

201323001A

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25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26（2014）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25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26（2014）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 -----	11
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	
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 -----	23
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 -----	25
細井昌子	
I I I . 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	31
I V . 研究成果の刊行物・別刷 -----	33

# 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、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した。In vivo マイクロダイアリス法を用いた検討により、対照群において報酬刺激（30%スクロース水）提示時に観察される有意な側坐核内ドパミン遊離量上昇が、神経障害性疼痛モデル動物においては消失していることを明らかとした。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マウスの分界条床核における定量的 RT-PCR 解析によって遺伝子発現変動の確認を行うと共に、慢性軽度ストレス負荷モデル（Chronic mild stress; CMS）動物の分界条床核における遺伝子発現変化と比較検討した。腹側分界条床核における  $\beta_1$  ノルアドレナリン受容体遺伝子および 5-HT<sub>2A</sub> セロトニン受容体遺伝子が神経障害性疼痛モデルマウスで有意に発現増加することを見出した。これら受容体分子が慢性疼痛評価に役立つマーカー分子となる可能性が示された。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では、慢性疼痛患者の抑うつ症状と感情気質について検討し、慢性疼痛患者では不安気質と抑うつ気質が心理的素因であることが示唆された。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では、九州大学心療内科外来初診の慢性疼痛患者 65 名に、痛みの強度、痛みによる生活障害尺度 Pain Disability Assessment Scale (PDAS)、Parental Bonding Instrument (PBI)、Pain Catastrophizing Scale (PCS)の質問紙調査を行った。PBI の平均値 (±SD) は、母親のケア 24.1 (±8.9)、過干渉 12.6 (±8.3)、父親のケア 19.7 (±8.8)、過干渉 12.3 (±7.4) であった。父親の過干渉のスコアは、痛みの強さ、生活障害、破局化と有意な正相関がみられた。また、回帰分析でも、父親の過干渉のみが慢性疼痛の痛みの強さや生活障害、破局化に関連していた。以上より、被養育体験が慢性疼痛の病態に関連する可能性が示唆された。

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・准教授  
細井 昌子・九州大学病院・講師

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

させるといふ悪循環を生じさせ、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 実験には雄性SDラットを使用した。6週齢の時点で、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、および切結紮手術後7日毎に28日後まで行った。また、対照群(Sham 施術群)として脊髄神経の露出までを行い、切結紮しない群を作製し解析に用いた。

神経障害性疼痛の評価をvon Frey試験を用いて行い、施術28日後に機械的痛覚過敏が持続している個体を、慢性疼痛モデルラットとして用いた。施術28日後のvon Frey試験後に、マイクロダイアリシス用ガイドカニューレ埋込手術を行った。術後2日目、マイクロダイアリシス開始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、リンゲル液を流速1.0  $\mu\text{l}/\text{min}$ で灌流した。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。

2) 慢性疼痛マーカーとなる情動関連分子の探索 動物種による情動関連遺伝子発現変化の相違の有無を検討するため、神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、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と共に、慢性軽度ストレス負荷モデル(Chronic mild stress; CMS)動物の分界条床核における遺伝子発現変化を比較検討することにより、慢性疼痛に特異的なマーカー分子を同定することを目指して研究を行った。実験には体重18-28gの雄性BALB/cマウスを用いた。神経障害性疼痛モデルは、6週齢の時点で坐骨神経に由来する総腓骨神経、脛骨神経、腓腹神経を露出させ、

総腓骨神経と脛骨神経を結紮し、末梢側を切断することにより作製した (Sapared nerve injury model : SNI モデル)。神経の露出まで行った群を Sham 群とした。SNI 施術の前日、および術後 1 週間ごとに 3 週間後までの計 4 回 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、尾懸垂試験 (TST : Tail suspension test) を用いて、神経障害性疼痛モデルにおける抑うつ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。CMS モデルは、6 週齢の時点から、軽度ストレスを、マウスに予測できないようランダムな順序で 5 週間連続負荷した。ストレス負荷終了後、TST を用いて、CMS モデルにおける抑うつ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。両側の腹側 BNST (vBNST) および背外側 BNST (dBNST) 領域を切り出し、液体窒素で急速冷凍後  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。RNA サンプルの調整は、3 個体の脳組織を 1 サンプルとしてまとめ、total RNA を抽出・精製し、定量的 RT-PCR 解析を行った。

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** 現在および過去に精神疾患に罹患したことがなく、うつ症状も認められな

い健常者 61 名 (男性 51 名、女性 10 名)、北海道大学病院精神科を初診した慢性疼痛患者 5 名 (男性 5 名、女性 0 名) と大うつ病性障害患者 70 名 (男性 21 名、女性 49 名) を対象とし、自記式質問紙による調査を施行した。感情気質を Temperament of Evaluation Memphis, Pisa, Paris and San Diego- Autoquestionnaire version (TEMPS-A) 短縮版により、現在の抑うつ症状の重症度を Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) 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** 2011 年 2 月～10 月に九州大学病院心療内科を初診した慢性疼痛患者 65 名 (男性 23 名、女性 42 名)、年齢  $46 \pm 15.8$  歳、疼痛期間の平均  $47 \pm 52.3$  カ月を対象として、以下の項目を調査した。

- ・痛みの強度 : 痛み VAS
  - ・痛みによる生活障害尺度 : Pain Disability Assessment Scale (PDAS)
  - ・痛みの破局化 : Pain Catastrophizing Scale (PCS)
  - ・養育 : Parental Bonding Instrument (PBI)
- 解析は単相関分析および重回帰分析 (独立変数 = PBI、従属変数 = 痛みのアウトカム) を使用した。

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、個人情報の保護に十分留意して行った。なお、質問紙検査については、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 神経障害性疼痛モデル動物における抑うつ様状態を定量的に評価する目的で、Chung モデルラットを用いて、報酬刺激提示時の快情動の減弱（アンヘドニア）を、報酬刺激提示時の側坐核内ドパミン遊離量の変化を指標として、in vivo マイクロダイアリシス試験により検討した。Chung モデルラットにおいては、施術 28 日後においても、機械的刺激に対する疼痛閾値の有意な低下が、神経障害側において確認された。

Chung モデルラットに対して、報酬刺激として 30%スクロース水を 30 分間提示し、側坐核内ドパミン遊離量の変化を解析したところ、Sham 施術群では報酬刺激提示前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が、Chung モデルラットにおいては有意なドパミン遊離量の変化は観察されなかった。また、30%スクロース水提示時の摂水量は両群間で有意な差が見られなかった。

2) 慢性疼痛マーカーとなる情動関連分子の探索 不安や抑うつ、嫌悪に関与することが報告されている受容体およびそのリガンド遺伝子ならびにそれらのシグナル伝達パスウェイ関連分子の遺伝子に関して、dlBNST ならびに vBNST より調製したサンプルを用いて定量的 RT-PCR により発現量変化を検討した。一昨年度の Gene chip assay において検討した dlBNST ならびに vBNST と、昨年度検討した前帯状回 (ACC) ならびに島皮質 (IC) の計 4 部位において発現変動が見られた遺伝子である、低分子量 G タンパク質 Ras ファミリー (RASD2)、Orphan 核内受容体 (NR4A3)、BDNF 受容体 (NTRK2)、ホーマータンパク質 (HOMER1)、アデノシン受容体 (ADORA2A)、ならびにシヌクレイン (SNCG) についても同様に定量的 RT-PCR により発現量変化を検討した。

vBNST 領域において、5-HT<sub>2A</sub> およびアドレナリン β<sub>1</sub> 受容体 mRNA 発現量の有意な増加が観察された。一方、昨年度までの神経因性疼痛モデルラットにおける検討において発現変動が見られた他の遺伝子に関しては、有意な変化は確認されなかった。

神経障害性疼痛モデルマウスを用いた解析と同じ遺伝子に関して、CMS モデルにおける遺伝子発現変化を、定量的 RT-PCR により検討した。CMS 群では、vBNST での CRF<sub>2</sub> 受容体および NR4A3 の mRNA 発現量が有意に増加し、dlBNST での PAC<sub>1</sub> 受容体 mRNA 発現量が有意に低下していた。また、dlBNST において NR4A3 の mRNA が増加 (P = 0.097)、5-HT<sub>1A</sub> 受容体の mRNA が減少 (P = 0.090) 傾向を示した。

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 PHQ-9 により評価した抑うつ症状得点は慢性疼痛患者群で健常群に比べて高い傾向がみられたが有意ではなかった。大うつ病性障害群の抑うつ症状得点は健常群に比べて有意に高かった。慢性疼痛患者群では、TEMPS-A の 5 気質のうち不安気質と抑うつ気質が有意に健常群よりも高かった。大うつ病性障害群では、5 気質のうち不安、抑うつ、循環気質得点が有意に健常群よりも高かった。しかし、慢性疼痛患者群は男性のみであり、健常群では男性が多く、MDD 群では女性が多かったため、性比の影響を考慮する必要があった。

そこで、性比の影響を排除するために、男性群のみで解析した。抑うつ症状得点は慢性疼痛患者群と大うつ病性障害群で健常群に比べて有意に高かった。大うつ病性障害患者では健常群よりも有意に抑うつ、循環気質が高く、発揚気質が低かった。慢性疼痛患者群の抑うつ、不安気質は健常群よりも有意に高かった。慢性疼痛患者群における不安気質は大うつ病性障害



群よりも有意に高かった。

**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** PBIの平均値(±SD)は、母親のケア 24.1(±8.9)、過干渉 12.6(±8.3)、父親のケア 19.7(±8.8)、過干渉 12.3(±7.4)であった。父親の過干渉のスコアは、痛みの強さ、生活障害、破局化と有意な正相関がみられた。母親でも同様の傾向は見られたが有意ではなかった。重回帰分析(性別、年齢で調整)により痛み関連スコアと養育因子との関連を解析したところ、性別、年齢で調整しても父親の過干渉スコアのみが、痛みの強さ(VAS)、生活障害(PDAS)、破局化(PCS)と有意な相関を示した。また、両親の養育スタイルが痛みの強さで13.4%、生活障害で18.9%、破局化で18.0%を説明することが明らかとなった。

#### D. 考察

**1) 慢性疼痛における情動の役割の研究** 神経障害性疼痛モデル動物における抑うつ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、側坐核におけるドーパミン遊離量を指標として検討した。神経障害性疼痛モデルラットにおいては、対照施術群で見られる報酬刺激提示時のドーパミン遊離量増加が消失しており、快情動が減弱していることが示唆された。本実験結果は、報酬課題時の腹側線条体神経活動が慢性疼痛患者で減弱するという検討結果と一致するものであり、慢性疼痛下での抑うつ状態、特にアンヘドニアの評価法として、実験動物での側坐核内ドーパミン遊離、ヒトでの腹側線条体神経活動計測の有用性を示すものと考えられる。

**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マーカー分子の同定を目的とし、神経障害性疼痛モデル動物と慢性軽度ストレス負荷モデル動物の分界条床核における遺伝子発現変化を定量的RT-PCR法を用いて比較検討した。両モデルとも抑うつ様行動の有意な増加が見られたものの、遺伝子発現変化については、一部遺伝子において異なることを明らかとした。腹側分界条床核における $\beta_1$ ノルアドレナリン受容体遺伝子および5-HT<sub>2A</sub>セロトニン受容体遺伝子の発現は、神経障害性疼痛モデル動物でのみ有意に増加していた。腹側分界条床核内におけるこれら受容体の発現変化が慢性疼痛マーカーとして有用であることが示唆された。一方、慢性軽度ストレス負荷モデル動物で有意な発現変化もしくはその変化の傾向が見られた遺伝子、腹側分界条床核におけるCRF<sub>2</sub>受容体とNR4A3遺伝子、ならびに背外側分界条床核におけるPAC<sub>1</sub>受容体、NR4A3、および5-HT<sub>1A</sub>受容体遺伝子に関しても、慢性疼痛との関連性は示されなかったものの、負情動との関連性については今後も検討すべき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** 慢性疼痛患者の感情気質について検討したが、同様の研究はこれまで報告がなく、本研究がはじめての報告である。うつ病、双極性障害では抑うつ、循環、不安、焦燥気質が健常群よりも強く認められることが報告されている。一方、本研究により慢性疼痛患者では健常群と比べて不安気質と抑うつ気質の傾向のみが有意に強く認められたことは、慢性疼痛患者とうつ病、双極性障害の相違点と共通点を示している。本研究の結果は不安気質と抑うつ気質が慢性疼痛出現の心理的機序の一つであることを示唆している。不安気質と抑うつ気質が慢性疼痛出現前から認められるか否

かについては今後前方視的なコホート研究による確認が必要である。

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 父親の過干渉と、痛みの強さ、痛みによる生活障害、破局化に関連がみられ、心療内科を受診する慢性疼痛患者では、父親の過干渉が痛みのアウトカムに影響を及ぼす可能性が示唆された。また、両親のケアおよび母親の過干渉は痛みのアウトカムと有意な関連が見られなかった。これは、心療内科患者群では、両親共に低ケアに偏った集団であるため、関連が出なかった可能性がある。実際平成23年度の我々の研究結果では、久山町一般住民と九州大学病院心療内科を受診した慢性疼痛患者難治例との比較において、一般住民群に比べて患者群では父親と母親ともに、ケアが低く、過干渉が高いという結果が得られている。したがって、慢性疼痛の重症度において両親のケアの重要性については否定できない。「両親ともにケアが低く、父親が過干渉」という養育スタイルを考えると、慢性疼痛の臨床でよく観察される「支配的な父親に母親も影響を受けて心理的余裕がなくなり、子どもへのケアが欠如してしまう」という養育環境を反映している可能性がある。

核家族化で地域との交流が少ない現代社会では、子どもは両親の養育スタイルの影響を直に受けやすく、適切な養育スタイルの環境整備が国民の慢性疼痛の予防という観点からますます重要となってくると思われる。また、近年の風潮で子育てにかかわる父親が増えることは望ましいことであるが、本人の気持ちをくんだ関わりである「ケア」と親の希望を子の押しつける「過干渉」とを区別して養育に関わっていくことが成人後の慢性疼痛の発症予防に重要となることが考えられた。

## E. 結論

1. 神経障害性疼痛モデルラットにおいて、対照施術群で見られる報酬刺激提示時の側坐核でのドーパミン遊離量増加が消失していることを明らかとした。
2. 神経障害性疼痛モデルマウスおよび慢性軽度ストレス負荷モデルマウスの分界条床核における遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR法を用いて比較検討し、慢性疼痛時に特異的に変動する慢性疼痛マーカー候補分子として、腹側分界条床核における  $\beta_1$  ノルアドレナリン受容体遺伝子および 5-HT<sub>2A</sub> セロトニン受容体遺伝子を見出した。これら受容体分子が慢性疼痛評価に役立つマーカー分子となる可能性が示された。
3. 不安気質と抑うつ気質が慢性疼痛患者の心理的素因であることが示唆された。
4. 心療内科を受診する慢性疼痛患者難治例では、父親の過干渉の養育スタイルが、痛みの強さ、生活障害、破局化といった痛み関連指標と関連していた。慢性疼痛難治例での父親や母親の養育スタイルは全般にケアが一般住民よりも低く、父親の過干渉が症状の重症度に差をつくるメカニズムが考えられる。慢性疼痛症状に対する医療への依存度に影響を与える慢性疼痛の自覚的重症感、生活障害、破局化を減少させ QOL を上げるために、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、生物心理社会的観点からのさらなる研究が望まれる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

井上猛（北海道大学）

- 1) Mitsui N, Asakura S, Shimizu Y, Fujii Y, Kako Y, Tanaka T, Oba K, Inoue T, Kusumi I: Temperament and character profiles of Japanese university students with depressive episodes and ideas of suicide or self-harm: a PHQ-9 screening study. *Compr Psychiatry* 54:1215-1221, 2013.
- 2) Nakai Y, Inoue T, Toda H, Toyomaki A, Nakato Y, Nakagawa S, Kitaichi Y, Kameyama R, Hayashishita Y, Wakatsuki Y, Oba K, Tanabe H, Kusumi I: The influence of childhood abuse, adult stressful life events and temperaments on depressive symptoms in the non-clinical general adult population. *J Affect Disord* 158:101-107, 2014.

細井昌子（九州大学）

- 1) 田代雅文、細井昌子. Trend&Topics 痛みを癒す テーマ①痛みのカウンセリング：受容を目指した治療的対話の創造. *Practice of Pain Management* Vol.4 No.3 pp.20-7, 2013
- 2) 細井昌子. 女丈夫症候群と慢性疼痛：ナラティブで見る日本人女性の危機. *心と社会* 44 巻 3 号 (No.153) pp.49-56, 2013
- 3) 細井昌子. 神経障害性疼痛を合併した慢性疼痛患者の心理と心身医学的アプローチ. *医学のあゆみ* Vol.247 No.4 pp.339-43, 2013
- 4) 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. *慢性疼痛* Vol.32 No.1 pp.79-87, 2013
- 5) 柴田舞欧, 安野広三, 細井昌子. 慢性疼痛を持つ患者に対する認知行動へのアプローチ. *Anet* Vol18 No1 pp.23-27, 2014

- 6) 細井昌子. 痛みの心身医学的診断の進め方：実存的苦悩の明確化のために(痛みの臨床 心身医療からのアプローチ) .*Modern Physician* Vol.34No.1 pp.13-17, 2014
- 7) Shibata M, Ninomiya T, Jensen MP, Anno K, Yonemoto K, Makino S, Iwaki R, Yamashiro K, Yoshida T, Imada Y, Kubo C, Kiyohara Y, Sudo N, Hosoi M.: Alexithymia is associated with greater risk of chronic pain and negative affect and with lower life satisfaction in a general population: the Hisayama Study. *PLoS One* 9: e90984, 2014.

### 2. 学会および研究会発表

南雅文（北海道大学）

- 1) 出山諭司、中誠則、井手聡一郎、仲子友和、平田美紀枝、眞嶋悠幾、武田宏司、吉岡充弘、南雅文: 腹側分界条床核内βアドレナリン受容体の活性化は摂食量減少と不安様行動を惹起する. *Neuro2013* (第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学学会大会・第23回日本神経回路学会大会), 京都, 2013.6.22
- 2) 眞嶋悠幾、井川ありさ、井手聡一郎、津田誠、井上和秀、南雅文: Chronic pain increases neurokinin 1 receptor mRNA expression in the bed nucleus of stria terminalis: Roles of neurokinin 1 receptor in the anxiety-like behavior. *Neuro2013* (第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学学会大会・第23回日本神経回路学会大会), 京都, 2013.6.22
- 3) 圓山智嘉史、井手聡一郎、原大樹、大野篤志、玉野竜太、小関加奈、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とニューロペプチド Y 神経情報伝達の相反的役割. 次世代を

担う創薬・医療薬理 シンポジウム 2013, 熊本, 2013.8.31

- 4) 井手聡一郎、原大樹、金田勝幸、南雅文: 背外側分界条床核におけるコルチコトロピン放出因子とニューロペプチド Y 神経情報伝達の電気生理学的解析. 第 23 回日本臨床精神薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同学会, 沖縄, 2013.10.24-26
- 5) 眞嶋悠幾、井川ありさ、井手聡一郎、南雅文: 慢性疼痛による分界条床核内 neurokinin 1 受容体 mRNA の発現増加: Neurokinin 1 受容体の不安様行動への関与. 第 23 回日本臨床精神薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同学会, 沖縄, 2013.10.24-26
- 6) 小関加奈、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、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とニューロペプチド Y 情報伝達の役割. 第 23 回日本臨床精神薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同学会, 沖縄, 2013.10.24-26
- 7) Deyama S, Ide S, Ohno A, Tamano R, Koseki K, Naka T, Maruyama C, 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. Neuroscience2013 (SfN 43rd Annual Meeting), San Diego, 2013.11.9-13
- 8) Minami M., Hara T, Ide S, Kaneda K: Opposing effects of corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y on neuronal excitability in the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis. Neuroscience2013 (SfN 43rd Annual Meeting), San Diego, 2013.11.9-13
- 9) 井手聡一郎、金田勝幸、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の役割. 日本薬学会 第 134 年会, 熊本, 2014.3.28-30

#### 井上猛 (北海道大学)

- 1) Nakai Y, Inoue T., Toyomaki A, Toda H, Yasuya Nakato Y, Nakagawa S, Kitaichi Y, Kameyama R, Hayashishita Y, Kusumi I. The Influence of childhood stress, life events and temperament on depression in general adults. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 2013.6.25.
- 2) 中井幸衛、井上 猛、豊巻敦人、戸田裕之、中川 伸、仲唐安哉、北市雄士、林下善行、若槻 百美、久住一郎: 不安に対する子供の時のストレス、気質、成人期ライフイベントの影響. 第 6 回日本不安障害学会学術大会、東京、2014.2.1.

#### 細井昌子 (九州大学)

- 1) 細井昌子: 慢性疼痛と過活動のスクリーンセイバー仮説、心身医療の考え方 (心と難治性疼痛フォーラム)、岐阜大学、2013.4.18
- 2) 細井昌子: 慢性疼痛患者における疲労感: 自律神経機能と機能性身体症候群の観点から. 第 9 回日本疲労学会総会・学術集会 シンポジウム II 「機能性身体症候群…慢性疲労症候群理解のために…」、秋田、2013.6.7
- 3) 細井昌子: 慢性疼痛の心身医学: 一般臨床における Social pain への対応 (ランチオンセミナー 講演). 第 58 回日本透析医学会学術集会・総会、福岡、2013.6.23
- 4) 細井昌子: 慢性痛のチーム医療: 心療内科の視点から(シンポジウム 慢性痛医療の最前線—チーム医療の各領域から—). 第 18 回日本ペインリハビリテーション学会、福岡、2013.9.1.
- 5) Hosoi M., Shibata M, Anno K, Kawata H, Iwaki

R, Sawamoto R, Ninomiya T, Kiyohara Y, Kubo C, Sudo N: The perceived parenting style in childhood and chronic pain in adulthood: From the general population to psychosomatic patients. ICPM2013 The 22nd World Congress on Psychosomatic Medicine, Portugal (Lisbon) 、2013.9.13

- 6) 細井昌子: シンポジウム 3 「慢性疼痛への全人的アプローチ」「慢性疼痛と過活動: スクリーンセイバー仮説と自律神経機能の観点から」. 日本線維筋痛症学会第 5 回学術集会、横浜、2013.10.6
- 7) 細井昌子: 感情の気づきや自己主張と慢性疼痛: 久山町研究から心療内科臨床まで、第 3 回 愛媛痛みと医療を考える会、松山、2013. 11. 14
- 8) 細井昌子: 慢性疼痛と養育スタイル: 痛み苦悩の本質とは? 第 10 回 宮崎ペインカンファランス、宮崎、2013.11.15
- 9) 細井昌子: 慢性疼痛と養育スタイル: Social Pain への対応の重要性、第 16 回熊本心身医学懇談会講演会、熊本、2014. 2. 12
- 10) 細井昌子: 慢性疼痛と失感情症. 第 43 回日本慢性疼痛学会 慢性痛の心理アセスメントワークショップ「慢性疼痛の治療的心理診断面接: 体から心へ」、横浜、2014. 2. 21

#### 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、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した。In vivo マイクロダイアリシス法を用いた検討により、対照群において報酬刺激（30%スクロース水）提示時に観察される有意な側坐核内ドパミン遊離量上昇が、神経障害性疼痛モデル動物においては消失していることを明らかとした。

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、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した。

B. 研究方法

1. 神経障害性疼痛モデルラットの作製

実験には雄性SDラットを使用した。6週齢の時点で、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、および切結紮手術後7日毎に28日後まで行った。また、対照群（Sham 施術群）として脊髄神経の露出までを行い、切結紮しない群を作製し解析に用いた。

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 % 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)

## 2. 慢性疼痛が報酬刺激提示時の側坐核ドーパミン遊離に及ぼす影響の検討

神経障害性疼痛の評価を von Frey 試験を用いて行い、施術 28 日後に機械的痛覚過敏が持続している個体を、慢性疼痛モデルラットとして用いた。施術 28 日後の von Frey 試験後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 2 日目、マイクロダイアリシス開始 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、リンゲル液を流速 1.0  $\mu\text{l}/\text{min}$  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、ラット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、透析液中のドー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

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定量的に評価する目的で、Chung モデルラットを用いて、報酬刺激提示時の快情動の減弱 (アンヘドニア) を、報酬刺激提示時の側坐核内ドーパミン遊離量の変化を指標として、in vivo マイクロダイアリシス試験により検討した。Chung モデルラットにおいては、施術 28 日後においても、機械的刺激に対する疼痛閾値の有意な低下が、神経障害側 (同側: ipsilateral) において確認された (図 1)。

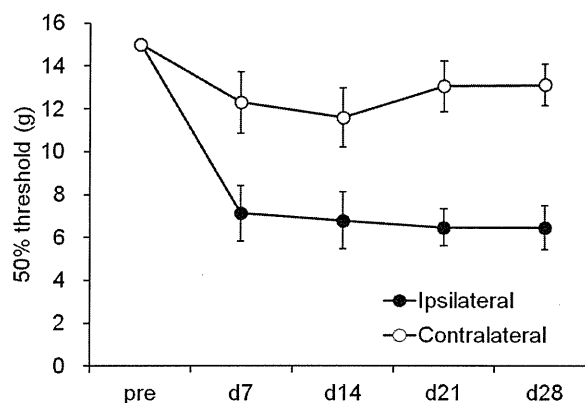


図 1 神経障害性疼痛モデル動物におけるアロディニア

神経障害性疼痛モデルラットにおいて、機械的刺激に対する疼痛閾値の経時変化を von Frey 試験により検討した。(n=9)

続いて、Chung モデルラットに対して、報酬刺激として 30% スクロース水を 30 分間提示し、側坐核内ドーパミン遊離量の変化を解析したところ、Sham 施術群では報酬刺激提示前と比較し有意な側坐核内ドーパミン遊離量上昇が確認されたが、Chung モデルラットにおいては有意なドーパミン遊離量の変化は観察されなかった



(図2)。また、30%スクロース水提示時の摂水量は両群間で有意な差が見られなかった (Sham,  $5.7 \pm 0.9$  g; Chung model,  $5.4 \pm 0.8$  g)。

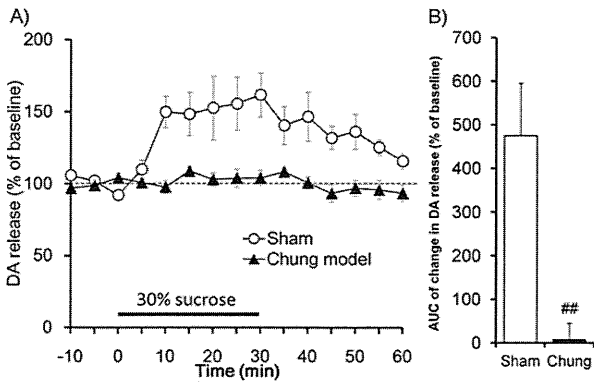


図2 神経障害性疼痛モデル動物における報酬刺激提示時の側坐核内ドパミン遊離

報酬刺激 (30%スクロース水) 提示時の側坐核 shell 内でのドパミン遊離量の変化を解析した。A) ドパミン遊離の経時変化。B) 報酬刺激提示開始後 60 分間のドパミン遊離変化量 (AUC)。Student's t-test: ##  $P < 0.01$  ( $n = 7$ , each)

#### D. 考察

これまでに、慢性疼痛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、ほとんど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自発痛により誘発されると考えられる抑うつ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、側坐核におけるドパミン遊離量を指標として検討した。神経障害性疼痛モデルラットにおいては、対照施術群で見られる報酬刺激提示時のドパミン遊離量増加が消失しており、快情動が減弱していることが示唆された。本実験結果は、報酬課題時の腹側線条体神経活動が慢性疼痛患者で減弱するという検討結果と一致するものであり、慢性疼痛下での抑うつ状態、特にアンヘドニアの評価法として、実験動物での側坐核内ドパミン遊離、ヒトでの腹側線条体神経活動計測の有用性を示

すものである。

#### E. 結論

神経障害性疼痛モデルラットにおいて、対照施術群で見られる報酬刺激提示時の側坐核でのドパミン遊離量増加が消失していることを明らかとした。

#### 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

- 1) 眞嶋悠幾、井川ありさ、井手聡一郎、津田誠、井上和秀、南雅文: Chronic pain increases neurokinin 1 receptor mRNA expression in the bed nucleus of stria terminalis: Roles of neurokinin 1 receptor in the anxiety-like behavior. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会), 京都, 2013.6.22

#### 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

昨年度までの神経障害性疼痛モデルラットを用いた研究における Gene chip assay の結果から、痛みによる負情動生成に関与すると考えられる複数の遺伝子を、慢性疼痛マーカー候補分子群として見出した。本年度は、動物種による相違の有無を検討するため、神経障害性疼痛モデルマウスの分界条床核における定量的 RT-PCR 解析によって遺伝子発現変動の確認を行うと共に、慢性軽度ストレス負荷モデル（Chronic mild stress; CMS）動物の分界条床核における遺伝子発現変化と比較検討した。腹側分界条床核における  $\beta_1$  ノルアドレナリン受容体遺伝子および 5-HT<sub>2A</sub> セロトニン受容体遺伝子が神経障害性疼痛モデルマウスで有意に発現増加することを見出した。これら受容体分子が慢性疼痛評価に役立つマーカー分子となる可能性が示された。

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分子を探索し、慢性疼痛治療のための創薬標的として、また、PET などによる慢性疼痛評価法開発に役立つマーカー分子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、動物種による相違の有無を検討するため、神経障害性疼痛モデルマウスにおける定量的 RT-PCR 解析によって遺伝子発現変動の確認を行うことと共に、慢性軽度ストレス負荷モデル（Chronic mild stress; CMS）動物の分界条床核における遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR 法を用いて比較検討することにより、慢性疼痛に特異的なマーカー分子を同定することを目指して研究を行った。

実験には体重 18-28 g の雄性 BALB/c マウス

を用いた。神経障害性疼痛モデルは、6週齢の時点で坐骨神経に由来する総腓骨神経、脛骨神経、腓腹神経を露出させ、総腓骨神経と脛骨神経を5-0滅菌済シルクブレード（日本商事株式会社、大阪）で結紮し、末梢側を切断することにより作製した（Spared nerve injury model : SNIモデル）。なお、神経の露出まで行った群をSham群とした。SNI施術の前日、および術後1週間ごとに3週間後までの計4回 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、尾懸垂試験（TST : Tail suspension test）を用いて、神経障害性疼痛モデルにおける抑うつ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。CMSモデルは、6週齢の時点から、軽度ストレスを、マウスに予測できないようランダムな順序で5週間連続負荷した（表1, 2）。ストレスの負荷はすべて19時から開始した。ストレス負荷終了後、TSTを用いて、CMSモデルにおける抑うつ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。脳サンプルの調整を行うため、頸椎脱臼したマウスより全脳を摘出し、ビブラトームを用いて400 μm厚の冠状スライスを作製した。分界条床核

表1 CMS 負荷内容

番号	内容	ストレス負荷時間
1	ケージを45度傾ける	14時間
2	床敷を濡らす*	24時間
3	絶食	24時間
4	絶水食	14時間
5	24時間点灯	24時間
6	過密飼育	24時間
7	ケージメイトの入替	24時間
8	24時間消灯	24時間
9	ケージ入替	24時間
10	何もしない	

表2 CMS 負荷日程

1週目	1	2	3	5	7	4	6
2週目	8	1	9	10	4	7	2
3週目	3	8	1	6	5	3	2
4週目	8	9	4	5	10	1	3
5週目	6	2	7	5	3	2	6

(BNST) を含む連続した2枚の脳スライスから、両側の腹側BNST (vBNST) および背外側BNST (dBNST) 領域を冷PBS中でパンチアウト（直径1mm）した。作製したサンプルは、液体窒素で急速冷凍後、-80°Cで保存した。RNAサンプルの調整は、3個体の脳組織を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。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、Mx3005P (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、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いてサンプルのcDNA相対値を算出した。内標準には $\beta$ -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。

TSTでは、マウスを実験環境に30分静置して馴化させた後、マウスの尾の先端から1cmの部分にテープを巻き付け、測定装置（室町機械、東京）の尾固定部に張り付けて床から30cmの高さにぶら下げ、無動時間を6分間自動計測した。

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

18 匹のマウスに対し総腓骨神経と脛骨神経結紮・切断を行った。術後 21 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 12 個体を遺伝子解析に用いた。TST を用いた解析において、神経障害性疼痛モデルマウスでは、sham 術群と比較して、無動時間が有意に増加しており、抑うつ様行動を発現していることが示された（図 1）。

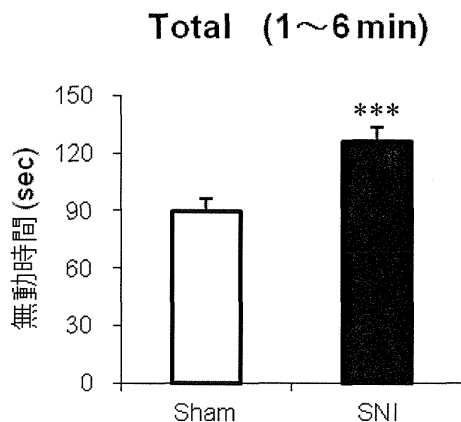


図 1 神経障害性疼痛モデルマウスにおける抑うつ様行動

TST の試験時間は 6 分、評価には試験中 1~6 分間の無動時間の合計値を用いた。n = 18, \*\*\* P < 0.001

### 2. 定量的 RT-PCR (神経障害性疼痛モデルマウス)

昨年度に引き続き、不安や抑うつ、嫌悪に関与することが報告されている受容体およびそのリガンド遺伝子ならびにそれらのシグナル

伝達パスウェイ関連分子の遺伝子に関して、dIBNST ならびに vBNST より調製したサンプルを用いて定量的 RT-PCR により発現量変化を検討した。一昨年度の Gene chip assay において検討した dIBNST ならびに vBNST と、昨年度検討した前帯状回 (ACC) ならびに島皮質 (IC) の計 4 部位において発現変動が見られた遺伝子である、低分子量 G タンパク質 Ras ファミリー (RASD2)、Orphan 核内受容体 (NR4A3)、BDNF 受容体 (NTRK2)、ホーマータンパク質 (HOMER1)、アデノシン受容体 (ADORA2A)、ならびに  $\gamma$  シヌクレイン (SNCG) についても同様に定量的 RT-PCR により発現量変化を検討した（図 2）。vBNST 領域において、5-HT<sub>2A</sub> およびアドレナリン  $\beta_1$  受容体 mRNA 発現量の有意な増加が観察された。一方、昨年度までの神経障害性疼痛モデルラットにおける検討において発現変動が見られた他の遺伝子に関しては、有意な変化は確認されなかった。