

201443002A

厚生労働科学研究委託費

生活習慣病・難治性疾患克服実用化研究事業

(慢性の痛み解明研究事業) 研究事業

診断・治療法の開発を目指した痛みの慢性化脳機構に関する

トランスレーショナル研究

平成 26 年度委託業務成果報告書

業務主任者 加藤総夫

東京慈恵会医科大学 神経科学研究部 教授

平成 27 年 3 月

様式第18

本報告書は、厚生労働省の慢性の痛み対策研究事業による委託業務として、加藤総夫が実施した平成26年度「診断・治療法の開発を目指した痛みの慢性化脳機構に関するトランスレーショナル研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	1
加藤総夫 （資料）	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1 げっ歯類慢性痛モデル動物の脳機能画像化解析.....	4
加藤総夫 （資料）	
2 マーモセット痛み回路間結合の画像化解析.....	7
岡野ジェイムス洋尚 （資料）	
3 慢性痛患者における fMRI 解析と新規解析法の開発.....	8
中江 文／シーモア・ベン（研究協力者 柴田政彦） （資料）	
4 慢性化過程における脳内生理活性物質動態の解析.....	10
南 雅文 （資料）	
III. 学会等発表実績	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	
いずれも印刷中のため、なし	

診断・治療法の開発を目指した痛みの慢性化脳機構に関する
トランスレーショナル研究

業務主任者 加藤 総夫 東京慈恵会医科大学 教授

研究要旨

げっ歯類慢性痛モデル・マーモセット・慢性痛患者における MRI 撮像を行い、慢性痛によって生じる脳内の機能的変化の評価法を開発した。またそれを支える脳構造間結合のシナプス伝達強度解析、関連する生理活性物質の解析を進めた。

加藤総夫

東京慈恵会医科大学 教授

A. 研究目的

慢性痛の成立の背景にある脳内の痛み情報処理回路群における可塑的变化の実態を解明するため、(1) 小動物(マウス)疼痛モデルマンガン造影 MRI 画像化法、および、(2) 特定脳領域間のシナプス結合を光遺伝学的手法によって評価する手法を開発した。

B. 研究方法

(1) ホルマリン誘発炎症性疼痛マウスにおける小動物マンガン造影 MRI

マウスに $MnCl_2$ 溶液を投与し、ホルマリン溶液(慢性痛群)を左足底に皮下投与して 9.4 T MRI スキャナを用いて、全脳 T1 強調画像を撮像した。

(2) 光遺伝学的手法による腕傍核-扁桃体シナプス結合評価

ラット腕傍核にチャンネルロドプシン-蛍光タンパク発現用アデノ随伴ウイルスベクターを感染させ、扁桃体ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行った。脳スライスに光照射し、Channelrhodopsin (ChR2) を光活性化することにより特異的神経核由来の経路を興奮させた。

(倫理面への配慮)

東京慈恵会医科大学動物実験規程に則り、東京慈恵会医科大学動物実験委員会、遺伝子組換え実験安全対策委員会、および、病原体等安全管理委員会の審査ののち学長承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) 左右両側の扁桃体中心核が、持続的侵害受容入力を受けた時に最も早い段階で活動亢進を示す事実が示された。

(2) 炎症性慢性痛モデル扁桃体中心核ニューロンが有意なシナプス伝達増大を示した。

D. 考察

炎症性疼痛モデル動物において、扁桃体中心核が疼痛誘発から24時間以内という急性痛から慢性痛に移行する初期の時点において活動亢進し、疼痛情報処理機構の中核として機能することが二つのアプローチの研究により示唆された。

E. 結論

小動物 MRI 解析、および、光遺伝学的手法によるシナプス伝達電気生理解析を組み合わせた本研究手法は、動物のシナプス伝達解析と、ヒト MRI 研究をつなぐ有用な研究アプローチである。

F. 健康危険情報

特筆すべき情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sato M, Ito M, Nagase M, Sugimura YK, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F, The lateral parabrachial nucleus is actively involved in the acquisition of fear memory in mice, Mol Brain (2015), in press.

ほか1編

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

Sugimura Y, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Optogenetic stimulation of parabrachio-amygdaloid pathway modulates excitability of the nociceptive amygdala. 9th FENS Forum of Neuroscience (ミラノ; 7月).

ほか17件

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

岡野ジェイムス洋尚

東京慈恵会医科大学 教授

A. 研究目的

慢性痛において活性化される脳内構造間の機能的神経連絡に関する霊長類における詳細な知見はげっ歯類のデータとヒトのデータの比較を進める上で必須である。小動物MRIを用い、tractography解析を中心とした結合解析を進めた。

B. 研究方法

マーモセット固定脳における神経核間投射線維の可視化を試みた。
(倫理面への配慮)本研究は動物実験委員会の審査を受け、研究機関の長の承認を得たうえで実施した。

C. 研究結果

超高磁場小動物用MRIを用いた拡散テンソルイメージング法により、比較的線維束が太く、かつ投射パターンが単純な黒質・線条体線維の描出に成功した。

D. 考察

本画像技術が痛み回路間結合神経線維の描出にも有用である可能性が示された。

E. 結論

超高磁場MRIを用いた神経走行の解剖学的解析手法を確立した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Hikishima K, Ando K, Yano R, Kawai K, Komaki Y, Inoue T, Itoh T, Yamada M, Momoshima S, Okano HJ, Okano H. Detection of nigrostriatal pathway loss using diffusion MRI in the MPTP-treated marmoset as a Parkinson's model. Radiology. in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

柴田政彦

大阪大学大学院医学系研究科 教授

A. 研究目的

慢性痛患者群と健常人を対象に、主に下行性疼痛抑制系や情動系に焦点を当て、安静時fMRIを用いた機能的結合を調べ、両群の違いを明らかにすること。

B. 研究方法

中枢機能障害性疼痛(CDP)患者31名と同数の健康成人を対象とした。MRI撮像はGE社製3T MRI装置を用いた。

(倫理面への配慮)大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

CDP患者群では中脳水道周囲灰白質(PAG)と両側扁桃体および前帯状回/内側前頭前野の間に有意な機能的結合が見られ、群間比較では左扁桃体を除きこれらの結合が患者群で有意に高かった。

D. 考察

本研究で明らかになった痛みの認知に関わる前帯状回/内側前頭前野や扁桃体とPAGとの機能的結合の変化は、CDP患者における下行性疼痛抑制系の状態変化を反映したものである可能性がある。

E. 結論

中枢機能障害性痛患者では、下行性疼痛抑制系の中脳水道周囲灰白質と情動系の扁桃体の間に健常人では見られない状態変化があり、病態生理との関連がある可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

南 雅文

北海道大学大学院薬学研究院 教授

A. 研究目的

痛みの慢性化に伴う意欲低下やアンヘドニアの脳機構解明を目的とした。

B. 研究方法

1. 神経障害性疼痛モデルラットの作製

SDラット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 試験を用いた。

2. 慢性疼痛およびその治療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

マイクロダイアリシス用ガイドカニューレを先端が側坐核 shell 領域の 1.0 mm 上方に留まるように埋め込み、マイクロダイアリシス用透析プローブを挿入してリンゲル液を流速 1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ で灌流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。(倫理面への配慮) 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

施術 1 週後の 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。プレガバリンを 2 週間脊髄髄腔内持続投与したラットを用いた。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 施術群におけるドーパミン遊離量の上昇が確認されなかったため、疼痛治療の影響を検討できなかった。

D. 考察

痛みの慢性化に伴う意欲低下やアンヘドニア (快感喪失) の脳機構解明を目的とし、慢性疼痛モデル動物を用い、痛みの慢性化過程における腹側被蓋野一側坐核ドーパミン神経情報伝達の変化を側坐核でのドーパミン遊離変化を指標として解析した。これまでの研究により、神経障害性疼痛モデルラットにおいては、施術後 4 週の時点で対照施術群において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可能性が示唆されていた。本研究結果によ

り、神経障害性疼痛モデルラットにおいては、施術後 1 週の時点でも対照施術群において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可能性が示唆された。以上より、慢性疼痛負荷による脳内の生理活性物質動態変化は、施術後 1 週目までの早い段階で起きていると考えられる。

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。また、慢性疼痛負荷による脳内の生理活性物質動態変化は、施術後 1 週目までの早い段階で起きている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Minami M, Ide S, How does pain induce negative emotion? Role of the bed nucleus of the stria terminalis in pain-induced place aversion, *Curr Mol Med* (2015), in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

げっ歯類慢性痛モデル動物の脳機能画像解析

担当責任者 加藤 総夫 東京慈恵会医科大学 教授

研究要旨

慢性痛の成立過程ならびに成立時の脳内の活動状態を機能画像化手法によって評価する方法を確立するため、ラット炎症性慢性痛モデルを用いて超高磁場 MRI 装置を用い、マンガン造影による自発痛評価を試みるとともに、脳部位間結合を評価する新手法として光遺伝学を用いた機能コネクティクスを開発した。

A. 研究目的

慢性痛の成立の背景には、脳内の痛み情報処理回路群における可塑的变化とその固定化がある。その変化の実態を解明し、定量的な評価法を開発することによって慢性痛の予後評価、診断、治療法の選定、さらには効率的な治療法開発に資する手法の開発を目指す。

この目的のため、本研究項目においては、(1) 小動物(マウス)疼痛モデルを作製し、慢性化の時間経過に伴った脳内の活動変化をマンガン造影 MRI 画像化法を用いて捉えることによって自発痛を動物で評価する方法の確立を目指した。また、(2) 本委託業務計画における臨床研究によって明らかにされてきた慢性痛患者の特異的脳構造間の安静時機能的結合の亢進のシナプス機構を解明するため、従来までの電気生理学的手法では困難であった特定の脳領域間のシナプス結合を光遺伝学的手法によって評価する手法を開発した。

B. 研究方法

(1) ホルモン誘発炎症性疼痛マウスにおける小動物マンガン造影 MRI

雄性マウス(9-10 週齢)を 2%イソフルラン麻酔下に維持し 50 mM $MnCl_2$ 溶液を尾静脈投与した(75 mg/kg, i.v.)。その後覚醒させ、自由行動下で飼育した。MRI 撮像の 24 時間前、6 時間前、および、2 時間前に 20 μ L 5%ホルモン溶液(慢性痛群)、または、生理食塩水(対照群)を左足底に皮下投与した。 $MnCl_2$ 溶液投与 24 時間後の時点で、2%イソフルラン麻酔下動物を、9.4 T MRI スキャナ(BioSpec 94/20 USR; Bruker BioSpin)内に固定し、Cryoprobe を用いて、全脳 T1 強調画像(TR = 50 ms; TE = 4.6 ms; spatial resolution = 100 x 100 x 100 μ m³)を撮像した。標準 $MnCl_2$ 溶液を同時に撮像し、画像シグナルを標準化した。

(2) 光遺伝学的手法による腕傍核-扁桃体シナプス結合評価

雄性ラット(4-5 週齢)腕傍核にチャンネルロドプシン

(ChR2)-蛍光タンパク発現用アデノ随伴ウイルスベクターを感染させ、4-5 週間飼育した。扁桃体を含む急性脳スライス標本を作製し、扁桃体ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行った。脳スライスに青色 LED 光(465 nm)を照射し、腕傍核由来神経終末のみ特異的に発現する ChR2 を光活性化することにより、特異的神経核由来の経路を興奮させた。この手法を用い、(1)と同様のホルモン誘発炎症性疼痛群と生理食塩水による対照群の腕傍核-扁桃体シナプス伝達を比較、解析した。

(倫理面への配慮)

「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)および、日本学術会議「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に則して策定された東京慈恵会医科大学動物実験規程に則り、東京慈恵会医科大学動物実験委員会、遺伝子組換え実験安全対策委員会、および、病原体等安全管理委員会の審査ののち学長承認を得て行われた。

C. 研究結果

(1) 各種疼痛モデル動物およびヒトで報告されている疼痛関連神経核群(扁桃体、体性感覚皮質、視床等)について慢性痛下自発行動に伴う神経活動を Mn^{2+} の細胞内取り込みと蓄積に基づいて評価した。その結果、左右両側の扁桃体中心核において対照群に比し有意な輝度値の増大が認められた。扁桃体中心核が、持続的侵害受容入力を受けた時に最も早い段階で活動亢進を示す神経核である可能性が示された。

(2) 光遺伝学的手法を用い、腕傍核から扁桃体中心核に投射するシナプス伝達を選択的に記録解析した結果、扁桃体中心核の特定のニューロン集団において、炎症性慢性痛モデルにおける有意な腕傍核-扁桃体中心核興奮性シナプス伝達増大が認められた。

D. 考察

炎症性疼痛モデル動物において、扁桃体中心核は疼痛誘発から 24 時間以内という急性痛から慢性痛に移

行する初期の時点において活動亢進し、疼痛情報処理機構の中心として機能することが二つのアプローチの研究により示唆された。

E. 結論

我々が本年度用いた小動物 MRI 解析、および、光遺伝学的手法によるシナプス伝達電気生理解析を組み合わせた研究手法は、動物でのみ解析可能な詳細なシナプス伝達と、ヒトを対象とした MRI 研究をつなぐ点で有用な研究アプローチであると考えられる。特に前者は、動物において、無麻酔自由行動下の脳活動を評価することを可能とする方法であり、慢性痛に伴う自発痛の脳機構の解明に有力な手法となりうると結論された。また、後者は、従来までの電気刺激法を用いたシナプス伝達解析法では、痛みに関与する脳幹部諸核間の投射線維を選択的に活性化することは不可能もしくは困難であったが、今回開発した本手法は、ヒト fMRI 画像化における BOLD 信号に基づいた安静時部位間機能結合の慢性痛における変化を動物のシナプスレベルの機構と対応させることを可能とする有力な手法である。

今後さらさらに詳細な解析を行い、慢性痛の治療につながる疼痛情報処理機構の解明に取り組む。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Sato M, Ito M, Nagase M, Sugimura YK, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F, The lateral parabrachial nucleus is actively involved in the acquisition of fear memory in mice, *Mol Brain* (2015), in press.

Ohkawa N, Saitoh Y, Suzuki A, Tsujimura S, Murayama E, Kosugi S, Nishizono H, Matsuo M, Takahashi Y, Nagase M, Sugimura YK, Watabe AM, Kato F, Inokuchi K, Artificial association of pre-stored information to generate a qualitatively new memory, *Cell Reports* (2015), in press.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

Independent roles of distinct types of adrenoceptors in synaptic modulation of network activity in the central nucleus of amygdala. 9th FENS Forum of Neuroscience (ミラノ; 7月).

Sugimura Y, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Optogenetic stimulation of parabrachio-amygdaloid pathway modulates excitability of the nociceptive amygdala. 9th Fens Forum of Neuroscience (ミラノ; 7月).

Takahashi Y, Ochiai T, Asato M, Watabe AM, Ohsawa M, Kamei J, Kato F. Insulin attenuates synaptic potentiation in the nociceptive amygdala in a rodent model of painful diabetic neuropathy. 9th FENS Forum of Neuroscience (ミラノ; 7月).

Kato F. Synaptic potentiation in the nociceptive amygdala. 8th IGAKUKEN International Symposium on "Pain Modulation and Opioid Functions" (東京; 9月)

Kato F. Amygdala plasticity in the chronification process of inflammatory pain. 第37回日本神経科学大会 (横浜; 9月) .

Shinohara K, Ikeda R, Takahashi Y, Kurihara H, Marumo K, Kato F. Role of CGRP in inflammatory pain-induced potentiation in the central amygdala. 第37回日本神経科学大会 (横浜; 9月) .

Tsurugizawa T, Kitamura A, Takahashi Y, Shinohara K, Uneyama H, Kato F. Sevoflurane modulates the hemodynamic responses in rat primary somatosensory cortex. 第37回日本神経科学大会 (横浜; 9月) .

Yamamoto S, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Two Distinct Types of Adrenoceptors Modulate Network Activity in The Central Nucleus of Amygdala. 第37回日本神経科学大会 (横浜; 9月) .

篠原 恵, 奥津 裕也, 池田 亮, 高橋 由香里, 栗原 裕基, 加藤 総夫, 丸毛 啓史. 痛みの慢性化における CGRP の役割 遺伝子欠損マウスを用いた扁桃体興奮性シナプス伝達の解析. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会 (鹿児島; 10月) . 日本整形外科学会雑誌 (2014); 88(8): S1642.

Kato F. Parabrachial-amygdala projection in the inflammatory pain chronification. The First CiNet Conference - New Directions in Pain Neuroscience (大阪; 12月) .

加藤 総夫. 高磁場小動物MRIの疼痛科学への応用. マウス精神疾患モデルMRI研究会 (東京; 1月)

Kato F. Pain chronification and amygdala plasticity. AND (Association of the Study for Neurons and Diseases) Winter Mini-Conference (熱海; 1月).

Kato F. What is the biological significance of emotion in pain and its regulation? 第92回日本生理学会大会 (神戸; 3月) . *J Physiol Sci.* (2015); CS07-4.

Sugimura YK, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Optogenetic demonstration of direct input from the lateral parabrachial nucleus to the nociceptive amygdala. 第92回日本生理学会大会 (神戸; 3月) . *J Physiol Sci.* (2015); S38-3.

Miyazawa Y, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Synaptic potentiation in the central amygdala in trigeminal inflammatory pain model of rats. 第92回日本生理学会大会 (神戸; 3月) . *J Physiol Sci.* (2015); P1-087.

Sugimoto M, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Effects of neurotoxic destruction of noradrenergic fibers of the central nucleus of amygdala on rat inflammatory orofacial

pain. 第 92 回日本生理学会大会 (神戸; 3 月). J Physiol
Sci. (2015); P3-192.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

マーモセット痛み回路間結合の画像化解析

担当責任者 岡野ジェイムス洋尚 東京慈恵会医科大学 教授

研究要旨

マーモセット痛み回路間結合を画像化するため、高磁場小動物MRIを用いた拡散テンソルイメージング解析法を確立した。

A. 研究目的

げっ歯類を用いて明らかにされてきた慢性痛において活性化される脳内構造間の機能的神経連絡は、霊長類においてはまだ十分に明らかにされておらず、その詳細に関する知見はげっ歯類のデータとヒトのデータの比較を進める上で必須である。小動物MRIを用いた、tractography解析を中心とした結合解析を進めるとともに、急性侵害刺激による関連脳領域の応答をBOLD法を用いて観察する。

B. 研究方法

非ヒト霊長類での痛み情動神経核間の解剖学的結合を画像化することを目的に、研究協力者の足島啓吾と共同してマーモセット固定脳における神経核間投射線維の可視化を試みた。本研究は動物実験委員会の承認を得たうえで実施した。

C. 研究結果

神経毒であるMPTPを投与しパーキンソン病症状を呈したマーモセットおよび野生型マーモセットの脳固定標本における神経線維の走行をMRIにより描出した。超高磁場小動物用MRIを用いた拡散テンソルイメージング法により、比較的線維束が太く、かつ投射パターンが単純な黒質・線条体線維の描出に成功した。また神経線維束はMPTP投与群において減少していた。

D. 考察

本画像技術が痛み回路間結合神経線維の描出に有用である可能性が示された。

E. 結論

超高磁場MRIを用いた神経走行の解剖学的解析手法が確立した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Hikishima K, Ando K, Yano R, Kawai K, Komaki Y, Inoue T, Itoh T, Yamada M, Momoshima S, Okano HJ, Okano H. Detection of nigrostriatal pathway loss

using diffusion MRI in the MPTP-treated marmoset as a Parkinson's model. Radiology. in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費
(生活習慣病・難治性疾患克服実用化研究事業(慢性の痛み解明研究事業)研究事業)
委託業務成果報告(業務項目)

慢性痛患者におけるfMRI解析と新規解析法の開発

担当責任者

中江 文 大阪大学大学院医学研究科 特任准教授
ベン・シーモア (独)情報通信研究機構脳情報通信融合研究センター 特別招聘研究員
柴田政彦 大阪大学大学院医学系研究科 教授(研究協力者)

研究要旨

線維筋痛症や複合性局所疼痛症候群などの中枢機能障害性痛(CDP)患者と健康成人を対象に安静時fMRIを実施した。患者群では中脳水道周囲灰白質と両側扁桃体および前帯状回/内側前頭前野の間に有意な機能的結合が見られ、群間比較では左扁桃体を除きこれらの結合が患者群で有意に高いことを見出した。CDP患者における下行性疼痛抑制系の状態変化を反映したものと考えられる。

A. 研究目的

複合性局所疼痛症候群や線維筋痛症など中枢機能障害性疼痛(Central Dysfunctional Pain; CDP)と呼ばれる難治性の疼痛疾患は、中枢神経系、特に下行性疼痛抑制系の機能障害が発症に関与すると考えられている。患者群と健康人を対象に、主に下行性疼痛抑制系や情動系に焦点を当て、安静時fMRIを用いた機能的結合を調べ、両群の違いを明らかにすること。

B. 研究方法

対象は、CDP患者31名(女性21名、平均年齢55.4±5.8歳)と同数の健康成人(女性18名、平均年齢56.1±15.1歳)である。患者群の内訳は、複合性局所疼痛症候群14例、線維筋痛症6例、その他(舌痛症3例、非定型顔面痛4例、機能性の四肢の痛み、原因の特定できない慢性の会陰部痛など)13例であった。痛みの期間 は4-300ヶ月で中央値は47ヶ月であった。

MRI撮像は、GE社製の3T MRI装置を用い、撮像条件は、TR/TE/FA = 2000ms/30ms/90°, Voxel size: 3.44 × 3.44 × 3.50 mm³, 40 slices, 5min (150 volumes)とした。データの処理及び解析は以下のとおりである。

Realign, Slice timing correction, Normalize, Smoothing (6mm-FWHM Gaussian Kernel), Temporal filtering (0.008 - 0.09Hz band-pass), Non-neuronal noise extraction (global, white matter, CSF signal and body movement-related components)

Statistical analysis: 1st level: Seed-based correlation analysis was performed on Conn; 2nd level: one- and two-sample t-test was performed on SPM8

Seeds:

PAG: 6mm-diameter spherical ROI (central coordinate: x=1, y=-29, z=-10)

Amygdala: AAL-based ROI

(倫理面への配慮)

大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

CDP患者群では中脳水道周囲灰白質(PAG)と両側

扁桃体および前帯状回/内側前頭前野の間に有意な機能的結合が見られ、群間比較では左扁桃体を除きこれらの結合が患者群で有意に高かった。(次頁資料参考)

D. 考察

本研究で明らかになった痛みの認知に関わる前帯状回/内側前頭前野や扁桃体とPAGとの機能的結合の変化は、CDP患者における下行性疼痛抑制系の状態変化を反映したものであり、抑制系の過活動やこの系が疼痛促進系として働いている可能性を示唆するものと考えられるが、病態との関係については今後さらなる検討が必要である。

E. 結論

中枢機能障害性痛患者では、下行性疼痛抑制系の中脳水道周囲灰白質と情動系の扁桃体の間に健康人では見られない状態変化があり、病態生理との関連がある可能性が考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

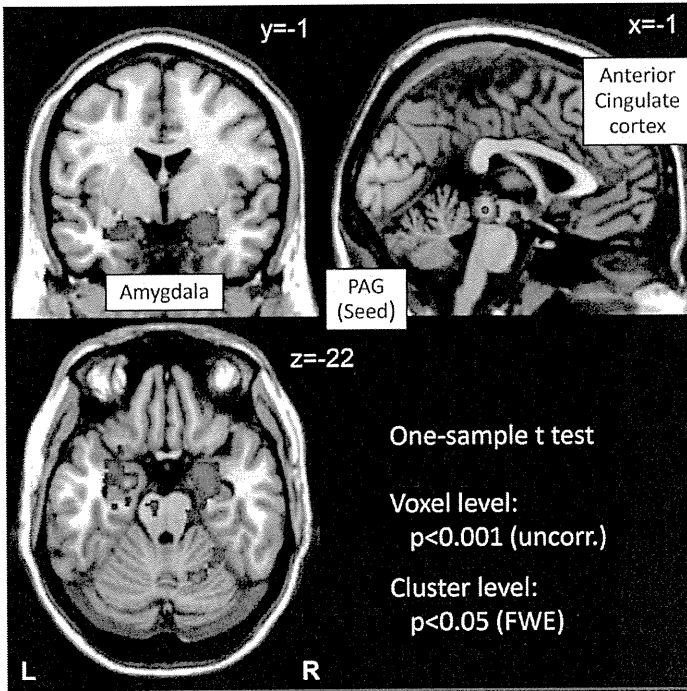
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし



Functional connectivity of PAG in CDP patients

PAG has positive functional connectivity with...

- Left and Right amygdala
- Anterior cingulate cortex
- Right cerebellum

These connections are stronger than those in healthy controls.

<note> HC data were acquired with a 1.5T MRI.

慢性化過程における脳内生理活性物質動態の解析

担当責任者 南 雅文 北海道大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨

痛みの慢性化に伴う意欲低下やアンヘドニア(快感喪失)の脳機構解明を目的とし、慢性疼痛モデル動物における痛みの慢性化過程における腹側被蓋野一側坐核ドパミン神経情報伝達の変化を側坐核でのドパミン遊離変化を指標として解析した。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術後1週および4週の時点で消失していることを明らかにした。

A. 研究目的

痛みの慢性化に伴う意欲低下やアンヘドニア(快感喪失)の脳機構解明を目的とし、平成26年度の研究では、慢性疼痛モデル動物を用い、痛みの慢性化過程における腹側被蓋野一側坐核ドパミン神経情報伝達の変化を側坐核でのドパミン遊離変化を指標として解析した。

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(O)は1段階大きい圧のフィラメント、反応した場合(X)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。

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

X: 最後に用いたフィラメントの圧の強さ

k: O / Xの配列によって決まる値(参照: Chapman et al. Journal of Neuroscience Methods (1994) 55-63)

δ : フィラメントの偏差 (= 0.224)

2. 慢性疼痛およびその治療が報酬刺激提示時の側坐核ド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2週後の時点まで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。その一部に関しては、慢性疼痛治療モデルラットとして、プレガバリン(pregabalin)の2週間脊髄髄腔内持続投与(900 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, i.t.)を行った。皮下への浸透圧ポンプ埋込と脊髄髄腔内(L3-4)投与のためのカニューレ埋込手術は、2週目の von Frey 試験後に行った(図1)。3週目の 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2-3日目、マイクロダイアリス開始16時間前から絶水食を行い、実験当日、マイクロダイアリス用透析プローブを挿入し、リング液を流速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。また、慢性疼痛期間が与える影響を検討するため、脊髄神経部分切結紮手術1週間後のラットを用いたマイクロダイアリス実験も行った。

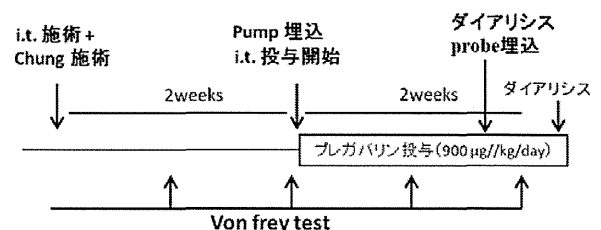


図1 慢性疼痛治療モデルラットにおける実験スケジュール

(倫理面への配慮)

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（日本学会会議）、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

慢性疼痛モデル動物として神経障害性疼痛モデル動物（Chung モデルラット）を用い、痛みの慢性化過程における腹側被蓋野—側坐核ドパミン神経情報伝達の変化を、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。これまでの研究において、施術 4 週後の 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（図 2A）。本研究では、この慢性疼痛下にて引き

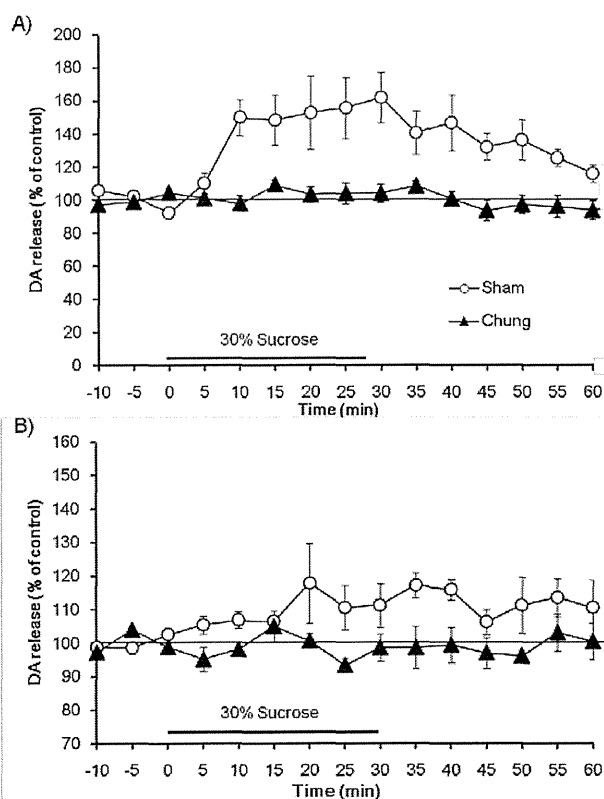


図 2 神経障害性疼痛モデル動物における報酬刺激提示時の側坐核内ドパミン遊離

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) 神経結紮施術 4 週後におけるドパミン遊離の経時変化。B) 神経結紮施術 1 週後におけるドパミン遊離の経時変化。

(n = 7, each)

き起こされる報酬刺激提示時の側坐核内ドパミン遊離低下が、より短い期間でも引き起こされるか検討を行った。施術 1 週後の 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（図 2B）。

続いて、慢性疼痛下にて引き起こされる報酬刺激提示時の側坐核内ドパミン遊離低下が、疼痛治療により回復されるか検討を行った（図 3）。慢性疼痛治療モデルラットとして、施術後 2 週間経過した Chung モデルラットに対して、プレガバリン（pregabalin）を 2 週間脊髄腔内持続投与（900 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, *i.t.*）したラットを用いた。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 施術群におけるドパミン遊離量の上昇が確認されなかったため、疼痛治療の影響を検討できなかった。

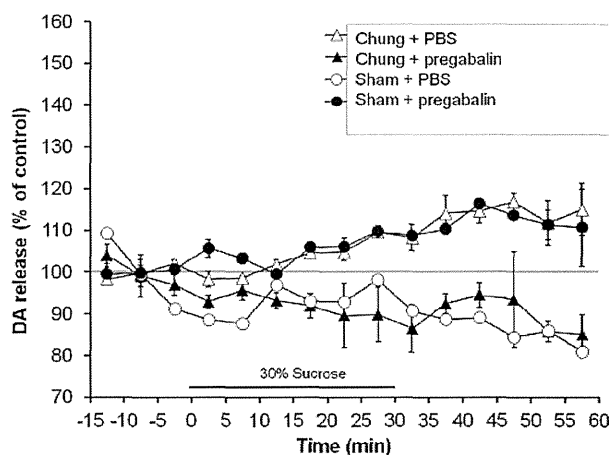


図 3 神経障害性疼痛治療モデル動物における報酬刺激提示時の側坐核内ドパミン遊離

Chung モデルによる慢性疼痛と pregabalin 処置による疼痛治療モデル動物において、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。(n = 1-3)

D. 考察

これまで、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、痛みの慢性化に伴う意欲低下やアンヘドニア（快感喪失）の脳機構解明を目的とし、慢性疼痛モデル動物を用い、痛みの慢性化過程における腹側被蓋野—側坐核ドパミン神経情報伝達の変化を側坐核でのドパミン遊離変化を指標として解析した。これまでの研究により、神経障害性疼痛モデルラットにおいては、施術後 4 週の時点で対

照施術群において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可能性が示唆されていた。本研究結果により、神経障害性疼痛モデルラットにおいては、施術後1週の時点でも対照施術群において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可能性が示唆された。以上より、慢性疼痛負荷による脳内の生理活性物質動態変化は、施術後1週目までの早い段階で起きていると考えられる。一方、施術後1週の時点では、対照施術群における報酬刺激提示時のドーパミン遊離量増加の程度が少なく、施術による影響が残っている可能性があるため、引き続き神経因性疼痛の術後の経過時間を変更し、検証を行う必要があると考えられる。

また、慢性疼痛下にて引き起こされる報酬刺激提示時の側坐核内ドーパミン遊離低下が、疼痛治療により回復されるかを、慢性疼痛治療モデルラットを用いて検討したが、対照施術群における報酬刺激提示時のドーパミン遊離量の上昇が確認されなかったため、疼痛治療の影響を解析できなかった。今回用いた実験スケジュール(図1)においては、ラットに対して、神経因性疼痛惹起のための施術、脊髄髄腔内へ持続投与のための浸透圧ポンプとカニューレ埋込施術、マイクロダイアリシスガイドカニューレ埋込施術の3種の手術を行っており、それらが過大なストレスとなってドーパミン神経活動に影響を及ぼしている可能性が考えられる。このため、経口(p.o.)あるいは腹腔内投与(i.p.)によるpregabalinの連続処置に方法を切り替えて検討を行う必要があると考えられる。

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。また、慢性疼痛負荷による脳内の生理活性物質動態変化は、施術後1週目までの早い段階で起きている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Minami M, Ide S, How does pain induce negative emotion? Role of the bed nucleus of the stria terminalis in pain-induced place aversion, *Curr Mol Med* (2015), in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし
3.その他
なし

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「診断・治療法の開発を目指した痛みの慢性化脳機構に関する
トランスレーショナル研究」

機関名 東京慈恵会医科大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Independent roles of distinct types of adrenoceptors in synaptic modulation of network activity in the central nucleus of amygdala. (ポスター)	Yamamoto S, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F.	9th FENS Forum of Neuroscience	平成26年7月	国外
Optogenetic stimulation of parabrachio-amygdaloid pathway modulates excitability of the nociceptive amygdala. (ポスター)	Sugimura Y, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F.	9th FENS Forum of Neuroscience	平成26年7月	国外
Insulin attenuates synaptic potentiation in the nociceptive amygdala in a rodent model of painful diabetic neuropathy. (ポスター)	Takahashi Y, Ochiai T, Asato M, Watabe AM, Ohsawa M, Kamei J, Kato F.	9th FENS Forum of Neuroscience	平成26年7月	国外
Synaptic potentiation in the nociceptive amygdala. (口頭)	Kato F.	8th IGAKUKEN International Symposium on "Pain Modulation and Opioid Functions"	平成26年9月	国内 (国際学会)
Amygdala plasticity in the chronification process of inflammatory pain. (口頭)	Kato F.	第37回日本神経科学大会	平成26年9月	国内
Role of CGRP in inflammatory pain-induced potentiation in the central amygdala. (ポスター)	Shinohara K, Ikeda R, Takahashi Y, Kurihara H, Marumo K, Kato F.	第37回日本神経科学大会	平成26年9月	国内
Sevoflurane modulates the hemodynamic responses in rat primary somatosensory cortex. (ポスター)	Tsurugizawa T, Kitamura A, Takahashi Y, Shinohara K, Uneyama H, Kato F.	第37回日本神経科学大会	平成26年9月	国内
Two Distinct Types of Adrenoceptors Modulate Network Activity in The Central Nucleus of Amygdala. (ポスター)	Yamamoto S, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F.	第37回日本神経科学大会	平成26年9月	国内

痛みの慢性化におけるCGRPの役割 遺伝子欠損マウスを用いた扁桃体興奮性シナプス伝達の解析. (口頭)	篠原 恵, 奥津 裕也, 池田 亮, 高橋 由香里, 栗原 裕基, 加藤 総夫, 丸毛 啓史.	第29回日本整形外科学会基礎学術集会	平成26年10月	国内
Parabrachial-amygdala projection in the inflammatory pain chronification. (口頭)	Kato F.	The First CiNet Conference - New Directions in Pain Neuroscience	平成26年12月	国内
高磁場小動物MRIの疼痛科学への応用. (口頭)	加藤 総夫.	マウス精神疾患モデルMRI研究会	平成27年1月	国内
Pain chronification and amygdala plasticity. (口頭)	Kato F.	AND (Association of the Study for Neurons and Diseases) Winter Mini-Conference	平成27年1月	国内 (国際学会)
What is the biological significance of emotion in pain and its regulation? (口頭)	Kato F.	第92回日本生理学会大会	平成27年3月	国内
Optogenetic demonstration of direct input from the lateral parabrachial nucleus to the nociceptive amygdala. (口頭)	Sugimura YK, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F.	第92回日本生理学会大会	平成27年3月	国内
Synaptic potentiation in the central amygdala in trigeminal inflammatory pain model of rats. (ポス)	Miyazawa Y, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F.	第92回日本生理学会大会	平成27年3月	国内
Effects of neurotoxic destruction of noradrenergic fibers of the central nucleus of amygdala on rat inflammatory orofacial	Sugimoto M, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F.	第92回日本生理学会大会	平成27年3月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文 (発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
The lateral parabrachial nucleus is actively involved in the acquisition of fear memory in mice	Sato M, Ito M, Nagase M, Sugimura YK, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F.	Mol Brain	発表予定 (印刷中)	国外
Artificial Association of Pre-stored Information to Generate a Qualitatively New Memory.	Ohkawa N, Saitoh Y, Suzuki A, Tsujimura S, Murayama E, Kosugi S, Nishizono H, Matsuo M, Takahashi Y, Nagase M, Sugimura YK, Watabe AM, Kato F, Inokuchi K	Cell Reports	発表予定 (印刷中)	国外

Parkinson Disease: Diffusion MR Imaging to Detect Nigrostriatal Pathway Loss in a Marmoset Model Treated with 1- Methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine.	Hikishima K, Ando K, Yano R, Kawai K, Komaki Y, Inoue T, Itoh T, Yamada M, Momoshima S, Okano HJ, Okano H.	Radiology	発表予定 (印刷中)	国外
How does pain induce negative emotion? Role of the bed nucleus of the stria terminalis in pain- induced place aversion.	Minami M, Ide S.	Curr Mol Med	発表予定 (印刷中)	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

