

201127001A

厚生労働科学研究費補助金

慢性の痛み対策研究事業

情動的側面に着目した慢性疼痛の病態解明と
診断・評価法の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 南 雅文（北海道大学薬学研究院 教授）

平成24（2012）年 5月

厚生労働科学研究費補助金

慢性の痛み対策研究事業

情動的側面に着目した慢性疼痛の病態解明と
診断・評価法の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 南 雅文（北海道大学薬学研究院 教授）

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

情動的側面に着目した慢性疼痛の病態解明と診断・評価法の開発 -----	1
南雅文	

I I. 分担研究報告

1. 慢性疼痛における情動の役割の研究 -----	7
南雅文	
2. 慢性疼痛マーカーとなる情動関連分子の探索 -----	11
井上和秀、南雅文	
(資料) Gene chip assay におけるパスウェイ解析結果 (1) ~ (9)	
3. 情動を指標とした脳機能画像による慢性疼痛評価法の開発 -----	31
井上猛	
4. 養育環境に関連した情動を指標とした慢性疼痛評価法の開発 -----	35
細井昌子	

I I I. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	43
-----------------------------	----

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（慢性の痛み対策研究事業）
総括研究報告書

情動的側面に着目した慢性疼痛の病態解明と診断・評価法の開発
(H23-痛み一般-001)

研究代表者：南 雅文（北海道大学薬学研究院 教授）

研究要旨

情動的側面に着目した慢性疼痛の病態解明と診断・評価法の開発を目的とし、基礎・臨床が連携・協力して研究を行った。1) 慢性疼痛における情動の役割の研究では、慢性疼痛における情動の役割の研究の前段階として急性・持続性疼痛における情動の役割の解析を、拡張扁桃体を構成する脳領域である分界条床核 (BNST) に着目して行い、負情動生成により痛みが増悪することを示す知見を得た。2) 慢性疼痛マーカーとなる情動関連分子の探索では、神経障害性疼痛モデル動物の BNST における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、背側 BNST で 20 遺伝子、腹側 BNST で 19 遺伝子を慢性疼痛マーカー候補の遺伝子群として抽出した。これら遺伝子群およびパスウェイ解析や既報により痛みの情動的側面への関与が考えられる遺伝子群に関して、定量的 RT-PCR、行動薬理的解析、マイクロダイアリスによる神経化学的解析により、痛みの情動的側面における関連性のより詳細な評価を行った。3) 情動を指標とした脳機能画像による慢性疼痛評価法の開発では、気分と痛み、行動抑制系・賦活系が社会的機能に複合的に及ぼす影響を質問紙によって解析し、腹側線条体の報酬系における神経活動との相関を明らかにするため、本年度は、まず 15 名の健常者において、腹側線条体の報酬予測課題における神経活動を機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) によって測定し方法論を確立した。さらに、慢性疼痛患者においても fMRI 測定を開始した。4) 養育環境に関連した情動を指標とした慢性疼痛評価法の開発では、慢性疼痛の入院患者、外来患者、一般住民 (慢性疼痛有り・無し) を対象に両親に関する被養育体験を調査し、両親の養育スタイル (ケアと過干渉) と痛みの強さを比較検討し、慢性疼痛を有する女性において、両親の養育スタイルが慢性疼痛の自覚的重症感に関連している可能性を示した。

研究分担者

井上 和秀・九州大学薬学研究院・教授
井上 猛・北海道大学医学研究科・講師
細井 昌子・九州大学病院・助教 (診療講師)、
九州大学医学研究院・講師

れら負情動は、QOL を著しく低下させるだけでなく、精神疾患・情動障害の引き金ともなり、また、そのような精神状態が痛みをさらに悪化させるという悪循環を生じさせ、慢性疼痛の病態において重要な役割を果たしていると考えられる。厚生労働省「慢性の痛みに関する検討会」の平成 22 年 9 月の提言では、科学的根拠の集積に基づく治療法の基準策定の必要性が示されており、感覚的側面に比べ科学的知見の

A. 研究目的

痛みによる不安、抑うつ、嫌悪などの負情動は、警告反応としての痛みにおいて重要であるが、こ

収集が遅れている情動的側面の研究推進は喫緊の課題である。痛みの情動的側面の神経機構に関する知見の集積は、より良い治療薬・治療法の選択につながるだけでなく、高齢化に伴い今後も増大する情動障害を合併した慢性疼痛患者の発生を抑制するための健康教育の基礎情報となり、国民の心身の健康およびQOLの向上に役立つ。

慢性疼痛治療のゴールは、患者のQOLを向上させ、痛みと共存した状態であってもよりよい社会生活が送れるようにすることであり、この点からも痛みの情動的側面の評価が重要である。そこで本研究では、情動的側面に着目した慢性疼痛の病態解明と診断・評価法の開発を目的とし、基礎・臨床が連携・協力して研究を進める。本研究で開発する情動関連脳領域に着目した脳機能画像計測による評価法は、患者のQOLをより直接に反映する新しい慢性疼痛評価法となることが期待される。また、慢性疼痛マーカーとなる情動関連分子の探索は、痛みによる負情動生成に関わる神経機構解明につながるだけでなく、それらマーカー分子を活用したPETなどの脳機能画像計測による評価法開発に役立つ。さらに、研究が遅れている養育環境と関連した情動と慢性疼痛との関係性に関する知見が得られることは、うつ病の蔓延化や虐待の増加に伴い養育行動の異常化が懸念される現代の養育環境を見直し、情動障害を合併した慢性疼痛の予防を促進することに繋がる。

B.研究方法

1) 慢性疼痛における情動の役割の研究
IsoproterenolのvBNST内局所微量投与による負情動惹起が各種疼痛試験における侵害受容反応に及ぼす影響を検討した。実験には雄性Sprague-Dawleyラットを使用した。6週齢の時点でvBNST内局所投与のためのガイドカニュー

ール挿入手術を行い、少なくとも5日間の回復期間において、各種疼痛試験に用いた。用いた疼痛試験は、①ホルマリンテスト、②酢酸ライジングテスト、③結腸直腸拡張刺激(CRD刺激)、④von Frey試験を行った。

2) 慢性疼痛マーカーとなる情動関連分子の探索

痛みによる負情動生成に関与する脳領域として拡張扁桃体に着目し、神経障害性疼痛モデル動物で発現変化する遺伝子群をDNAチップアッセイによる網羅的解析により探索した。さらに、得られた結果および既報より、痛みの情動的側面への関与が考えられる遺伝子群について、定量的RT-PCR、行動薬理学的解析およびマイクロダイアリスによる神経化学的解析により、痛みの情動的側面における関連性のより詳細な評価を行った。

以上の動物を用いた研究の実施にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律(動愛法)」を遵守し、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(文部科学省告示第71号)及び、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(日本学術会議)、国立大学法人北海道大学および九州大学の動物実験に関する指針に即して、各大学で設けられた規程に従い立案した計画を、動物実験倫理委員会の審議を経て研究機関の長の承認を得た上で動物実験に着手した。

3) 情動を指標とした脳機能画像による慢性疼痛評価法の開発

報酬予測課題時の腹側線条体神経活動のfMRIによる測定には、先行研究を元に独自に作成したMonetary incentive delay課題を用いた。機能画像計測には、GE社製1.5 T scannerを用いた。機能画像としてT2*-weighted gradient echo echo-planar

imaging (EPI) を撮像し、SPM8 を用いて解析した。左右の腹側線条体を ROI として設定した。ROI 解析には Marsbar を用いた。慢性疼痛患者において、不安 (HAD)、抑うつ (HAD, PHQ-9)、行動抑制系・行動賦活系尺度 (BIS/BAS 尺度)、疼痛と疼痛による生活障害 (BPI, PDAS, SF-MPQ-JV)、健康関連の生活の質 (SF8) を質問紙により評価した。

4) 養育環境に関連した情動を指標とした慢性疼痛評価法の開発 慢性疼痛の入院患者、外来患者、一般住民 (慢性疼痛有り・無し) を対象に両親に関する被養育体験を調査し、両親の養育スタイル (ケアと過干渉) と痛みの強さを比較検討した。

以上の人を対象とした研究の実施にあたっては、「臨床研究に関する倫理指針」等の関連指針に従って、ヘルシンキ宣言のもと、被験者の人権擁護、個人情報保護に十分留意して行った。なお、慢性疼痛患者と健常者の質問紙検査、脳機能画像検査については、北海道大学病院及び九州大学病院の自主臨床研究審査委員会の承認を得て行った。不利益・危険性について文書を用いて十分に説明した上で文書同意を得た。

C. 研究結果

1) 慢性疼痛における情動の役割の研究 Isoproterenol の vBNST 内局所微量投与による負情動惹起が各種疼痛試験における侵害受容反応に及ぼす影響を検討した。ホルマリンおよび酢酸ライによる化学的侵害刺激に対しては、疼痛関連行動の増加傾向は見られたものの有意な変化はみられなかった。一方、CRD 刺激 (内臓痛) では有意な痛みの増悪がみられた。程度は大きくないものの、急性・持続性疼痛が負情

動により増悪することが示された。

2) 慢性疼痛マーカーとなる情動関連分子の探索 神経障害性疼痛モデル動物の BNST における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、背側 BNST で 20 遺伝子、腹側 BNST で 19 遺伝子を慢性疼痛マーカー候補の遺伝子群として抽出した。これら遺伝子群およびパスウェイ解析や既報により痛みの情動的側面への関与が考えられる遺伝子群に関して、定量的 RT-PCR、行動薬理的解析、マイクロダイアリスによる神経化学的解析により、痛みの情動的側面における関連性のより詳細な評価を行った。定量的 RT-PCR、行動薬理的解析および神経化学的解析により、コルチコトロピン放出因子 (CRF) およびその受容体 (CRF1R,2R) の痛みの情動的側面への関与が示唆された。

3) 情動を指標とした脳機能画像による慢性疼痛評価法の開発 15名の健常者において、腹側線条体の報酬予測課題における神経活動を機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) によって測定し方法論を確立した。さらに、慢性疼痛患者においても fMRI 測定を開始した。

4) 養育環境に関連した情動を指標とした慢性疼痛評価法の開発 慢性疼痛の重症感の指標となる疼痛の自覚的強度は一般疼痛群と比べて、心療内科受診患者で高かった。慢性疼痛の自覚的重症感が上がるにつれて、被験者からみた父親及び母親の養育スタイルは有意にケアが低く、過干渉が高かった。

D. 考察

1) 慢性疼痛における情動の役割の研究 負情動の生成が疼痛閾値に与える影響とその神経機構を明らかとすることを目的とし、痛みの情

動的側面に関与する脳部位である BNST を活性化させることにより負情動を生成させた後、疼痛行動の評価を行ったところ、ホルマリンテスト、酢酸ライジングテストでは疼痛関連行動の増加傾向がみられ、さらに CRD 刺激においては有意な疼痛関連行動の増加がみられた。これらの結果は、負情動が痛みの増悪を引き起こす可能性を示しており、その神経機構に BNST が重要な役割を果たしていることが考えられる。しかしながら、本研究により検討したいずれの急性・持続性疼痛についても負情動の影響は小さいものであった。来年度の研究では、神経障害性疼痛モデル動物を用い、慢性疼痛に対する負情動の影響を検討する予定である。

2) 慢性疼痛マーカーとなる情動関連分子の探索

慢性疼痛評価に役立つ分子マーカー同定を目的とし、神経障害性疼痛モデル動物を用いて、慢性疼痛により発現変化する遺伝子の探索を行い、Gene chip assay の結果、dlBNST で 20 遺伝子、vBNST で 19 遺伝子を、慢性疼痛マーカー候補分子として抽出した。今後、痛みによる負情動生成に関与する他の脳領域（島皮質、前帯状回）に関しても解析を行い、領域間で共通して変動する遺伝子ならびに特定領域で変動が大きい遺伝子を絞り込んでいくことで、慢性疼痛評価に役立つ分子マーカーを同定することが出来ると考えられる。

また、Gene chip assay の結果では変動が確認されなかったものの、パスウェイ解析の結果および不安や抑うつ、嫌悪などの負情動との関連に関するこれまでの報告にもとづき、10 遺伝子に関して定量的 RT-PCR を行ったところ、5-HT 受容体、CRF 受容体、PAC1 受容体およびそのリガンド PACAP 遺伝子に関して発現量変化が見られた。このため、既に負情動との関連が報告されている分子に関しては、パスウェイ解析

の結果も考慮しつつ、その遺伝子発現変化に関して、引き続き定量的 RT-PCR による検討を行う必要があると考えられる。

一方、Gene chip assay の結果抽出された遺伝子の中から、5 つの遺伝子に関して定量的 RT-PCR による確認を行ったところ、おおむね Gene chip assay の結果と同様の結果が確認されたものの、一部は結果が異なっていた。本年度の研究では、個体間のバラツキを軽減するために、3 個体から得られたサンプルを 1 群として、神経障害性疼痛モデル群と sham 術群を 2 群ずつ解析したが、例数不足によるバラツキが生じ、結果が一部異なるケースが発生したものと考えられる。このため、次年度以降の検討においては、3 個体から得られたサンプルを 1 群として、3 群ずつの解析を行うことでバラツキを軽減させる予定である。また、神経障害性疼痛モデルにおいて、機械的痛覚過敏の形成評価のみではなく、不安・抑うつなどの負情動変化の評価も併せて行ったのちに群分けすることで、より精度の向上を行うことが必要であると考えられる。

3) 情動を指標とした脳機能画像による慢性疼痛評価法の開発

健常者において報酬予測課題時の腹側線条体神経活動を再現性よく測定することができた。この結果は先行研究とよく一致している。まだ少数例であるが、慢性疼痛患者においても報酬予測課題時の腹側線条体神経活動を測定することが可能であることが明らかになった。症例数が少ないため、統計解析することはできないが、今後症例数が集積した後に、腹側線条体の神経活動と不安・抑うつ・痛み・生活の質・生活の障害との相関を検討する予定である。そのことによって、腹側線条体の神経活動が慢性疼痛患者の症状・生活の質にどのような影響を与えているのかが明らかになると期待される。

4) 養育環境に関連した情動を指標とした慢性疼痛評価法の開発 一般住民と比べて、心療内科患者は、被養育体験で望ましい養育スタイルが有意に少ないという知見が初めて示された。さらに、一般住民のなかでも、健常群と比べると、ケアと自律が少なく、冷淡と過干渉が多く、一般疼痛群は心療内科患者に近い養育スタイルを示していた。ケアと自律という望ましい養育スタイルを受けることで、慢性疼痛罹患に対して保護的な生理学的因子が存在する可能性があると考えられた。その生理学的因子については、さまざまな生体内システムが関与していると考えられるが、候補のひとつとして、オキシトシンが考えられるため、一般住民や心療内科患者群での血中オキシトシン値の比較を今後の課題としている。オキシトシン測定に際しては、ペプチドの抽出を行った測定が必要であることが2011年に指摘されてきているため、抽出を行う高感度オキシトシン測定系を現在開発中である。本研究での対象である一般住民や心療内科患者で測定し解析を進めていく方針である。

また、高い過干渉の養育スタイルが父親でも母親でも慢性疼痛に関連することが明らかになった。高い過干渉は、依存的なパーソナリティや対人過敏性との関連が報告されており、ソーシャルスキルの低さから自己効力が低くなり、慢性疼痛に発展しやすい可能性がある。また本スタイルは、強迫性との関連が報告されており、強迫的に過活動を行うことで、筋骨格系の疲労から慢性疼痛に発展する可能性がある。

一方、低いケアの被養育スタイルも、父親でも母親でも慢性疼痛に関与することが明らかになった。低いケアは、自己評価の低さや抑うつとの関連が報告されており、抑うつを介して慢性疼痛に関連している可能性がある。

本研究結果を端緒にして、両親の養育スタイル

が痛みの情動的側面や慢性疼痛罹患リスクにどのような影響を及ぼすかについて、さらなる研究が重要である。

E. 結論

1. 急性・持続性疼痛における情動の役割の解析を行い、ホルマリンおよび酢酸による化学的侵害刺激に対しては、疼痛関連行動の増加傾向が、CRD 刺激（内臓痛）では有意な痛みの増悪がみられた。
2. 神経障害性疼痛モデル動物の拡張扁桃体における遺伝子発現変化の網羅的解析により、計 39 遺伝子を慢性疼痛マーカー候補の遺伝子群として抽出された。さらに、定量的 RT-PCR、行動薬理的解析、神経化学的解析による詳細な解析により、コルチコトロピン放出因子（CRF）およびその受容体（CRF1R,2R）の痛みの情動的側面への関与が示唆された。
3. 15名の健常者において、腹側線条体の報酬予測課題における神経活動を機能的磁気共鳴画像法（fMRI）によって測定し方法論を確立した。さらに、慢性疼痛患者においても fMRI 測定を開始した。
4. 慢性疼痛の重症感の指標となる疼痛の自覚的強度は一般疼痛群と比べて、心療内科受診患者で高かった。慢性疼痛の自覚的重症感が上がるにつれて、被験者からみた父親及び母親の養育スタイルは有意にケアが低く、過干渉が高かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会および研究会発表

南雅文（北海道大学）

- 1) Soichiro Ide, Atsushi Ohno, Ryuta Tamano, Tomonori Naka, Satoshi Deyama, Mitsuhiro Yoshioka, Masabumi Minami: Involvement of corticotropin-releasing factor within the dorsolateral part of the bed nucleus of the stria terminalis in pain-induced aversion. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 韓国, 2011.9.23-24
- 2) 中誠則, 井手聡一郎, 南雅文: 痛みによる不快情動生成における分界条床核内 CRF 神経情報伝達系の役割. 第 33 回日本疼痛学会, 松山, 2011.7.22-23
- 3) 小関加奈, 中誠則, 仲子友和, 平田美紀枝, 井手聡一郎, 吉岡充弘, 南雅文: Noradrenergic transmission within the bed nucleus of the stria terminalis regulates food intake and anxiety-like behaviors. 第 85 回日本薬理学会, 京都, 2012.3.14-16
- 4) 眞嶋悠幾, 中誠則, 仲子友和, 平田美紀枝, 井手聡一郎, 吉岡充弘, 南雅文: 摂食行動および不安様行動における分界条床核内ノルアドレナリン神経情報伝達の役割. 日本薬学会 第 132 年会, 札幌, 2012.3.29-31

細井昌子（九州大学）

- 1) 河田 浩, 細井昌子, 柴田舞欧, 有村達之, 富岡光直, 船越聖子, 安野広三, 山城康嗣, 久保千春, 須藤信行: 両親の養育態度は疼痛性障害患者の心理特性に影響するか?—自記式質問紙を用いた検討—. 第 52 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会, 横浜, 2011. 6. 9
- 2) 中山智恵, 細井昌子, 河田 浩, 日浅 綾, 有村達之, 富岡光直, 船越聖子, 安野広三, 山城康嗣, 松下智子, 須藤信行: 性的虐待歴

を有する疼痛性障害と敵意, 身体化およびヒステリー傾向との関係. 第 52 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会, 横浜, 2011. 6.10

- 3) 中山智恵, 河田 浩, 細井昌子, 安野広三, 牧野聖子, 岩城理恵, 富岡光直, 有村達之, 久保千春, 須藤信行: 対人交流障害を治療対象とした幼少期に虐待歴を有する病歴 20 年の疼痛性障害の治療経験. 第 51 回日本心身医学会九州地方会, 福岡, 2012. 2.17
- 4) 河田 浩, 細井昌子, 柴田舞欧, 有村達之, 富岡光直, 安野広三, 船越聖子, 山城康嗣, 久保千春, 須藤信行: 疼痛性障害における幼少期の養育態度と痛みの破局化との関連. 日本慢性疼痛学会, 東京, 2012. 2. 18
- 5) 柴田舞欧, 河田 浩, 安野広三, 岩城理恵, 富岡光直, 有村達之, 牧野聖子, 山城康嗣, 久保千春, 清原 裕, 須藤信行, 細井昌子: 慢性疼痛を有する女性における幼少時の両親の養育態度: 一般住民と心療内科患者の比較. 第 41 回日本慢性疼痛学会, 東京, 2012. 2.18
- 6) 岩城理恵, 安野広三, 柴田舞欧, 河田 浩, 須藤信行, 細井昌子: 慢性疼痛と養育スタイル—父親の過干渉が痛みの強さ, 生活障害, および破局化に関連する. 第 41 回日本慢性疼痛学会, 東京, 2012. 2.18
- 7) 中山智恵, 河田 浩, 安野広三, 牧野聖子, 岩城理恵, 富岡光直, 有村達之, 須藤信行, 細井昌子: 幼少期の虐待歴を背景とし根深い人間不信を呈した病歴 20 年の疼痛性障害に対する段階的心身医学的治療. 第 41 回日本慢性疼痛学会, 東京, 2012. 2.18

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

I I . 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（慢性の痛み対策研究事業）
分担研究報告書

「情動的側面に着目した慢性疼痛の病態解明と診断・評価法の開発（H23-痛み-一般-001）」
慢性疼痛における情動の役割の研究

研究代表者：南 雅文（北海道大学薬学研究院 教授）

研究要旨

本研究では、慢性疼痛における情動の役割の研究の前段階として急性・持続性疼痛における情動の役割の解析を行った。痛みによる負情動生成に関与する脳領域として拡張扁桃体を構成する脳領域である分界条床核（BNST）に着目し、各種疼痛行動評価試験により、負情動が疼痛関連行動に与える影響の検討を行い、負情動生成により痛みが増悪することを示す知見を得た。今後、神経障害性疼痛などの慢性疼痛モデル動物を用いた検討を行い、慢性疼痛における情動の役割を明らかにしていく。

A. 研究目的

痛みによる不安、抑うつ、嫌悪などの負情動は、警告反応としての痛みに重要であるが、これら負情動は、QOL を著しく低下させるだけでなく、精神疾患・情動障害の引き金ともなり、また、そのような精神状態が痛みをさらに悪化させるという悪循環を生じさせ、慢性疼痛の病態において重要な役割を果たしていると考えられる。そこで本研究では、慢性疼痛モデル動物を用いた研究により、痛みの情動的側面に関与する脳部位の活性化が、痛みを与える影響とその神経機構を明らかにすることを目的とする。本年度はまずその前段階として、負情動が急性・持続性疼痛に与える影響を、拡張扁桃体領域を構成する脳領域の一つである BNST に着目して検討した。

B. 研究方法

当研究室ではこれまでに、BNST 腹側領域（vBNST）内におけるノルアドレナリン神経情

報伝達の亢進が負情動生成に重要な役割を担っていることを明らかにしており、vBNST への isoproterenol (β アドレナリン受容体アゴニスト) 局所微量投与が、不安や嫌悪を生成させることを報告してきた。本研究では、isoproterenol の vBNST 内局所微量投与による負情動惹起が各種疼痛試験における侵害受容反応に及ぼす影響を検討した。実験には雄性 Sprague-Dawley ラットを使用した。6 週齢の時点で vBNST 内局所投与のためのガイドカニューレ挿入手術を行い、少なくとも 5 日間の回復期間において、各種疼痛試験に用いた。Isoproterenol は用時 PBS に溶解し、両側 vBNST に投与した。疼痛試験として以下の行動実験を行った。

① ホルマリンテスト

痛み刺激として、0.8% ホルマリン 50 μ L を後肢足底内投与し、その 60 分後まで 5 分 (300 秒) 毎に licking (舐める)、biting (噛む)、shaking (振る)、lifting (上げる) を行った時間 (秒)

を計測し、以下の式により nociceptive score を算出した。Nociceptive score = [$\{\text{time spent with lifting}\} \times 1 + \{\text{time spent with licking, shaking or biting}\} \times 2$] (sec) / 300 (sec)。本実験では、薬物を vBNST 内局所微量投与した 3 分後にホルマリンを処置し、観察を行った。

② 酢酸ライジングテスト

痛み刺激として、1% 酢酸 1 mL を腹腔内投与し、その 60 分後まで 5 分 (300 秒) 毎に writhing (体をよじる) の回数を計測した。本実験では、薬物を vBNST 内局所微量投与した 5 分後に酢酸の処置を行った。

③ 結腸直腸拡張刺激 (CRD 刺激)

イソフルラン吸入麻酔下のラットに、直径 2 cm のポリエチレンバルーンを肛門から 6 cm (結腸直腸の位置) に挿入し、尾部にテープで固定して、末端をバロスタット装置に接続した。麻酔から回復後、バロスタット装置からバルーンに空気を送り込むことで、一定圧の CRD 刺激 (30 mmHg) を 30 分間負荷し、writhing (体をよじる) と abdominal contraction (腹壁の収縮) の回数を計測し、以下の式で nociceptive score を算出した。Nociceptive score = writhing count \times 2 + abdominal contraction。本実験では、薬物を vBNST 内局所微量投与した 5 分後に CRD 刺激を負荷した。

④ von Frey 試験

薬物の vBNST 内局所微量投与が触覚刺激に与える影響、もしくはアロディニア (異痛) の発生を惹起する可能性を検討するために、von Frey 試験を行った。実験には、0.4, 0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 15.0 g のフィラメントを使用した。2.0 g のフィラメントから測定を開始し、反応しない場合 (○) は 1 段階大きい圧のフィラメン

ト、反応した場合 (×) は 1 段階小さい圧のフィラメントを用いて測定を順次行った。測定は初めて反応が交叉した後に 4 回繰り返し行った。検定後、以下の式を用いて 50 % threshold を算出した。

$$50\% \text{ threshold} = 10^{X+k\delta} / 10000$$

X: 最後に用いたフィラメントの圧の強さ

k: ○ / × の配列によって決まる値 (参照:

Chaplan et al. Journal of Neuroscience Methods (1994) 55-63)

δ : フィラメントの偏差 (= 0.224)

本実験では、薬物を vBNST 内局所微量投与した薬物投与から 5 分後に測定を開始した。

研究の実施にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律 (動愛法)」を遵守し、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (文部科学省告示第 71 号) 及び、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議)、国立大学法人北海道大学の動物実験に関する指針に即して、北海道大学で設けられた規程に従い立案した計画を、動物実験倫理委員会の審議を経て研究機関の長の承認を得た上で動物実験に着手した。

C. 研究結果

① ホルマリンテスト

vBNST 内 isoproterenol 処置により負情動を惹起させた後に、ホルマリンを後肢足底内に投与することで、ホルマリン誘発疼痛関連行動に対する負情動の影響を検討した。第 1 相においては isoproterenol 処置の影響は見られなかったものの、局所の炎症反応による痛みと考えられる第 2 相においては、vehicle 処置群と比較して nociceptive score の上昇傾向がみられた (図 1)。

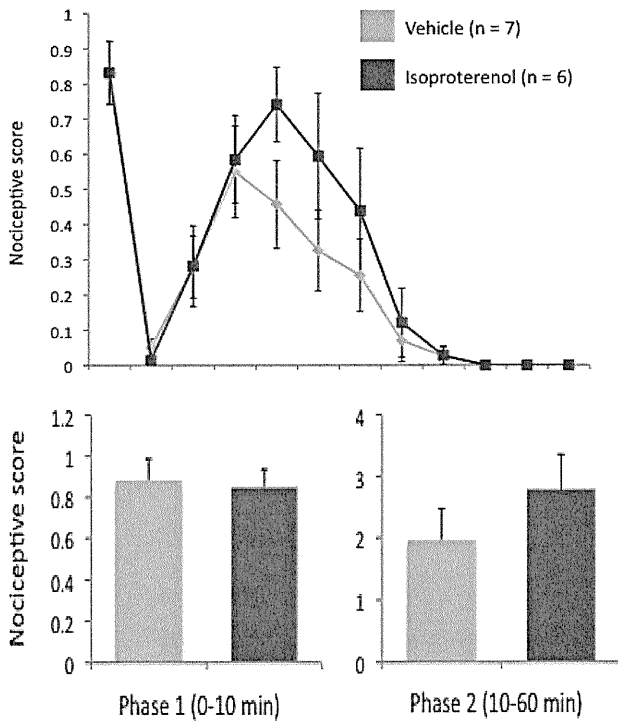


図1 ホルマリン誘発疼痛関連行動に対する負情動の影響（上：経時変化、下：累積）

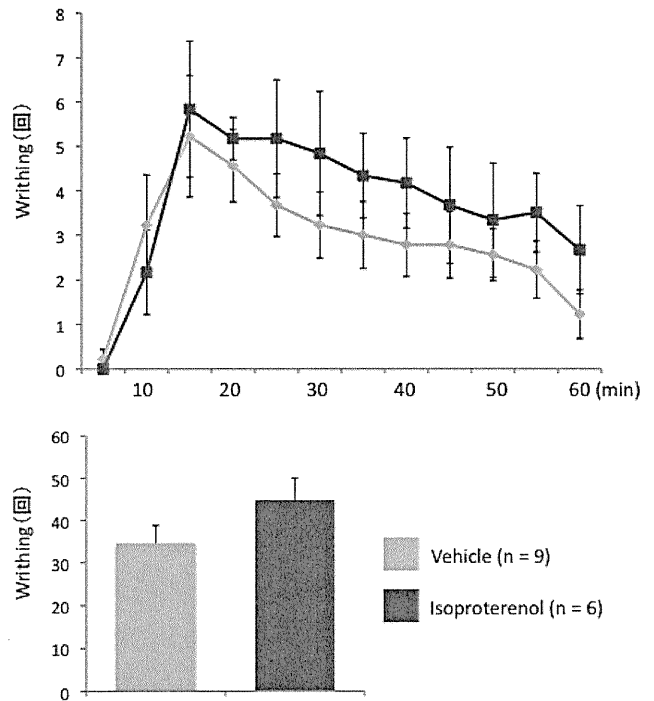


図2 酢酸誘発疼痛関連行動に対する負情動の影響（上：経時変化、下：累積）

② 酢酸ライジングテスト

vBNST内 isoproterenol 処置により負情動を惹起させた後に、酢酸を腹腔内に投与することで、酢酸誘発疼痛関連行動に対する負情動の影響を検討した。Isoproterenol 処置群においては、vehicle 群と比較して、writhing 回数の持続的な上昇傾向がみられた（図2）。

③ CRD 刺激

vBNST内 isoproterenol 処置により負情動を惹起させた後に、CRD 刺激を負荷することによって、内臓刺激誘発疼痛関連行動に対する負情動の影響を検討した。Isoproterenol 処置群においては、vehicle 群と比較して、CRD 刺激に対する疼痛関連行動の持続的な増加が見られ、負荷30分間の総 nociceptive score を比較したところ、有意な上昇がみられた（図3）。

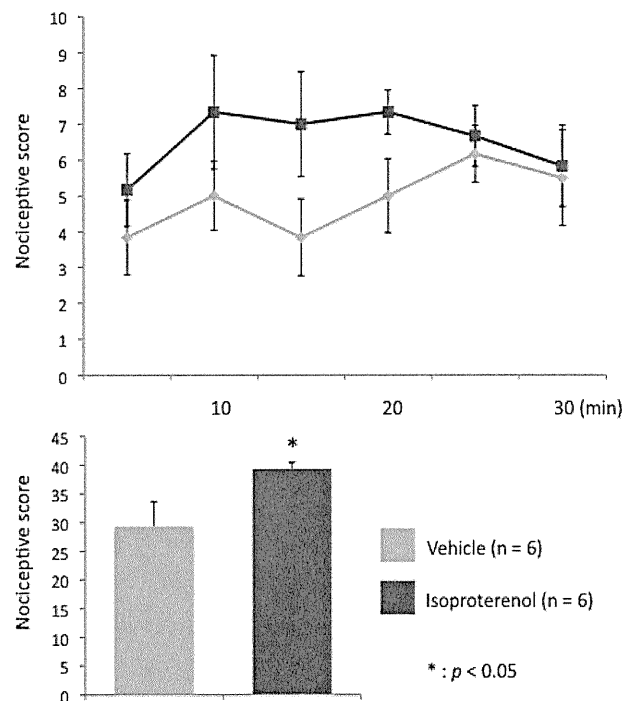


図3 内臓刺激誘発疼痛関連行動に対する負情動の影響（上：経時変化、下：累積）

④ von Frey 試験

vBNST内 isoproterenol 処置により負情動を惹起させた後に、フィラメントをラット後肢足底にあてて、逃避反応を起こす閾値を測定したところ、isoproterenol 処置群と vehicle 群の間に有意な差は見られなかった。

D. 考察

負情動の生成が疼痛閾値に与える影響とその神経機構を明らかとすることを目的とし、痛みの情動的側面に関与する脳部位である BNST を活性化させることにより負情動を生成させた後、疼痛行動の評価を行ったところ、ホルマリンテスト、酢酸ライジングテストでは疼痛関連行動の増加傾向がみられ、さらに CRD 刺激においては有意な疼痛関連行動の増加がみられた。これらの結果は、負情動が痛みの増悪を引き起こす可能性を示しており、その神経機構に BNST が重要な役割を果たしていることが考えられる。

ホルマリンテストならびに酢酸ライジングテストにおける化学的侵害刺激に対しては、疼痛関連行動の増加傾向は見られたものの有意な変化はみられなかった。一方、CRD 刺激（内臓痛）では有意な痛みの増悪がみられたことから、痛み刺激の種類や場所により情動の関与の程度が異なる可能性も考えられる。しかしながら、本研究により検討したいずれの急性・持続性疼痛についても負情動の影響は小さいものであった。来年度の研究では、神経障害性疼痛モデル動物を用い、慢性疼痛に対する負情動の影響を検討する予定である。

E. 結論

慢性疼痛における情動の役割の研究の前段階として、急性・持続性疼痛における情動の役割の解析を行った。ホルマリンおよび酢酸によ

る化学的侵害刺激に対しては、疼痛関連行動の増加傾向は見られたものの有意な変化はみられなかった。一方、CRD 刺激（内臓痛）では有意な痛みの増悪がみられた。程度は大きくないものの、急性・持続性疼痛が負情動により増悪することが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（慢性の痛み対策研究事業）
分担研究報告書

「情動的側面に着目した慢性疼痛の病態解明と診断・評価法の開発（H23-痛み-一般-001）」

慢性疼痛マーカーとなる情動関連分子の探索

研究分担者：井上 和秀（九州大学薬学研究院 教授）

研究代表者：南 雅文（北海道大学薬学研究院 教授）

研究要旨

本研究では、痛みによる負情動生成に関与する脳領域として分界条床核（BNST）に着目し、神経障害性疼痛モデル動物を用いた研究により、慢性疼痛により発現変化する情動関連情報伝達分子の探索を行った。Gene chip assayの結果、背外側BNSTで20遺伝子、腹側BNSTで19遺伝子を、慢性疼痛マーカー候補の機能分子群として見出し、その一部に関し定量的RT-PCR解析によって遺伝子発現変動の確認を行った。今後、他の脳領域に関しても解析を行い、候補分子の絞り込みを行うことで、慢性疼痛評価法に役立つ分子マーカーを同定できると考えられる。

A. 研究目的

痛みによる不安、抑うつ、嫌悪などの負情動は、警告反応としての痛みに重要であるが、これら負情動は、QOLを著しく低下させるだけでなく、精神疾患・情動障害の引き金ともなり、また、そのような精神状態が痛みをさらに悪化させるという悪循環を生じさせ、慢性疼痛の病態において重要な役割を果たしていると考えられる。そこで本研究では、神経障害性疼痛モデル動物を用いた研究により、慢性疼痛により発現変化する情動関連情報伝達分子を探索し、慢性疼痛治療のための創薬標的およびPETなどによる慢性疼痛評価法の開発に役立つ分子マーカーを同定することを目的とする。

B. 研究方法

慢性疼痛では、情動機能に関与する神経機構の可塑的变化により、不安、嫌悪、抑うつなどの負情動をより強く感じるようになり、そのような精神的変容が痛みをより強く感じさせる

悪循環を引き起こしていると考えられる。本研究では、痛みによる負情動生成に関与する脳領域に着目し、神経障害性疼痛モデル動物で発現変化する遺伝子群をDNAチップアッセイによる網羅的解析により探索し、定量的RT-PCRにより発現変化を確認する。初年度は拡張扁桃体に着目して研究を行った。

実験には、雄性Wistar系ラットを用いた。9週齢の時点で第5腰髄脊髄神経を結紮し、その末梢側を切断することで神経障害性疼痛モデルを作製した（Chung model）。28日後にvon Frey testを行い、機械的痛覚過敏が生じている個体を遺伝子解析の実験に用いた。また、対照群として、sham手術を施したラットを用いた。ネブタール麻酔下のラットより全脳を摘出し、ビブラトームを用いて450 μm厚の冠状スライスを作製した。拡張扁桃体領域を構成する脳領域の一つである分界条床核（BNST）を含む連続した2枚のスライスから、左右の背外側領域（dlBNST）と腹側領域（vBNST）を、冷

PBS 中でパンチアウト（直径 1 mm）した。作製したサンプルは、一晚 4 °C で RNAlater を浸透させた後、-80°C で保存した。

RNA サンプルの調整は、3 個体の脳サンプルを 1 サンプルとしてまとめ、TRIzol ならびに RNeasy mini kit を用いて total RNA 抽出・精製した。サンプルの一部は定量的 RT-PCR 解析に用い、残りは、逆転写反応により 1 本鎖 cDNA を作製、さらに、2 本鎖 cDNA を合成した後、直鎖増幅による aRNA (amplified RNA) 合成に用いた。精製後、標識・断片化を行い Gene Chip assay に用いた。

Gene Chip assay は Affymetrix 社の GeneChip Rat Genome 230 2.0 array を用いて行い、解析ソフト GeneChip Operating Software (GCOS) により解析した。Ingenuity 社のパスウェイ解析ソフト IPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用いて、神経障害性疼痛モデルと sham 群に関し、31,099 遺伝子に関して発現変化を比較し、signal ratio を算出し、解析した。

定量的 RT-PCR 解析では、total RNA より逆転写反応により得た cDNA 溶液を用いた。PCR 反応および DNA 増幅の検出は、Mx 3005P (STRATAGENE 社) を用いた。PCR 反応時間は、95°C、10 秒で熱変性を行い、それ以降 95°C で 5 秒、60°C で 30 秒の反応を 40 サイクル行った。反応終了後、指数関数的に DNA の増幅が起こっている領域で任意に Ct 値を定め、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いてサンプルの cDNA 相対値を算出した。内標準には β -actin を用いた。なお各遺伝子のプライマーの特異性は PCR 反応後の増幅産物を電気泳動し、予測分子量の位置にバンドを観察することで確かめた。

In vivo マイクロダイアリシス法では、ラットにペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) 麻酔下、マイクロダイアリシス用ガイドカニューレをその先端が dIBNST の 1.0 mm 上方に留ま

るように固定した。術後 1~2 日後、マイクロダイアリシス用透析プローブを挿入し、0.15%BSA 含有リンゲル液を流速 1.0 μ l/min で灌流した。なお、灌流路にはフリームービングチューブおよび可動式アームに装着したシールを用い、実験中、ラットが自由にチャンバー内を行動できる状態で行った。透析液は 15 分毎に回収し、透析液中 CRF 含量を enzyme immunoassay kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc.) を用いて定量した。実験終了後、マイクロダイアリシス用透析プローブ刺入部位を確認し、dIBNST 内への刺入が確認された個体のみデータ解析に用いた。

dIBNST 内薬物投与には、事前にガイドカニューレ埋込手術を行ったラットを用いた。ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) 麻酔下、dIBNST 内薬物投与用 25G ガイドカニューレを両側に挿入し、歯科用セメントにて固定した。ガイドカニューレ挿入位置は dIBNST の 1.5 mm 上方 (bregma より AP; -0.3 mm, L; \pm 1.6 mm, DV; -5.0 mm) とした。ラットは手術後 5 日目以降に実験に使用した。dIBNST 内薬物投与は、侵害刺激を与える 10 分前に 33G インジェクションカニューレをガイドカニューレに刺入し、マイクロインジェクションポンプを用いて、頭蓋表面から深さ 6.5 mm の位置に 0.5 μ l の容量を流速 0.5 μ l/min で投与した。実験終了後、投与部位の確認を行い、両側 dIBNST 内への薬物投与が確認された個体のみデータ解析に用いた。

痛みにより惹起される不快情動を行動薬理学的試験法により評価するために、条件付け場所嫌悪性試験 (CPA test) を用いた。CPA test には、大きさの等しい 2 つのボックス（一方が白く床面に凹凸のあるボックス、もう一方が黒く床面が滑らかなボックス）からなるシャトルボックスを使用した。侵害刺激により条件付けを行う CPA test は、4 日間の実験プロトコールで

行った (図 1)。1 日目 (habituation session) および 2 日目 (preconditioning session) は、ラットを 15 分間 (900 秒間) 装置内で自由に行動させ、各ボックスにおける滞在時間を計測し、2 日目により長く滞在したボックスを pain-paired compartment とした。3 日目 (conditioning session) は、ボックス間の移動が出来ない状態にし、まず control 刺激として saline 100 μ l を左後肢足底内 (i.p.l.) 投与し、直ちに pain-paired compartment と反対側のボックスに 60 分間閉じ込めた。約 4 時間後、vehicle あるいは薬物を dIBNST 内投与し、dIBNST 内投与の 10 分後に、侵害刺激として 2% ホルマリン 100 μ l を右後肢足底内投与し、直ちに pain-paired compartment に 60 分間閉じ込めた。4 日目 (test session) は再びラットを 15 分間装置内で自由に行動させ、各ボックスにおける滞在時間を計測した。2 日目の pain-paired compartment 滞在時間から 4 日目の pain-paired compartment 滞在時間を引いた値を CPA score と定義し、この値が正に大きいほど痛みによる不快情動が強く惹起されたものとして評価した。

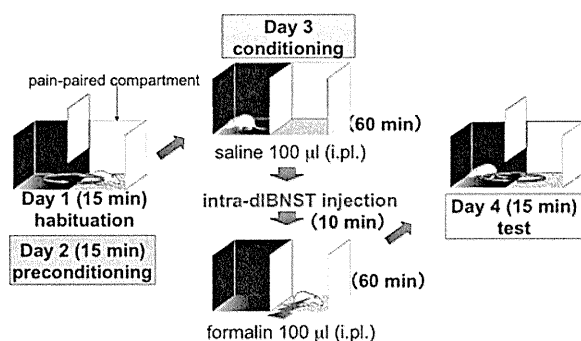


図 1 条件付け場所嫌悪性試験 (1) 侵害刺激による条件付けの実験手順。

侵害刺激の代わりに、dIBNST 内薬物投与により条件付けを行う CPA test は、6 日間の実験プロトコルで行った (図 2)。1, 2 日目は同様であるが、test session を 6 日目とし、3 日目から 5 日目を conditioning session とした。2 日目

により長く滞在したボックスを drug-paired compartment とした。Conditioning session では、ラットを group 1 と 2 の 2 つのグループに分けた。午前のセッションでは、group 1 のラットには dIBNST 内薬物投与を行い投与直後から 30 分間 drug-paired compartment に閉じ込めた。一方、group 2 のラットには何も処置を施さずに 30 分間 drug-paired compartment とは反対側のボックスに閉じ込めた。4 時間後、午後のセッションでは、group 1 のラットは無処置で drug-paired compartment とは反対側のボックスに 30 分間閉じ込め、group 2 のラットには dIBNST 内薬物投与を行い 30 分間 drug-paired compartment に閉じ込めた。group 1, 2 ともに同様の条件付けを 3 日間繰り返した。

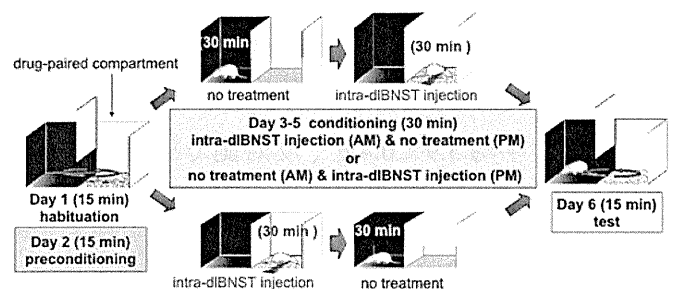


図 2 条件付け場所嫌悪性試験 (2) dIBNST 内薬物投与による条件付けの実験手順。

ホルマリンテストでは、アクリル製の透明な観察筒 (直径 30 cm、高さ 30 cm) にラットを入れ、30 分以上環境に馴化させた後、2% ホルマリン 100 μ l を右後肢足底内に投与し、速やかに観察筒に戻した。ラットが lifting、licking、biting、shaking を行った秒数を 5 分毎 (300 秒毎) に 60 分間計測し、以下の式により、Nociceptive score を算出した。

$$\text{Nociceptive score} = \{[\text{time (sec) spent with lifting}] \times 1 + [\text{time (sec) spent with licking, biting or shaking}] \times 2\} / 300 \text{ (sec)}$$

研究の実施にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律（動愛法）」を遵守し、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省告示第 71 号）及び、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議）、国立大学法人九州大学の動物実験に関する指針に即して、九州大学で設けられた規程に従い立案した計画を動物実験倫理委員会の審議を経て研究機関の長の承認を得た上で動物実験に着手した。

C. 研究結果

1. 神経障害性疼痛モデルの作製

10 匹のラットに対し脊髄神経部分切結紮を行い、術後 28 日目に von Frey test で機械的痛覚過敏形成の検討を行い、痛覚過敏の程度が高い上位 6 個体を遺伝子解析に用いた。用いた 6 個体の von Frey test における 50%反応閾値は結紮側で平均 3.9 ± 0.4 g、反対側で平均 10.3 ± 1.7 g であった。

2. Gene chip assay

慢性疼痛マーカー分子として可能性のある遺伝子が極力漏れないようにフィルタリングを行うこととした。Gene chip assay により得られたデータは、GCOS により、以下の手順でデータのフィルタリングを行った。

- ① 神経障害性疼痛モデル群と sham 術群との 1 対 1 対応で比較し $N=4$ （神経障害性疼痛モデル 2 群 × sham 術 2 群の組合せ）のうち半数以上で『I (Increase)』あるいは『D (Decrease)』と判定された遺伝子を抽出した。
- ② ①について、さらに 4 組のうち少なくとも 3 組で発現変動を示した遺伝子を抽出した。
- ③ ②について、発現変動の方向（増減の向き）

が 3 組以上で一致しており、かつモデル群もしくは sham 術群のいずれか一方が一定量の発現を示していたものを抽出した。

Gene chip assay 上の 31,099 遺伝子のうちで、まず①のフィルタリング後、IPA によりパスウェイ解析を行った。IPA のアルゴリズムにより既知のパスウェイのうち、dlBNST では、cAMP-mediated signaling（添付資料 1）、Synaptic Long Term Potentiation（添付資料 2）、Corticotropin Releasing Hormone Signaling（添付資料 3）、GABA Receptor Signaling（添付資料 4）、Glutamate Receptor Signaling（添付資料 5）などが、また vBNST においては、cAMP-mediated signaling（添付資料 6）、G-Protein Coupled Receptor Signaling（添付資料 7）、Synaptic Long Term Potentiation（添付資料 8）、Glutamate Receptor Signaling（添付資料 9）などが、有意に相関があると判定された。（添付資料 1 - 9 では、赤色が神経障害性疼痛モデル群で発現量増加、緑色が減少を示している。）

次に、フィルタリング②を行ったところ、dlBNST で 72 遺伝子、vBNST で 33 遺伝子が抽出された。さらに、フィルタリング③を行うことで、dlBNST で 20 遺伝子（添付資料 10）、vBNST で 19 遺伝子（添付資料 11）を、慢性疼痛マーカー候補の遺伝子群として抽出した。

3. 定量的 RT-PCR

まず、Gene chip assay において dlBNST で発現変動が見られた遺伝子のうち、ガラニンプレプロペプチド（GAL）、GABA_A 受容体 $\gamma 1$ サブユニット（GABRG1）、グルタミン酸脱炭酸酵素 2（GAD2）、ならびに vBNST において発現変動が見られた遺伝子のうち、カルシトニン受容体（CALCR）、プレプロノシセプチン（PNO）に関して、定量的 RT-PCR により発現量変化を

検討した (図 3)。Gene chip assay の結果と同様に、神経障害性疼痛モデル群において sham 群と比較して GAL、GAD2、ならびに PNOG 遺伝子の発現量増加と CALCR 遺伝子の発現量減少が確認された。一方、GABRG1 遺伝子は発現量の変化は確認されなかった。

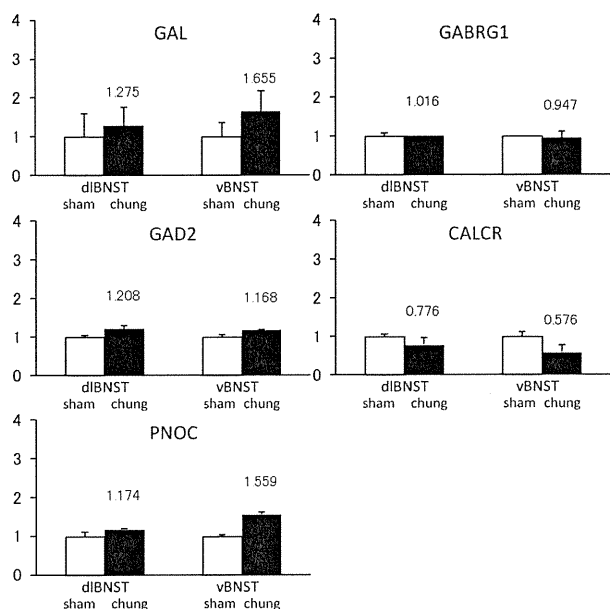


図 3 定量的 RT-PCR 解析結果 (1)

Gene chip assay により有意に変動があった 5 つの遺伝子に関して発現量変化を解析した。

次に、パスウェイ解析において cAMP-mediated signaling や Corticotropin Releasing Hormone Signaling の関与が指摘されていることから、不安や抑うつ、嫌悪に関与することが報告されている G タンパク質共役型受容体およびそのリガンドに着目し、セロトニン受容体 (5-HT1A,2A,2C,7)、アドレナリン受容体 (β 1,2)、コルチコトロピン放出因子受容体 (CRF1R,2R)、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド受容体 (PAC1R) およびそのリガンドペプチド (PACAP) に関して、定量的 RT-PCR により発現量変化を検討した (図 4)。神経障害性疼痛モデル群において sham 群と比較して、dIBNST では 5-HT1A,2A,2C,7、および

CRF1R、dIBNST と vBNST 両部位で CRF 2R、PAC1R、PACAP 遺伝子において、Gene chip assay では検出されなかった発現量増加が確認された。

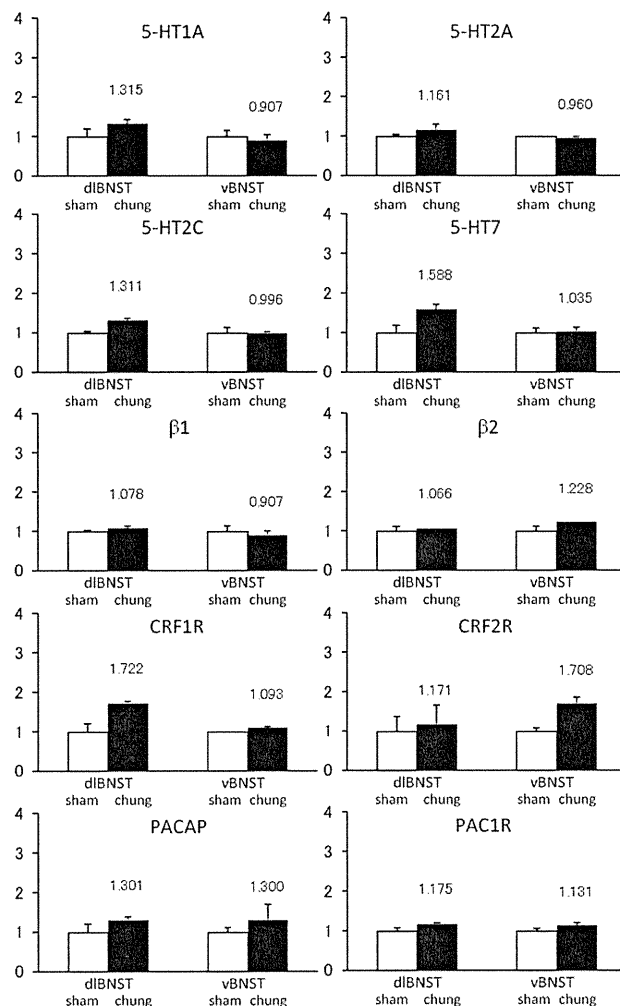


図 4 定量的 RT-PCR 解析結果 (2)

不安や抑うつ、嫌悪との関連が知られる 10 遺伝子に関して発現量変化を解析した。

4. *In vivo* マイクロダイアリス

Gene chip assay におけるパスウェイ解析、ならびに定量的 RT-PCR 解析の結果より、慢性疼痛下では dIBNST 内において、CRF 神経情報伝達系に変化が生じていることが示唆された。そこで、ラットにホルマリン後肢足底内投与を行うことによる侵害刺激が、dIBNST 内 CRF 遊離