

201200001A

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24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25（2013）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24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25（2013）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	----- 9
南雅文	
2. 慢性疼痛マーカーとなる情動関連分子の探索	----- 15
井上和秀、南雅文	
(資料) Gene chip assay における解析結果 (1) ~ (7)	
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	----- 33
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	----- 37
細井昌子	
I I I. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 49
I V. 研究成果の刊行物・別刷	----- 51

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、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) に着目した検討を行い、BNST 内ノルアドレナリン神経情報伝達活性化により不安が惹起されることを明らかにした。また、BNST 内ノルアドレナリン神経情報伝達活性化による負情動惹起は、神経障害性疼痛モデル動物において機械的侵害刺激に対する閾値を低下させる傾向を示した。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前帯状回 (ACC) ならびに島皮質 (IC) における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、ACC で 48 遺伝子、IC で 88 遺伝子を、慢性疼痛マーカー候補分子群として見出した。さらに、昨年度検討した BNST における結果も考慮し、候補分子の絞り込みを行った。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、行動薬理的解析により、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、昨年度に続き、健常者群を対象として、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、方法論の確立の検討を行った。さらに、慢性疼痛患者においても fMRI の測定を行った。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、一般住民 (福岡県久山町の 40 歳以上を対象) における人生早期の被養育体験と慢性疼痛の関連を検討した。父親および母親ともに、ケアスコアが低いほど、また、過干渉スコアが高いほど、慢性疼痛を有する割合が高かった。特に、女性は被養育体験の影響を受けやすく、父親の娘本人の気持ちへの関心の低さと過干渉が重要な要因であることが示された。

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

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った悪循環を生じさせ、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

A. 研究目的

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、①高架式十字迷路試験による不安情動評価、②神経障害性疼痛モデル動物におけるvon Frey試験による疼痛試験を行った、また、マイクロダイアリシス法を用いて、慢性疼痛が側坐核ドパミン遊離に及ぼす影響検討のための予備的検討を行った。

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前帯状回(ACC)ならびに島皮質(IC)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、行動薬理的解析により、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、先行研究をもとに独自に作成した 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 福岡県久山町の 40 歳以上を対象とした 2011 年の健康診断でストレス健診を希望した 840 名のうち、回答を中断した 56 名と片親または両親の記憶がない 24 名の計 80 名を除外し、養育に関する質問紙の結果が両親ともに得られた 760 名を解析した。質問の内容は、1) 人口統計学的データ、2) 疼痛関連データ、3) 養育関連データの 3 種類で、回収されたデータは SPSS 14.0 を使用して解析した。

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り不安情動が惹起された。また、BNST 内ノルアドレナリン神経情報伝達活性化による負情動惹起は、神経障害性疼痛モデル動物において機械的侵害刺激に対する閾値を低下させる傾向を示した。神経障害性疼痛モデル動物における抑うつ様症状を評価するため、報酬刺激提示時の快情動の減弱(無快感: アンヘドニア)を、側坐核内ドパミン遊離量を指標とすることで、定量的に解析することを目指し、健常マウスを用いて予備的検討を行った。報酬刺激として 30% スクロース水を提示したところ、水を提示した群と比較し有意な側坐核内ドパミン遊離量上昇が確認された。

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 ACC および IC における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、ACC で 48 遺伝子、IC で 88 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、行動薬理的解析により、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)が痛みによる負情動生成に関与すること、さらに、ニューロペプチド Y (NPY) が CRF の働きを抑制することにより痛みによる負情動生成を抑制することを明らかにした。

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 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。慢性疼痛性患者については、5名が本研究に参加したが、うち2名は高齢のためMRI装置内で報酬予測課題を適切に遂行することが困難であった。また1名も課題の理解と遂行が困難であったため、2名だけが適切に参加することができた。慢性疼痛性患者2名を対象に各種評価尺度、報酬予測課題遂行時のfMRIを計測した。2名とも気分障害を併存しており、疼痛の評価尺度では共に腰部、腹部の慢性的痛みを訴え、社会生活機能の阻害要因であると見なせた。また主観的QOLが著しく低かった。fMRI計測について右腹側線条体に注目して、200ポイント獲得条件から無報酬条件（ゼロポイント条件）の差分コントラスト画像を求め、そのコントラスト値について健常者群と慢性疼痛患者2名を比較した。統計的比較は行っていないが、健常者群よりもコントラスト値が低いことから、報酬獲得条件において右腹側線条体での賦活が小さいと考えられた。

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 父親および母親ともに、ケアスコアが低いほど、また、過干渉スコアが高いほど、慢性疼痛を有する割合（有症率）が高かった。適切な養育とされている“ケアあり／過干渉なし”を基準として、年齢、教育歴、婚姻・経済的状況で調整した養育スタイルの各カテゴリーのオッズ比を検討した。男性においてはPBIのカテゴリーの違いによる有意なリスクの増減は認められなかった。女性において有意なオッズ比の上昇を認めた養育スタイルは、父親の“ケアなし／過干渉あり”（オッズ比2.1）であった。一般住民の慢性疼痛の発症において、女性は被養育体験の影響を受けやすく、父親の娘本人の気持ちへの関心の低さと過干渉が重要な要因であることが示唆された。

D. 考察

1) 慢性疼痛における情動の役割の研究 BNST内ノルアドレナリン神経情報伝達の活性化により生じる負情動について検討した結果、嫌悪に加え不安も惹起されることが明らかとなった。さらに、神経障害性疼痛モデルラットにおいて、機械的侵害刺激に対する疼痛閾値が、負情動生成により低下する、すなわち痛みが増悪する傾向が見られた。これらの結果は、慢性疼痛下において負情動の生起が痛みの増悪を引き起こしている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。

一方、神経障害性疼痛モデルラットにおける自発痛およびそれにより惹起される情動変化に関しては、ほとんど研究が進んでいない。来年度の研究では神経障害性疼痛モデル動物における自発痛により誘発されると考えられる抑うつ様状態を評価する目的で、報酬刺激提示時の快情動の減弱（アンヘドニア）を、側坐核内におけるドパミン遊離量を指標として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 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、ACCで48遺伝子、ICで88遺伝子を慢性疼痛マーカー候補分子として抽出した。さらに、昨年度のvBNSTおよびdBNSTにおける検討結果と合わせ、領域間で共通して変動する遺伝子を絞り込むことで、6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、さらに特定領域で変動が大きい遺伝子を絞り込んでいき、確認実験を行うことで、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、昨年度、パスウェイ解析ならびに定量

的 RT-PCR 解析の結果において変化が見られた CRF 神経情報伝達系に着目して、行動薬理学的解析ならびにマイクロダイアリシスによる神経化学的解析を用いて検討し、CRF およびその受容体の痛みの情動的側面への関与が示唆された。本年度は、不快情動生成を制御する神経機構を検討するために、NPY 神経情報伝達に着目して行動薬理学的解析を行い、dlBNST において NPY は CRF 神経情報伝達を介した不快情動生成を抑制することを新たに見出した。

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 予備的検討であるが、慢性疼痛患者は報酬予測による動機付け処理に寄与する腹側線条体の賦活が弱い傾向が見られた。これは慢性疼痛の神経基盤が腹側線条体での特にドパミン神経伝達に対して抑制的に影響することを示唆する結果である。痛みの重篤度との関連は、さらなる例数が必要であり、本検討では不明である。今回の報告では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。それにより、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ともに、慢性疼痛評価法としての有用性も示されることが期待される。

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 父親および母親ともに、ケアスコアが低いほど、また、過干渉スコアが高いほど、慢性疼痛を有する割合（有症率）が高かった。適切な養育とされている“ケアあり／過干渉なし”を基準として、年齢、教育歴、婚姻・経済的状況で調整した養育スタイルの各カテゴリーのオッズ比を検討した。男性におい

ては PBI のカテゴリーの違いによる有意なリスクの増減は認められなかった。女性において、有意なオッズ比の上昇を認めた養育スタイルは、父親の“ケアなし／過干渉あり”（オッズ比 2.1）であった。一般住民の慢性疼痛の発症において女性は被養育体験の影響を受けやすく、父親の娘本人の気持ちへの関心の低さと過干渉が重要な要因であることが示唆された。少子化時代を迎えている日本の養育環境では失敗を恐れる親の観点が優先され、こどもの希望に沿わない過干渉に陥りやすい。本研究で有意に慢性疼痛の有症率を上げていた“ケアなし／過干渉あり”の養育スタイルは、本研究の対象集団が養育を受けていた 40 年以上前の日本よりも、現代ではより広く一般化していると考えられる。将来を見据えた国民医療の観点で、慢性疼痛症状に対する医療への依存度に影響を与える自覚的重症感を減少させ QOL を上げていくために、情動の安定性に影響を与える両親の養育スタイルと慢性疼痛との関連についてさらなる研究が望まれる。

E. 結論

1. BNST 内ノルアドレナリン神経情報伝達の活性化により、嫌悪情動だけでなく不安情動も惹起されることを明らかとした。さらに、BNST 活性化による負情動生起が、神経障害性疼痛モデル動物において、痛みを増悪させる傾向が示された。
2. 前帯状回 (ACC) ならびに島皮質 (IC) において、慢性疼痛下での遺伝子発現変動を検討し、複数の慢性疼痛マーカー候補分子を見出した。今後、再現性の確認と、候補分子の絞り込み、行動薬理学的解析による当該遺伝子の機能解析を行うことで、慢性疼痛評価に役立つ分子マーカーを同定することができると考えられる。

3. 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 fMRI によって測定する方法論を確立した。さらに、慢性疼痛患者における fMRI、気分・痛み・生活の質について測定を開始した。今後症例の集積後に統計解析することにより、慢性疼痛患者の腹側線条体機能と症状・QOL との関連が明らかになることが期待される。
4. 一般人口において、幼少期の両親の低いケアと高い過干渉といった養育態度が成人後の慢性疼痛発症に影響していた。特に、父親の養育スタイルも影響することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

南雅文（北海道大学）

- 1) Naka T, Ide S, Nakako T, Hirata M, Majima Y, Deyama S, Takeda H, Yoshioka M, Minami M: Activation of β -adrenoceptors in the bed nucleus of the stria terminalis induces food intake reduction and anxiety-like behaviors. *Neuropharmacology* **67**: 326-330 (2013)
- 2) Ide S, Hara T, Ohno A, Tamano R, Koseki K, Naka T, Maruyama C, Kaneda K, Yoshioka M, Minami M: Opposing roles of corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis in the negative affective component of pain in rats. *J Neurosci.* **33**: 5881-5894 (2013)

井上 猛（北海道大学）

- 1) Takamura N, Masuda T, Inoue T, Nakagawa S, Koyama T: The effects of the co-administration of the α 1-adrenoreceptor antagonist prazosin on the anxiolytic effect of citalopram in

conditioned fear stress in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **39**:107-111 (2012)

- 2) Tha KK, Terae S, Nakagawa S, Inoue T, Kitagawa N, Kako Y, Nakato Y, Popy KA, N, Zaitu Y, Yoshida D, Ito YM, Miyamoto T, Koyama T, Shirato H: Impaired integrity of the brain parenchyma in non-geriatric patients with major depressive disorder revealed by diffusion tensor imaging. *Psychiatry Research*: in press.
- 3) Inoue T, Tanaka T, Nakagawa S, Nakato Y, Kameyama R, Boku S, Toda H, Kurita T, Koyama T: Utility and limitations of PHQ-9 in a clinic specializing in psychiatric care. *BMC Psychiatry* **12(1)**:73, (2012)

2. 学会および研究会発表

南雅文（北海道大学）

- 1) 眞嶋悠幾、中誠則、里吉寛、井手聡一郎、南雅文: 不安様行動および疼痛感受性における分界条床核内ノルアドレナリン神経伝達の役割. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム, 神戸, 2012.9.1
- 2) 小関加奈、原大樹、井手聡一郎、大野篤志、玉野竜太、圓山智嘉史、中誠則、出山諭司、金田勝幸、吉岡充弘、南雅文: 痛みによる不快情動生成における背外側分界条床核内コルチコトロピン放出因子の関与役割. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム, 神戸, 2012.9.1
- 3) 井手聡一郎、山本隆太、武田宏司、南雅文: 内臓侵害刺激による分界条床核内ノルアドレナリン遊離とストレス負荷の影響. 第 32 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 東京, 2012.9.15-16
- 4) 原大樹、井手聡一郎、大野篤志、玉野竜太、小関加奈、中誠則、圓山智嘉史、金田勝幸、吉岡充弘、南雅文: 痛みによる不快情動生成における背外側分界条床核内コルチコトロピン放出因子の関与. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 2012.9.18-21
- 5) Deyama S, Naka T, Ide S, Nakako T, Hirata M, Majima Y, Takeda H, Yoshioka M,

Minami M: Effects of β -adrenoceptor activation within the bed nucleus of the stria terminalis on food intake and anxiety-like behaviors. Neuroscience 2012, New Orleans, 2012.10.13-17

- 6) 井手聡一郎、山本隆太、武田宏司、南雅文: 脳腸相関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関与. 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 宇都宮, 2012.10.18-20
- 7) 原大樹,井手聡一郎,大野篤志,玉野竜太,小関加奈,圓山智嘉史, 中誠則, 金田勝幸,吉岡充弘, 南雅文: 痛みによる不快情動生成における背外側分界条床核内コルチコトロピン放出因子の役割. 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 宇都宮, 2012.10.18-20
- 8) 圓山智嘉史、井手聡一郎、大野篤志、玉野竜太、小関加奈、中誠則、出山諭司、吉岡充弘、南雅文: 痛みによる不快情動生成における背外側分界条床核内神経ペプチド作動性情報伝達の役割. 第 86 回日本薬理学会年会, 福岡, 2013.3.21-23
- 9) 井手聡一郎、大野篤志、玉野竜太、小関加奈、中誠則、圓山智嘉史、出山諭司、吉岡充弘、南雅文: 背外側分界条床核内神経ペプチド作動性情報伝達の痛み誘発不快情動生成における役割. 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 2013.3.28-30

細井昌子 (九州大学)

- 1) 細井昌子: 慢性疼痛と失感情症: 久山町疫学研究から痛みの臨床まで. 第 4 回山口県痛みを考える会, 山口, 2012. 4. 5
- 2) 細井昌子: 痛みと失感情症: 久山町疫学研究から痛み臨床まで. 第 42 回熊本ペインクリニック研究会, 熊本, 2012. 5.11
- 3) 安野広三, 細井昌子, 柴田舞欧, 岩城理恵, 河田 浩, 澤本良子, 久保千春, 育体験と中年期以降の慢性疼痛の関連. 第 53 回日本心身医学会総会, 鹿児島, 2012. 5.26
- 4) 岩城理恵, 細井昌子, 安野広三, 柴田舞欧, 河田 浩, 久保千春, 須藤信行: 養育と慢性疼痛[2]: 心療内科外来患者における父親の

過干渉と破局化および痛みのアウトカム. 第 53 回日本心身医学会総会, 鹿児島, 2012. 5.26

- 5) 河田 浩, 柴田舞欧, 細井昌子, 安野広三, 岩城理恵, 澤本良子, 久保千春, 清原 裕, 須藤信行: 養育と慢性疼痛[3]: 一般住民と心療内科患者の比較. 第 53 回日本心身医学会総会, 鹿児島, 2012. 5.26
- 6) 細井昌子: 失感情症と慢性疼痛罹患のリスク: 心療内科臨床から久山町疫学研究まで. 第 53 回日本心身医学会総会 (教育講演), 鹿児島, 2012. 5.26
- 7) 細井昌子: 痛みの医療で麻酔科医に何が求められているか(委員会企画シンポジウム麻酔科医, 本当に必要?: 集中治療, ペインクリニック, 緩和医療). 第 59 回日本麻酔科学会, 神戸, 2012. 6. 7
- 8) 細井昌子: 慢性疼痛に対する心身医学的アプローチ～危険因子&治療対象としての失感情症を中心に～, 第 29 回精神身体合併症研究会, 福岡, 2012. 7. 4
- 9) Shibata M, Hosoi M, Ninomiya T, Anno K, Makino S, Iwaki R, Ymashiro K, Yoshida T, Kiyohara Y, Sudo N: Alexithymic tendency exacerbates the risk of chronic pain in a general population: the Hisayama Study. International Association for the Study of Pain (IASP) Milan 2012, 14th world congress on pain, イタリア ミラノ, 2012. 8.30
- 10) Anno K, Shibata M, Ninomiya T, Iwaki R, Kawata H, Sawamoto R, Kubo C, Kiyohara Y, Sudo N, Hosoi M: The Relationship between perceived parenting style in childhood and prevalence of chronic pain in adulthood in a general Japanese population. International Association for the Study of Pain (IASP) Milan 2012, 14th world congress on pain, イタリア ミラノ, 2012. 8.31
- 11) Kawata K, Shibata M, Anno K, Iwaki R, Ninomiya T, Sawamoto R, Kubo C, Kiyohara Y, Sudo N, Hosoi M: Perceived parenting style in childhood and chronic pain: comparison between general inhabitants and psychosomatic chronic pain patients in the

university hospital. International Association for the Study of Pain (IASP) Milan 2012, 14th world congress on pain, イタリア ミラノ, 2012. 8.31

- 12) 細井昌子: 第7回身体疾患とうつ病研究会学術講演会(特別講演), 福岡, 2012. 9.14
- 13) 早木千絵, 細井昌子, 富岡光直, 安野広三, 久保千春, 須藤信行: 失感情症を伴う疼痛性障害に対する自律訓練法の効果: 箱庭療法との相互作用を活かした多面的治療の一例. 日本自律訓練学会第35回大会, 東京, 2012. 9.30
- 14) 細井昌子: 慢性疼痛の心身医療: サイエンスとアートの融合を目指して. 第3回運動器疾患の慢性疼痛を考える会(特別講演), 名古屋, 2012.10.20
- 15) 細井昌子: 慢性の痛み愁訴における失感情症の役割: 罹患リスクと心身医学的治療対象の観点から. 第2回宮城運動器の痛みを考える会(特別講演), 仙台, 2012.11.22
- 16) 安野広三, 細井昌子ほか: 慢性疼痛に対するマインドフルネスに基づく治療介入の有用性—当科における経験をもとに—. 第52回日本心身医学会九州地方会(シンポジウム), 福岡, 2013. 2. 9
- 17) 樋口友理, 井坂吉宏, 細井昌子, 富岡光直, 安野広三, 勝賀瀬なゆは, 河田 浩, 須藤信行: 非言語的アプローチの導入が治療の転機となった身体表現性障害の一例. 第52回日本心身医学会九州地方会, 福岡, 2013. 2. 9
- 18) 勝賀瀬なゆは, 柴田舞欧, 細井昌子, 安野広三, 岩城理恵, 富岡光直, 清原 裕, 須藤信行: 一般住民における失感情症: 筋肉痛の有症率および痛みの程度への影響. 第52回日本心身医学会九州地方会, 福岡, 2013. 2.10
- 19) 江藤紗奈美, 細井昌子, 安野広三, 富岡光直, 樋口友理, 勝賀瀬なゆは, 河田 浩, 須藤信行: 段階的心身医学的治療が有用であった線維筋痛症の一例. 第52回日本心身医学会九州地方会, 福岡, 2013. 2.10
- 20) 江藤紗奈美, 安野広三, 富岡光直, 河田 浩, 須藤信行, 細井昌子: 思春期における線維筋痛症に対する段階的心身医学療法の一例—否定的感情と過活動へのアプローチ—. 第42回日本慢性疼痛学会, 東京, 2013. 2.22
- 21) 安野広三, 細井昌子, 岩城理恵, 柴田舞欧, 河田 浩, 須藤信行: 慢性疼痛に対するマインドフルネスに基づく治療介入の有用性—痛みの破局化に対する効果を中心に—. 第42回日本慢性疼痛学会, 東京, 2013. 2.22
- 22) 早木千絵, 富岡光直, 安野広三, 岩城理恵, 河田 浩, 須藤信行, 細井昌子: 失感情症を伴う疼痛性障害の段階的心身医学療法: 治療導入時における自律訓練法・箱庭療法併用の有用性. 第42回日本慢性疼痛学会, 東京, 2013. 2.22
- 23) 富田吉敏, 細井昌子, 安藤哲也, 石川俊男: 夫婦間葛藤への対処に社会的サポートの活用が有効であった帯状疱疹後神経痛の一例. 第42回日本慢性疼痛学会, 東京, 2013. 2.22
- 24) 田代雅文, 山田信一, 山本洋介, 伊達 久, 細井昌子: 慢性疼痛の心身医学的診療: 治療的対話の工夫. 第42回日本慢性疼痛学会(ワークショップ), 東京, 2013. 2.22
- 25) 柴田舞欧, 細井昌子, 安野広三, 牧野聖子, 山城康嗣, 岩城理恵, 義田俊之, 久保千春, 清原 裕, 須藤信行: 地域一般住民においてアレキシサイミア傾向は慢性疼痛の増加に関連する—久山町疫学研究第2報—. 第42回日本慢性疼痛学会, 東京, 2013. 2.23
- 26) 細井昌子: 心と難治性疼痛—心身医学の立場から—. 第86回日本薬理学会, 福岡(市民公開講座, 講演), 2013. 3.23

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、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）に着目した検討を行った。BNST 内ノルアドレナリン神経情報伝達の活性化により不安が惹起されることを明らかにした。また、BNST 内ノルアドレナリン神経情報伝達活性化による負情動惹起は、神経障害性疼痛モデル動物において機械的侵害刺激に対する閾値を低下させる傾向を示した。今後は、神経障害性疼痛モデル動物における情動および神経情報伝達の変化を、種々の行動薬理的試験法や *in vivo* マイクロダイアリス法を用いて明らかにしていく。

A. 研究目的

痛みによる不安、抑うつ、嫌悪などの負情動は、生体警告系としての痛みの生理的役割に重要であるが、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、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、BNST 内ノルアドレナリン神経情報伝達の活性化により生じる負情動に関して検討すると共に、負情動が神経障害性疼痛モデル動物における疼痛関連行動に与える影響を検討した。

B. 研究方法

当研究室ではこれまでに、BNST 腹側領域（vBNST）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、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 内局所微量投与が、不安様行動に与える影響を検討すると共に、vBNST 内 isoproterenol 処置による負情動惹起が神経障害性疼痛モデル動物における侵害受容反応に及ぼす影響を検討した。

1. vBNST 内 isoproterenol 投与による不安様行動惹起

実験には雄性 Sprague-Dawley (SD) 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埋込手術を行い、少なくとも 5 日間の回復期間において、行動薬理試験に用いた。Isoproterenol は用時 PBS に溶解し、両側 vBNST に投与した。

不安様行動の評価試験として、高架式十字迷路 (EPM) 試験を行った。EPM 試験には、壁のない open arm (10×50 cm) と壁に囲まれた closed arm (10×50 cm, 壁の高さ 45 cm) が中央の platform (10×10 cm) を挟んで十字型に交差し、地面から 50 cm の高さに設置されている装置を用いた。照明は、platform において 15-20 lux になるように調節した。本実験では、open arm に頭を向けて platform にラットを置き、10 分間装置の上を自由に探索させた。ラットは通常、壁のある場所、すなわち closed arm を好むが、探索行動のため open arm にも行く。不安が亢進している場合には、open arm への探索は少なくなる。open arm の滞在時間および侵入回数を指標として不安レベルの評価を行った。動物の行動はカメラによって観察し、コンピューターによって自動解析 (Actimetrics, Wilmette, IL) した。

2. 神経障害性疼痛モデルラットにおける vBNST 内 isoproterenol 投与の影響

実験には雄性 SD 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埋込手術を行い、少なくとも 5 日間の回復期間をおいた後、脊髄神経部分切結紮手術を行った (Chung model)。神経障害性疼痛の評価は von Frey 試験を用い、脊髄神経部分切結紮手術の前日、および 4 日後に行った。脊髄神経部分切結紮手術の 7 日後に isoproterenol を両側 vBNST に投与し、von Frey 試験を行った。

von Frey 試験には、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 5 分後に測定を開始した。

3. 慢性疼痛が側坐核ドパミン遊離に及ぼす影響検討のための予備的実験

実験には雄性 BALB/c マウスを使用した。8 週齢の時点で、マウス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側坐核 shell 領域の 1.0 mm 上方に留まるように埋込手術を行った。術後 1~2 日後、実験開始 16 時間前から絶水食を行い、実験当日、マイクロダイアリシス用透析プローブを挿入し、リングル液を流速 1.0 μl/min で灌流した。なお、灌流路には可動式アームに装着したシーベルを用い、実験中、マウスが自由にチャンバー内を行動できるようにした。透析液は 5 分毎に回収し、透析液中のドパミン含量を電気化学検出器を用いて定量した。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、側坐核 shell 内への刺入が確認された個体のみデータ解析に用いた。

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. vBNST 内 isoproterenol 投与による不安様行動惹起

vBNST 内 isoproterenol 投与が、不安様行動に与える影響を、EPM 試験を用いて検討した (図 1)。不安様行動の指標である open arm 滞在時間は、isoproterenol の用量依存的に減少し、高用量 (30 nmol/side) 投与群においては vehicle 投与群と比較して有意な減少が見られた。

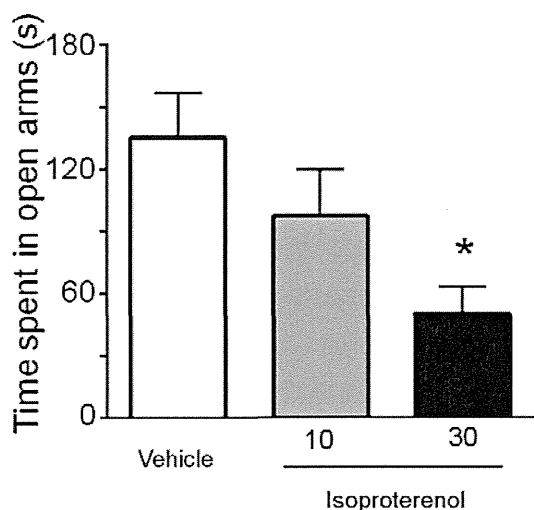


図 1 高架式十字迷路 (EPM) 試験の解析結果 (1) vBNST 内 isoproterenol 投与ラットにおける不安様行動の発現に関して解析した。数値は投与用量 (nmol/side)。 (n = 9-15, * P < 0.05)

次に、vBNST 内 isoproterenol 投与による不安惹起がβアドレナリン受容体を介したものであることを確認するため、β受容体アンタゴニスト timolol を用いて実験を行った。Timolol 30 nmol を同時投与した群においては、isoproterenol 投与による open arm 滞在時間の減

少が有意に抑制された (図 2)。一方、timolol 30 nmol 単独投与群では、vehicle 投与群と比較して有意な変化は見られなかった。

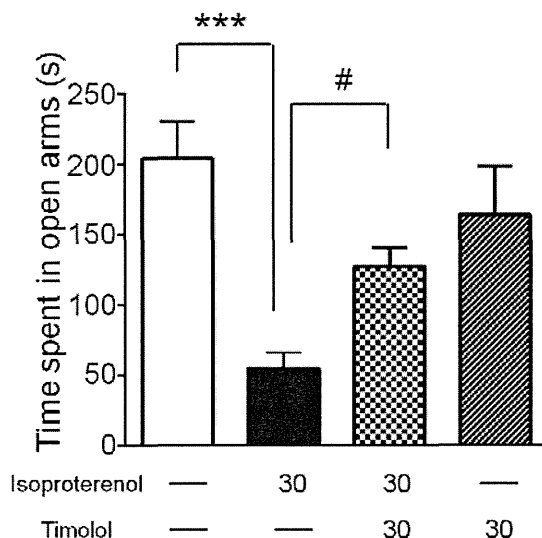


図 2 高架式十字迷路 (EPM) 試験の解析結果 (2) vBNST 内 isoproterenol 投与による不安様行動惹起に対する timolol 同時投与の効果に関して解析した。数値は投与用量 (nmol/side)。 (n = 7-11, *** P < 0.001 vs vehicle, # P < 0.05 vs isoproterenol alone)

2. 神経障害性疼痛モデルラットにおける vBNST 内 isoproterenol 投与の影響

負情動が神経障害性疼痛モデル動物における疼痛関連行動に与える影響を、術後 7 日目の Chung モデルラットに対して、負情動が惹起されることが確認された vBNST 内 isoproterenol (30 nmol/side) 投与を行った後に、von Frey 試験を用いることで検討を行った。Chung モデルラットにおいて、isoproterenol 処置群と vehicle 群の間に有意な差は見られなかったものの、機械的刺激に対する疼痛閾値が低下する傾向が、神経障害側 (同側: ipsilateral) ならびに反対側 (contralateral) において確認された (図 3)。

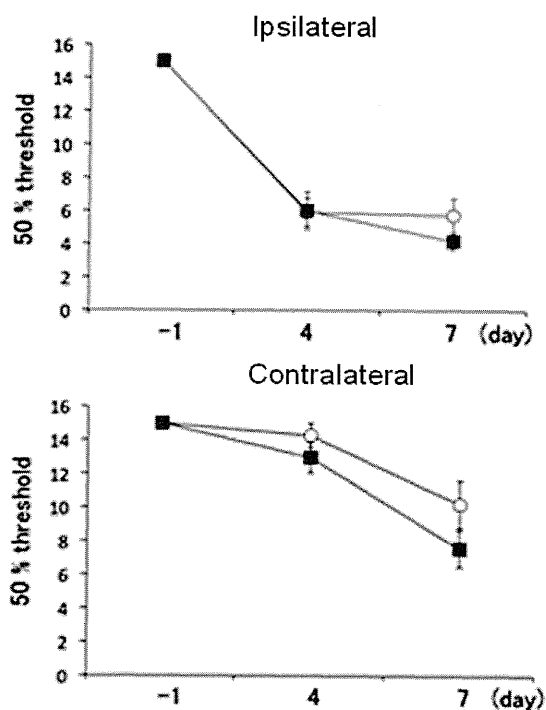


図3 von Frey 試験の解析結果

神経障害性モデルラットにおいて、vBNST 内 isoproterenol 投与が機械的刺激に対する疼痛閾値に与える影響について解析した。(n = 15, vehicle : open circles, 30 nmol isoproterenol : closed squares)

3. 慢性疼痛が側坐核ドパミン遊離に及ぼす影響検討のための予備的実験

神経障害性疼痛モデル動物において、負情動の惹起が機械的侵害刺激に対する応答を増悪させる可能性が示されたが、神経障害性モデル動物における自発痛およびそれにより惹起される情動変化に関しては、未だ研究が進んでいない。そこで、神経障害性疼痛モデル動物における抑うつ様症状を評価するため、報酬刺激提示時の快情動の減弱（無快感：アンヘドニア）を、側坐核内ドパミン遊離量を指標とすることで、定量的に解析できないかと考え、本年度は先ず、野生型マウスを用いて予備的検討を行った。報酬刺激として30%スクロース水を提示したところ、水を提示した群と比較し有意な側坐核内ドパミン遊離量上昇が確認された（図4）。

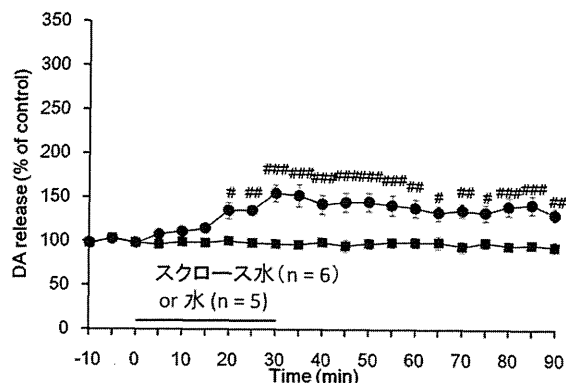


図4 In vivo マイクロダイアリシス試験の解析結果
報酬刺激(30%スクロース水)提示による側坐核 shell 内でのドパミン遊離量の変化に関して解析した。
(##### P < 0.05, 0.01, 0.001 vs 水提示群、closed circles: スクロース提示群、closed squares: 水提示群)

D. 考察

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、BNST 内ノルアドレナリン神経情報伝達の活性化により生じる負情動について検討した結果、高架式十字迷路試験において不安様行動の指標となる open arm 滞在時間の減少が確認され、嫌悪に加え不安も惹起されることが明らかとなった。さらに、これらの負情動が神経障害性疼痛モデル動物における疼痛関連行動に与える影響を検討したところ、Chung model ラットにおいて、機械的侵害刺激に対する疼痛閾値が、負情動生成により低下する、すなわち痛みが増悪する傾向が見られた。これらの結果は、慢性疼痛下において負情動の生起が痛みの増悪を引き起こしている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可能性が考えられる。

本研究では、神経障害性疼痛モデルラットにおいて、負情動の生起が痛みを増悪する傾向は示されたものの、有意な変化ではなかった。これは、神経障害性疼痛モデルラットにおける機

械的侵害刺激に対する疼痛閾値がコントロール群（薬物無処置群）においても非常に低下しており、それ以上の低下が起こりにくい可能性が考えられる。一方、神経障害性疼痛モデルラットにおける自発痛およびそれにより惹起される情動変化に関しては、ほとんど研究が進んでいない。来年度の研究では神経障害性疼痛モデル動物における自発痛により誘発されると考えられる抑うつ様状態を評価する目的で、報酬刺激提示時の快情動の減弱（アンヘドニア）を、側坐核内におけるドーパミン遊離量を指標として検討する予定である。

E. 結論

BNST 内ノルアドレナリン神経情報伝達の活性化により、嫌悪情動だけでなく不安情動も惹起されることを明らかとした。さらに、BNST 活性化による負情動生起が、神経障害性疼痛モデル動物において、痛みを増悪させる傾向が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naka T, Ide S, Nakako T, Hirata M, Majima Y, Deyama S, Takeda H, Yoshioka M, Minami M: Activation of β -adrenoceptors in the bed nucleus of the stria terminalis induces food intake reduction and anxiety-like behaviors. *Neuropharmacology* **67**: 326-330 (2013)

2. 学会および研究会発表

- 1) 眞嶋悠幾、中誠則、里吉寛、井手聡一郎、南雅文: 不安様行動および疼痛感受性における分界条床核内ノルアドレナリン神経伝達

の役割. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム, 神戸, 2012.9.1

- 2) 井手聡一郎、山本隆太、武田宏司、南雅文: 内臓侵害刺激による分界条床核内ノルアドレナリン遊離とストレス負荷の影響. 第 32 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 東京, 2012.9.15-16
- 3) Deyama S, Naka T, Ide S, Nakako T, Hirata M, Majima Y, Takeda H, Yoshioka M, Minami M: Effects of β -adrenoceptor activation within the bed nucleus of the stria terminalis on food intake and anxiety-like behaviors. Neuroscience 2012, New Orleans, 2012.10.13-17
- 4) 井手聡一郎、山本隆太、武田宏司、南雅文: 脳腸相関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関与. 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 宇都宮, 2012.10.18-20

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

今年度の研究では、痛みによる負情動生成に関与する脳領域として前帯状回（ACC）ならびに島皮質（IC）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、ACC で 48 遺伝子、IC で 88 遺伝子を、慢性疼痛マーカー候補分子群として見出した。さらに、昨年度検討した分界条床核（BNST）における結果も考慮し、候補分子の絞り込みを行った。今後、定量的 RT-PCR 解析によって遺伝子発現変動の確認を行うことで、慢性疼痛評価法に役立つ分子マーカーを同定することを目指す。

A. 研究目的

痛みによる不安、抑うつ、嫌悪などの負情動は、生体警告系としての痛みの生理的役割に重要であるが、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 Gene chip assay 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。本年度は情動調節に関与することが知られている前帯状回（ACC）ならびに島皮質（IC）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抽出するとともに、高架式十字迷路（EPM）試験を用いて、神経障害性疼痛モデルにおける不安様症状の発現を確認した後に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。ネンブター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。ACC および IC を含むそれぞれ連続した 2 枚のスライスから、右側（神経結紮を行った反対側）の領域を、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、一晩 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 を抽出・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群と 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 を鋳型として逆転写反応により得た cDNA 溶液を用いた。定量的 PCR 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 増幅が起こっている領域で任意に Ct 値を定め、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用いてサンプルの cDNA 相対値を算出した。内標準には $\beta\text{-actin}$ 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。

EPM 試験には、壁のない open arm (10 \times 50 cm) と壁に囲まれた closed arm (10 \times 50 cm, 壁の高さ 45 cm) が中央の platform (10 \times 10 cm) を挟んで十字型に交差して、地面から 50 cm の高さに設置されている装置を用いた。照明は、platform において 15-20 lux になるように調節した。本実験では、open arm に頭を向けて platform にラットを置き、10 分間装置の上を自由に探索させた。ラットは通常、壁のある場所、すなわち closed arm を好むが、探索行動のため open arm にも行く。不安が亢進している場合には、open arm への探索は少なくなる。open arm の滞在時間および侵入回数を指標として不安レベルの評価を行った。動物の行動はカメラによって観察し、コンピューターによって自動解析 (Actimetrics, Wilmette, IL) した。

背外側 BNST(dlBNST)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、dlBNST 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 dlBNST の 1.5 mm 上方 (bregma より AP; -0.3 mm , L; $\pm 1.6\text{ mm}$, 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。dlBNST 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 μl の容量を流速 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ で投与した。実験終了後、投与部位の確認を行い、両側 dlBNST 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の行動薬理学的評価には、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