

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20602018

研究課題名（和文） 経頭蓋磁気刺激法を用いた神経因性疼痛治療法の開発

研究課題名（英文） Effects of transcranial magnetic stimulation on neuropathic pain

研究代表者

由比友顕(YUHI TOMOAKI)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：60330982

研究成果の概要（和文）：本研究では反復経頭蓋磁気刺激（rTMS）が神経因性疼痛に及ぼす影響を神経因性疼痛モデルマウスを用いて検討し低頻度 rTMS がモデルマウスの機械的痛覚過敏には影響しないが熱痛覚過敏を軽減すること、その際前帯状回の興奮性を抑制することが明らかとなった。rTMS は神経因性疼痛治療法の一つとなることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we tried to clarify whether rTMS can modulate the neuropathic pain in the mouse neuropathic pain model. As a result, we found that low-frequency rTMS reduces the excitability of frontal cingulate gyrus of mouse and decreases the neuropathic pain. Our results suggest rTMS has the potency to treat the neuropathic pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：神経因性疼痛、磁気刺激

1. 研究開始当初の背景

痛みは誰もが経験する表在感覚の1種である。本来は身体への侵襲を痛みとしていち早く察知しこれを回避するために必要な感覚であるが痛みが持続すると日常生活に大きな支障をきたす。特に神経因性疼痛は神経がダメージを受けた時点のみならず神経の

ダメージが回復しても尚、また回復後に新たな痛み（灼熱痛・電撃痛・刺すような痛み）が出現持続することが多い上、非ステロイド性抗炎症薬やオピオイドでも改善しない。国内でも約13%の人は仕事や生活に支障をきたす慢性疼痛に悩みこの78%の人は現在の治療

では満足な疼痛軽減は得られていない。

経頭蓋磁気刺激法(transcranial magnetic stimulation、TMS)は頭皮上に置いた円形コイルに1ミリ秒間に約8000アンペアの電流を流し電磁誘導で脳内に電流を発生させこれで神経を興奮させる方法である。無痛性・非侵襲的に脳局所を刺激でき錐体路機能の検査法として広く臨床応用されている。さらに連続して刺激するrepetitive TMS(rTMS)が開発され刺激頻度によって脳の興奮性を変化させることが明らかとなってから治療法への応用が検討されはじめた。

神経刺激による慢性疼痛治療としては硬膜外電極を用いた電気刺激療法が1991年ごろから行われはじめたが手術侵襲が問題である。この点rTMSは非侵襲的で安全性が高く2001年ごろからrTMSによる慢性疼痛治療の臨床研究が報告されはじめた。が痛みの原因が多岐にわたることや、rTMSの刺激条件、刺激部位が施設によって異なることもあり効果は一定していない。

2. 研究の目的

我々はrTMSが新たな神経因性疼痛治療法となるには基礎的研究がまず必要と考え神経因性疼痛モデル動物を用いてrTMSの効果を検証する。rTMSでの刺激では様々なパラメーター(刺激部位、刺激頻度、強度、回数、刺激期間)を設定する必要があるため、臨床研究のデータを参考にしながら、神経因性疼痛治療に最適な刺激条件を明らかとする。rTMSがこれらの神経因性疼痛と関連するファクターへ如何なる影響を及ぼし神経因性疼痛を抑制するのか、そのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)神経因性疼痛モデルの作製:Seltzerモデルを用いた。ddYマウスの左大腿上部皮膚を切開し筋腹を剥離し坐骨神経を露出させた。9-0のナイロン糸にて坐

骨神経の直径の1/3-1/2を結紮した。その後筋膜・皮膚を縫合した。Sham手術群は皮膚・筋膜の切開縫合のみ行った。手術2週間後から感覚評価ならびにrTMSを行った。

(2)機械的痛覚刺激: von Freyフィラメントを用いて機械的痛覚を評価した。ddYマウスを金網の上に1時間放置し環境になれたところで下肢足底に異なる刺激強度のフィラメントをあて逃避反応がみられるか否かをみた。1回5秒刺激し、5分間隔で5回繰り返し3回以上逃避すれば反応ありとした。反応する最小刺激強度を閾値とした。

(3)熱痛覚刺激の評価: plantar試験(Ugo Basile, Italy)で評価した。ガラス板上にマウスを1時間放置し環境になれたところで、下肢足底にレーザー光を照射し(刺激強度50)下肢を逃避させるまでの潜時を測定した。5分間隔で5回刺激を行い平均値を記録した。

(4)rTMS: ddYマウスの頭部～上半身をモリブデン製のメッシュの布で覆い固定した。下肢、尻尾は自由に動かせた。円形コイル(直径8cm)、日本光電製磁気刺激装置を用いた。rTMS群は運動閾値の120%の強度、刺激回数は1日あたり1000発刺激(200発ごとに2分休憩)とした。rTMSの頻度と刺激回数に関しては当初成熟期ddYマウスを用いて、20Hzの高頻度で2日/週刺激としたが、次項で記載しているがこの条件でのrTMSでは効果がみられなかった。このためこれまで我々が蓄積したddYマウスやてんかんモデルELマウスへの磁気刺激の経験をふまえ条件を再検討し、発育期ddYマウスへの変更、1Hzの低頻度、5日/週刺激へ変更した。rTMS(-)群はrTMSでの拘束時

間にあわせて最大25分間の身体拘束と rTMSの音刺激のみを行った。Sham手術群は拘束のみ行った。

(5) 刺激期間、刺激条件：ふたつの異なる条件で rTMSによる鎮痛効果を評価した。

① 成熟期 ddY マウスへの高頻度 rTMS：20 週齢の ddY マウスを用いて神経因性疼痛モデルを作製した。術後4週間は各マウスの機械的非侵害刺激と熱痛覚刺激に対する反応のみ評価した。術後5-13週目に毎週 rTMS 群 (n=8) は週の前半2日間に rTMS を、rTMS (-) 群は25分間の身体拘束を行った。週の後半に感覚評価を行った。

② 発育期 ddY マウスへの低頻度 rTMS：5 週齢で坐骨神経を結紮し、7~11週齢まで rTMS をおこなった。この間2週ごとに感覚閾値を記録した。

(6) スライス標本作製法と電気生理学実験：

マウスを深麻酔したのち脳を素早く取り出し、冷脳脊髄液下でマウス用ブレインスライサー(室町機械)を用いて anterior cingulate gyrus のレベルで冠状断の脳組織を取り出した。使用部位の決定には、G Paxinos & KJ Franklin のアトラス「The Mouse Brain」を参考にし、bregma1.1-2.2 mm を切り出した。その後、脳梁と anterior cingulate gyrus を含む部分を両側一緒にトリミングし、脳スライサーにて 400 μ m の厚みの皮質スライスを作成した。作成した皮質スライスをインターフェース型チャンバーに移動して2時間程度の回復時間をおいたのちに電気刺激と誘発電位の記録を開始した。

刺激にはステンレス双極電極(直径 50 μ m) を用い、記録にはガラス微小電極(抵抗 3-5 M Ω) を用いた。先行論文の記録部位を参考にして、Cingulate gyrus の area2 の 2-3 層に記録電極を、脳梁に近い部位に刺激電極をお

いた。電極間距離は、スライス間、群間で差がないように顕微鏡下で計測した。まず、刺激応答曲線を作成し、その後、シナプス後電位を誘導できる刺激値で伝達物質の放出効率を反映すると考えられている、Paired pulse facilitation を調べた。シナプス電位の解析にはベースラインから下向きに変化する誘発電位の振幅を計測した。刺激値が大きくなると、細胞体から発生する電場電位と思われる誘発電位が得られた。この電位の解析には、海馬体の集合スパイク電位の測定と同様に、上向きに変位するシナプス電位からの下向きの振れ幅を振幅として解析した。

(7) 統計処理：実験データは平均値 \pm 標準偏差で表記した。多重比較においてはANOVAを用いて統計処理を行った。p<0.05を統計的有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 成熟期 ddY マウスへの高頻度 (20Hz) rTMS

① 機械的痛覚刺激：rTMS (+) 群、rTMS (-) 群ともに術後10週までは左下肢(結紮側)の逃避閾値(0.7 \pm 0.2 g)は有意差(P<0.05)をもって右下肢(健側：1.2 \pm 0.1 g)よりも低下し感覚過敏がみられたが、13週目には両群ともに左右下肢間の有意差は消失した。rTMS (+) 群での結紮側(左下肢)の閾値は rTMS 前が 0.68 \pm 0.33 g、rTMS 刺激後が 0.68 \pm 0.27g にて rTMS 前後での閾値の変化はみられなかった。右下肢も同様に rTMS 前後での変化はなかった(前 1.53 \pm 0.63 g、後 1.18 \pm 0.35 g)。rTMS (-) 群でも左右下肢間での拘束前後の逃避閾値変動はなかった。

② 熱痛覚刺激：rTMS (-) 群、rTMS (+) 群ともに術後13週までは左下肢(結紮側)の熱刺激に対する逃避反応潜時(3.6 \pm 0.2 秒)は有意差(p<0.05)をもって右下肢(

健側:6.3±0.2秒)よりも短縮しており熱痛覚過敏を呈した。rTMS群での左下肢(結紮側)の閾値はrTMS前が3.4±0.7秒、rTMS刺激後が3.4±0.4秒にて変化はなかった。健側もrTMS前後での変化はなかった(前6.1±0.92秒、後6.0±0.6秒)。rTMS(-)群でも結紮側、健側ともに拘束前後での逃避閾値の変動はなかった。

成熟期ddYマウスを用いて神経因性疼痛モデルは作製できたがrTMSによる鎮痛効果は確認できなかった。これまで我々が蓄積したddYマウスやてんかんモデルELマウスへの磁気刺激の経験をふまえ条件を再検討し、発育期ddYマウスへの変更、術後4週ではなく2週目から5日/週の刺激、rTMSの刺激回数は1000発/日は変更しないが、低頻度刺激(1Hz)へ変更した。

(2) 発育期 ddY マウスへの低頻度(1Hz)rTMS

①機械的痛覚刺激：von Freyフィラメントによる機械的刺激からの逃避潜時はrTMS前は右下肢(健側)1.4±0.3秒に対して左下肢(結紮側)では0.4±0.1秒と短縮しており左下肢の感覚過敏を認めた。rTMSを8週行った術後10週目では左下肢の潜時はrTMS(+)群0.5±0.1秒、rTMS(-)群0.55±0.1秒であり、rTMSによる感覚過敏の変化はみられなかった。右下肢(健側)の潜時も両群間で差はみられなかった(Fig.1)。

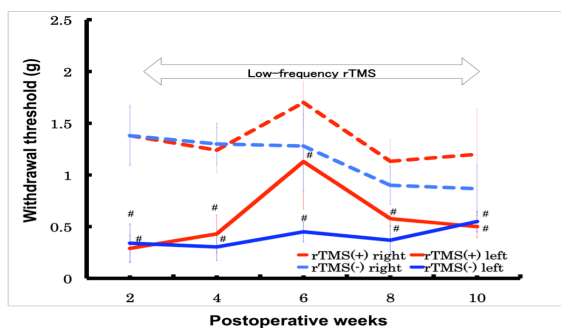


Fig.1 Withdrawal thresholds of the operated left side (straight line) and intact right side (dotted line) in response to mechanical stimulation applied to the corresponding hind paw in the mice applied with rTMS [rTMS(+), red] or audible artifact [rTMS(-), blue]. # p<0.01 between operated left and intact right hind paw.

②熱痛覚刺激：rTMS前の6週齢では熱刺激に対する逃避潜時は両群とも差なく右下肢7.5±0.7秒に対して結紮した左下肢では2.9±0.6秒と短縮し感覚過敏を呈した。rTMS後の11週齢ではコントロール群の左下肢潜時3.7±1.0秒に対してrTMS群4.6±1.1秒と有意に(p<0.001)延長しておりrTMS群のみ熱痛覚過敏が抑制された(Fig.2)。

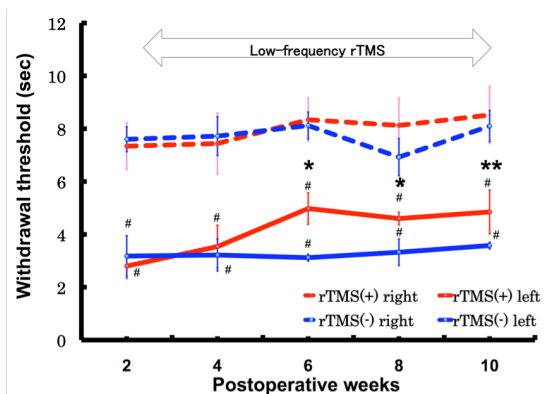


Fig.2 Withdrawal thresholds of the operated left side (straight line) and intact right side (dotted line) in response to heat stimulation applied to the corresponding hind paw in the mice applied with rTMS [rTMS(+), red] or audible artifact [rTMS(-), blue]. * p<0.01, ** p<0.05 between rTMS(+) and rTMS(-) of left hind paw. # p<0.01 between operated left and intact right hind paw.

③前帯状回スライス標本での電気生理学的解析：術後6週間経過（rTMS4週間実施）の時点で発育期ddYマウスの電気生理学的解析を行った。前帯状回のStimulus-response curve(SSR)は神経結紮したのみのrTMS(-)群ではshamコントロール群に比べて上方へシフトしており興奮性が増強していた。一方rTMS(+)群ではSSRはコントロール群と同じ反応を示しており、rTMSが前帯状回の過剰興奮を改善したことが判明した(Fig. 3)。Paired-pulse facilitationに関してはrTMSでの変化はみられなかった。

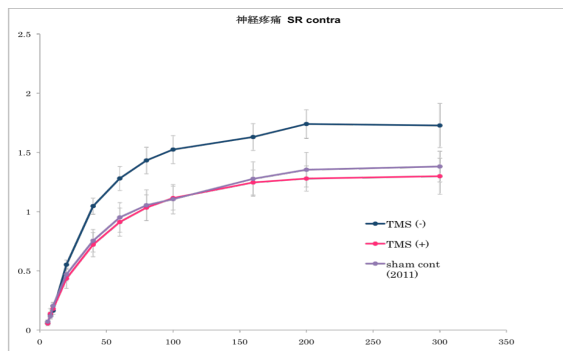


Fig. 3 stimulus-response curves of anterior cingulate gyrus of ddY mice with (red) or without (green) rTMS and sham-operated control ddY mice (purple).

以上よりrTMSは神経因性疼痛を改善する効果があること、効果発現は神経障害の程度、時期、rTMS刺激条件に依存すること、作用点として前帯状回の過剰興奮を抑制することが明らかとなった。rTMSは集合膜電位を変化させるがpaired-pulse facilitationへは影響しないことから、神経細胞膜の電位依存性Naチャンネル活性を変化させると考えられる。rTMSの鎮痛効果発現まで約1ヶ月rTMSが必要であり、その間の神経細胞内の分子レベルの変化を今後解析する必

要がある。またrTMS中止後いつまで鎮痛効果が残存するのか、また最大の鎮痛効果を発揮する至適条件に関しては、更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計4件)

①Tomoaki Yuhi, Modulation of neuropathic pain with repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in mouse neuropathic pain model, International Conference of Clinical Neurophysiology 2010, 2010年11月1日、神戸国際会議場(神戸)

②由比友顕, 反復経頭蓋磁気刺激法による神経因性疼痛治療：モデルマウスでの試み、第33回日本神経科学大会、2010年9月4日、神戸コンベンションセンター(神戸)

③由比友顕, ELマウスの感覚系にrTMSが与える影響、第51回日本神経学会総会、2010年5月21日、東京国際フォーラム(東京)

④由比友顕, 反復経頭蓋磁気刺激法(rTMS)が感覚系に与える影響：ddY及びELマウスでの検討、第39回日本臨床神経生理学会学術大会、2009年11月19日、北九州国際会議場(北九州)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

由比 友顕 (YUHI TOMOAKI)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：60330982

(2) 研究分担者

笛田 由紀子 (FUETA YUKIKO)

産業医科大学・産業保健学部・講師

研究者番号：10132482

上野 晋 (UENO SUSUMU)

産業医科大学・産業生態科学研究所・教授

研究者番号：00279324

(3) 連携研究者

なし