

〈原著論文〉

髄核由来炎症反応におけるビタミンEのNO産生抑制効果

牧山 公彦

川崎医科大学大学院 脊椎・災害整形外科, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 腰椎椎間板ヘルニア (LDH) の疼痛発生機序には、機械的圧迫因子と化学的因子の関与が挙げられる。機械的圧迫因子に関しては、前方圧迫要素、後方圧迫要素、不安定性の三つの組み合わせが考えられる。化学的因子に関しては一酸化窒素 (NO)、炎症性サイトカインなどの関与が示されており、これらの中でNOはLDHによる神経障害性疼痛の一因となっているという報告がある。

一方、強力な抗酸化剤として注目されているビタミンEにはその直接的作用である抗酸化作用とは別に抗炎症作用があり、炎症の場でスーパーオキシド(O₂⁻)、プロスタグランジンE₂(PGE₂)、サイトカインを調整し、NO産生を阻害することが報告されている。

今回われわれは、LDHによる炎症の場においてビタミンEがNOの発生を抑制し、神経障害性疼痛の発生の防止に有効であるという仮説を立てた。

本研究の目的は髄核・マクロファージ共培養モデルを用いて、ビタミンE添加によるNOの発生抑制効果を検討することである。

実験には生後12週齢のSprague Dawleyラット(雄)97匹を用いた。ラットの髄核細胞と炎症性マクロファージの共培養をビタミンE添加群と無添加群とで分けて行い、培養開始2時間後、1週間後の培養液中のNO値を測定し比較検討を行った。

その結果、共培養開始から2時間後と比較して全ての群において1週間後のNO値が有意に上昇した。そしてビタミンE添加群では無添加群と比較して有意にNO値が低値であった。以上から、ラットを用いた髄核細胞とマクロファージの共培養によって炎症のメディエーターであるNO値が上昇し、それはビタミンE添加群において抑制された。

この結果からビタミンEが抗炎症作用によってLDHの神経障害性疼痛の一因であるNOの発生を抑制することができ、新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

doi:10.11482/KMJ-J41(1)1 (平成26年10月9日受理)

キーワード：椎間板ヘルニア、ビタミンE、髄核、炎症、神経障害性疼痛、一酸化窒素

緒言

腰椎椎間板ヘルニア (LDH) の疼痛発生機序には、機械的圧迫因子と化学的因子の関与が挙げられる。機械的圧迫因子に関しては、前方圧迫要素、後方圧迫要素、不安定性の三つの

組み合わせが考えられる。化学的因子に関しては一酸化窒素 (NO)¹⁾、炎症性サイトカイン²⁻⁶⁾などの関与が示されており、これらの中でNOはLDHによる神経障害性疼痛の一因となっているという報告がある^{6,7)}。

別刷請求先
牧山 公彦
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学 脊椎・災害整形外科

電話：086 (462) 1111
ファックス：086 (464) 1175
Eメール：makiyama@med.kawasaki-m.ac.jp

一方、強力な抗酸化剤として注目されているビタミンEにはその直接的作用である抗酸化作用とは別に抗炎症作用があり、炎症の場でスーパーオキシド(O₂⁻)、プロスタグランジンE₂(PGE₂)、サイトカインを調整し、NO産生を阻害することが報告されている^{8,9)}。

今回われわれは、LDHによる炎症の場においてビタミンEの抗炎症作用に着目して、ビタミンEがNOの発生を抑制することによって、神経障害の発生の防止に有効であるという仮説を立てた。本研究の目的は髄核・マクロファージ共培養モデルを用いて、ビタミンE添加によるNOの発生抑制効果を検討することである。

材料と方法

生後12週齢の雄 Sprague Dawley Rat を97匹使用した。本研究は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け(No.13-010)、川崎医科大学動物実験指針に基づき行った。

1. マクロファージ採取培養方法

3%チオグリコレート培地を腹腔内投与し腹膜炎を誘発させ、2日後に腹腔内を冷 phosphate buffered saline (PBS) で洗浄しながら腹水を回収する。これを4℃、1500rpm で5分遠心分離

機にかける。得られた白色沈殿は、10%子牛血清含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium を用いて直径0.4μmの多孔を有する Cell Culture Insert 裏面に4×10⁶個/wellとなるようにまく。37℃、CO₂ 5%条件下で2時間培養した後、培地を捨てPBSで2回洗浄する。洗浄後 Cell Culture Insert 裏面に張り付いている細胞がマクロファージとなる。得られたマクロファージを Opti-Modified Eagle's Medium (Opti-MEM) を用いて37℃、CO₂ 5%条件下で培養する。

2. 髄核細胞採取培養方法

マクロファージを採取した同ラットの尾椎から髄核組織を無菌的に摘出後、0.025%トリプシン含有EDTAにて5分間酵素処理して細胞に分離する。得られた細胞は Mesenchymal Stem Cell Medium で37℃、CO₂ 5%条件下に24時間培養する。

3. 髄核細胞とマクロファージの共培養方法

培養開始2日目に髄核細胞がしっかりと接着していることを確認した後、マクロファージを張り付かせておいた Cell Culture Insert 内面に髄核細胞を4×10⁵個/wellとなるように Opti-MEM を用いてまき共培養開始する(図1, 図2)。

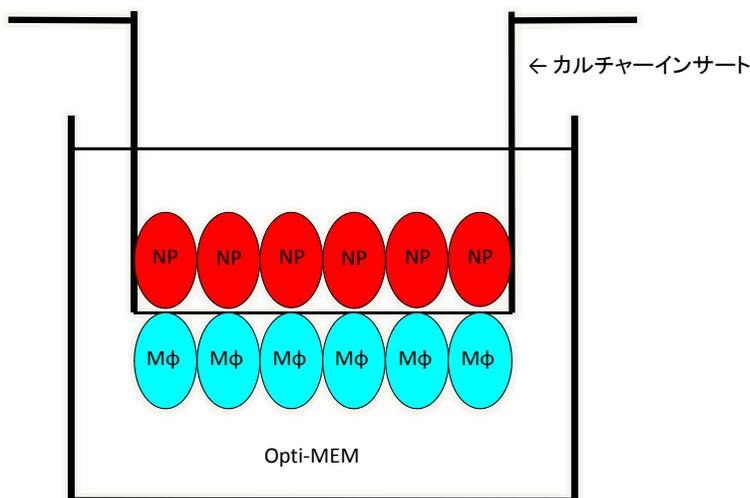


図1 カルチャーインサートを用いた共培養法
NP：髄核細胞，Mφ：マクロファージ，Opti-MEM：Opti-Modified Eagle's Medium

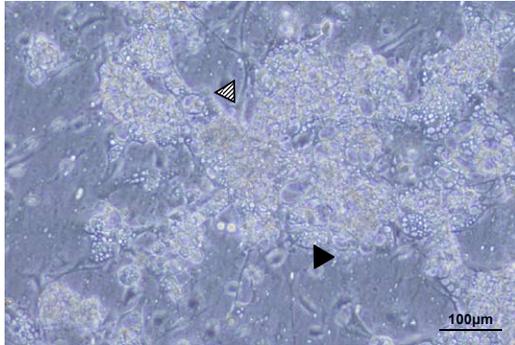


図2 カルチャーインサートを用いて共培養した髄核細胞とマクロファージ培養開始後1週間
▲：髄核細胞, ▲：マクロファージ

実験には髄核細胞とマクロファージの共培養によるヘルニアモデルにビタミンE添加群と無添加群の2種の培養系を用いた。合計263サンプルの共培養ヘルニアモデルを作成し、各群のサンプル数はビタミンE添加群の培養開始2時間：45サンプル、1週間：73サンプル、ビタミンE無添加群の培養開始2時間：48サンプル、1週間：97サンプルであった。

4. ビタミンE添加方法

ビタミンEの濃度は石岡ら¹⁰⁾が大動脈平滑筋培養実験で用いた10µg/mlとなるように共培養開始時にOpti-MEMに添加を行った。95%エ

タノール100mlにdl-α-トコフェロール500mgを溶解して作成したトコフェロール液100µlをµシリンジを使用して49.9mlのOpti-MEMに攪拌しながらゆっくりと添加した。

5. 測定

共培養開始後2時間、7日間の培養液中のNOxを、NO₂/NO₃ Assay KitC IIを用いてGriess法にて測定した。

6. 統計処理

測定結果は平均値±標準偏差 (mean ± SD) で記した。Man-Whitney U検定を(Stat Mate IV, ATMS社, 日本)を用いて統計学的検討を行い、p<0.05を有意とした。

結果

髄核細胞とマクロファージの共培養におけるNO産生量の経時的变化(図3, 表1)は培養開始2時間ではビタミンE添加群4.66±1.06µmol/l (n=45)、無添加群4.26±1.42µmol/l (n=48)でP=0.121251と有意差を認めなかった。培養開始から1週間後ではビタミンE添加群6.73±1.06µmol/l (n=73)、無添加群12.04±11.81µmol/l (n=97)とビタミンE添加群の方が統計学的有意差をもって低値であった。(p<0.001)。

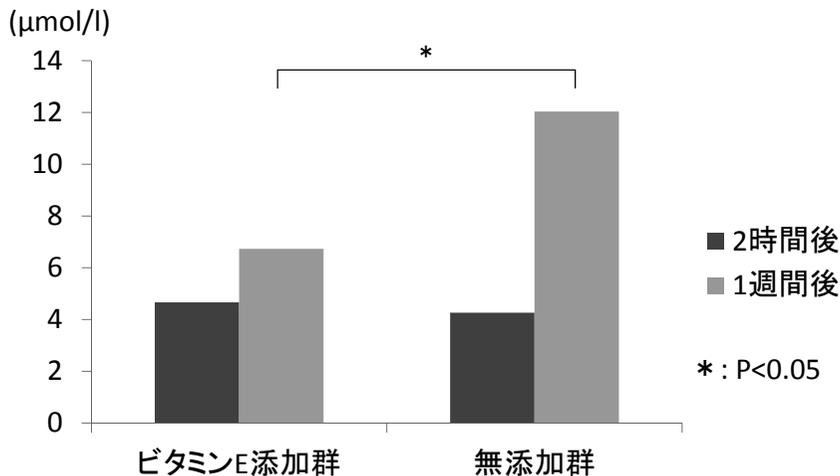


図3 髄核・マクロファージ共培養モデルにおけるNO産生量(µmol/l)の経時的变化

表1 髓核・マクロファージ共培養モデルにおけるNO産生量 ($\mu\text{mol/l}$) の経時的变化 (*: $P<0.05$)

	ビタミン添加群	無添加群
2時間後	4.66 \pm 1.06	4.26 \pm 1.42
1週間後	6.73 \pm 1.06	12.04 \pm 11.81*

考 察

LDHの症状発現には、機械的圧迫因子と化学的因子の関与が示されている。化学的因子に関して、Nachemsonら¹¹⁾はLDHとその周囲組織のpH値が低下していることを報告し、この酸性化が神経根周囲で生じる炎症反応の一因であると推測した。これまでLDHにおける下肢痛の発生機序にはこの炎症反応が主に関与しているとされてきた¹²⁾。体内で最大の無血管組織である髓核は高密度の線維性組織である繊維輪と軟骨性の終板によって囲まれ、宿主の免疫機構から物理的に隔絶されている。椎間板ヘルニアにおいては髓核が椎間板から脱出し、宿主免疫に暴露されることによって異物とみなされ、自己免疫反応による炎症が発生すると考えられている¹³⁾。Kangら¹⁾が人の摘出ヘルニア組織を用いた生化学的検討においてNO産生があると報告して以来、この炎症反応に関する化学的因子として、Glycoprotein²⁾、Immunoglobulin G³⁾、PhospholipaseA₂⁴⁾、Stromelysin⁵⁾、Prostaglandin E₂⁶⁾などが報告されている。また、Hashizumeら¹⁴⁾はLDH組織内にNOが発生することを組織学的に証明し、Kawakamiら⁶⁾はLDHにおける神経障害性疼痛にはPLA₂やNOの発生が関与すると報告している。またMabuchiら⁷⁾は非選択的NOS阻害薬であるNG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)を投与することで神経障害性疼痛が一過性に軽減すると報告していることから、NOが神経因性疼痛に関与していることが支持される。

一方、1922年、EvansとBishopにより抗不妊ビタミンとして発見されたビタミンEは、活性酸素やフリーラジカルによる脂質の過酸化、タンパク質の変性、酵素の失活あるいは核酸の酸化的障害を防ぐ物質として注目されている。

しかし、Devarajらは糖尿病患者に大量のビタミンEを3カ月間投与したところ、白血球やマクロファージからのO₂⁻、IL-1 β の産生が軽減したと報告し、ビタミンEが直接的抗酸化作用とは別に抗炎症作用を有することを示した⁸⁾。BrigeliusらはビタミンEがprotein kinase Cを阻害することを報告しており¹⁵⁾、坂本らはビタミンEがマクロファージの膜画分に取り込まれると、細胞内へのCa²⁺流入やprotein kinase C阻害を介して、高分子型Phospholipase A₂活性が抑制されると述べている^{9,16,17)}。これらのことから、細胞膜からのアラキドン酸遊離が抑制され、PGE₂産生が阻害されると考えられる。NO産生を触媒するiNOS¹⁸⁾はPGE₂等の誘導刺激によってマクロファージで産生されるため¹⁹⁾、PGE₂が抑制されるとNOも抑制される。さらにGrammas²⁰⁾らは、ビタミンEの代謝産物であるCEHCが腫瘍壊死因子(TNF- α)やLipopolysaccharide (LPS)で刺激したラット動脈内皮細胞とマウスミクログリア細胞においてNO産生を阻害し、またTNF- α で刺激したマウスミクログリア細胞でのPGE₂産生を阻害して抗炎症作用を示すことを報告している。

以上のことから本研究においてはビタミンEの抗炎症作用に着目し、髓核・マクロファージ共培養モデルを用いて腰椎椎間板ヘルニアによる神経障害性疼痛の一因と言われているNO産生の抑制効果を検討した。ビタミンEの濃度は石岡ら¹⁰⁾が大動脈平滑筋培養実験で用いた10 $\mu\text{g/ml}$ となるようにOtpi-MEMに添加を行った。また、予備実験においてビタミンEの濃度を上げていくと培養液が白濁するためビタミンEの濃度は10 $\mu\text{g/ml}$ に設定した。

髓核・マクロファージ共培養モデルは、腰椎椎間板ヘルニアにおけるマクロファージにさらされた脱出髓核をin vitroで再現したものである。今回の共培養モデルは細胞間レベルでの解析を行うためにYamamotoら²¹⁾およびKatsunoら²²⁾の方法を参考に共培養を行った。Yamamotoらは、髓核細胞とストローマ細胞をCell Culture Insertを用いて細胞レベルでの共培

養を行った。この方法は異なる細胞同士が接着し、なおかつ液性因子を介した細胞同士の相互反応を調べる共培養法として非常に有用であると提唱している。Katsunoらは年齢による免疫応答の変化を検討するために髄核細胞・マクロファージ共培養モデルを作成し、週齢数が増すにつれてNO値の増加およびを認め、神経周囲のNO値が臨床症状の違いに関係していると報告している。

本研究では髄核・マクロファージ共培養によって培養液中にNOが産生されたが、それはビタミンE添加によって有意に抑制されていた。この結果からビタミンEが抗炎症作用によってLDHの神経障害性疼痛の一因であるNOの発生を抑制することができ、新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

また、これまで様々な研究でヘルニア組織内にNOの発生が認められており、この産生には主にマクロファージの関与が示唆されている。しかし、変性髄核にもiNOSの発現が認められており²³⁾、NO産生に対する変性髄核の関与について今後の更なる研究が必要である。

結語

髄核・マクロファージ共培養モデルを用いて、ビタミンE添加によるNOの発生抑制効果を検討した。髄核・マクロファージ共培養によって培養液中にNOが産生されたが、それはビタミンE添加によって有意に抑制されていた。ビタミンEが抗炎症作用によってLDHの神経障害性疼痛の一因であるNOの発生を抑制することができ、新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の立案から論文作成までご指導いただいた川崎医科大学脊椎災害整形外科学教授の長谷川徹先生に深甚なる謝意を表します。また実験遂行にあたりご助力いただいた同教室員並びに研究補助員の皆様に深謝申し上げます。

引用文献

- 1) Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson WF 3rd, Evans CH: Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine* 21: 271-277, 1966
- 2) Marshall LL, Trethewie ER, Curtain CC: Chemical radiculitis. A clinical, physiological and immunological study. *Clin Orthop Relat Res* 129: 61-37, 1977
- 3) Pennington JB, McCarron RF, Laros GS: Identification of IgG in the canine intervertebral disc. *Spine* 15: 674-678, 1990
- 4) Saal JS, Franson RC, Dobrow R, Saal JA, White AH, Goldthwaite N: High levels of inflammatory phospholipase A2 activity in lumbar disc herniations. *Spine* 15: 674-678, 1990
- 5) Liu J, Roughley PJ, Mort JS: Identification of human intervertebral disc stromelysin and its involvement in matrix degradation. *J Orthop Res* 9: 568-575, 1991
- 6) Kawakami M, Tamaki T, Hashizume H, Weinstein JN, Meller ST: The role of phospholipase A2 and nitric oxide in pain-related behavior produced by an allograft of intervertebral disc material to the sciatic nerve of the rat. *Spine* 22: 1074-1079, 1997
- 7) Mabuchi T, Matsumura S, Shinji M, Okuda-Ashitaka E, Kitano T, Kojima H, Nagano T, Minami T, Ito S: Attenuation neuropathic pain by the nociceptin / orphanin FQ antagonist JTC-801 is mediated by inhibition of nitric oxide production. *European journal of Neuroscience* 17: 1384-1392, 2003
- 8) Devaraj S, Jialal I: Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications. *Circulation* 102: 191-196, 2000
- 9) 坂本 亘：マクロファージとビタミンE。ビタミン68: 699-710, 1994
- 10) 石岡達司：大動脈中膜平滑筋細胞培養に関する研究（第3編）。加齢及び糖尿病ラット由来細胞におけるビタミンEの細胞増生に対する影響。岡山医学会雑誌 99: 1197-1204, 1987
- 11) Nachemson A: Intradiscal measurements of pH in patients with lumbar rhizopathies. *Acta Orthop Scand* 40: 23-42, 1969
- 12) Bobechko WP, Hirsh C: Auto-immune response to nucleus pulposus in rabbit. *J Bone Joint Surg* 47B: 574-

- 580, 1965
- 13) 西田康太郎, 土井田稔, 高田徹, 宮本裕史, 黒坂昌弘: 椎間板の特殊性と遺伝子治療. 骨・関節・靭帯 16: 804-809, 2003
- 14) Hashizume H, Kawakami M, Nishi H, Tamaki T: Histochemical demonstration of nitric oxide in herniated lumbar discs. A clinical and animal model study. *Spine* 22: 1080-1084, 1997
- 15) Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A: The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr* 76: 703-716, 2002
- 16) Sakamoto W, Fujie K, Nishihira J, Handa H, Ueda N, Yamamoto S: Effect of vitamin E on expression of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-stimulated rat macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1304: 139-144, 1996
- 17) Sakamoto W, Fujie K, Handa H, Nishihira J, Mino M: Vitamin E inhibits PGE2 and O2- production in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1704: 251-255, 1991
- 18) A Fugen: iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Science* 75: 639-653, 2004
- 19) Galea E, Feinstein DL: Regulation of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *FASEB J* 13: 2125-2137, 1999
- 20) Grammas P, Hamdheydari L, Benakas EJ, Mou S, Pye QN, Wechter WJ, Floyd RA, Stewart C, Hensley K: Anti-inflammatory effects of tocopherol metabolites. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 1047-1052, 2004
- 21) Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, Nakai T, Nishimura K, Kawada H, Hotta T: Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in coculture system. *Spine* 29: 1508-1514, 2004
- 22) Katsuno R, Hasegawa T, Iwashina T, Daisuke S, Mikawa Y, Mochida J: Age-related effects of cocultured rat nucleus pulposus cells and macrophages on nitric oxide production and cytokine imbalance. *Spine* 33: 845-849, 2008
- 23) Hua G, Haiping Z, Baorong H, Dingjun H: Effect of ulinastatin on the expression of iNOS, MMP-2, and MMP-3 in degenerated nucleus pulposus cells of rabbits. *Connect Tissue Res* 54: 29-33, 2013

〈Original Article〉

Inhibitory effect of vitamin E on NO production in nucleus pulposus-derived inflammatory reaction

Kimihiko MAKIYAMA

*Department of Orthopaedic Surgery Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192, Japan*

ABSTRACT Mechanical compression factor and chemical factors are involved in the pathogenetic mechanism of pain in lumbar disc herniation (LDH). With regard to the mechanical compression factor, a combination of the following three elements seems to be operating: anterior compression, posterior compression, and instability. Previous reports suggest that chemical factors, such as nitrogen oxide (NO) and inflammatory cytokines, are involved in the mechanism of neuropathic pain. Additionally, NO has been reported to be an important cause of neuropathic pain in LDH.

It has been reported that vitamin E, which has received attention as a potent antioxidant, has an anti-inflammatory effect in addition to its direct antioxidant effect. It modulates the levels of

superoxide, prostaglandin E₂, and cytokines, thereby inhibiting NO production at inflammatory sites.

We have hypothesized that vitamin E is effective in preventing the development of neuropathic pain through its ability to inhibit NO production at sites of LDH-induced inflammation.

This study aimed to examine the inhibition of NO production via the addition of vitamin E to a nucleus pulposus-macrophage co-culture model.

Ninety-seven 12-week-old male Sprague Dawley rats were used in the study. Rat nucleus pulposus-inflammatory macrophage co-cultures with and without the addition of vitamin E were set up, and NO levels in the co-culture medium at 2 hours and at 1 week of incubation were assessed.

In both groups, the NO level in the co-culture medium was significantly higher at 1 week of incubation than that at 2 hours of incubation. Additionally, the NO level in co-culture medium was significantly lower in the vitamin E-added co-culture group than in the non-vitamin E-added co-culture group. These findings indicate that the elevation of NO, a mediator of inflammation, occurred in the rat nucleus pulposus-inflammatory macrophage co-cultures, and this elevation was inhibited in the vitamin E-added co-culture.

The results revealed that vitamin E is capable of inhibiting NO production, a cause of neuropathic pain in LDH, through its anti-inflammatory effect, and may serve as a new therapeutic strategy.

(Accepted on October 9, 2014)

Key words : Lumber disc herniation, Vitamin E, Nucleus pulposus, Inflammation, Neuropathic pain, Nitrogen oxide

Corresponding author
Kimihiro Makiyama
Department of Orthopaedic Surgery Kawasaki Medical
School, 577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-
0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111
Fax : 81 86 464 1175
E-mail : makiyama@med.kawasaki-m.ac.jp

