

脊髄障害性疼痛症候群の実態の把握と病態の解明に関する研究

研究分担者 戸山 芳昭 慶應義塾大学整形外科 教授  
研究分担者 中村 雅也 慶應義塾大学整形外科 講師

研究要旨

脊髄髄内腫瘍術後患者に対するアンケート調査（NPSI と SF-36）を施行し、脊髄障害性疼痛の発生頻度、腫瘍の種類別の NPSI score の比較、NPSI score と術後 JOA スコアとの相関を検討した。脊髄髄内腫瘍の術後に生じる neuropathic pain により患者の QOL は低下しており、その病態は腫瘍の局在や組織像、麻痺の程度、疼痛の分布（at-level / below-level）により異なる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、脊髄髄内腫瘍の手術成績は画像診断技術・顕微鏡視下手技の向上、術中モニタリングの導入により飛躍的に向上してきた。しかし、脊髄髄内腫瘍の手術後は神経脱落症状のみならず、異常知覚やしびれを伴った神経障害性疼痛により患者の日常生活動作は著しく障害されることをしばしば経験する。しかし過去の報告では、脊髄損傷や脊髄空洞症に伴う疼痛に関する報告は散見されるが、髄内腫瘍術後の neuropathic pain を詳細に検討した報告はほとんどないため、その実態や特徴、患者の身体面や精神面に与える影響は不明であった。そこで本研究の目的は、当院で手術治療を施行した脊髄髄内腫瘍患者に対するアンケート調査を行い、脊髄髄内腫瘍術後の脊髄障害性疼痛の実態と特徴を明らかにすることである。

B. 研究方法

2000～2008 年に慶應義塾大学病院で手術を行った脊髄髄内腫瘍のうち死亡例を除く 105 例（男性 79 例、女性 26 例）にアンケート調査を施行した。アンケートの回収率は 81%（105 例中 85 例）で、これらの腫瘍の内訳は上衣腫 43 例、星細胞腫 17 例、血管系腫瘍 21 例（血管芽細胞腫 13 例、海綿状血管腫 8 例）、その他 4 例（神経鞘腫 2 例、脂肪腫・線維腫各 1 例）で

あった。術式は、全摘 73 例、亜全摘 6 例、部分摘出（脂肪腫・線維腫）、生検、脊髄離断（いずれも星細胞腫）が各 2 例であった。術後経過観察期間は 1～11 年（平均 5.4 年）であった。Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI) と SF-36 を送付した。NPSI score は自発痛（皮膚表面）、自発痛（深部組織）、発作痛、誘発痛、異常感覚の subscore 各 10 点の合計 50 点で評価した。また、神経症状の評価は JOA score for cervical/thoracic myelopathy (full score: 17/11) を用いた。術後 central neuropathic pain の発生頻度と局在を調べ、性別、手術時年齢、腫瘍の種類が NPSI score に及ぼす影響、さらに NPSI score と術後 JOA スコア、SF-36 との相関を検討した。

また、最も症例数の多かった上衣腫 43 例に対して、術後疼痛発生の危険因子の解析を行った。検討項目は、年齢、性別、腫瘍高位、術前の痛み、麻酔方法、手術時間、術前後の JOA の変化、術中の血糖の最低値、最高値、術中の血圧低下、術中の PaO<sub>2</sub> および PaCO<sub>2</sub> の最低値、最高値、周術期のグルココルチコイドおよび NSAIDs の投与、術中のグリセオール投与、術後人工呼吸管理である。

データは平均値±SEM で記載した。NSCI の subscore 間の比較と NSCI score と subscore の腫瘍間での比較検討は one-way ANOVA Dunn's

test を用いて行った。NSCI score と JOA score との相関および SF-36 下位尺度 score と NSCI score の相関は non-parametric spearman test で検討した。SF-36 の下位尺度 score は one-sample mean comparison test versus a fixed value of 50 を用いて検討した。P<0.05 を統計学的な有意水準とした。

## C. 研究結果

### 1) 髄内腫瘍術後患者の central neuropathic pain

脊髄髄内腫瘍患者の術後 NPSI score は平均 13.5 点で、その分布は二峰性を示した。NPSI score が 10 点未満の軽度群は 87 人中 39 人 (44%) に対して、NPSI score が 10 点以上の中等一重度群は 48 人 (56%) と過半数を占めていた。NPSI score と手術時年齢に有意な相関はみられなかった。また、男女間での NPSI score も統計学的に有意差は認めなかった。

髄内腫瘍術後の NPSI score の詳細をサブスコアでみると、自発痛 (皮膚表面) が 2.5 点、自発痛 (深部組織) が 2.9 点、発作が 2.0 点、誘発痛が 2.1 点、異常感覚が 4.0 点で、異常感覚が他のサブスコアと比較して有意に高かった (one-way ANOVA Dunn's test)。異常感覚以外のサブスコア間には統計学的有意差はみられなかった。

### 2) 髄内腫瘍術後患者における NPSI score と JOA スコアの相関

Central neuropathic pain と術後神経症状との関連をみるために、NPSI score と JOA score を頸髄と胸髄に分けて検討した。頸髄髄内腫瘍では両者に相関はみられなかった。頸髄髄内腫瘍で相関がみられなかった要因として、麻痺が軽度で強い疼痛を訴えた患者の存在が考えられる。これら 8 例は疼痛を腫瘍高位 (at-level) に訴えており、全例が hemangioblastoma であった。一方、胸髄髄内腫瘍では NPSI score と JOA score 間に弱い負の相関がみられた ( $r=-0.415$ , spearman test  $p=0.048$ )。しかし、これらの相関から外れる軽度な神経脱落症状にもかかわらず強い疼痛を訴えた 3 例も hemangioblastoma で疼痛を腫瘍高位 (at-level)

に訴えていた。頸髄の 8 例とあわせると、at-level の疼痛を訴えた 11 例はいずれも脊髄後角部に存在した血管系腫瘍 (血管芽細胞腫) であったことは非常に興味深い。NPSI score が 10 点以上の症例における疼痛の分布は、頸髄髄内腫瘍術後では、at-level, below-level, both がほぼ同程度であったのに対して、胸髄髄内腫瘍では below-level が 7 割を占めていた。

### 3) 髄内腫瘍の種類別の NPSI score の比較

脊髄障害性疼痛を髄内腫瘍の種類別に検討すると、上衣腫が 14.1 点、星細胞腫が 14.2 点、血管系腫瘍が 14.0 点、その他が 3.0 点で、その他の腫瘍が他の腫瘍と比較して有意に低かった (one-way ANOVA Dunn's test)。残りの 3 群間で NPSI score の有意差はみられなかった。しかし、疼痛サブスコアを腫瘍別に比較すると、自発痛 (皮膚表面) は星細胞腫が、発作痛は血管系腫瘍が他の腫瘍よりも統計学的に有意に高かった。他のサブスコアでは 4 群間に有意差はみられなかった。

### 4) 上衣腫における術後疼痛の危険因子の検討

因子毎の解析で有意差の認められたものは、術前の痛み、術後のグルココルチコイドの投与であった。ペインスコアの平均は、術前の痛みがあった群 (N=22) で 28.8、なかった群で (N=21) で 14.9 であった。術中のグルココルチコイドは危険因子とは認められなかったことから、投与時期が関与している可能性が疑われた。このため、投与時期を術後 12 時間までと 12 時間以後で分けて解析したところ、12 時間までは有意差が認められなかったが、12 時間以後は有意差が認められた。ペインスコアの平均は、12 時間以後に投与した群 (N=13) で 31.5、12 時間以後には投与がなかった群 (N=29) で 17.0 であった。これら 2 因子について重回帰分析を行ったところ、ペインスコア =  $5.625 + 9.972 \times$  術前の痛みの有無 (有り = 1, 無し = 0) +  $11.342 \times$  術後 12 時間以後のグルココルチコイド投与の有無 (有り = 1, 無し = 0) であった。R = 0.682、R<sup>2</sup> = 0.437、調整済み決定係数 = 0.407 であった。上衣腫 43 名のうち、明らかに at level の痛みがある症例 20 例に限って解析を行ったところ、

ペインスコア $=9.720+13.532\times$ 術前の痛みの有無(有り $=1$ , 無し $=0$ ) $+7.990\times$ 術後12時間以後のグルココルチコイド投与の有無(有り $=1$ , 無し $=0$ )であった。 $R=0.782$ ,  $R^2=0.612$ , 調整済み決定係数 $=0.566$ であった。

#### 5) 髄内腫瘍術後のSF-36とNPSI scoreの相関

髄内腫瘍の術後患者のSF-36の下位尺度スコアは、国民標準値である50点と比較して、いずれも有意に低下していた。特に日常役割機能は身体的と精神的いずれも顕著に低下していた。さらに、各下位尺度スコアとNPSI scoreとの相関を調べると、全ての下位尺度スコアにおいてNPSI scoreと有意な負の相関を認めた(spearman test,  $p<0.05$ )。

### D. 考察

#### 1) 脊髄髄内腫瘍術後の脊髄障害性疼痛の特徴

Central neuropathic pain of spinal cord (脊髄障害性疼痛)に関する過去の報告は脊髄損傷、脊髄空洞症に関するものが多く、脊髄髄内腫瘍に関する報告は極めて少ない。髄内腫瘍摘出術後のdysesthesiasの発生頻度は約50-70%と報告されているが、これらを詳細に検討した報告はほとんどない。

今回の検討より、脊髄髄内腫瘍術後患者のNPSI scoreは平均13.5点(50点満点)で、二峰性の分布を示し、約60%の患者に中等度以上(NPSI score $>10$ )のcentral neuropathic painをがみられた。当初われわれは、髄内腫瘍術後に生じるcentral neuropathic painの原因は、腫瘍摘出操作に伴う脊髄への侵襲と考えていたので、1)術後の神経障害の重症度とcentral neuropathic painに相関がある、2)腫瘍の組織学的違いにより術後のcentral neuropathic painは差があるとの仮説を立てていた。しかし頸髄発生例ではJOA scoreとNPSI scoreの相関は全くみられず、胸髄発生例でも弱い相関しかなかった。その要因として、1)麻痺は軽度で疼痛が強い症例、2)麻痺は重度で疼痛が弱い症例の存在が考えられる。興味深い点は、1)の症例が全例血管芽細胞腫で脊髄後角部に存在したことである。血管芽細胞腫は高頻度に脊

髄空洞症を伴うことはよく知られている。自験例でも全例に空洞症を伴っていた。過去の報告でも脊髄空洞症における疼痛発生メカニズムには脊髄後角の関与が示されており、今回の我々の結果からも、血管芽細胞腫の術後neuropathic painはat-levelにみられ、腫瘍の発生部位が後角であったことから、腫瘍そのものによる後角の障害に加えて手術操作により、後角部障害に起因する疼痛が発生したものと考えている。その結果、運動麻痺を含む神経障害は軽度であるにもかかわらず、at-levelに強い疼痛が生じたものと考えられる。

一方、麻痺が重症であるにもかかわらず術後neuropathic painが軽度の症例の特徴は、7例中6例が上衣腫で術前より高度な麻痺が存在し、術後麻痺の増悪がみられなかった点であるが、術後に麻痺が悪化した症例と比較して、術前より麻痺が強い症例では術後疼痛が出現しにくい可能性が考えられるが、その要因は不明でありさらなる検討が必要である。また興味深い所見は、高悪性度星細胞腫に対して胸髄高位での脊髄離断術を施行した3例で、術後NPSI scoreが広くばらついた点である。1例は全く疼痛がなく、残る2例はbelow-levelとat-levelに各々疼痛を訴えていた。これら3例はいずれも脊髄視床路を含む脊髄は完全に切断されているにもかかわらず、疼痛にばらつきがあったことから、完全に切断された脊髄視床路は必ずしも術後neuropathic painの出現に必須とは言えない可能性がある。しかし、これらの症例を除外すると、1)術後JOA scoreとNPSI scoreに相関がみられたこと、2)central neuropathic painはbelow-levelとboth(at-level and below-level)であったことを考慮すると、術後に不全麻痺を呈する場合には術後の神経症状の悪化は術後neuropathic painの出現の指標となりうる可能性があり、脊髄視床路のdysfunction(decreased or increased function)の関与が考えられる。

#### 2) 上衣腫の術後慢性疼痛の危険因子

上衣腫の術後慢性疼痛の危険因子として、術期では術前の痛み、術後12時間以後に投与したステロイドが関与していることが明らか

となった。一般に、術前の痛みが術後遷延性疼痛の危険因子となることはよく知られている。また、脊髄損傷動物モデルでも、予め神経刺激を与えておくと、脊損後の疼痛が増悪することが報告されている。Lipopolysaccharide の腹腔内投与によって誘発される機械的アロディニアについて調べた別の動物実験では、開腹操作が先行する群では、しない群に比べて、閾値が低下している。このように、疼痛刺激が複数回与えられることによって、後の刺激による疼痛が増強あるいは遷延することが、共通して認められている。発症機序に、共通のものがあるかどうかを含めて詳細は明らかではないが、今後、慢性疼痛の原因を明らかにしていく上で、手がかりとなり得る。

術中・術後のステロイド投与は、脊髄に対する手術侵襲に伴う麻痺の改善を期待して、広く使用されている。今回使用した症例も全て術直後の麻痺が強かった症例に使用しており、今回の術後疼痛は手術手技により術直後に麻痺が強かった、つまり脊髄に対する侵襲が関与する可能性が考えられる。

一方、ステロイドは神経障害性疼痛そのものに対する治療薬としても使用されており、ステロイド投与が疼痛を悪化させたとの報告はほとんどない。しかし、硬膜外血腫による脊髄圧迫症例で、メチルプレドニゾロンの大量投与が疼痛を悪化させた可能性があるという一例報告では、発症の 16 時間後に投与しており、今回の結果と矛盾がない。一方、動物モデルでは、ステロイドの投与が神経障害性疼痛を悪化させるという報告が多数あり、人での使用に対して警告を発している。今回の研究結果では、どのような場合にステロイドの投与が神経障害性疼痛を悪化させるのか特定ができていないが、脊髄損傷や脊髄障害性疼痛に対して、ステロイドを投与する場合には、十分な注意を以て行うことが必要である。

### 3) 髄内腫瘍術後疼痛が患者 QOL に与える影響

髄内腫瘍の治療成績はこれまで、主に術後の神経脱落症状や生命予後で評価されてきたため、術後 neuropathic pain を定量的に検討し、さらに患者 QOL との相関を調べた報告はない

ため、髄内腫瘍の術後患者の疼痛の病態や QOL にどの程度の影響があるのかに関する情報は皆無と言える。今回の SF-36 によるアンケート調査により、脊髄髄内腫瘍術後患者の各下位尺度スコアは、国民平均値 50 点より全ての項目において統計学的に有意に低下していた。当然、髄内腫瘍患者では術後に残存する神経障害がこれらスコアの低下の主要因と考えられる。しかし、重要な点は全ての下位尺度スコアと NPSI score の間に有意な負の相関がみられたことであり、術後に残存する neuropathic pain が患者の QOL に影響を与えていることが明らかになった。

## E. 結論

今回の検討から、脊髄髄内腫瘍の術後に生じる neuropathic pain の病態は、腫瘍の局在や種類、麻痺の程度、疼痛の分布 (at-level / below-level) により異なる可能性が示唆された。血管芽細胞腫以外で術後不全麻痺を呈し、below-level に疼痛が生じた場合は、脊髄視床路の関与が考えられる。上衣腫の術後疼痛の危険因子として術前の痛みと、術後 12 時間以後に投与したステロイドの二つの因子の関与が示唆された。一方、血管芽細胞腫では術後高頻度に at-level に疼痛を生じる可能性が高く、後角の関与が考えられる。しかし、完全麻痺の場合に生じる below-level の疼痛に関してはその発生メカニズムは不明である。今後、functional MRI 等を用いたさらなる詳細な検討が必要である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

特になし

### 2. 学会発表

- 1) 中村雅也, 辻収彦, 藤吉兼浩, 渡辺航太, 辻崇, 石井賢, 松本守雄, 戸山芳昭, 千葉一: 脊髄髄内腫瘍術後の脊髄障害性疼痛の評価 (第 1 報) 第 39 回日本脊椎脊髄病学会 2010, 4 高知

2) 中村雅也, 辻収彦, 藤吉兼浩, 細金直文渡  
 辺航太, 辻崇, 石井賢, 戸山芳昭, 千葉一,  
 松本守雄: 脊髄内腫瘍術後の脊髄障害性疼  
 痛の評価 (第 2 報) 第 40 回日本脊椎脊髄病  
 学会 2011, 4 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況  
 なし

脊髄障害性疼痛症候群の実態の把握と病態の解明に関する研究  
腰下肢痛における神経障害性疼痛の実態の把握と病態の解明に関する研究

研究分担者 山下 敏彦 札幌医科大学 教授

研究協力者 竹林 庸雄 札幌医科大学 講師

### 研究要旨

初年度は、脊髄後角における中枢感作が原因と考えられる神経障害性下肢痛例に対して、Ca拮抗剤をくも膜下投与し鎮痛効果を検討した。VASによる自己評価では有意な改善を認め、鎮痛機序にはNMDA-NO産生系の抑制の可能性を示した。

次年度より、腰部脊柱管狭窄症(以下LSS)による下肢痛に対して疫学調査を行った。多施設コホート研究における初回調査においてLSSにおける神経障害性疼痛の頻度を検討し、LSSの重症度・病態を明らかにすることを目的とした。総計249例で解析を行い、pain DETECTによる調査では神経障害性疼痛の要素を含む13点以上は38.1%、神経障害性疼痛の要素が病態のほとんどを占める19点以上が13.8%であった。

## 1. 脊髄障害による神経障害性疼痛の検討

### A. 研究目的

神経障害性疼痛は動物モデルによる基礎的研究が盛んに行われており、臨床的にも手術を含めた多くの治療法が報告されている。これらは、末梢神経障害に起因した疼痛であるが、疼痛が遷延化すると脊髄レベルで可塑的変化が起こり、脊髄障害性疼痛となる可能性がある。脊髄障害性疼痛は難治性であり、各種の薬剤による疼痛コントロールが行われているが、未だ決定的な薬剤は存在していない。今回脊髄後角におけるNMDA recaptor-NO系の活性化による中枢性感作に着目し、本機序を抑制することで臨床的に慢性疼痛治療に応用可能ではと考えた。

活性化には脊髄2次ニューロンの細胞内へのCaイオン流入が関与しているため、Ca拮抗剤をくも膜下投与し、その鎮痛効果を検討した。

### B. 研究方法

症例は理学所見に乏しいにも関わらず3ヵ月以上の保存治療に抵抗もしくは術後遺残する慢性腰下肢痛症例で、治療への参加同意を得られた30症例を対象とした。男性16例、女性14

例、治療開始時平均年齢59.1歳(27~79歳)であった。これらの症例に対してL-type Ca channel拮抗剤である塩酸nicardipineをくも膜下腔投与した。投与は週1回で4週間行われた。くも膜下腔投与時に髄液の採取を行い、髄液中の硝酸イオン濃度、IL-8濃度の計測も同時に行った。

検討項目は、Visual analog scale (VAS)による疼痛自己評価、投与前、投与後4週、12週における髄液中硝酸イオン濃度とIL-8濃度である。硝酸イオンはNOの代謝産物であり、NO値を反映する指標として用いた。IL-8は炎症を反映する指標として用いた。以上の項目について対照となった30例を無作為交互にnicardipine投与群と対処群に振り分けた。

### C. 研究結果

VASを用いた疼痛自己評価では対照群において投与前9.5、4週後7.6、12週後8.0、最終観察時には8.6であり、経過中ほぼ不変であった。一方、nicardipine投与群では同様に9.3、4.8、4.5、4.4と疼痛点数の改善を認めた。nicardipine投与群における改善率は4週、12週、最終観察時においてそれぞれ48.4%、

51.2%、52.7%であった。対照群の4週、12週、最終観察時のVASとnicardipine投与群のVASでは統計学的有意差を認めた。対照群の髄液中の硝酸イオン濃度は投与前 $30.4\mu\text{M}/\ell$ 、4週後 $28\mu\text{M}/\ell$ 、12週後 $32.0\mu\text{M}/\ell$ で経過中ほぼ不変であった。一方、nicardipine投与群では投与前 $26.4\mu\text{M}/\ell$ 、4週後 $15.0\mu\text{M}/\ell$ 、12週後 $15.4\mu\text{M}/\ell$ と減少した。髄液中のIL-8濃度は、対照群では投与前 $85.3\mu\text{M}/\ell$ 、4週後 $93.4\mu\text{M}/\ell$ 、12週後 $87.0\mu\text{M}/\ell$ で経過中ほぼ不変で、nicardipine投与群では投与前 $7.9\mu\text{M}/\ell$ 、4週後 $82.2\mu\text{M}/\ell$ 、12週後 $85.3\mu\text{M}/\ell$ も変化がなかった。

#### D. 考察

慢性疼痛の一因として考えられる神経因性疼痛の分枝レベルにおけるメカニズムは明らかにされつつある。中でも脊髄後角におけるNMDA receptorの慢性疼痛における関与についての報告がなされている。NMDA receptor発現による疼痛機序にはNO産生系が関与する。これらの系にはcalcium channel拮抗剤をくも膜下腔へ投与することで鎮痛効果が得られることも報告されている。今回われわれはこの脊髄後角レベルにおける効果を期待して臨床応用を模索してきた。今回の結果は今後の治療に期待をもてるが、主観的評価のみで疼痛を評価しているため、客観的評価法を加えることが必要である。

## 2. 腰部脊柱管狭窄症による神経障害性疼痛の検討

### A. 研究目的

圧迫性神経障害により生じる障害は神経麻痺であるが、同時に痛み・しびれは患者に大きな問題となる。治療成績に関したこれまでも多くの研究が行われているが、痛み・QOLなども含めた体系的な評価手段で解析されたものは少ない。麻痺に劣らず痛みやしびれの重要な問題であるが、侵害受容性疼痛と異なり治療抵抗性という特徴から神経障害性疼痛あるいは脊髄障害性疼痛と呼ばれることがある。本研究の目的は脊椎疾患のうち、最も多い疾患である腰部脊柱管狭窄症における神経障害性

疼痛を検討することである。

### B. 研究方法

対象は病院受診者で、共通の評価項目による研究デザインで、1年間の縦断研究により自然経過、治療介入の内容・治療成績の把握を目的として、札幌医科大学・東京大学・久留米大学の3大学関連施設によって昨年度から始まった。腰椎疾患への各種質問票に加え、神経障害性疼痛質問票としてpainDETECT<sup>1,2)</sup>を調査した。

PainDETECTは9つの質問からなり、痛みの強さに7項目はそれぞれ0-5点で0-35点、痛みのパターンが1項目で(-1)から1点、痛みの広がり1項目で0-2点の得点で、総合得点は0-38点となる。Freynhagenらの研究で、12点以下は神経障害性疼痛の関与がなく、13点から18点までは神経障害性疼痛の関与があり、9点以上は神経障害性疼痛の可能性が高い。

### C. 研究結果

収集後、現在データ解析が可能であった対象数は249例(男134 女115)で、年齢 $71.5\pm 5.3$ 歳(46~93歳)であった。罹病期間は $35.8\pm 69.0$ (週)と約9ヶ月で、BMIは $23.5\pm 3.6$ (16.3~37.1)であった。

神経障害性疼痛質問票としてのPainDETECTは平均 $11.7\pm 6.2$ であった。腰部脊柱管狭窄症例における神経障害性疼痛の割合は、神経障害性疼痛の要素が含まれる(混合性疼痛も含む)13点をカットオフ値とすると37.9%、神経障害性疼痛である19点をカットオフ値とすると13.7%であった。

男性の方が多く、60歳未満で20.8%、一方60歳代で9.6%、70歳代で15.5%、80歳以上では12.2%であった。また、同時に調査したMRIでの狭窄度と神経所外性疼痛の頻度を比較すると、1/4~1/2の狭窄では10.8%、1/2~3/4では12.5%、3/4以上の狭窄では22.4%と、狭窄の程度が高度になるほど神経障害性疼痛の頻度が高かった。

## D. 考察

今回の対象は初診あるいは比較的初期治療しか受けていない患者を対象としており、大学病院で手術患者を対象とした集団よりは軽症の患者を多く含む筈である。しかし、疑いを含めると約4割で神経障害性疼痛の関与があった。Matsudairaらの報告<sup>3)</sup>によれば、腰部脊柱管狭窄症の手術治療患者の満足度は83%と比較的高かったが、不満となる因子の解析では術前の安静時しびれのみが4.27（多変量解析：1.28-23.08）のオッズ比で残った。術前の安静時しびれは術後も遺残することが多く、これらは神経障害性疼痛を反映している可能性が高く今後検討していく必要がある。

### 参考文献

- 1) Freynhagen R, Baron R, Gockel U, et al. painDETECT: a new screening questionnaire to identify neuropathic components in patients with back pain. Curr Med Res Opin 2006;22:1911-20.
- 2) 住谷昌彦, 柴田政彦, 山田芳嗣. 疼痛の分類・疫学. 臨床神経科学 2009; 27: 490-3.
- 3) Matsudaira K, Yamazaki T, Seichi A, et al. Modified fenestration with restorative spinoplasty for lumbar spinal stenosis. Technical note. J Neurosurg Spine 2009;10(6):587-94.

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

特になし

### 2. 学会発表

特になし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



脊髄障害性疼痛症候群の実態の把握と病態の解明に関する研究

研究分担者 上野 雄文 九州大学大学院 医学研究院 精神病態医学分野 特任准教授

**研究要旨**

fMRI を用いて、末梢神経および中枢での痛みに関連する刺激によって、痛みの画像化および慢性疼痛の中枢に与える影響を検討した。痛み刺激による脊髄の画像化の可能性を示した。また慢性疼痛の中枢に対する影響を検討し、痛みに関する研究に画像が有効であることを示した。これらの結果は今後の疼痛に関する治療や薬物の効果の判定に応用される可能性がある。

**A. 研究目的**

本研究は疼痛の生理学的手法を通して末梢神経から中枢までの痛みの認知機構および慢性疼痛の中枢に対する影響を解明することを目的とした。今後の治療の方向を検討し、また治療の指標となるような生理学的指標を確立することを試み、画像解析の疼痛研究への応用を行った。

**B. 研究方法**

fMRI（機能的核磁気共鳴画像）を用いて、疼痛刺激あるいは疼痛を思わせる視覚刺激を行うことで疼痛の認知機構を生理学的に理解する。まず、脊髄特に頸髄部をターゲットに fMRI での機能的画像取得を試みた（研究 1）。撮像法は磁性変化を捉えるのに鋭敏な GE（Gradient-Echo）法を用い、GE-EPI 法で試行している。当初は脳撮像用のプロトコルで撮像していたが、信頼できる解剖画像の取得が困難であったため撮像方法を工夫する必要がある。タスクは右手掌中央部に痛みを感じる程度のタッピング刺激（刺激：6 秒間、安静：24 秒間）を合計 12 サイクルのブロックデザインとし、BOLD 信号変化は GE 社製 Signa の fMRI 専用解析ソフト Brain wave を用いた。また、痛みを思わせる視覚刺激を用いて、疼痛の認知機構を解明することを目的とし fMRI での撮像を行った。（研究 2）「中腰姿勢で荷物を持つ」

写真を提示したときの脳活動を fMRI で撮像し、腰痛経験者では virtual low back pain と表現できるような不快な情動体験が喚起されるのかについて研究を行った。

**C. 研究結果**

研究 1 ではその結果ターゲットレベルの脊髄内で有意な信号変化が認められ ( $Z \geq 3.78$ )、神経機能変化が生じていることが確認された。ターゲットレベルの脊髄内で有意な信号変化が認められ ( $Z \geq 3.78$ )、神経機能変化が生じていることが確認された。EPI での撮像で脊髄内の賦活を認めるのは姿勢の保持、静止磁場の問題、Magnetic Distortion の影響が考えられた。研究 2 では腰痛経験群では腰痛非経験群に比べて、前前頭皮質、補足運動野などの前頭皮質、側頭皮質、視覚連合野、視床、島、後帯状回、小脳などで有意な脳活動がみられた。腰痛経験群では写真提示によってすべての対象者が不快感を感じ、なかには痛みを訴える者もいた。一方、腰痛非経験群では不快感、痛みともに感じる者はいなかった。また、腰痛経験者が写真を見ているときの脳活動と、過去に報告された実際に腰痛を経験している際に活動する部位は部分的に一致しており、腰痛を経験していることで視覚情報から Virtual Pain と表現できる不快な情動体験を経験しうることが示唆された。

## D. 考察

研究1によってfMRIによって脊髄の疼痛での賦活の画像化の可能性が示された。姿勢の保持、静止磁場の問題、Magnetic Distortionの問題が影響し、画像化が正確でない被験者も見られた。またエコープランナーイメージング(EPI)での脊髄の画像化が試みられているが、今後の発展が期待される。研究2では中枢での痛みの認知機構を画像を用いて示すことが出来た。島、帯状回、視床、前頭前野、補足運動野などの部位は実際の痛みの刺激でも賦活される部位である。痛み刺激を与えない刺激で賦活するという現象を示し、慢性疼痛の中枢に対する影響を示すとともに、この結果は痛みの客観的な指標となる可能性があり、今後の治療や薬物の効果の判定などに使われることが期待される。

## E. 結論

末梢と中枢での痛みの認知機構をfMRIを用いた画像解析で行った。末梢では画像化の可能性を示すにとどまったが、今後技術の発展に伴い可能性が広がることが期待される。中枢の画像化では視覚刺激のみを用いた痛みの認知機構を示すことが可能であり、慢性疼痛の中枢への影響と考えられた。今後の治療や薬物の効果の判定に用いられることが期待される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takefumi Ueno, Masayuki Inoue, Kiichiro Morita, Toshihiko Matsuoka, Toshi Abe, Hisao Maeda: Comparison between real sequential finger and imagery movements: an fMRI study revisited, *Brain Imaging and Behavior*. 4 : 80-85, 2010
- 2) Gothelf D, Hoeft F, Ueno T, Sugiura L, Lee AD, Thompson P, Reiss AL. : Developmental changes in multivariate neuroanatomical patterns that predict risk for psychosis in 22q11.2 deletion syndrome. *Psychiatr*

Res. 45 : 322-331, 2010

- 3) Oribe N, Onitsuka T, Hirano S, Hirano Y, Maekawa T, Obayashi C, Kasai K, Ueno T, Kanba S: Differentiation between bipolar disorder and schizophrenia revealed by neural oscillation to speech sounds: a MEG study. *Bipolar Disord*. 12: 804-812, 2010.
  - 4) Masayuki Inoue, Takefumi Ueno (shared first author), Kiichiro Morita, Yoshihisa Shoji, Toshimasa Matsuoka, Ryo Fujiki, Toshi Abe, Naohisa Uchimura : Brain Activities on fMRI Using the shiritori Task in Normal Subjects: *Kurume Med J* 57(4):109-15, 2011.
  - 5) Tsuchimoto R, Kanba S, Hirano S, Oribe N, Ueno T, Hirano Y, Nakamura I, Oda Y, Miura T, Onitsuka T : Reduced high and low frequency gamma synchronization in patients with chronic Schizophrenia: *Schizophr Res*. 133 :99-105, 2011.
  - 6) Ueno T, Hirano S, Hirano Y, Oribe N, Nakamura I, Oda Y, Kanba S, Onitsuka T: Stability of the Rayleigh distribution. *Proc International Cong Imaging Signal Processing IEEE*, 5:2402-2403, 2011.
  - 7) Kazuhiro Shimo, Takefumi Ueno, Jarred Younger, Makoto Nishihara, Shinsuke Inoue, Tatsunori Ikemoto, Shinichirou Taniguchi, Takahiro Ushida: Visualization of Painful Experiences Believed to Trigger the Activation of Affective and Emotional Brain Regions in Subjects with Low Back Pain. : *PLoS ONE*. 6 (11) : e26681, 2011
- ### 2. 学会発表
- 1) Ueno T. Inoue M. Morita K. : Difference between a real sequential finger and imagery movements: An fMRI study., Human brain mapping, 2010/06/7, Barcelona, Spain.
  - 2) Oribe N, Onitsuka T, Hirano S, Hirano Y,

Ueno T, Obayashi C, Kanba S. Neural Oscillation to Speech Sounds in Bipolar Disorder Asian Network for Bipolar Disorders, 2010. 6.24, Kuala Lumpur, Malaysia.

- 3) Oribe N, Onitsuka T, Hirano S, Hirano Y, Ueno T, Obayashi C, Kanba S. Neural Oscillation to Speech Sounds in Bipolar Disorder Asian Bipolar Forum. 2010. 9. 11, Seoul, Korea.
- 4) Hirano Y, Hirano S, Oribe N, Maekawa T, Tsunoda T, Nakamura I, Tsuchimoto R, Ueno T, Ninomiya H, Onitsuka T, Kanba S: Auditory sensory gating deficit to voices in psychotic bipolar disorder : a MEG study. 29<sup>th</sup> 29th International Congress of Clinical Neurophysiology, 2010. 10. 28- 11. 1, Kobe, Japan.
- 5) 下和弘, 牛田享宏, 上野雄文, 池本竜則, 谷口慎一郎: 視覚情報によって腰痛は惹起されるのか? -過去の腰痛経験が慢性腰痛におよぼす影響-, 第4回日本運動器疼痛学会, 大阪 2011. 11. 19-20

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

脊髄障害性疼痛症候群の実態の把握と病態の解明に関する研究  
脊髄障害性疼痛動物モデルの評価

研究分担者 柴田 政彦 大阪大学大学院 医学系研究科 疼痛医学寄附講座 教授

研究協力者 中江 文 大阪大学大学院 医学系研究科 麻酔集中治療講座 特任准教授

研究要旨

1. 脊髄障害性疼痛の原因には様々ある。さらに、脊髄障害で起こるのは痛みだけでなく、運動機能の変化がおこる。よって、動物においてその病態を評価するにあたってはその受傷機転、障害部位に注目し、起こりうる運動機能の変化も合わせて解釈していくことが重要である。その分子生物学的な変化が、本当に痛みや侵害刺激による変化なのか、運動機能の低下に伴う変化なのかを注意深く検討する必要がある。
2. 脊髄障害性疼痛の動物モデルの一つに脊髄挫滅モデルがある。脊髄挫滅モデルは外傷性脊髄損傷の受傷機転に最も近いことと運動麻痺が軽度で、疼痛行動の評価が後肢で可能である点で研究に適したモデルと考えられる。今回は、下行性疼痛抑制系を担うセロトニン系、その中でもセロトニン2C受容体の選択的スプライシングに注目し、その疼痛行動と制御機構の関係を明らかにした。内因性の疼痛制御機構としてのセロトニン系にはセロトニン2C受容体以外にも様々なサブタイプが関与する。今後、セロトニン系の制御機構の全般的な解明をめざし、その制御機構のメカニズムの検討を続けたいと考えている。

A. 研究目的

脊髄障害性モデルの一つに脊髄挫滅モデルがある。このモデルは、外傷性の脊髄損傷の受傷機転に近いこと、ラットにおいては運動麻痺が軽度で、疼痛行動の評価が2週間後より可能ということで、亜急性期の病態メカニズムの解明に適したモデルと言える。

内因性の鎮痛機構として下行性疼痛抑制系という仕組みがある。これは脳幹部からの神経伝達物質が脊髄を下行性に伝達し、鎮痛作用を生み出すとい

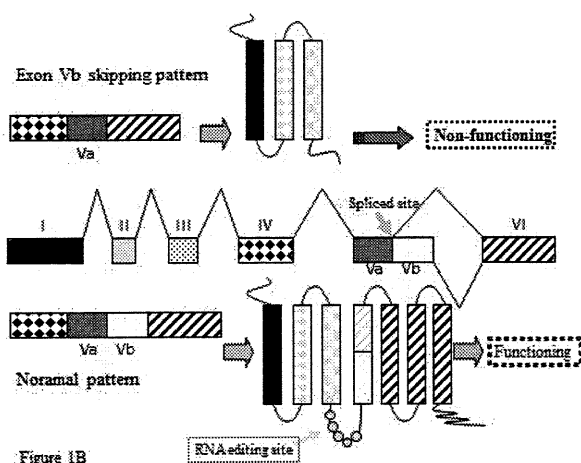
うものである。その神経伝達物質として代表的なのが、セロトニンとノルアドレナリンである。

セロトニンを伝達物質とする受容体のうちセロトニン2C受容体は、その制御機構がユニークであることが知られている。受容体の数による制御以外に、1つはRNA編集が起こり、その受容体機能が低下する仕組み、もう1つは選択的スプライシングが起こり、受容体としての体裁をなさなくなるという仕組みである。

今回我々は、脊髄障害性疼痛モデルとして、ラットの脊髄挫滅モデルを用いて、セロトニン2C受容体の選択的スプライシングによる脊髄レベルの疼痛制御機構の解明をめざし、研究を行った。

B. 研究方法

6週齢のオスのSDラットので脊髄挫滅モデルを作成した。その対照群として、椎弓切除のみを行い脊髄挫滅を行わないシャム手術群、何も外科的処置を行わないナীব群での比較を行うこととした。手術方法は、椎弓切除後、5cmの高さから10gの錘を、0.5cm四方の先端に荷重が集中するように落とし、受傷させた。受傷後2週間で逃避行動をとれ



るレベルまでの運動機能の回復状況を確認し、von Frey Filament を用いて疼痛行動を測定した。

術後2週間で過剰麻酔により安楽死させた後、脊髓の取り出しを行った。脊髓は受傷部位周囲1cm (Injury-Core)、受傷部位より頭側(Rostral)1cm、受傷部位より尾側(Cauda)1cmに分けて取り出した。取り出したのちRNA抽出を行った後逆転写後、リアルタイムPCR法でセロトニン2C受容体の数、選択的スプライシング後の mRNA の定量を行った。統計は JMP9.01 を用い、Tukey-Cramer 検定で行った。

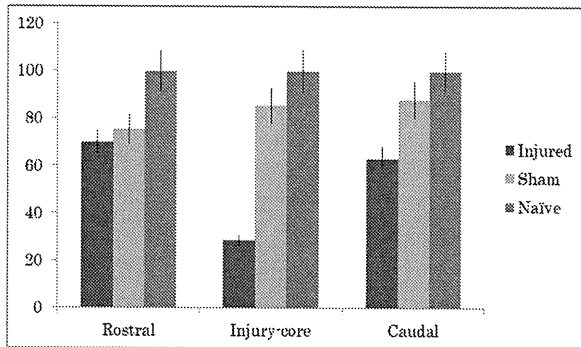
(倫理面への配慮)

本研究は、動物を対象とした研究である。よって、大阪大学動物実験倫理審査委員会において承認を受けている。使用する動物の数はできるだけ少なく済むように計画を立て、動物が苦痛を伴う時は安楽死させることを徹底した。

### C. 研究結果

術後2週間で障害モデルの後肢の評価で疼痛域との低下を認めた。(p<0.05)

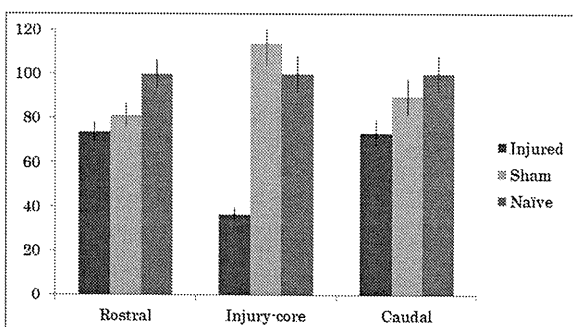
#### 1) セロトニン2C受容体 mRNA の総量の変化



障害モデルサンプルにおいてすべての部位でセロトニン2C受容体 mRNA の量はナীবに比べ、Injury-Core ではさらにシャムとの比較においても減少した。(p<0.05)

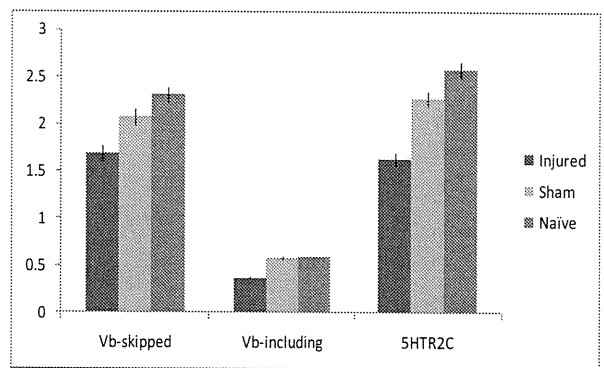
#### 2) スプライシング後の無機能化する受容体 mRNA による影響の検討

##### ①無機能化した受容体 mRNA の割合

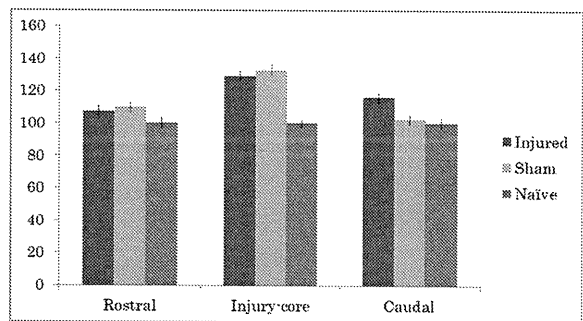


まず、無機能化した mRNA の割合そのものを調べた。セロトニン2C受容体そのものの影響が無視できないと考えられたため、セロトニン2C受容体全体に対する無機能化した mRNA の割合を検討する必要がある。

##### ②セロトニン2C受容体の総量に対する無機能なスプライシングバリエーションの割合



無機能な受容体の割合は障害モデルの尾側サンプルで高く (p<0.05) 疼痛行動との関連が示唆された。



##### 3) スプライシングバリエーションの絶対量の比較

ナীবサンプルでもスプライシングのおこっている割合が高い。

### D. 考察

脊髓挫滅モデルにおいて、疼痛行動を評価することは可能で、術後2週間で疼痛を感じている可能性がある。

運動麻痺からの回復は疼痛行動の評価には十分ではあるが、術前よりは弱い状況での評価がなされており、今回の変化の一部には運動機能の変化に伴う分子生物学的な変化がおこっている可能性は否定できない。

選択的スプライシングは、特に障害部位より尾側のサンプルで増えており、スプライシングによる影響が考えられた。

脊髓挫滅モデルにおける変化では、もともとス

ライシングがおこっている割合が一定量存在する。よって、セロトニン2C受容体による制御を考える上では、スプライシングによる影響を考え、数による制御やRNA編集による影響を論じていく必要があると考えられた。

#### E. 結論

脊髄控滅モデルにおいて、セロトニン2C受容体による疼痛行動の制御機構は3つある。① 受容体の数の変化による制御。② RNA編集でGタンパク結合能の変化により、セロトニンの伝達のしやすさが異なることによる制御。③ 選択的スプライシングにより受容体の体裁をなさないタンパクが賛成されることによる制御が存在する。選択的スプライシングによる制御について以下のことが明らかになった。①セロトニン2C受容体は脊髄においてナイーブな状態でスプライシングがおこっている。② 障害部位(Injury-Core)ではセロトニン2C受容体のスプライシングによる制御より、数の変化によるインパクトの方が大きい。③ 障害部位より尾側(Caudal)では選択的スプライシングによる受容体機能の無機能化のインパクトがある程度存在する。④ 障害部位ではシャム個体においてもモデル個体と同様の無機能化がおこり、脊髄控滅による純粋な効果でない可能性がある。RNA編集がおこらない(受容体機能が低い状態)では選択的スプライシングによる受容体の無機能化がおこりやすいという報告もある。よって、セロトニン2C受容体による制御は我々が思っている以上に細かな調節機構が働いている可能性があることが分かった。セロトニン系はセロトニン2C受容体以外にも様々なサブタイプが存在する。よって、それらすべてがどのように制御されているのかは不明である。今後、それらがどのような制御機構を持っているが、そしてそれらを制御する因子が何かかわかれば、新しい創薬ターゲットとなる。このように本研究の発展により、痛みのメカニズム、鎮痛薬の新たな作用点を見極めることは、医療行政上、大変有意義であり、国民の保健において多大なる貢献ができると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Aya Nakae, Kunihiko Nakai, Kenji Yano, Ko Hosokawa, Masahiko Shibata, and Takashi Mashimo. The animal model of spinal cord injury as an experimental pain model. Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2011 (2011), Article ID 939023, 11 pages

##### 2. 学会発表

- 1) 石田 葉子、田中 達哉、中江 文、中井國博、三上 晶子、吉田 真理、柴田 政彦、矢野 健二、細川 互、眞下 節、脊髄坐滅モデルにおけるセロトニン2C受容体選択的スプライシングの関与、日本分子生物学会、神戸、12月、2010、ポスター
- 2) 吉田真理、田中達哉、石田葉子、中江文、中井國博、三上晶子、大場創介、柴田政彦、眞下節、上田晃一、核小体RNA、RBII-52の神経因性疼痛でのセロトニン2C受容体に対する役割、第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月9日～12日、2009。ポスター

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

該当なし。

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

##### 3. その他

該当なし。

脊髄障害性疼痛症候群の実態の把握と病態の解明に関する研究  
脊髄及び脊髄根損傷に伴う疼痛メカニズムの解明

研究分担者 野口 光一 兵庫医科大学解剖学神経科学部門 教授

研究要旨

脊髄障害性疼痛の分子メカニズムを解明する基礎的研究の一端として、神経根及び脊髄神経障害性疼痛に特異的な病態を解析した。3年間の研究の結果、末梢神経の障害に伴い脊髄グリア細胞において、IL-18やtPA、さらに種々のLipid Mediatorsとその受容体の発現変化（ロイコトルエンやPAF）が生じること、P2X7 ATP受容体も発現増加し、両者とも痛みに関与することを今年度発見した。さらに神経根（前根）傷害モデルにおいても、脊髄において変化が観察された。

A. 研究目的

脊髄障害性疼痛のメカニズムを解明する基礎的研究の一環として、脊髄や脊髄神経根の損傷・圧迫・炎症に伴う疼痛メカニズムを解明することを目的としている。腰椎椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄による神経根症は腰・下肢痛を主訴とする事が多く、この病態の一面は神経根に対する圧迫や髄核への炎症反応の神経への波及である。しかし神経根の微小切断を含めた損傷の要素が脊髄後角にどのような影響をおよぼしているかは不明である。また、末梢神経損傷後の神経障害性疼痛モデルの解明で得られてきた脊髄におけるグリア細胞の関与という新しい概念が、脊髄や脊髄根損傷後の疼痛にどのように適応できるか、という点ではほとんどデータがない。本研究ではその第一歩として、神経根及び脊髄神経損傷時の脊髄グリア細胞の動態と、その疼痛メカニズムへの関与を解明することをめざした。

B. 研究方法

脊髄根損傷と後根神経節（DRG）より末梢の脊髄神経損傷において、脊髄における種々の分子の遺伝子発現の変化を検討し、差があるか否かについて調べる。

1. ラットを用いた神経根及び脊髄神経損傷に伴う疼痛モデルの確立

疼痛関連動作（heat/cold hyperalgesia、mechanical allodynia）の確認：SD雄性ラットを用いて坐骨神経痛モデルである神経根損傷モデル及び選択的L5脊髄神経損傷モデルの両者を作成し、疼痛関連動作（thermal hyperalgesia、mechanical allodynia）を経時的に観察する。

また、グリアの発現においては末梢神経の障害による神経障害性疼痛モデル（SNI）も使用した。

2. 神経根損傷に伴う種々のグリアマーカー、サイトカイン、tPA、ATP受容体各種サブタイプ等の免疫組織化学的变化の解析

SDラットのL5神経根損傷モデルを作成し、脊髄後角における種々の細胞内情報伝達因子、サイトカイン、グリアマーカー、P2X7などATP受容体サブタイプ等の発現を免疫組織化学法、Western blot法を用いて解析する。さらに発現の経時的な変化も検索する。

3. 疼痛関連因子としての脂質受容体の関与

新規疼痛関連分子として末梢神経障害時の脊髄グリア細胞及び後根神経節におけるロイコトルエン合成酵素及びその受容体、PAF(platelet-activating factor)やその受容体に関して、in situ ハイブリダイゼーション法や免疫組織化学法を用いて検討する。

## C. 研究結果

### 1. ラットを用いた神経根及び脊髄神経損傷に伴う疼痛モデルの確立

L4, 5 レベルの神経根を結紮することで安定した疼痛行動を得ることができた。選択的 L5 脊髄神経結紮モデルと比較して、やや疼痛行動のレベルは弱いものの安定したモデルと判断できた。以後の解析はこの両者を用いて結果の比較や新分子の動態の解析を行った。

### 2. 神経根損傷に伴う種々のグリアマーカー、サイトカイン、tPA 等の免疫組織化学的変化の解析

マイクログリアのマーカーである Iba-1、アストロサイトの GFAP の免疫組織化学法を施行した。安定して、Iba-1、GFAP の上昇を確認することができた。新しい所見として、神経根のうち前根のみを結紮するモデルにおいても脊髄マイクログリアやアストロサイトの活性化が観察されたことである。これは後根の損傷を慎重に除外したモデルにおいても同様の変化が観察された。前根損傷モデルにおける DRG における分子の変化については、特に疼痛に関わる大きな変化は本プロジェクトにおいては観察されなかった。

### 3. グリア細胞での P2X7ATP 受容体発現

末梢神経障害性疼痛モデルの脊髄マイクログリアにおいてイオンチャンネル型 ATP 受容体の一つである P2X7 の mRNA と蛋白が発現増加することを発見した。さらに P2X7 阻害剤投与にて疼痛行動の抑制が明らかとなった。

### 4. 疼痛関連因子としての脂質受容体の関与

- A. ロイコトリエン(LT)合成酵素 (5-L0、FLAP、LTC4s) 及び BLT1 および CysLT1 受容体の発現増加を発見し、疼痛メカニズムに関与していることを発見した。
- B. DRG ニューロンにおいても CysLT2 の発現が増加し、ATP 受容体 P2X3 との強い関係を発見した。
- C. 今年になり、末梢神経障害性疼痛モデルの脊髄において、PAF 合成酵素及びその受容体が、マイクログリアにおいて発現増加し、疼痛メカニズムに関与していることを発見して発表した。

## D & E. 考察および結論

整形外科疾患に特に多い後根神経節より中枢側で脊髄までの解剖学的要素に対する神経損傷による疼痛メカニズムを調べ、末梢神経障害との比較検討するのが本研究の一つの目的である。過去の本研究において、神経根損傷において脊髄後角グリア細胞でダイナミックな遺伝子発現の変化が見られることが明らかとなった。

末梢神経障害時のマイクログリアにおいて新規の分子が関与していることを複数発見した。サイトカインの IL-18、脂質メディエーターであるロイコトリエンや PAF、さらにイオンチャンネル型 ATP 受容体 P2X7 である。これらの発見も新規性が高く、今後とも精力的に検討を続ける予定である。

本研究を発展させて腰椎椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄による疼痛病態を解明し、治療の対象分子としても新しいアプローチとなることが期待される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kondo T, Obata K, Miyoshi K, Sakurai J, Tanaka J, Miwa H, Noguchi K. Transient receptor potential A1 mediates gastric distention-induced visceral pain in rats. *Gut* 58, 1342-52, 2009
- 2) Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Noguchi K. Leukotriene synthases and the receptors induced by peripheral nerve injury in the spinal cord contribute to the generation of neuropathic pain. *GLIA* 58, 599-610, 2010
- 3) Tetsuo Fukuoka, Kimiko Kobayashi, and Koichi Noguchi, Laminae-specific distribution of alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in the adult rat spinal cord, *Neuroscience*, 169, 994-1006, 2010.
- 4) Masamichi Okubo, Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi, Tetsuo Fukuoka, Yi Dai and



Koichi Noguchi, Expression of leukotriene receptors in the rat dorsal root ganglion and the effects on pain behaviors, *Mol Pain*, 6, 57, 2010.

5) Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi, Masamichi Okubo, Tetsuo Fukuoka, and Koichi Noguchi. Increase of close homologue of cell adhesion molecule L1 in primary afferent by nerve injury and the contribution to neuropathic pain, *J. Comp. Neurol.*, 519, 1597-1615, 2011.

6) Tetsuo Fukuoka, Koichi Noguchi, Comparative study of voltage-gated sodium channel  $\alpha$ -subunits in non-overlapping four neuronal populations in the rat dorsal root ganglion, *Neurosci. Res.*, 70, 164-71, 2011.

7) Kimiko Kobayashi, Emiko Takahashi, Yasuko Miyagawa, Hiroki Yamanaka and Koichi Noguchi, Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model, *Neurosci. Lett.*, 504, 57-61, 2011

8) Naoki Yoshida, Kimiko Kobayashi, Lina Yu, Shenglan Wang, Rengaowa Na, Satoshi Yamamoto, Koichi Noguchi and Yi Dai, Inhibition of TRPA1 channel activity in sensory neurons by the glial cell line-derived neurotrophic factor family member, artemin, *Mol Pain*, 7, 41, 2011.

9) Koichi Noguchi, Masamichi Okubo, Leukotrienes in nociceptive pathway and neuropathic/inflammatory pain, *Biol. Pharm. Bull*, 34, 1163-9, 2011.

10) Masamichi Okubo, Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi, Hirosato Kanda, Yi Dai and Koichi Noguchi, Up-regulation of platelet-activating factor synthases and its receptor in spinal cord contribute to development of neuropathic pain following peripheral nerve injury, *Mol Pain*, 8, 8, 2012.

11) Tetsuo Fukuoka, Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi, Masamichi Okubo, Kan Miyoshi, Yi Dai, and Koichi Noguchi, Re-evaluation

of the phenotypic changes in L4 DRG neurons following L5 spinal nerve ligation, *Pain*, 153, 68-79, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

脊髄障害性疼痛症候群の実態の把握と病態の解明に関する研究

研究分担者 井上 和秀 九州大学大学院薬学研究院 教授

**研究要旨**

神経障害性疼痛はオピオイドや NSAIDs 等の既存の鎮痛薬が奏効しないため、臨床上問題となっている。我々は、末梢神経損傷による神経障害性疼痛発症に脊髄活性化ミクログリアと P2X4 受容体が重要な役割を演じていることを報告していたので、その詳細なメカニズムを明らかにしたいと考えた。そこで、初年度には、その他の神経障害性疼痛モデルでも損傷により脊髄内のミクログリアが顕著に活性化されることを明らかにした。平成 22 年度には、神経障害性疼痛における脊髄ケモカインの関係を明らかにするためにミクログリアでの機能が不明であった CCL3 の役割に注目した。その結果、CCL3 が神経障害性疼痛発症に寄与している可能性が示唆された。さらに平成 24 年度には、損傷神経でケモカイン CCL21 が産生放出されて、ミクログリア活性化と P2X4 過剰発現に重要な働きをすることが明らかになった。これらの研究成果は、神経障害性疼痛のメカニズム解明の一助となり、ケモカインをターゲットとした治療薬開発の可能性を示している。

**A. 背景、研究目的**

神経障害性疼痛は、軽い触刺激を激しい痛みとして誤認する病態（アロディニア）を主徴とする難治性慢性疼痛であり、物理的損傷、癌、糖尿病、帯状疱疹などにより末梢および中枢神経が損傷することにより発症する。オピオイドや NSAIDs 等の既存の鎮痛薬が奏効しないため、臨床上問題となっており、発症機序の解明と治療薬の開発が急務となっている。我々は、「神経障害性疼痛発症モデル脊髄では、ミクログリアが活性化し、そこに過剰発現する P2X4 受容体の刺激により放出された脳由来神経栄養因子が後角二次ニューロンに働き、KCC2 の発現を抑制し、細胞内陰イオン濃度を異常に高める。この二次ニューロンに対して、触刺激により介在ニューロンから放出された GABA が作用して脱分極を引き起こし、それが痛みシグナルとなる」との仮説を提出した。しかし、損傷神経から何が出てミクログリアに働きかけるのかは謎であった。

ケモカインは白血球の遊走の調節に重要な役割を果たす 8~10kDa の小さなタンパク質であり、炎症や免疫反応の調節因子と考えられて

いたが、近年の研究により中枢神経系において、多発性硬化症、脳卒中、HIV 脳症など多くの重大な神経炎症疾病の病態に関わっていることが報告されてきた。CC ケモカインの一つである CCL2 (Monocyte attractant protein-1; MCP-1) は、神経損傷時に脊髄後根神経節 (DRG) や脊髄後角において顕著に発現量が増加すること (White et al., 2005; Zhang and De Koninck, 2006)、さらに受容体である CCR2 欠損マウスやアンタゴニスト投与により神経障害性疼痛が抑制され、CCL2-CCR2 シグナリングが神経障害性疼痛の形成に直接的に影響を及ぼすことが明らかとなった (Abbadie et al., 2003; Bhangoo et al., 2007)。一方、CCL3 は、単球や T 細胞の遊走を引き起こす CC ケモカインとして知られていて、炎症部位へのそれら免疫担当細胞の集積に必要とされおり、多発性硬化症 (Balashov et al., 1999; Zang et al., 2001)、Wallerian 変性 (Perrin et al., 2005)、脳虚血 (Cowell et al., 2006) など様々な中枢神経系障害に関わっていることが明らかとなっている。疼痛に関しては、CCL3 の受容体である CCR1 は TRPV-1 受容体陽性小型 DRG ニューロン

に発現し、炎症性痛覚過敏に関与していること (Zhang et al., 2005)、さらに、CCR1 はオピオイド  $\mu$  受容体陽性神経細胞に発現し、 $\mu$  受容体の脱感受性を介して疼痛の促進に関与していることが報告されている (Zhang et al., 2004)。しかしながら、末梢神経損傷後の脊髄 CCL3 の神経障害性疼痛における役割は未だ解明されていない。そこで本研究では、神経障害性疼痛における脊髄 CCL3 の役割を解明することを目的とし、神経障害性疼痛発症メカニズムの解明を目指した。

さらに、CCケモカイン類の CCL21 は、脊髄損傷時や神経障害時に増加すること、ミクログリアのケモタキシスを引き起こすことが報告されていたが、神経障害性疼痛における役割に関しては分かっていなかった。そこで本研究では、神経障害性疼痛における脊髄 CCL21 の役割を解明することも目的とし、あわせて神経障害性疼痛発症メカニズムの解明を目指した。

## B. 研究方法

神経因性疼痛病態モデルラットの作製には、脊髄神経損傷モデル (Kim and Chung, 1992) の作製法を改変して行った。触刺激に対する痛み行動の測定は von Frey filament を用いた Up and down 法 (Dixon, 1980; Chaplan et al., 1994) により行った。脊髄腔内カテーテル留置手術を施したラットで痛み行動を前測定した後、PBS (-) で適時希釈した薬物を 5  $\mu$ l 脊髄腔内に注入した。

## C. 研究結果

### ① CCL3 単回脊髄腔内による後肢痛覚閾値の経時的変化

正常ラットの脊髄腔内に CCL3 (10, 1, 0.1 fmol) を単回投与した後、アロディニアが投与後 15 分から認められ、60 分をピークとし、360 分後まで持続した。この CCL3 による逃避閾値の低下は用量依存的であった。更に高濃度 (0.1~10pmol) にして CCL3 を単回投与した場合、投与後 10 日間も持続するアロディニアが発現した。

### ②脊髄神経損傷による脊髄内 CCL3、CCR1、CCR5 mRNA 発現の経時変化

CCL3 の髄腔内投与によりアロディニアが発現することが示唆されたため、L5 脊髄神経非損傷 (naïve) および損傷後 1、2、3、7、10、14 日目のラットにおいて、損傷を与えた神経の投射先である L5 脊髄における CCL3 mRNA の発現変化を、リアルタイム RT-PCR 法により検討した。その結果、非損傷側 (contralateral) 脊髄と比較し、損傷側 (ipsilateral) 脊髄において、脊髄神経損傷後 1 日目と 14 日目をピークとする 2 相性のピークが確認され、有意な CCL3 mRNA の発現増加が確認された。また、CCR1 mRNA の発現量は損傷後全ての期間において有意な差は見られなかった。さらに、CCR5 mRNA は 3 日目をピークとして 2 から 14 日目まで損傷側脊髄において mRNA の増加が確認された。

### ③脊髄神経損傷によるアロディニアに対する CCL3 中和抗体脊髄腔内投与の効果

脊髄における CCL3 のアロディニアに対する効果をより明確なものとするため、CCL3 中和抗体を脊髄神経損傷後 3 日間投与し、その効果を検討した。その結果、ネガティブコントロールである IgG2A 投与群と比較して、CCL3 中和抗体投与群では神経損傷に伴う痛み閾値の低下が抑制された。このことは、神経障害性疼痛の発現に CCL3 が関与していることを示唆している。

### ④脊髄神経損傷による DRG ニューロンでの CCL21 の発現

L5 脊髄神経損傷により、損傷側 (ipsilateral) DRG ニューロンにおいてのみ、神経損傷 12 時間後から CCL21 の発現が認められた。一方、脊髄後角においては、CCL21 の発現は神経損傷 12 時間後では認められず、24 時間後および 48 時間後に認められた。このことから損傷 DRG ニューロンで増産された CCL21 が中枢側への軸索を介して後角まで輸送されたと推測されるが、実際にその中間位置の、軸索小丘及び L5 脊髄後根神経の軸索において CCL21 が神経損傷 24 時間後に確認された。

### ⑤神経損傷動物でのアロディニア発現には CCL21 が必要

L5 脊髄神経損傷後、野生型マウス (WT) では、

術後3日目から軽度機械刺激に対する後肢逃避閾値の低下（つまりアロディニア）が損傷側（ipsilateral）に発現したが、遺伝的に CCL21 が欠損している plt マウスでは疼痛閾値は損傷前とほぼ変わらず、アロディニアの発現は観察されなかった。次いで、脊髄後角での CCL21 の作用を明らかにするために、CCL21 の機能を阻害する中和抗体 0.3  $\mu$ g を神経損傷直前と、神経損傷後3日目まで一日二回、髄腔内投与したところ、IgG 投与対照群のアロディニアと比較して著明に抑制された。これらのことから、神経損傷動物でのアロディニア発現には CCL21 が必要であると考えられる。なお、CCL21 は熱刺激と機械的侵害刺激に対する急性痛反応に対しては特段の機能は有していなかった。

さらに、CCL21 によるミクログリア P2X4 過剰発現と神経障害性疼痛発症の関係について検討した。神経損傷後に脊髄後角ミクログリア P2X4 受容体の過剰発現が報告されているが、野生型マウス (WT) ではそれが再確認された。一方、plt マウスでは、その発現がかなり抑制されていた。CCL21 が P2X4 発現に関与している可能性が出てきたので、初代培養ミクログリアに CCL21 (10 nM) を処理したところ、24 時間目に P2X4 受容体タンパク量が無処置群 (Ctl) の約 1.5 倍に増加した。さらに、plt マウスでは末梢神経を損傷しても、神経障害性疼痛が発症しなかったが、神経損傷後2日目に plt マウスへ、リコンビナント CCL21 の髄腔内投与を行った結果、損傷側 (ipsilateral) において神経損傷後 14 日目まで続くアロディニアが発現した。つまり、plt マウスでも神経障害性疼痛を引き起こす条件は CCL21 以外全てそろっており、そこに外因的に CCL21 を補給することでアロディニアを発症することができたわけである。一方、P2X4 受容体欠損マウスでは神経損傷による神経障害性疼痛が発症しないことは既に報告しているが、CCL21 を P2X4 受容体欠損マウスに投与しても、一過性の疼痛過敏以外、持続的なアロディニアは観察されなかった。以上のデータは、CCL21 は神経障害性疼痛に関する必須アイテムであり、

その神経障害性疼痛発症には P2X4 受容体の発現が不可欠であることが明らかとなった。

#### D & E. 考察および結論

神経障害性疼痛モデル (Chung 変法)、糖尿病性神経障害性疼痛モデル、および抗がん剤パクリタキセル誘発モデルでも、損傷により脊髄内のミクログリアが顕著に活性化された。また、損傷を受けた DRG ニューロンの細胞内で CCL21 が発現し、軸索小丘、神経軸索を経て、脊髄後角まで輸送されること、そしてその後、CCL21 がミクログリアに作用して P2X4 受容体の過剰発現に寄与し、神経障害性疼痛の発症に深く関与している可能性が示唆された。正常ラットへ CCL3 を単回髄腔内投与することにより、用量依存的かつ持続的な機械的アロディニアの形成が確認された。また、神経障害性疼痛モデル動物の損傷側脊髄において CCL3 mRNA の発現量が増加した。さらに、神経障害性疼痛モデル動物への CCL3 中和抗体慢性投与によりアロディニアの発症が抑制された。これらのことにより、末梢神経障害後の脊髄 CCL3 が正常時より著しく増加し、それが神経障害性疼痛発症に寄与している可能性が示唆された。しかしながら、CCL3 中和抗体慢性投与後の神経障害性疼痛モデル動物の脊髄を免疫組織学的検討により、OX-42 陽性ミクログリア細胞数および形態には大きな変化は見られなかったことより、CCL3 がミクログリアの細胞数、形態変化に対する関与は少なく、これらを介して疼痛発症に寄与している可能性が低いと示唆される。本研究の成果が、神経障害性疼痛のメカニズム解明と治療薬開発の一助となることを期待する。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tsuda M, Kuboyama K, Inoue T, Nagata K, Tozaki-Saitoh H and Inoue K. Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. *Mol Pain* 2009, 5:28
- 2) Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Koga Y, Tsuda M, Inoue K, Activation of P2X7 receptors induces CCL3 production in microglial cells