4. 組織学的評価

術後28日の椎間板組織変性を評価した。ラット (n=3) をIHC分析と同じ方法で安楽死させ、椎間板を採取した。採取した椎間板を4% (w/v) paraformaldehydeで48時間固定し、Kristensen脱灰液で2週間脱灰した後、水道水で24時間洗浄し、パラフィン包埋した (Mohd Isa et al., 2018)。ラット椎間板の矢状断正中標本 (厚さ5 μ m) を用いて組織学的スコア (Rutges et al., 2013) を評価するためにH&E、SO、または、Alcian blue (AB) で染色した。Rutgesら (Rutges et al., 2013) により考案さ

れた、この半定量的組織学的スコアは、H&EおよびSO染色によってNPとAFの解剖学的構造を6つのカテゴリーに分けて評価するものである。即ち、終板 (H&E)、AFの形態 (H&E/SO)、AFとNPの境界 (H&E/SO)、NPの細胞形態 (H&E)、NP細胞質 (H&E)、NP細胞外基質 (SO) のそれぞれを、0 (非変性特性) から2 (重度の変性特性) で評価し、合計点によって0 (健常椎間板組織) から12 (完全に変性した椎間板組織) までの範囲で評価された(Rutges et al., 2013)。AB染色は点数に直接関与しないが、細胞外基質の評価に適した染色であるため補助目的に実施した。全ての評価は、盲検化された2人の独立した観察者によって行われた。各観察者は、1検体について3回の評価を実施して個体の平均値を算出した上で、各群間を比較した。

5. 疼痛関連行動分析

IHC分析で術後28日目まで生存させたラット9匹 (各群n=3) 、および、組織学的分析に使用したラット9匹 (各群n=3) の、計18匹のラット (各群n=6) を疼痛関連行動分析に使用した。全ラットにHargreaves、von Frey、tail flick試験を実施した。各試験の24時間前および試験直前に、20分間各ラットを個別に試験環境で過ごさせて、環境に慣れさせた(Mohd Isa et al., 2018)。全ての試験は、盲検化された同一の検者によって行われた。各ラットで複数回の測定を行って平均値を算出し、得られた結果を群間で比較した。

5.1 Hargreaves試験

Hargreaves 試験は、Hargreaves 試験装置 (Ugo Basile Biological Instruments、Gemonio、Italy) を使用して、術前2日目 (Day-2) と術後2、7、14、27日目に実施した(Mohd Isa et al., 2018)。ラットはガラス板 (Ugo Basile Biological Instruments) 上に四方および上方を囲われた個別の小部屋 (上方に空気孔あり) に入れられた。熱刺激として赤外線ビームを皮膚切開部の腹側に照射した。熱刺激に対する逃避行動を示すまでの潜時を記録した。ビームの強度は最大出力の50 %に設定した。組織損傷を防ぐ目的で、カットオフ時間を20秒間に設定した。同一ラットにおいて各時点で4回の測定を実施したが、各測定間に少なくとも1分の休憩を挟んだ。

5.2 von Frey試験

von Frey試験は、dynamic plantar aesthesiometer (Ugo Basile Biological Instruments) を用いて、術前2日目 (Day-2) と術後2、7、14、27日目に実施した。金網の上にHargreaves試験で用いたものと同じ小部屋を設置してラットを入れた。直径0.5 mmのフィラメントを皮膚切開部の腹側に当て、0 gから開始して5 gまで直線的

に増加する力を10秒間かけて加えていき、その後は5 gの力を試験開始から30秒後まで一定の力で加えた(Btresh et al., 2013)。ラットが何らかの逃避行動を示すまでの潜時を記録した。同一ラットにおいて各時点で5回の測定を実施したが、各測定間に少なくとも10秒の休憩を挟んだ。

5.3 tail flick試験

tail flick試験はheat flux radiometer (Ugo Basile Biological Instruments社製)を用いて行われた。Hargreaves試験と同一日程で施行されたことによる過度の熱刺激による組織損傷を避けるために、術前1日目 (Day-1) と術後3、8、15、28日目に実施した(Mohd Isa et al., 2018)。各ラットをタオルにくるんだ状態で10分間落ち着かせた後、体部はタオルで覆ったまま尾だけを装置の上に置き、尾の遠位端から5cm近位部腹側に赤外線ビームを照射した。熱刺激に対する尾振り払い反応までの潜時を記録した。組織損傷を防ぐ目的で、カットオフ時間を20秒間に設定した。同一ラットにおいて各時点で4回の測定を実施したが、各測定間に少なくとも15秒の休憩を挟んだ。

6. 統計分析

全てのデータは、平均±標準誤差 (SE) として表記した。多群間比較にはone-way ANOVAを使用した。2群比較には対応のないStudent-t検定を用いた。すべてのANOVAの結果は、Tukey-Kramer post-hoc検定またはKruskal-Wallis検定を用いてさらに評価した。差については、5%の有意水準で統計的に有意とみなした ($P < 0.05$)。

実験結果

椎間板損傷後の UPAL ゲル埋植は炎症性サイトカイン産生を抑制する

UPALゲル埋植が炎症を抑制するかどうかを調べるために、本研究ではUPALゲル埋植が炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。既に確立された実験モデルとしてラット尾椎椎間板髄核パンチモデル(Mohd Isa et al., 2018)とウサギ髄核吸引モデル(Tsujimoto et al., 2018)を使用し、椎間板髄核組織欠損部にUPALゲルを埋植した際の影響を調べた。これらのモデルのそれぞれにおいて、TNF- α およびIL-6陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合を、手術後1日、4日、7日、28日後にIHCで分析し、以下の3つのグループについて検討した。即ち、ラットモデルでは、sham群（皮膚切開のみ）、punch群（髄核パンチのみ）、gel群（髄核パンチ後にUPALゲルを埋植）、ウサギモデルでは、control群（無処置コントロール）、aspiration群（髄核吸引のみ）、gel群（髄核吸引後にUPALゲルを埋植）の3群間でそれぞれ比較した。

ラットモデルでは、punch群のTNF- α 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、術後1日目から7日目まで徐々に増加したが、28日目には減少した (Fig.8b, c, d)。gel群でも同様の傾向が見られた (Fig.8b, c, d) が、gel群のTNF- α 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、各時点でpunch群に比べて有意に低かった (punch vs. gel、各時点で $P < 0.01$ 、Fig.8c, d)。TNF- α 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、7日目の線維輪細胞の割合を除いて、sham群とgel群の間で有意差はなかった (Fig.8c, d)。ウサギモデルでは、aspiration群のTNF- α 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、それぞれ4日目および7日目にピークを迎え (Fig.8f)、gel群のTNF- α 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、各時点でaspiration群と比較して有意に低かった (aspiration vs. gel、各時点での $P < 0.01$ 、Fig.8g, h)。gel群では、各時点でのTNF- α 陽性髄核細胞の割合がcontrol群に比べて有意に高く (control vs. gel、各時点で $P < 0.01$ 、Fig.8g)、各時点でのTNF- α 陽性線維輪細胞の割合にはcontrol群とgel群との間に有意差はなかった (Fig.8h)。

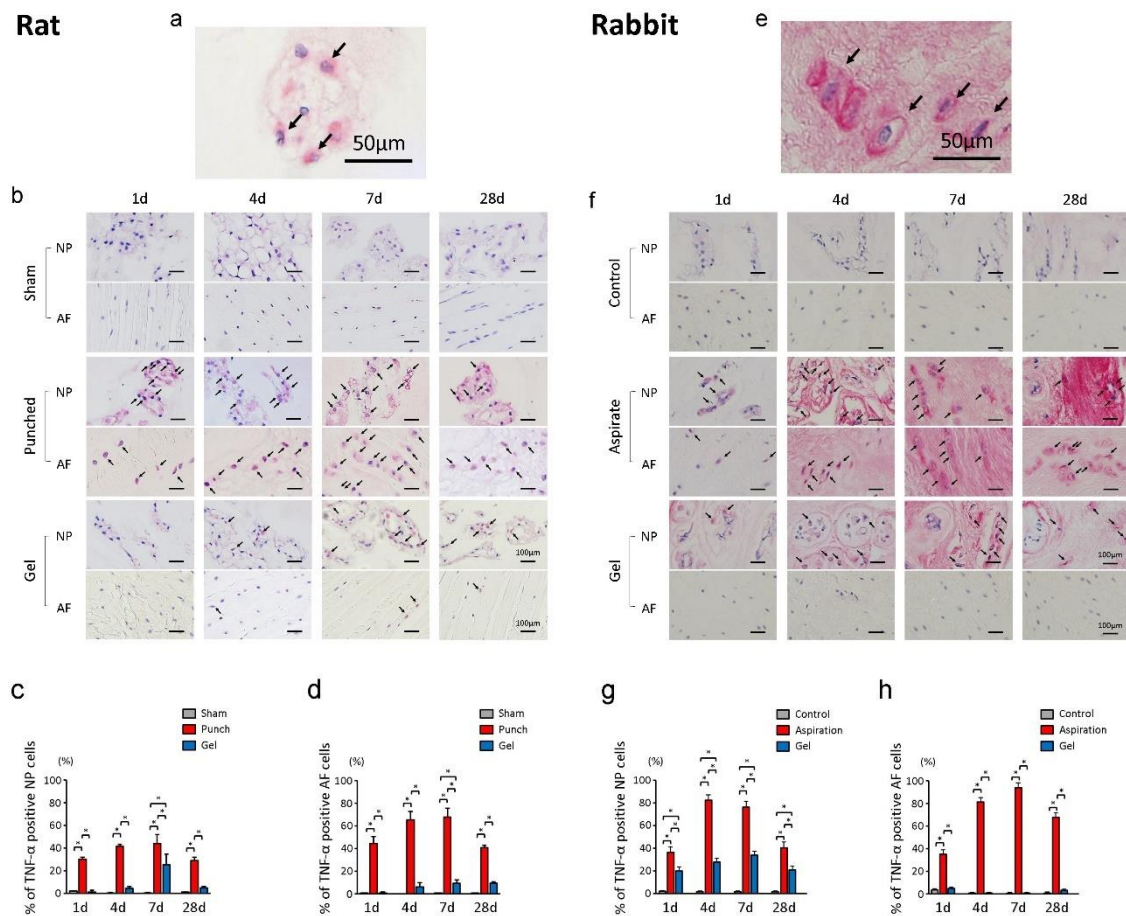


Figure 8. ラットモデルおよびウサギモデルにおけるTNF- α 陽性細胞率の評価. TNF- α 陽性細胞は赤色に染色され、核はHematoxylinを用いて紫色に対比染色した. **a)** 代表的なラットモデルにおけるTNF- α 陽性細胞の例示. 矢印; TNF- α 陽性髄核細胞. スケールバー: 50 μ m. **b)** ラットモデルの代表的なTNF- α 染色画像. 矢印; TNF- α 陽性細胞. スケールバー: 100 μ m. **c)** ラットモデルの椎間板髄核組織におけるTNF- α 陽性細胞率の評価. **d)** ラットモデルの椎間板線維輪組織におけるTNF- α 陽性細胞率の評価. (n = 6, 平均 $\pm$ SE, * P < 0.05). **e)** 代表的なウサギモデルにおけるTNF- α 陽性細胞の例示. 矢印; TNF- α 陽性髄核細胞. スケールバー: 50 μ m. **f)** ウサギモデルの代表的なTNF- α 染色画像. 矢印; TNF- α 陽性細胞. スケールバー: 100 μ m. **g)** ウサギモデルの椎間板髄核組織におけるTNF- α 陽性細胞率の評価. **h)** ウサギモデルの椎間板線維輪組織におけるTNF- α 陽性細胞率の評価. (n = 6, 平均 $\pm$ SE, * P < 0.05).

ラットモデルにおけるpunch群およびgel群のIL-6陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合については、それぞれ4日目および7日目にピークを迎えたが、IL-6陽性髄核細胞の割合は4日目から28日目まで、IL-6陽性線維輪細胞の割合は7日目から28日目まで減少した (Fig.9b, c, d)。しかし、ゲル群のIL-6 陽性髄核細胞およ

び線維輪細胞の割合は、各時点でpunch群に比べて有意に低かった (punch vs. gel、各時点での $P < 0.01$ 、Fig.9c, d)。IL-6 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、4日目のIL-6 陽性髄核細胞の割合、および4日目と7日目のIL-6 陽性線維輪細胞の割合を除いて、sham群とgel群で有意差はなかった (Fig.9c, d)。ウサギモデルでは、術後のIL-6陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合の変化はラットモデルと同様の傾向を示し (Fig.9f)、gel群のIL-6陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、各時点でaspiration群よりも有意に低かった (aspiration vs. gel、各時点で $P < 0.01$ 、Fig.9g, h)。また、gel群では、各時点でのIL-6陽性髄核細胞の割合がcontrol群に比べて有意に高く (control群 vs. gel、各時点での $P < 0.01$ 、Fig.9g)、各時点でのIL-6陽性線維輪細胞の割合にはcontrol群とgel群とで有意な差はなかった (Fig.9h)。これらの結果は、UPALゲル埋植は、ラットおよびウサギの両モデルにおいて、椎間板傷害によって生じる炎症反応を減少させることを示唆していた。

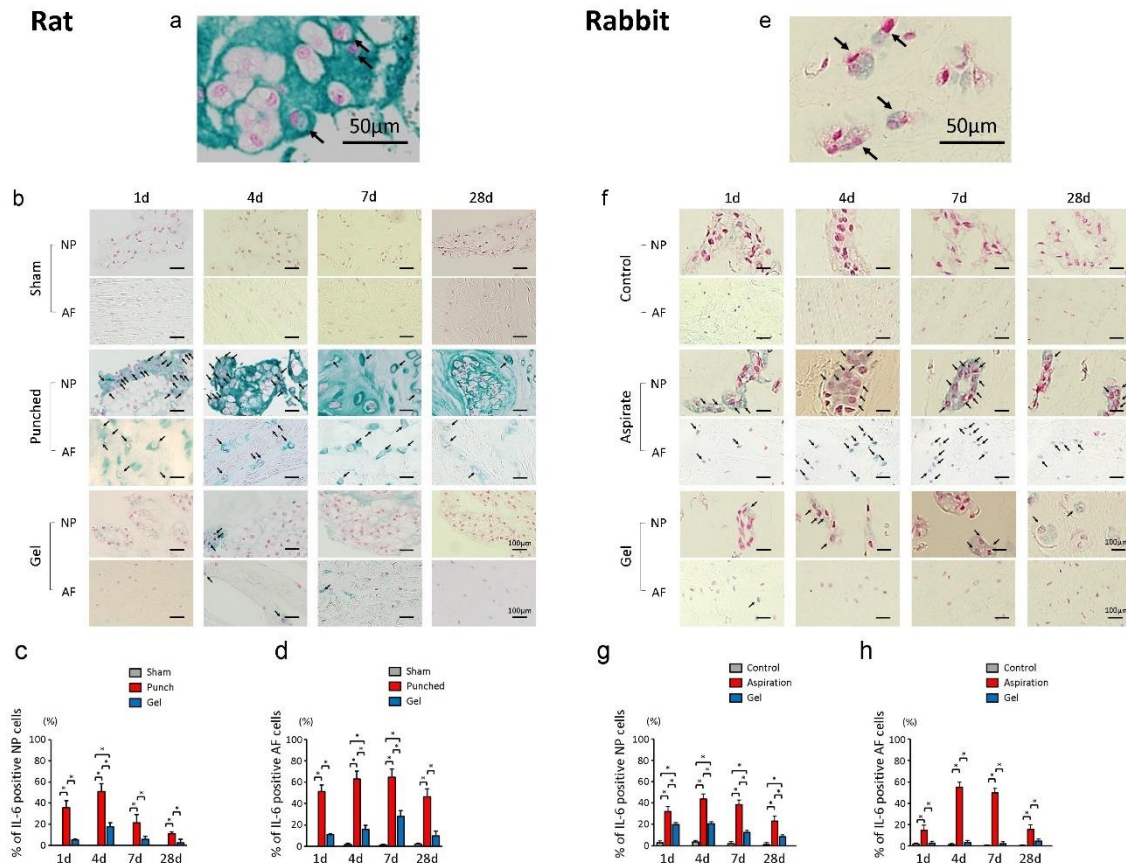


Figure 9. ラットモデルおよびウサギモデルにおけるIL-6陽性細胞率の評価。IL-6陽性細胞は緑色に染色され、核はFast redを用いて赤色に対比染色した。a) 代表的なラットモデルにおけるIL-6陽性細胞の例示。矢印；IL-6陽性髄核細胞。スケールバー：50 μ m。b) ラットモデルの代表的なIL-6染色画像。矢印；IL-6陽性細胞。スケールバー：100 μ m。c) ラットモデルの椎間板髄核組織におけるIL-6陽性細胞率の評価。d) ラットモデル

の椎間板線維輪組織におけるIL-6陽性細胞率の評価。(n = 6, 平均±SE, * $P < 0.05$). **e)** 代表的なウサギモデルにおけるIL-6陽性細胞の例示. 矢印; IL-6陽性髓核細胞. スケールバー: 50 μm . **f)** ウサギモデルの代表的なIL-6染色画像. 矢印; IL-6陽性細胞. スケールバー: 100 μm . **g)** ウサギモデルの椎間板髓核組織におけるIL-6陽性細胞率の評価. **h)** ウサギモデルの椎間板線維輪組織におけるIL-6陽性細胞率の評価.(n = 6, 平均±SE, * $P < 0.05$).

椎間板損傷後の UPAL ゲル埋植は TrkA 発現を抑制する

椎間板損傷後のNGF受容体発現に対するUPALゲルの効果を調べるために、上記のラットモデルおよびウサギモデルを用いた。これらの各モデルにおいて、椎間板切除術後、術後1日目、4日目、7日目、28日目のIHCでTrkA陽性細胞の割合を分析し、上記のごとく3群間で比較した (Fig.10)。

ラットでは、各時点でのTrkA陽性髓核細胞および線維輪細胞の割合について、sham群とgel群との間で有意な差は認められなかった (Fig.10b)。また、いずれの群でも7日目まではほとんど変化がなく、punch群では術後28日目にのみTrkA陽性髓核細胞および線維輪細胞の割合が有意に増加した (punch vs. sham、 $P < 0.01$ 、punch vs. gel、 $P < 0.01$ 、Fig.10c, d)。ウサギモデルでは、aspiration群のTrkA 陽性髓核細胞および線維輪細胞の割合は、術後1日目から28日目にかけて緩やかな増加を示した (Fig.10f, g, h)。また、control群とgel群では、術後1日目から28日目まではほぼ変化がなく (Fig.10f)、各時点でgel群のTrkA陽性髓核細胞および線維輪細胞の割合はaspiration群に比べて有意に低かった (aspiration vs. gel、各時点 $P < 0.01$ 、Fig.10g, h)。これらの結果は、UPALゲル埋植が、ラットおよびウサギの両モデルにおいて、椎間板傷害によって誘導された椎間板内のTrkA受容体発現を抑制することを示唆していた。

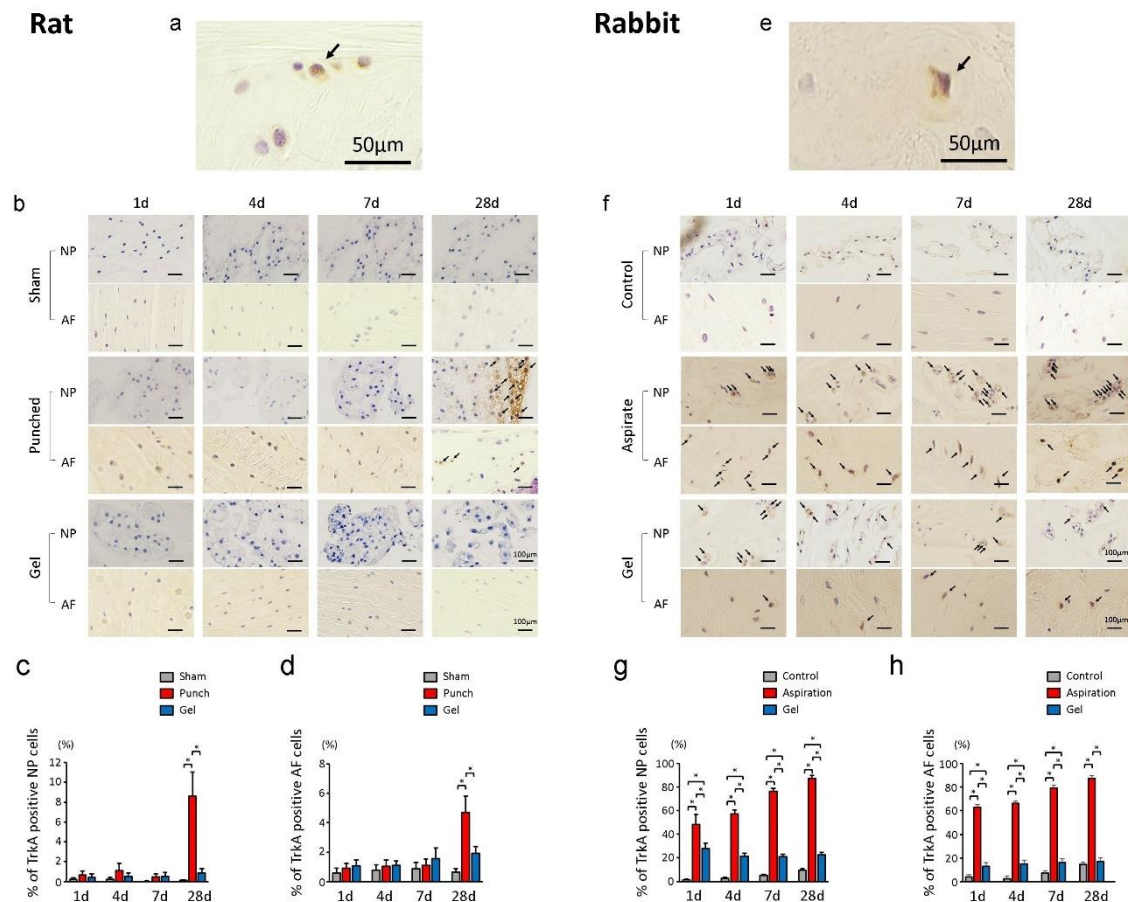


Figure 10. ラットモデルおよびウサギモデルにおけるTrkA陽性細胞率の評価. TrkA陽性細胞は茶色に染色され、核はHematoxylinを用いて紫色に対比染色した. **a)** 代表的なラットモデルにおけるTrkA陽性細胞の例示. 矢印; TrkA陽性髄核細胞. スケールバー: 50 μ m. **b)** ラットモデルの代表的なTrkA染色画像. 矢印; TrkA陽性細胞. スケールバー: 100 μ m. **c)** ラットモデルの椎間板髄核組織におけるTrkA陽性細胞率の評価. **d)** ラットモデルの椎間板線維輪組織におけるTrkA陽性細胞率の評価. ($n = 6$, 平均 $\pm$ SE, $*P < 0.05$). **e)** 代表的なウサギモデルにおけるTrkA陽性細胞の例示. 矢印; TrkA陽性髄核細胞. スケールバー: 50 μ m. **f)** ウサギモデルの代表的なTrkA染色画像. 矢印; TrkA陽性細胞. スケールバー: 100 μ m. **g)** ウサギモデルの椎間板髄核組織におけるTrkA陽性細胞率の評価. **h)** ウサギモデルの椎間板線維輪組織におけるTrkA陽性細胞率の評価. ($n = 6$, 平均 $\pm$ SE, $*P < 0.05$).

ラット椎間板損傷モデルにおいて UPAL ゲル埋植は椎間板変性を抑制する

本研究で使用したウサギモデルでは、既にUPALゲルの椎間板変性抑制効果が報告されている(Tsujimoto et al., 2018)。UPALゲルの椎間板変性抑制効果はラットでは検証されておらず、既報(Mohd Isa et al., 2018)と同等の椎間板変性が起こ

っていることを確認する必要があったため、ラット髄核パンチモデル(Mohd Isa et al., 2018)を用いて同様の効果が得られるかを組織学的解析で評価した。

組織学的スコアの評価には、Rutgesらの原法に従って、H&E染色、SO染色、AB染色を行った(Rutges et al., 2013)。椎間板の組織学的評価では、sham群では規則的な終板構造、よく組織化された線維輪構造、線維輪と髄核の間の明確な境界、髄核細胞のクラスター形成はなく、髄核組織の豊富な細胞外基質が認められた(Fig.11a)。punch群では、術後28日目に重度の終板構造の破綻、線維輪の破裂、線維輪と髄核の区別のつかない境界、髄核細胞のクラスター化、髄核組織の細胞外マトリックスの喪失、髄核組織の軟骨様組織が観察された(Fig.11a)。しかし、gel群の椎間板は規則的な終板構造、蛇行しているもののある程度規則的な線維輪の半環状層状構造を示し、正常な髄核細胞とクラスター化した髄核細胞が混在しており、部分的に乱れた髄核の細胞外基質構造を示していた(Fig.11a)。AB染色の結果、punch群では椎間板に薄く髄核の細胞外基質に染色性を認めたが、sham群では椎間板組織全体に強い染色性が認められた。gel群では、椎間板髄核組織における細胞外基質の染色性がsham群と比べて低下しているものの、ある程度の染色性は保たれていた(Fig.11a, AB列)。以上の所見を反映して、術後28日目の半定量的な組織学的椎間板変性スコア(Rutges et al., 2013)は、gel群ではpunch群に比べて有意に低かった($P < 0.01$ 、Fig.11b)。また、gel群とsham群の組織学的スコアには有意差はなかった(Fig.11b)。これらの結果から、ラットモデルではUPALゲル埋植により椎間板切除術後の椎間板組織変性が抑制されることが示唆された。

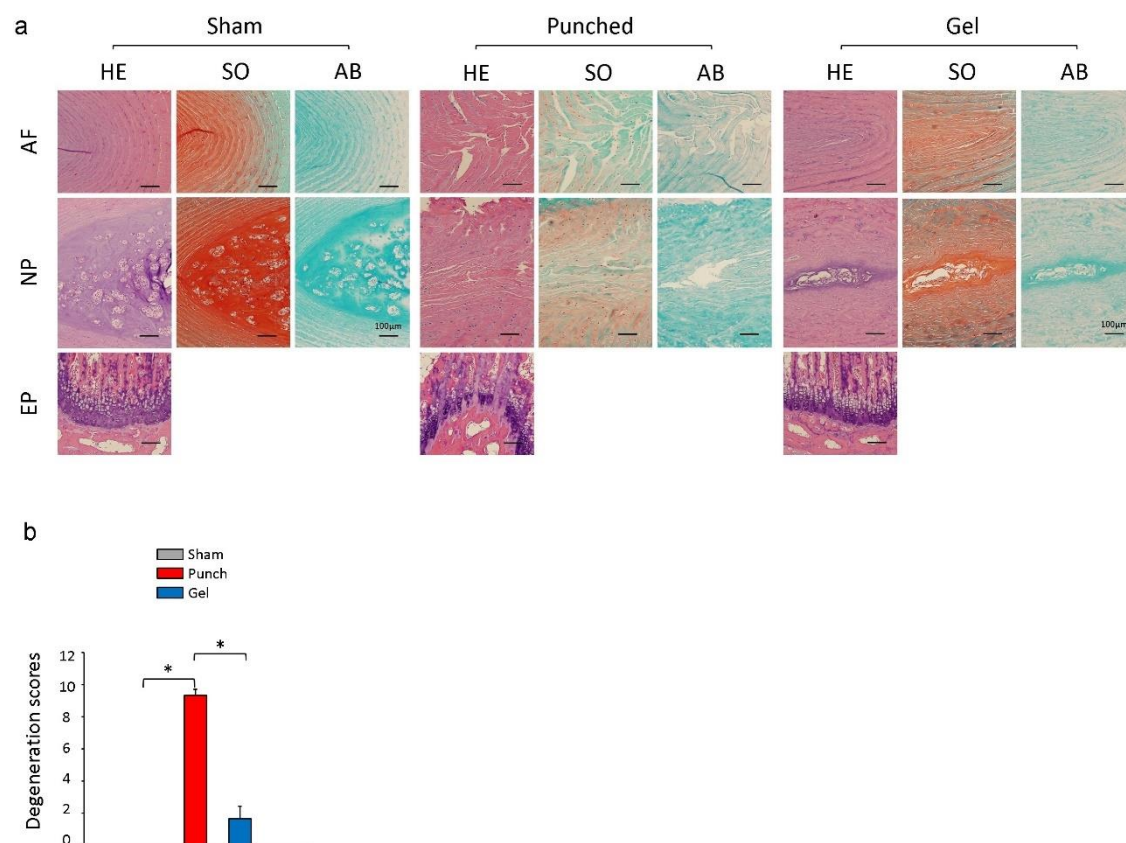


Figure 11. ラットモデルにおける組織学的評価. **a)** ラットモデルにおける代表的なH&E、SO、AB染色画像. スケールバー：100 μ m. **b)** ラットモデルにおける半定量的組織学的椎間板変性スコアの評価. (n = 6, 平均 $\pm$ SE, * P < 0.05).

ラット椎間板損傷モデルにおいて UPAL ゲル埋植は疼痛関連行動を減少させる

本研究のIHCおよび組織学的解析では、UPALゲル埋植は炎症反応およびTrkA発現を抑制し、椎間板組織変性を抑制することが示され、UPALゲル埋植は椎間板損傷による疼痛を軽減する可能性が示唆された。そこで、引き続き疼痛関連行動の評価を行った。ウサギモデルでは疼痛関連行動を評価する方法が確立されていないため、ラットモデルを使用してUPALゲル埋植の疼痛緩和効果を調査した。Hargreaves試験とvon Frey試験（術前2日、術後2日、7日、14日、27日）、tail flick試験（術前1日、術後3日、8日、15日、28日）を行い、各試験における潜時を評価した。

Hargreaves試験では、術後2日から27日までの間において、punch群ではsham群およびgel群と比較して有意に逃避行動までの潜時が短縮していた（punch vs. sham、各時点での P < 0.01、punch vs. gel、各時点での P < 0.01、Fig.12a）。同様に、von Frey試験では、術後2日から27日までの間において、punch群ではsham群およびgel群と比較して有意に逃避行動までの潜時が短縮していた（punch vs.

sham、各時点での $P < 0.01$ 、punch vs. gel、各時点での $P < 0.01$ 、Fig.12b)。tail flick試験では、sham群とgel群の潜時は経時的変化を示さなかったが、punch群の潜時は術後に延長し、術後の各時点でsham群とgel群よりも有意に延長していた（punch vs. sham、各時点での $P < 0.01$ 、punch vs. gel、各時点での $P < 0.01$ 、Fig.12c)。これらの結果は、UPALゲル埋植が椎間板損傷によって誘発される痛みを緩和することを示唆していた。

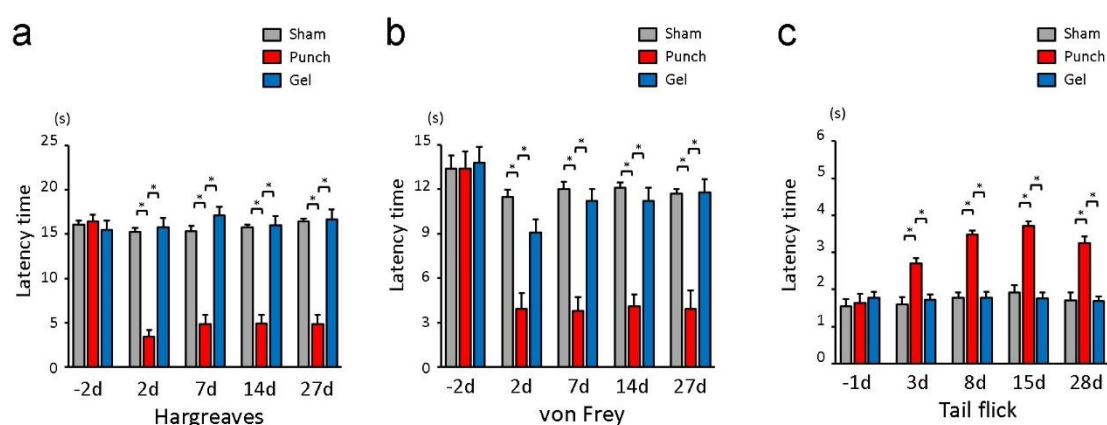


Figure 12. ラットモデルにおける疼痛関連行動評価. **a)** Hargreaves試験. **b)** von fray試験. **c)** tail flick試験. (n = 6, 平均±SE, * $P < 0.05$).

考察

本研究の目的は、UPAL ゲル埋植がラットおよびウサギの 椎間板損傷モデルにおいて炎症性サイトカイン産生、TrkA 発現、椎間板組織変性を抑制し、侵害刺激に対する疼痛関連行動を減少させるかどうかを評価することであった。UPAL ゲル埋植はラットおよびウサギの椎間板損傷モデルにおいて、TNF- α と IL-6 産生を抑制し、TrkA 受容体の発現を低下させた。さらに、UPAL ゲル埋植はラットモデルにおいて、手術後の椎間板変性を抑制し、疼痛関連行動を減少させた。以上の結果から、UPAL ゲル埋植は、椎間板組織の変性を抑制するだけでなく、炎症を抑制し、TrkA 発現抑制によって示唆される *neoinnervation* を阻害することによって、椎間板部分摘出術後の疼痛を緩和する新しい治療法となり得る可能性が示唆された。

過去の報告では、炎症反応が急性期の腰痛に関連していることが示されている(Mohd Isa et al., 2018, Wuertz and Haglund, 2013, Lai et al., 2016)。本研究のラットパンチモデルでは、髄核細胞と線維輪細胞の両方で TNF- α と IL-6 の産生が UPAL ゲル移植により減少した。さらに、侵害受容刺激に対する行動分析から、UPAL ゲル移植により疼痛関連行動が減少することが示された。Wuertz らは、IL-6 を含むインターロイキンおよび TNF- α の高発現が腰痛の発生に極めて重要な役割を果たすと報告した(Wuertz and Haglund, 2013)。Lai らはラットを用いた *in vivo* 研究において、線維輪穿刺に続いて TNF- α 注射を行うと疼痛関連行動が増加することを報告した(Lai et al., 2016)。Mohd Isa らは、IL-6 と IL-1 β を含む急性期炎症反応シグナル伝達が、炎症とアポトーシスを制御する NF- κ B と MAPK を活性化する下流のシグナル伝達カスケードに寄与する経路の一つであることを明らかにした(Mohd Isa et al., 2018)。本研究では、UPAL ゲル埋植により炎症性サイトカインの産生が抑制され、疼痛関連行動が改善されたことから、Mohd Isa らによる HA ハイドロゲル埋植での報告と同様に(Mohd Isa et al., 2018)、UPAL ゲル埋植による炎症性サイトカイン産生の抑制が椎間板痛を軽減することが示唆された。現在、ヒト腰椎椎間板ヘルニアに対する椎間板部分切除術後の UPAL ゲル埋植の臨床試験を実施しており(Sudo, 2019)、本研究で示された UPAL ゲル埋植の術後疼痛軽減効果がヒトでも発揮されるかどうかを検討する予定である。

NGF は、IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインにより発現が亢進し、高親和性受容体である TrkA と結合することで、椎間板への *neoinnervation* や局所の炎症反応を促進し、慢性的な椎間板性疼痛を引き起こす(Lotz and Ulrich, 2006, Aoki et al., 2004, Woolf et al., 1997, Patel et al., 2000)。本研究では、ラットモデルにおいて、gel 群では術後 28 日まで TrkA の発現が抑制されていた。Mohd Isa らは、損傷を受けたラット椎間板に HA ゲルを埋植すると、NGF などの神経栄養

因子の産生を抑制することで NGF-TrkA 結合が減少し、ラットにおける疼痛関連行動が減少することを報告している(Mohd Isa et al., 2018)。Lane らは、抗 NGF 抗体がプラセボと比較してヒトの膝関節痛を有意に減少させたことを報告している(Lane et al., 2010)。これらのことから、UPAL ゲルを埋植することで、椎間板損傷後の **neoinnervation** が抑制または遅延されて、椎間板性疼痛が軽減される可能性があることが示唆された。このことから、UPAL ゲル埋植は、椎間板部分切除後の急性期疼痛の緩和効果に加えて、慢性的な椎間板性痛の予防効果も期待できると考えられた。

本研究では、ラットおよびウサギモデルの双方において、UPAL ゲル埋植により TrkA の発現が抑制された。しかし、ウサギモデルでは、術後 1 日目から 28 日目までの間、**aspiration** 群で TrkA の発現が増加し、UPAL ゲル埋植により発現が抑制された。一方、ラットモデルでは、術後 28 日目から **punch** 群でのみ TrkA の発現が増加し、UPAL ゲル埋植により発現が抑制された。ラットモデルでの TrkA 発現は Mohd Isa らの報告(Mohd Isa et al., 2018)と同程度であった。術後早期のウサギ椎間板における TrkA 発現についてはこれまで報告がなく、本研究が最初の研究である。ラットモデルとウサギモデルの間で TrkA 発現の増加時期が異なるのは、種の違いによるものと考えられる。

椎間板組織の変性変化は、脊柱に加わる負荷に耐える上で重要な椎間板機能を損い、慢性的な椎間板性疼痛の原因となる(Schwarzer et al., 1995)。椎間板ヘルニアは椎間板の変性とそれに続く椎間板性疼痛の原因となり得る(Bailey et al., 2013, Barth et al., 2008, McGirt et al., 2009)。ウサギとヒツジの椎間板変性モデルにおける我々の以前の報告(Tsujimoto et al., 2018)のように、本研究のラット髄核パンチモデルにおいても UPAL ゲル埋植によって椎間板変性は抑制された。即ち、髄核組織の SO および AB 染色は **punch** 群よりも **gel** 群の方が細胞外基質の染色性が良好であり、H&E および SO 染色は **punch** 群よりも **gel** 群の方が髄核および線維輪組織の損傷が少なかったことから、UPAL ゲル移植は細胞外基質の調節障害を抑制し、線維組織の形成を抑制したことが示唆された。したがって、UPAL ゲル埋植は、椎間板変性を抑制することで、慢性的な椎間板性疼痛の予防的治療になる可能性がある。

ラットを用いた過去の研究では、椎間板線維輪穿刺は機械的および熱的な痛覚過敏を誘発することが示されている(Lai et al., 2015)。Mohd Isa らはラット尾椎髄核パンチモデルを報告し、Hargreaves 試験、von Frey 試験、tail-flick 試験を用いて機械的および熱的な侵害刺激が引き起こす疼痛関連行動に対する HA ゲル埋植の効果を解析した(Mohd Isa et al., 2018)。彼らは、HA ゲルを埋植すると、Hargreaves 試験と von Frey 試験では潜時が延長し、tail-flick 試験では髄核傷害単独の場合よりも潜時が短くなることを報告した(Mohd Isa et al., 2018)。この結果

に対して Mohd Isa らは、髄核損傷単独の場合では受傷部位の疼痛により、疼痛部位以外の部位に加えられた侵害刺激に対して痛覚鈍麻を生じる diffuse noxious inhibitory control (DNIC) 現象が生じたのに対し、HA ゲルを埋植した場合には受傷部位の疼痛が軽減されたために DNIC 現象が生じなかったと結論づけている (Mohd Isa et al., 2018)。本研究では、gel 群は punch 群に比べて Hargreaves 試験や von Frey 試験で潜時が延長し、tail-flick 試験では潜時が短かったことが示された。このことから、UPAL ゲルを埋植することで受傷部の疼痛が軽減され、DNIC 現象が抑制されたと考えられる。

この研究にはいくつかの限界がある。第一に、ラット髄核パンチモデルにおける炎症性サイトカイン産生の減少と疼痛関連行動の減少との間には直接的な因果関係は示されていない。UPAL ゲルの疼痛抑制メカニズムは、Mohd Isa らの報告で示された HA ゲルの疼痛抑制メカニズムと同様に (Mohd Isa et al., 2018)、主要な炎症性シグナル分子の減衰とタンパク質制御経路の調節を介して、neoinnervation の阻害、椎間板組織変性の抑制、および侵害時劇に対する疼痛関連行動の減少を生じるものと考えられる。しかし、このことを明らかにするためには、今後更なる検討が必要である。第二に、ウサギモデルは疼痛関連行動の評価には適していないため、ラットモデルにおいて示された疼痛関連行動に関する結果が、ウサギモデルにおいても同様に示されるかは不明である。ウサギを対象とした定量的な疼痛関連行動分析法はまだ存在しない。しかし、本研究のウサギモデルの解析において、椎間板損傷後の炎症性サイトカイン産生がラットと同様の傾向を示したことから、疼痛も同様の傾向を示すことが予測される。

結論として、UPAL ゲル埋植は、主要な炎症性サイトカインである TNF- α および IL-6 産生、神経新生に重要な役割を持つ TrkA 発現、椎間板組織の変性を抑制し、侵害刺激に対する疼痛関連行動を減少させた。UPAL ゲル埋植は、椎間板組織変性の予防のみならず、椎間板部分切除術後の疼痛の軽減にも有用であると考えられ、椎間板ヘルニアなどの疾患に対する画期的な新しい治療法となり得ることが期待される。

総括および結論

- ・ 局所麻酔薬の椎間板内注入は変性椎間板組織の組織障害に直接関与しない、また、椎間板部分摘出後の UPAL ゲル埋植が椎間板性疼痛を軽減するという仮説のもと、局所麻酔薬の変性椎間板組織に対する組織障害性、ならびに、UPAL ゲルの炎症性サイトカイン産生および椎間板への神経新生阻害効果、椎間板変性抑制効果、侵害刺激に対する疼痛関連行動減少効果について検証した。
- ・ ウサギ変性椎間板器官培養モデルでは、bupivacaine が髄核細胞のアポトーシスを誘導したが、ウサギ *in vivo* 変性椎間板モデルでは、局所麻酔薬の椎間板内注入において、局所麻酔薬自体の組織障害性は示されなかった。
- ・ 局所麻酔薬の椎間板内注入においては、生理食塩水注入と同程度の組織障害性しか示さなかったことから、薬剤の注入圧が主たる椎間板組織変性惹起の原因と考えられた。
- ・ ウサギおよびラット椎間板損傷モデルにおいて、UPAL ゲル埋植は主要な炎症性サイトカインである TNF- α および IL-6 産生、神経新生に重要な役割を持つ TrkA 発現を抑制した。
- ・ ラット椎間板損傷モデルにおいて、UPAL ゲル埋植は椎間板組織の変性を抑制し、侵害刺激に対する疼痛関連行動を減少させた。
- ・ UPAL ゲル埋植は、椎間板損傷後の炎症反応と、それに引き続く神経新生および椎間板変性を阻害することで、侵害刺激に対する疼痛関連行動を減少させた可能性が示唆された。
- ・ UPAL ゲル埋植は、椎間板組織変性の予防のみならず、椎間板部分切除術後の疼痛の軽減にも有用であると考えられ、椎間板ヘルニアなどの疾患に対する画期的な新しい治療法となり得ることが期待される。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究院医学専攻機能再生医学講座整形外科学教室博士課程在学中に行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科学分野教授岩崎倫政先生に深謝いたします。

また本研究を行うにあたり、UPAL をご提供頂いた持田製薬株式会社に深い感謝の意を表します。

最後に、これまでの研究課程において直接のご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院脊椎・脊髄先端医学分野の須藤英毅特任准教授をはじめ、整形外科学分野の諸先生方、研究に関わっていただいた皆様に心よりの感謝を申し上げます。

本研究は、JSPS 基盤研究 B JP 18K19595、JSPS 若手研究 JP 20K17983、および、武田科学振興財団医学系研究助成の助成を得たものです。

本研究で使用した UPAL ゲルは、持田製薬株式会社より提供を受けたものです。

引用文献

- Andersson, G.B. (1999). Epidemiological features of chronic low-back pain. *Lancet* 354, 581-585.
- Aoki, Y., Takahashi, Y., Ohtori, S., Moriya, H., and Takahashi, K. (2004). Distribution and immunocytochemical characterization of dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar intervertebral disc in rats: a review. *Life Sci* 74, 2627-2642.
- Baba, R., Onodera, T., Momma, D., Matsuoka, M., Hontani, K., Elmorsy, S., Endo, K., Todoh, M., Tadano, S., and Iwasaki, N. (2015). A Novel Bone Marrow Stimulation Technique Augmented by Administration of Ultrapurified Alginate Gel Enhances Osteochondral Repair in a Rabbit Model. *Tissue Eng Part C Methods* 21, 1263-1273.
- Bailey, A., Araghi, A., Blumenthal, S., Huffmon, G.V., and Group, A.R.C.S. (2013). Prospective, multicenter, randomized, controlled study of anular repair in lumbar discectomy: two-year follow-up. *Spine (Phila Pa 1976)* 38, 1161-1169.
- Barth, M., Diepers, M., Weiss, C., and Thome, C. (2008). Two-year outcome after lumbar microdiscectomy versus microscopic sequestrectomy: part 2: radiographic evaluation and correlation with clinical outcome. *Spine (Phila Pa 1976)* 33, 273-279.
- Brayda-Bruno, M., Tibiletti, M., Ito, K., Fairbank, J., Galbusera, F., Zerbi, A., Roberts, S., Wachtel, E., Merkhher, Y., and Sivan, S.S. (2014). Advances in the diagnosis of degenerated lumbar discs and their possible clinical application. *Eur Spine J* 23 Suppl 3, S315-323.
- Btsh, J., Fischer, M.J.M., Stott, K., and McNaughton, P.A. (2013). Mapping the binding site of TRPV1 on AKAP79: implications for inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci* 33, 9184-9193.
- Buchner, M., Neubauer, E., Zahlten-Hinguranage, A., and Schiltenswolf, M. (2007). The influence of the grade of chronicity on the outcome of multidisciplinary therapy for chronic low back pain. *Spine (Phila Pa 1976)* 32, 3060-3066.
- Burke, J.G., Watson, R.W., McCormack, D., Dowling, F.E., Walsh, M.G., and Fitzpatrick,

J.M. (2002). Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators. *J Bone Joint Surg Br* 84, 196-201.

Carragee, E.J., Don, A.S., Hurwitz, E.L., Cuellar, J.M., Carrino, J.A., Carrino, J., and Herzog, R. (2009). 2009 ISSLS Prize Winner: Does discography cause accelerated progression of degeneration changes in the lumbar disc: a ten-year matched cohort study. *Spine (Phila Pa 1976)* 34, 2338-2345.

Chee, A.V., Ren, J., Lenart, B.A., Chen, E.Y., Zhang, Y., and An, H.S. (2014). Cytotoxicity of local anesthetics and nonionic contrast agents on bovine intervertebral disc cells cultured in a three-dimensional culture system. *Spine J* 14, 491-498.

Chou, R., Qaseem, A., Snow, V., Casey, D., Cross, J.T., Shekelle, P., Owens, D.K., Physicians, C.E.A.S.o.t.A.C.o., Physicians, A.C.o., and Panel, A.P.S.L.B.P.G. (2007). Diagnosis and treatment of low back pain: a joint clinical practice guideline from the American College of Physicians and the American Pain Society. *Ann Intern Med* 147, 478-491.

Chu, C.R., Izzo, N.J., Papas, N.E., and Fu, F.H. (2006). In vitro exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. *Arthroscopy* 22, 693-699.

Elliott, D.M., Yerramalli, C.S., Beckstein, J.C., Boxberger, J.I., Johannessen, W., and Vresilovic, E.J. (2008). The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 33, 588-596.

Freemont, A.J., Watkins, A., Le Maitre, C., Baird, P., Jeziorska, M., Knight, M.T., Ross, E.R., O'Brien, J.P., and Hoyland, J.A. (2002). Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc. *J Pathol* 197, 286-292.

Gantenbein, B., Grünhagen, T., Lee, C.R., van Donkelaar, C.C., Alini, M., and Ito, K. (2006). An in vitro organ culturing system for intervertebral disc explants with vertebral endplates: a feasibility study with ovine caudal discs. *Spine (Phila Pa 1976)* 31, 2665-2673.

Haschtmann, D., Stoyanov, J.V., Ettinger, L., Nolte, L.P., and Ferguson, S.J. (2006). Establishment of a novel intervertebral disc/endplate culture model: analysis of an ex vivo

in vitro whole-organ rabbit culture system. *Spine (Phila Pa 1976)* 31, 2918-2925.

Hayashi, S., Taira, A., Inoue, G., Koshi, T., Ito, T., Yamashita, M., Yamauchi, K., Suzuki, M., Takahashi, K., and Ohtori, S. (2008). TNF-alpha in nucleus pulposus induces sensory nerve growth: a study of the mechanism of discogenic low back pain using TNF-alpha-deficient mice. *Spine (Phila Pa 1976)* 33, 1542-1546.

Igarashi, T., Iwasaki, N., Kasahara, Y., and Minami, A. (2010). A cellular implantation system using an injectable ultra-purified alginate gel for repair of osteochondral defects in a rabbit model. *J Biomed Mater Res A* 94, 844-855.

Iwasaki, K., Sudo, H., Yamada, K., Higashi, H., Ohnishi, T., Tsujimoto, T., and Iwasaki, N. (2014a). Effects of single injection of local anesthetic agents on intervertebral disc degeneration: ex vivo and long-term in vivo experimental study. *PLoS ONE* 9, e109851.

Iwasaki, K., Sudo, H., Yamada, K., Ito, M., and Iwasaki, N. (2014b). Cytotoxic effects of the radiocontrast agent iotrolan and anesthetic agents bupivacaine and lidocaine in three-dimensional cultures of human intervertebral disc nucleus pulposus cells: identification of the apoptotic pathways. *PLoS ONE* 9, e92442.

Jünger, S., Gantenbein-Ritter, B., Lezuo, P., Alini, M., Ferguson, S.J., and Ito, K. (2009). Effect of limited nutrition on in situ intervertebral disc cells under simulated-physiological loading. *Spine (Phila Pa 1976)* 34, 1264-1271.

Kraychete, D.C., Sakata, R.K., Issy, A.M., Bacellar, O., Santos-Jesus, R., and Carvalho, E.M. (2010). Serum cytokine levels in patients with chronic low back pain due to herniated disc: analytical cross-sectional study. *Sao Paulo Med J* 128, 259-262.

Lai, A., Moon, A., Purmessur, D., Skovrlj, B., Laudier, D.M., Winkelstein, B.A., Cho, S.K., Hecht, A.C., and Iatridis, J.C. (2016). Annular puncture with tumor necrosis factor-alpha injection enhances painful behavior with disc degeneration in vivo. *Spine J* 16, 420-431.

Lai, A., Moon, A., Purmessur, D., Skovrlj, B., Winkelstein, B.A., Cho, S.K., Hecht, A.C., and Iatridis, J.C. (2015). Assessment of functional and behavioral changes sensitive to painful disc degeneration. *J Orthop Res* 33, 755-764.

Lane, N.E., Schnitzer, T.J., Birbara, C.A., Mokhtarani, M., Shelton, D.L., Smith, M.D., and Brown, M.T. (2010). Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 363, 1521-1531.

Leckie, S.K., Bechara, B.P., Hartman, R.A., Sowa, G.A., Woods, B.I., Coelho, J.P., Witt, W.T., Dong, Q.D., Bowman, B.W., Bell, K.M., et al. (2012). Injection of AAV2-BMP2 and AAV2-TIMP1 into the nucleus pulposus slows the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model. *Spine J* 12, 7-20.

Lee, H., Sowa, G., Vo, N., Vadala, G., O'Connell, S., Studer, R., and Kang, J. (2010). Effect of bupivacaine on intervertebral disc cell viability. *Spine J* 10, 159-166.

Liu, Y., Wei, J., Zhao, Y., Zhang, Y., Han, Y., Chen, B., Cheng, K., Jia, J., Nie, L., and Cheng, L. (2017). Follistatin-like protein 1 promotes inflammatory reactions in nucleus pulposus cells by interacting with the MAPK and NF κ B signaling pathways. *Oncotarget* 8, 43023-43034.

Lotz, J.C., and Ulrich, J.A. (2006). Innervation, inflammation, and hypermobility may characterize pathologic disc degeneration: review of animal model data. *J Bone Joint Surg Am* 88 Suppl 2, 76-82.

Luoma, K., Riihimäki, H., Luukkonen, R., Raininko, R., Viikari-Juntura, E., and Lamminen, A. (2000). Low back pain in relation to lumbar disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 25, 487-492.

Masuda, K., Aota, Y., Muehleman, C., Imai, Y., Okuma, M., Thonar, E.J., Andersson, G.B., and An, H.S. (2005). A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 30, 5-14.

Masuda, K., Sah, R.L., Hejna, M.J., and Thonar, E.J. (2003). A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *J Orthop Res* 21, 139-148.

McGirt, M.J., Eustacchio, S., Varga, P., Vilendecic, M., Trummer, M., Gorenssek, M., Ledic, D., and Carragee, E.J. (2009). A prospective cohort study of close interval computed tomography and magnetic resonance imaging after primary lumbar discectomy: factors associated with recurrent disc herniation and disc height loss. *Spine (Phila Pa 1976)* 34, 2044-2051.

Miyagi, M., Ishikawa, T., Kamoda, H., Suzuki, M., Murakami, K., Shibayama, M., Orita, S., Eguchi, Y., Arai, G., Sakuma, Y., et al. (2012). ISSLS prize winner: disc dynamic compression in rats produces long-lasting increases in inflammatory mediators in discs and induces long-lasting nerve injury and regeneration of the afferent fibers innervating discs: a pathomechanism for chronic discogenic low back pain. *Spine (Phila Pa 1976)* 37, 1810-1818.

Mo, J.H., Kim, J.S., Lee, J.W., Chung, P.S., and Chung, Y.J. (2013). Viability and Regeneration of Chondrocytes after Laser Cartilage Reshaping Using 1,460 nm Diode Laser. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 6, 82-89.

Mohd Isa, I.L., Abbah, S.A., Kilcoyne, M., Sakai, D., Dockery, P., Finn, D.P., and Pandit, A. (2018). Implantation of hyaluronic acid hydrogel prevents the pain phenotype in a rat model of intervertebral disc injury. *Sci Adv* 4, eaaq0597.

Moon, J.H., Kuh, S.U., Park, H.S., Kim, K.H., Park, J.Y., Chin, D.K., Kim, K.S., and Cho, Y.E. (2012). Triamcinolone decreases bupivacaine toxicity to intervertebral disc cell in vitro. *Spine J* 12, 665-673.

Nikkhoo, M., Wang, J.L., Parnianpour, M., El-Rich, M., and Khalaf, K. (2018). Biomechanical response of intact, degenerated and repaired intervertebral discs under impact loading - Ex-vivo and In-Silico investigation. *J Biomech* 70, 26-32.

Nishimura, K., and Mochida, J. (1998). Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus. An experimental study. *Spine (Phila Pa 1976)* 23, 1531-1538; discussion 1539.

Ohnishi, T., Yamada, K., Iwasaki, K., Tsujimoto, T., Higashi, H., Kimura, T., Iwasaki, N., and Sudo, H. (2019). Caspase-3 knockout inhibits intervertebral disc degeneration related to injury but accelerates degeneration related to aging. *Sci Rep* 9, 19324.

Ohtori, S., Inoue, G., Eguchi, Y., Orita, S., Takaso, M., Ochiai, N., Kishida, S., Kuniyoshi, K., Aoki, Y., Nakamura, J., et al. (2013a). Tumor necrosis factor- α -immunoreactive cells in nucleus pulposus in adolescent patients with lumbar disc herniation. *Spine (Phila Pa 1976)* 38, 459-462.

Ohtori, S., Inoue, G., Orita, S., Eguchi, Y., Ochiai, N., Kishida, S., Kuniyoshi, K., Nakamura, J., Aoki, Y., Ishikawa, T., et al. (2013b). 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* 7, 212-217.

Ohtori, S., Kinoshita, T., Yamashita, M., Inoue, G., Yamauchi, K., Koshi, T., Suzuki, M., Orita, S., Eguchi, Y., Nakamura, S., et al. (2009). Results of surgery for discogenic low back pain: a randomized study using discography versus discoblock for diagnosis. *Spine (Phila Pa 1976)* 34, 1345-1348.

Patel, T.D., Jackman, A., Rice, F.L., Kucera, J., and Snider, W.D. (2000). Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo. *Neuron* 25, 345-357.

Pfarrmann, C.W., Metzdorf, A., Zanetti, M., Hodler, J., and Boos, N. (2001). Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 26, 1873-1878.

Quero, L., Klawitter, M., Nerlich, A.G., Leonardi, M., Boos, N., and Wuertz, K. (2011). Bupivacaine--the deadly friend of intervertebral disc cells? *Spine J* 11, 46-53.

Rutges, J.P., Duit, R.A., Kummer, J.A., Bekkers, J.E., Oner, F.C., Castelein, R.M., Dhert, W.J., and Creemers, L.B. (2013). A validated new histological classification for intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 21, 2039-2047.

Schwarzer, A.C., Aprill, C.N., Derby, R., Fortin, J., Kine, G., and Bogduk, N. (1995). The prevalence and clinical features of internal disc disruption in patients with chronic low back pain. *Spine (Phila Pa 1976)* 20, 1878-1883.

Seki, S., Kawaguchi, Y., Chiba, K., Mikami, Y., Kizawa, H., Oya, T., Mio, F., Mori, M., Miyamoto, Y., Masuda, I., et al. (2005). A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease. *Nat*

Genet 37, 607-612.

Stolworthy, D.K., Bowden, A.E., Roeder, B.L., Robinson, T.F., Holland, J.G., Christensen, S.L., Beatty, A.M., Bridgewater, L.C., Eggett, D.L., Wendel, J.D., et al. (2015). MRI evaluation of spontaneous intervertebral disc degeneration in the alpaca cervical spine. *J Orthop Res* 33, 1776-1783.

Strube, P., Pfitzner, B.M., Streitparth, F., Hartwig, T., and Putzier, M. (2017). In vivo effects of bupivacaine and gadobutrol on the intervertebral disc following discoblock and discography: a histological analysis. *Eur Radiol* 27, 149-156.

Sudo H. Exploratory clinical trial on the safety and capability of dMD-001 in lumbar disc herniation. https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/icdr_e/ctr_view.cgi?recptno=R000039018. Accessed December 10, 2019.

Sudo, H., and Minami, A. (2011). Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Arthritis Rheum* 63, 1648-1657.

Sudo, H., Yamada, K., Iwasaki, K., Higashi, H., Ito, M., Minami, A., and Iwasaki, N. (2013). Global identification of genes related to nutrient deficiency in intervertebral disc cells in an experimental nutrient deprivation model. *PLoS ONE* 8, e58806.

Sukegawa, A., Iwasaki, N., Kasahara, Y., Onodera, T., Igarashi, T., and Minami, A. (2012). Repair of rabbit osteochondral defects by an acellular technique with an ultrapurified alginate gel containing stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A* 18, 934-945.

Tobert, D.G., Antoci, V., Patel, S.P., Saadat, E., and Bono, C.M. (2017). Adjacent Segment Disease in the Cervical and Lumbar Spine. *Clin Spine Surg* 30, 94-101.

Tsujimoto, T., Sudo, H., Todoh, M., Yamada, K., Iwasaki, K., Ohnishi, T., Hirohama, N., Nonoyama, T., Ukeba, D., Ura, K., et al. (2018). An acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel promotes intervertebral disc repair: A preclinical proof-of-concept study. *EBioMedicine* 37, 521-534.

Weiler, C., Nerlich, A.G., Bachmeier, B.E., and Boos, N. (2005). Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: a study

in surgical specimen and autopsy controls. *Spine (Phila Pa 1976)* 30, 44-53; discussion 54.

Willburger, R.E., and Wittenberg, R.H. (1994). Prostaglandin release from lumbar disc and facet joint tissue. *Spine (Phila Pa 1976)* 19, 2068-2070.

Woolf, C.J., Allchorne, A., Safieh-Garabedian, B., and Poole, S. (1997). Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacol* 121, 417-424.

Wuertz, K., and Haglund, L. (2013). Inflammatory mediators in intervertebral disk degeneration and discogenic pain. *Global Spine J* 3, 175-184.

Xia, K., Zhu, J., Hua, J., Gong, Z., Yu, C., Zhou, X., Wang, J., Huang, X., Yu, W., Li, L., et al. (2019). Intradiscal Injection of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Nucleus Pulposus-Like Cell-Seeded Polymeric Microspheres Promotes Rat Disc Regeneration. *Stem Cells Int* 2019, 6806540.

Yamada, K., Sudo, H., Iwasaki, K., Sasaki, N., Higashi, H., Kameda, Y., Ito, M., Takahata, M., Abumi, K., Minami, A., et al. (2014). Caspase 3 silencing inhibits biomechanical overload-induced intervertebral disk degeneration. *Am J Pathol* 184, 753-764.