

はり治療作用機序の検討のための頭痛モデル動物の作成および 頭痛外来と連携したはり治療による効果の評価

慶應義塾大学 医学部 神経内科 清水 利彦 柴田 護 鳥海 春樹

研究要旨: 頭痛の重症度や発作頻度の改善に「はり治療」の有効性を示す報告は多い。はり治療が頭頸部や肩部の筋硬結を改善させた結果であると考えられるが、作用機序の詳細は明らかにされていない。

そこで、当研究室で進行している頭痛病態モデルの検討を進展させ、片頭痛発作のTriggerの一つと考えられている大脳皮質拡延性抑制(Cortical Spreading Depression: CSD)につき、その発生閾値に影響を及ぼす要因について研究を進めた。血中性ホルモン濃度がCSD発生に及ぼす影響については、独自の実験系を確立して重要な知見を集積した。また、三叉神経の侵害刺激がCSD発生に影響することを示した。この知見に基づき、三叉神経支配領域の筋にTrigger Point を作成すると、CSD発生に影響することについても明らかした。以上の知見は、はり治療作用機序検討のための頭痛モデル動物作成に有用と考えられた。また、頭痛患者における「はり治療」の有効性を検討するため、頭痛外来から「神経疼痛疾患はり治療外来」へ紹介された頭痛患者に対し、はり治療を行った症例の症状緩和に対する評価を行った。一般の頭痛診療とはり治療の併用は、頭痛の発作頻度、重症度両者の改善に有効性を見せた。これらの結果は、はり治療を併用した治療戦略は、薬剤乱用頭痛の予防などに対する有力な対応策となっていく可能性を示すものと考えられた。

A. 研究の目的

はり治療はさまざまな疾患に用いられているがその作用機序については明らかにされていない。その中で、はり治療における経験的な刺激ポイントである「経穴」と「Trigger Point」の類似性が指摘され、はり治療の科学的な作用機序を解明する方策として、Trigger Point研究が行われている。

Trigger Point とは筋中に出現する自発性の収縮部位で、それが存在する筋の筋膜上には感覚の過敏スポットが形成される。このような筋の変化がどのような機序で出現するのか、またそれに対してはり治療による刺激を加えた場合、どのような反応がおこるのかを詳細に検討することが、はり

治療の作用機序を証明していくための重要なステップになると考えられる。そこで本研究では、片頭痛発作の病態に関係すると考えられているCSDの発生閾値を変化させる要因につき、動物実験による検討を行う。CSDは、脳局所に存在する神経細胞やグリア細胞の細胞膜におこる脱分極で、脱分極後15~30分の間、神経細胞は電気的活動が抑制された状態になり、毎分約2~5mmの速さで開始部位から周囲に伝播するといわれており、大脳表面への、電気的・機械的・化学的刺激で誘発される。これは、片頭痛の“前兆”に相当する現象と考えられる神経症状であり、典型的症状として、閃

輝暗点が知られる。このCSDに関する検討の結果から Trigger Pointとの関連性の可能性を検索し、はり治療作用機序検討のための頭痛モデル動物作成につなげることを目的とする。また臨床研究として、頭痛患者にみられる Trigger Pointに対するはり治療が頭痛症状をどの程度改善させるかについて、評価を行った。

B. 実験方法

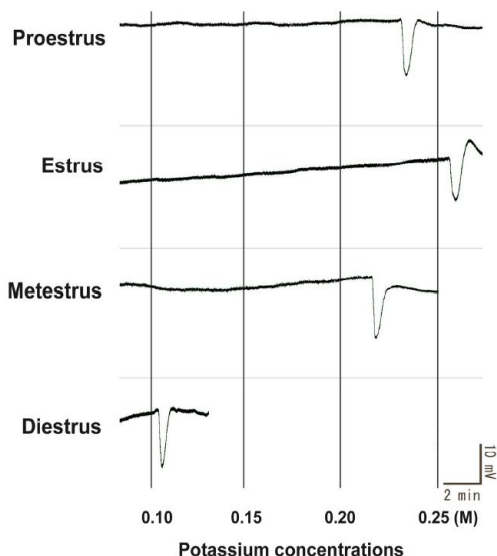
基礎研究

片頭痛発作の病態に関係すると考えられている CSDの発生閾値を変化させる要因につき、動物実験による検討を行った。

1. 性ホルモンの血中濃度変化とCSDの発生閾値に関する検討

CSDは、片頭痛の病態に関与していると考えられており、月経周期とCSDの相関研究が、様々な形態で行われてきた。しかしながら、血中の性ホルモン濃度とCSDの発生について、明瞭な関連性を示す研究は存在しなかった。そこで我々は、健康雌マウスから、高精度にその性周期を決定するプロトコルを確立し、4期に分類した各性周期のCSD発生閾値を計測した。

使用動物は、C57BL/6Jの雌性マウス30匹。性周期を判別したマウスに対してCSDの計測実験を行った。性周期の判別は、ギムザ染色による膣粘膜細胞のスミア標本の顕微鏡観察および、ホルモン変動に対応した膣口の形態変化の目視観察を行い、proestrus発情前期、estrus発情期、metestrus発情後期、diestrus発情休止期の4群分類を採用した。



性周期を決定後、速やかに動物の脳表にDC電極を設置し、KCl溶液を0.025Mの低濃度より滴下して、CSDが発生したKCl濃度をその動物のCSD発生閾値とし、各群で比較検討した(図1)。

図1

CSD計測終了後、速やかに全血採血し、血中のestradiol(E2)とprogesterone(P4)について、LC-MS/MS法で濃度測定した。

2. 感覚神経に対する侵害刺激がCSDの発生閾値に及ぼす影響

雄性Sprague-Dawley ラット12匹を使用した(コントロール群(C群;左右頬部にvehicleを4日間)、両側足底部に10mM capsaicinを4~6日間連日投与し2群(各5匹)に分けた(4日投与群(feet-d4群), 6日投与群(feet-d6群))、両側頬部に10mM capsaicinを4~6日間連日投与した群(4日投与群(face-d4群)、6日投与群(face-d6群))。試薬として6%エタノールにcapsaicinを溶解させ、tween80を使用して生理食塩水に混合し、10mMのcapsaicin溶液を調整した。コントロール群(C群)には、6%エタノール, tween80および生理食塩水の混合液をvehicleとして、左右頬部に50μlを2日間皮下注射により投与した。4日投与群(d4群)および6日投与群(d6群)には、調整した10mM capsaicin溶液をそれぞれ、4日間および6日間連続皮下注射した。

各群において、投与期間終了後、イソフルラン吸入麻酔下(2%、400ml/min/air、UNIVENTOR 400, Malta)、ステレオタキシク固定器に固定し、バイタルモニター下(MLT0670 and ML117, ADInstruments, Australia)、頭頂部の頭皮を切除して頭頂骨を露出させた。露出させた頭頂骨に、デンタルドリルを使用し、Bregmaより外方4mm、尾側4mmの位置に直径2mmの骨孔を作成し、ここにCS

D検出用白金電極（NBR, Japan）をデンタルセメント（LuxaFlow, DMG, USA）を使用して固定した。頸部皮膚を切開し、同部位に塩化銀不感電極を刺入した。これらの電極をプリアンプ（4002, DAGAN, USA）に接続し、Power Lab（PowerLab 8/30, ADInstruments, Australia）に入力してモニター記録した。同様にデンタルドリルを使用し、Bregmaより外方4mm、尾側8mmの位置に直径2mmの骨孔を作成し、骨孔底部の脳硬膜を除去して脳軟膜を露出した。この骨孔を囲むように、デンタルセメントを使用して内容量10 μ lのcup状に形成し、CSDを発生させるためのKCl溶液の投与ルートを作成した。作成後、脳表の乾燥を避けるため、ただちに生理食塩水でcupを満たした。CSD発生用KCl溶液は、電解質計測器にて、1.0MのKCl標準溶液を作成し、これを濃度調整して、0.1M、0.3M、0.6M、1.0Mの4種類の溶液を作成した。CSD発生および計測については、計測電位の安定を10分間確認した後、ラット頭頂部に作成したKCl投与ルートに満たした乾燥防止用の生理食塩水を払拭し、濃度調整したKCl溶液を低濃度（0.1M）より、ピペットで10 μ l計量し、ルートに投与した。CSD発生の有無を10分間観察し、発生しない場合は順次、高濃度のKClに置換し、CSDが発生したKCl濃度を、そのラットのCSD発生閾値とした。発生回数はCSD発生後、自然収束するまでの出現回数を測定した。CSD持続時間については、全ての群に0.6MのKCl溶液によるCSD誘発を行い、その自然収束にいたるまでの時間を測定した。

3. 三叉神経支配域のtrigger pointがCSD発生閾値におよぼす影響

C57BL/6J雄性マウス（8週齢・22~25g）12匹をコントロール群（当日CSD計測 n = 4）、コントロール群（2日後CSD計測 n = 4）およびトリガーポイント作成群（2日後CSD計測 n = 4）の3群に分類した。各群のマウスをイソフルラン吸入麻酔下（1.2%/400ml/min）で定位固定器に固

定し保温パット上に背臥位で静置した。両咬筋に絶縁鍼電極（ステンレス絶縁電気鍼, 株式会社 松葉）を経皮的に刺入し、各群に対して低周波通電器（LFP7000, 株式会社 全医療器）で通電し、咬筋を強縮させた。咬筋の強縮により強く咬合したマウスの口をペアンで開口させ、伸張性収縮刺激を加えた。この操作を5分間に80回繰り返す。咬筋のトリガーポイントを作成モデルとした。各群については、麻酔下での絶縁鍼刺入のみで通電を行わず、コントロール群とした。各群の動物は前述の操作直後にCSD発生閾値を計測し、各群の動物は慶應動物センターで2日間の飼育後CSD発生閾値を計測した。頭皮を切開し露出した頭頂骨にデンタルドリルを使用して直径0.5mmの微小孔を2つ形成した。微小孔の位置は、Bregma外方2mm、尾側2mmおよび4mmに統一した。尾側2mmの微小孔に対してデンタルセメントを用いDC電極を設置し測定した。尾側4mmの微小孔は、デンタルセメント（UniFil LoFlo, 株式会社ジーシー）で孔を囲ってCupを作成し、KCl投与ルートとした。この投与ルートへ0.1M~0.5Mまで0.025M毎に濃度を振ったKCl溶液を低濃度のものから順に満たしていき、それぞれ5分間の静置観察の間にCSDが発生したKCl濃度をその動物のCSD発生閾値とした。

4. TRPV1刺激が顔面の熱疼痛閾値に与える影響

TRPV1刺激は、麻酔下でC57BL/6マウスの右顔面（whisker pad）に10mM capsaicin を浸透させた綿球に30分間作用させることで行った。疼痛閾値測定は、処置後2日目に施行した。定量的な熱疼痛閾値の測定にはOrofacial Pain Assessment Device (OPAD, 米国 Stoelting 社製)を用いた。本装置は、表面温度を変化させることのできるバーにwhisker padを押し付けて、その奥のボトルに貯められたミルクを吸い口から単位時間に吸い付く頻度を定量化することで、熱疼痛閾値の変化を測定する装置である。なお、対照実験として、無処置のC57BL/

6マウスのwhisker padに20 , 32 , 45 の刺激を与えた際のミルクの吸い付き頻度を測定した。

(倫理面への配慮) なお本研究は慶應義塾大学動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。

臨床研究

慶應義塾大学医学部神経内科頭痛外来診患者のうち、平成23年9月より平成24年9月まで「神経疼痛疾患はり治療外来」に紹介された患者の診療情報から、薬物治療に抵抗性をみせ、3か月以上症状改善のなかった患者を抽出して、はり治療追加後の症状改善を、後ろ向き研究として行った。

対象は、ICHD-2の診断基準で緊張型頭痛と診断された患者14名(男性3名、女性11名、平均年齢 48.8 ± 13.0 歳 (mean \pm SD)、うち3例は片頭痛との合併型)であった。はり治療頻度は月1~4回であった。診療録より、患者が最も強い圧痛を訴えて、はり治療の対象となった筋硬結を「後頸部」「側頸部」「肩部」に分類し、はり治療前後の頭痛発作の頻度とvisual analogue scaleを用いた重症度の変化を検討した。

倫理的配慮

本研究は頭痛患者の診療情報使用について、慶應義塾大学医学部倫理委員会に研究計画を提出し承認を受けた上で行われた(慶應義塾大学倫理委員会 承認番号2012-134)。

対象となる個人の人権の擁護

対象者は「神経疼痛疾患はり治療外来」受診に先立ち十分な説明を受け、診療情報の使用について、拒否する権利、又は拒否をすることにより対象者が不利益な取り扱いを受けないことを保障された。加えて、Web上に公開された当科HPにおいて、上記の件についての説明文が掲載された。データは個人情報管理者が厳重に管理した。

C. 結果

基礎研究

1.性ホルモンの血中濃度変化とCSDの発生閾値に関する検討

分類された各周期毎のCSD発生閾値は、発情前期 0.21 ± 0.06 M (n = 4)、発情期 0.24 ± 0.05 M (n = 4)、発情後期 0.25 ± 0.09 M (n = 7)、発情休止期 0.13 ± 0.05 M (n = 6)であった。発情前期、発情期および発情後期の3群間においては、CSD発生閾値に有意な差を認めなかったが、発情休止期ではCSDが他の3群に比較し、有意なCSD発生閾値が低下が見出された。特に発情後期と比べ有意に低値を示した(P < 0.05)。

E2の血中濃度は、発情前期 4.82 ± 4.88 pg/mL (n = 5)、発情期 1.55 ± 1.96 pg/mL (n = 5)、発情後期 1.47 ± 0.80 pg/mL (n = 5)、発情休止期 2.26 ± 2.63 pg/mL (n = 5)で、P4の血中濃度は、発情前期 0.73 ± 0.91 ng/mL、発情期 1.78 ± 1.54 ng/mL、発情後期 0.95 ± 0.67 ng/mL、発情休止期 0.49 ± 0.48 ng/mLであった。血中のE2は、発情前期に高濃度を示した後急速に濃度低下し、P4は、発情期に高濃度を示した後急速に濃度低下した(図2)。

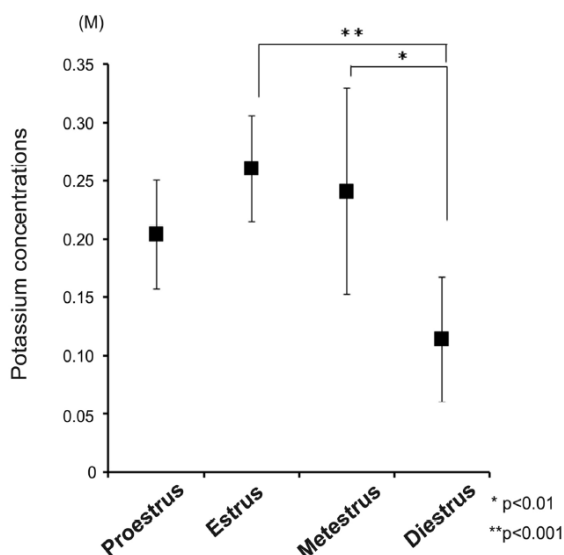


図2

2.感覚神経に対する侵害刺激がCSDの発生閾値に

及ぼす影響

(1) . CSD発生閾値と発生回数

C群において、KCl 濃度0.1Mおよび0.3MではCSDの誘発が観察されず、0.6M群よりCSDが誘発された。これに対し、feet-d4群およびfeet-d6群ではKCl 濃度0.3Mから、face-d4群およびface-d6群ではKCl 濃度0.1MからCSDの発生が認められた。feet-d4群d4群およびfeet-d6群ではKCl 濃度0.1MからCSDの発生が認められた。

KCl溶液各濃度において誘発されたCSD発生回数は、C群で0.1M(0回)、0.3M(0回)、0.6M(0.25 ± 0.50 回, mean \pm SD)、1.0M(6.75 ± 1.70 回, mean \pm SD)であった。

またfeet-d4群では、0.1M(0回)、0.3M(0.6 ± 0.5 回, mean \pm SD)、0.6M(3.6 ± 3.0 回, mean \pm SD)、1.0M(6.2 ± 1.9 回, mean \pm SD)であり、feet-d6群では、0.1M(0回)、0.3M(2.4 ± 2.6 回, mean \pm SD)、0.6M(5.2 ± 2.8 回, mean \pm SD)、1.0M(5.2 ± 2.2 回, mean \pm SD)であった。

これに対しface-d4群では、0.1M(1.25 ± 0.9 回, mean \pm SD)、0.3M(5.00 ± 1.41 回, mean \pm SD)、0.6M(12.5 ± 2.10 回, mean \pm SD)、1.0M(12.75 ± 3.30 回, mean \pm SD)であり、face-d6群では、0.1M(1.25 ± 0.50 回, mean \pm SD)、0.3M(12.25 ± 2.50 回, mean \pm SD)、0.6M(15.75 ± 4.79 回, mean \pm SD)、1.0M(18.50 ± 4.43 回, mean \pm SD)であった。

1.0MのKCl濃度で誘発されるCSDの回数は、face-d4群およびface-d6群では、C群とfeet-d4群およびfeet-d6群に対し有意な差を呈した($P < 0.05$; 図3)。

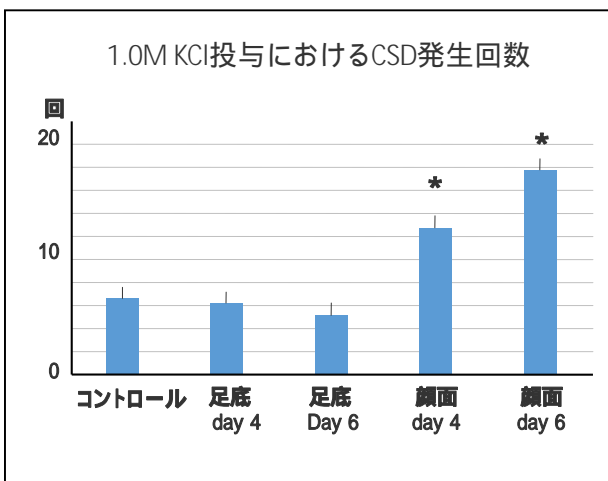


図3 : 1.0M KCl投与におけるCSD発生回数 .

(2) . CSD持続時間

1.0MのKCl溶液により誘発されたCSDの持続時間は、C群(35.8 ± 12.5 分, mean \pm SD)、feet-d4群(36.2 ± 7.5 分, mean \pm SD)、feet-d6群(38.0 ± 6.8 分, mean \pm SD)、face-d4群(89.5 ± 30.3 分, mean \pm SD)、face-d6群(133.5 ± 73 分, mean \pm SD)で、C群、feet-d4およびfeet-d6群に対しface-d4群およびface-d6群において有意な延長を示した($P < 0.05$; 図4)。

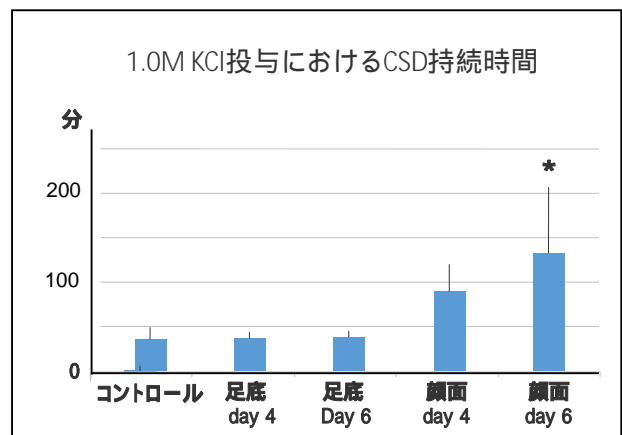


図4 : 1.0M KCl投与におけるCSD持続時間

3. 三叉神経支配域のtrigger pointがCSD発生閾値におよぼす影響

コントロール群(当日CSD計測)のCSD発生閾値は 0.28 ± 0.01 M (mean \pm SD), コントロール群(2日後CSD計測)では 0.28 ± 0.02 Mで両群間に

においてCSD発生閾値には有為差を認めなかった。

トリガーポイント作成群（2日後CSD計測）のCSD発生閾値は 0.21 ± 0.05 Mであり コントロール群（当日CSD計測）と コントロール群（2日後CSD計測）との間に有意な低下が観察された（図5； $p < 0.05$ ）。

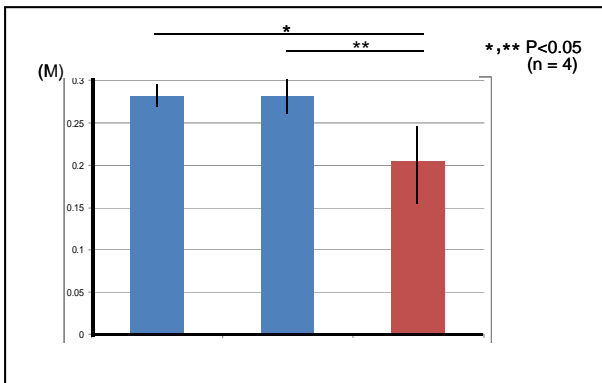


図5：三叉神経のCSD誘発に対する影響。

トリガーポイント作成群のCSD発生閾値は コントロール群（当日CSD計測）と コントロール群（2日後CSD計測）と比較し有意な低下を示した（ $p < 0.05$ ）。

4. TRPV1刺激が顔面の熱疼痛閾値に与える影響
無処置のマウスでは、訓練による条件付けによって単位時間のミルク吸い付き回数は33 において205回/分となった。その状態で、バーの表面温度を45 まで上昇させると、90回/分まで吸い付き回数は減少した。これは熱疼痛による影響と考えられた。一方、あらかじめwhisker padに10 mM capsaicin でTRPV1刺激を行ったマウスでは、33 の状態でも有効な吸い付き行動は著明に減少（2回/分）しており、熱疼痛閾値の低下が観察された。

臨床研究

頭痛日数は鍼治療施行前 5.6 ± 2.2 日（mean \pm SD）から鍼治療施行1ヶ月後 4.1 ± 2.4 日、2ヶ月後 3.0 ± 2.4 日、3ヶ月後 1.7 ± 2.3 日と減少した。

頭痛日記の重症度は鍼治療施行前 8.1 ± 1.6 から鍼

治療施行1ヶ月後 5.5 ± 2.5 、2ヶ月後 4.2 ± 2.9 、3ヶ月後 2.3 ± 2.4 と減少した。

重症度が半減するまでの平均治療回数は、 2.8 ± 3.3 回であった。患者が最も強い圧痛を訴えて鍼治療対象となった筋硬結は、後頭部9例、側頸部4例、肩部1例であった。

D. 考察

臨床研究によるはり治療の効果検討の結果は、患者の頭痛頻度と重症度の両者が頭頸部のTrigger pointの緩解に相関して低下していくというものであった。これは緊張型頭痛のみならず、片頭痛発作に対するはり治療の作用の主体は、発作が起こりにくくするものである可能性を示唆するものと考えられる。この片頭痛発作を誘発する因子については、発作の発生に重要な関与が示唆されるCSDの発生閾値に影響を与える因子について検討した。そして、本研究により、TRPV1受容体を介した三叉神経の侵害刺激がKCl 投与により誘発されるCSDの出現頻度と持続時間の増加を来たすことを明らかにした。これまで三叉神経とCSDの関係について、特にCSDが三叉神経血管系におよぼす影響に着目されさまざまな知見が示されてきた。我々もすでにCSDが三叉神経節においてERKのリン酸化を認めることを報告した。

このような知見のある中で、我々の結果はCSDと三叉神経血管系の関係についてあらたな見解を与える重要なデータであると考えられる。三叉神経からの刺激がCSDに影響を及ぼす解剖学的経路についてこれまで明らかにされていなかった。しかし、近年、片頭痛発生に強い関連性を示すと考えられる硬膜からの刺激を感受する三叉神経線維が視床ニューロンを介し、体性感覚や辺縁系のみならず、視覚野や膨大後部皮質など多彩な大脳皮質に広範に投射していることが示されており、本研究の結果もこれらの解剖学的経路が関与している可能性が推察される。

上記の結果に加え、本研究は咬筋に作成したトリガーポイントがCSD発生閾値を変化させることも明らかにした。すでに我々は、三叉神経終末に侵害刺激を加えるとCSD発生の閾値が低下することを示しており、これらの結果より頭頸部に形成されたトリガーポイントは三叉神経を介しCSD発生の閾値を低下させている可能性があるかと推察される。片頭痛患者では頭痛発作があらわれる前に肩こりや後頸部筋のこりを自覚することがあり、このような症例に鍼治療を行うと、肩こりのみならず頭痛の改善も認められることが知られている。本研究により得られた知見はこのような現象の解明に役立つ可能性を有しているだけでなく、鍼治療が片頭痛に効果を示す作用機序を検討するための頭痛の動物モデルとしても重要な役割を有している。

このように我々の結果は片頭痛の病態に新しい検討の切り口を与えるとともに、統合医療、特に“鍼灸”の片頭痛治療に対する作用機序のエビデンスとして重要な知見を提供するものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Unekawa M, Tomita Y, Toriumi H, Suzuki N. Suppressing effect of chronic peroral topiramate on potassium-induced cortical spreading depression in rats. *Cephalalgia*. 32 518-27 2012
2. Unekawa M, Tomita M, Tomita Y, Toriumi H, Suzuki N. Sustained decrease and remarkable increase in red blood cell velocity in intraparenchymal capillaries associated with potassium-induced cortical spreading depression. *Microcirculation*. 19 166-74 2012
3. 清水利彦 片頭痛の治療新薬 医学のあゆみ 2 43 1296-1299. 2012

4. 清水利彦、鈴木則宏 片頭痛の病態生理. *神経内科* 77 331-336. 2012
5. 清水利彦 発作性片側頭痛と持続性片側頭痛. *Clinical Neuroscience* 30 565-566 2012
6. 清水利彦 慢性反復性頭痛. *Medical Practice* 29 471-475 2012
7. 柴田 護 顔面痛の診断と治療. *神経内科* 77 447-455 2012
8. 柴田 護 鈴木則宏 Horner症候群と群発頭痛発作時の自律神経異常. *Clinical Neuroscience* 30 558-559 2012
9. 柴田 護 片頭痛慢性化と慢性片頭痛. *医学のあゆみ* 243 1117-1122 2012
10. 鳥海春樹 神経内科 “頭痛専門診”における鍼灸活用-頭痛に対する強力な診療ツールとしての鍼灸- *東洋医学鍼灸ジャーナル*30 75-80 2013
11. 鳥海春樹 海老根妙子 黒井俊哉 柴田護 清水利彦 鈴木則宏 頭痛専門診療における鍼灸併用の可能性 *臨床神経学* 52 1297-1298, 2012
12. Sato H, Shibata M, Shimizu T, Shibata S, Toriumi H, Ebine T, Kuroi T, Iwashita T, Funakubo M, Kayama Y, Akazawa C, Wajima K, Nakagawa T, Okano H, Suzuki N. Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. *Neuroscience*. 2013; 248: 345-358.
13. 清水利彦 . 国際頭痛分類改訂版 β のポイント . *日本頭痛学会誌* , 2014; 41 : 21-25 .
14. 清水利彦 . 片頭痛を分類する . *日本頭痛学会誌* , 2014; 41 : 121-125 .
15. 柴田 護 . 片頭痛のメカニズム . *日本頭痛学会誌* 2014; 41 : 26-29.

H . 知的所有権の取得

特許取得 なし, 実用新案登録 なし, その他 なし

