

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791083
 研究課題名 (和文) 帯状疱疹後神経痛に伴う脳内モノアミン動態の解明－難治性疼痛の治療に向けて
 研究課題名 (英文) Elucidation of the monoamine dynamics in the rat with postherpetic neuralgia- contribution to the treatment for refractory pain
 研究代表者
 舟尾 友晴 (FUNAO TOMOHARU)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：70433307

研究成果の概要 (和文)：帯状疱疹後神経痛モデルマウスを用いた実験は感染実験となり、実験室使用などの制約が生じるため、まず神経因性疼痛の代表的な坐骨神経結紮モデルラットを用いて脳内モノアミン動態を解析することとした。脳内モノアミン濃度を測定することは可能となったものの、測定値のばらつきが大きく難渋している状態である。測定に必要な試薬の微調整などを行うことで、再現性のある測定ができるよう努力を継続する予定である。

研究成果の概要 (英文)：It is necessary for this study to infect mice with herpesvirus. I have to use the laboratory for experimental virus infection, so I try to elucidate of the monoamine dynamics in the rat neuropathic pain model. It was possible to measure the monoamine in the rat, but the value of measuring the monoamine is unstable. I will make an effort to measure reproducibly and seek to clarify the monoamine dynamics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：麻酔科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：脳内モノアミン、疼痛治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 帯状疱疹後神経痛 (postherpetic neuralgia, PHN) は日常診療において最も頻度の高い神経因性疼痛 (neuropathic pain) で、帯状疱疹による皮疹の消失後にも疼痛が持続し、アロディニア (通常では痛みと感じな

い程度の刺激を痛みと認識する現象) を伴うことが特徴である。本疾患に対しては有効な治療法が未だに確立されておらず、鎮痛薬の内服や神経ブロック等種々の治療に対して抵抗性を示すことが多い。従って本疾患を有する患者は長期間の闘病生活を強いられる

場合が多く、これは患者本人の精神的・経済的負担に留まらず、医療費の増大・生産性の低下等、国家レベルでも多大な損失を生ずる。それ故帯状疱疹後神経痛の原因の解明および有効な治療法の確立は緊急を要する重要な課題である。

(2) 帯状疱疹後神経痛の発生機序については多くの研究がなされ、自発痛やアロディニアの原因として、脊髄後角の変性やC線維の萎縮・脱落、およびこれに続くA β 線維軸索の脊髄後角浅層への延長が明らかにされてきた。しかしこれらの研究のほとんどは直接の病変部位である脊髄を対象としたもので、これらの脊髄病変からの痛みの伝導や、疼痛の認識に大きく関与している視床や大脳皮質との関連についてはほとんど検討されず、また疼痛の認識機構についても直接の研究対象とされなかった。

(3) 疼痛の認識に大きく関与している視床や大脳皮質での脳内モノアミンを解析することが、帯状疱疹後神経痛に対する新たな治療法を探る一助になると考えた。

2. 研究の目的

(1) 脊髄に加えられた侵害刺激は、脊髄視床路(spinothalamic tract)を經由して大脳皮質に伝えられるが、この経路においては視床の腹後側核(ventroposterior lateral nucleus: VPL)、腹後内側核(ventroposterior medial nucleus: VPM)、腹後下核(ventroposterior inferior nucleus: VPI)や内側下核(thalamic nucleus submedius: SM)が皮質への刺激の伝導に大きな役割を果たしていることが明らかになった。近年、実験動物を用いた研究から、視床の一部分を構成する腹側核(ventrobasal nucleus)が帯状疱疹後神経痛の発現に特に重要な役割を果たしており、神経因性疼痛を有する動物においては腹側核からのセロトニンの分泌が低下していることが明らかになった。

(2) 帯状疱疹後神経痛に対して臨床的に有効とされる、アミトリプチリンに代表される三環系抗うつ薬は何れもドパミン、ノルアドレナリン、セロトニンといった脳内のモノアミン濃度に影響を与えるうえ、近年使用が開始された選択的セロトニン再取り込み阻害薬(selective serotonin reuptake inhibitors: SSRI)も、その有効性が知られている。これらの臨床データは、帯状疱疹後神経痛の発生にこれらの神経伝達物質、中でもセロトニンの関与を示唆するものである。

(3) 本研究では帯状疱疹後神経痛モデルを用いて腹側核のモノアミンの動態を定量的に検討し、帯状疱疹後神経痛の発生と脳内モノアミンの関係を明らかにする。さらに鎮痛薬と脳内モノアミンとの関係を検討し、鎮痛の機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 6週齢、体重20gのBALB/c雌マウスを用い、次の手順に従って帯状疱疹後神経痛モデルを作成する。先ずペントバルビタール(50mg/kg、腹腔内投与)による全身麻酔下に除毛クリームにて右後脚を中心に腹側・背側を脱毛する。3日後に右後脚の皮下組織が薄い部分(5 x 5mm)を27G針にて乱刺したのちHerpes Simplex Virus type-1(1 x 10⁶ plaque-forming units in 10 μ l, 7401H strain)を接種する。接種後、22°Cで12時間毎の昼夜サイクルで飼育し、食餌と水分は自由に与える。運動麻痺や死亡を防ぐため、接種5日後~11日後までvalacyclovir (VCV: GlaxoSmithKline, U.K.)を25mg/kg、1日2回経口投与する。

Herpes Simplex Virus type-1を接種したマウスのうち約半数は、帯状疱疹様皮疹が治癒(接種12日後)した後はアロディニアや痛覚過敏を認めず、接種20日後には疼痛関連反応もみられなくなる。しかし半数では皮疹が消失した後もこれらが残存し、接種60日後にも疼痛関連反応がみられることが知られており、これらを帯状疱疹後神経痛モデルとする。疼痛の評価はvon Frey filament (0.17g, 1.20g

の2種類)を用いて行い、得られたスコアに基づいてアロディニアや痛覚過敏の診断を行う(文献2)。接種20日後の時点において帯状疱疹後神経痛モデルマウスと帯状疱疹後神経痛に移行しなかったマウスとの2群に分ける。

(2) ペントバルビタールによる全身麻酔下で動物を定位脳固定装置に固定し、bregmaの後方1.7mm左外側1.9mmにバーホールを作成する。3.6mmの深さの腹側核(ventrobasal nucleus)にマイクロダイアライシスプローブ(Eicom, AU-1-7-01)を留置の後、覚醒させる。2-3日後に下記のマイクロダイアライシス法に従って脳細胞外液中のセロトニン、ドパミン、ノルアドレナリン濃度の測定を行い、帯状疱疹後神経痛の有無から成る2群で比較・検討する。

(3) シリンジポンプ(ESP-64, Eicom)を用いて、マイクロダイアライシスプローブを人工脳脊髄液で灌流($2\ \mu\text{l}/\text{min}$)する。プローブを通して得られた灌流液を、フラクションコレクターを用いて収集、冷却貯留する。10分間に得られた灌流液 $20\ \mu\text{l}$ 中の $15\ \mu\text{l}$ をオートサンプルインジェクターを用いて高速液体クロマトグラフ(high performance liquid chromatography: HPLC)に注入する。HPLCの移動相は10%アセトニトリルを含む75mM磷酸緩衝液(pH 3.0)、流速は $0.3\text{ml}/\text{min}$ とし、分離用カラムはODS系(EICOMPAK SC-50DS, Eicom)を用いる。作用電極に純黒鉛、参照電極に塩化銀を装着した電気化学検出装置(HTEC-500, Eicom)を用い、550mVの荷電時に得られたピーク面積から外部標準直線を用いて定量を行う。

4. 研究成果

(1) 帯状疱疹後神経痛モデルマウスを用いた実験は感染実験となり、実験室使用などの制約が生じるため、まず神経因性疼痛の代表的な坐骨神経結紮モデルラットを用いて脳内モノアミン動態を解析することとした。

(2) 8,9週齢Sprague-Dawley系雄ラットを用い、セボフルレンによる全身麻酔下に一側下

肢の坐骨神経を剖出し、5-0絹糸で2回結紮することで坐骨神経結紮モデルラットを作成した。約2週間後機械的アロディニアが発現した坐骨神経結紮モデルラットに対し、ペントバルビタールによる全身麻酔下で動物を定位脳固定装置に固定し、bregmaの後方2.3mm外側3.5mmにバーホールを作成した。7mmの深さの腹後側核(ventroposterior lateral nucleus: VPL)にマイクロダイアライシスプローブ(Eicom, AU-1-7-01)を留置し、シリンジポンプ(ESP-64, Eicom)を用いて、マイクロダイアライシスプローブを人工脳脊髄液で灌流($2\ \mu\text{l}/\text{min}$)する。プローブを通して得られた灌流液を、フラクションコレクターを用いて収集、冷却貯留し10%アセトニトリルを含む75mM磷酸緩衝液(pH 3.0)を移動相とする高速液体クロマトグラフ(high performance liquid chromatography: HPLC)に注入した。作用電極に純黒鉛、参照電極に塩化銀を装着した電気化学検出装置(HTEC-500, Eicom)を用い、550mVの荷電時に得られたピーク面積から外部標準直線を用いてドパミン、ノルアドレナリン、セロトニン濃度の定量を行った。

(3) 生体実験であるため、脳内モノアミンが測定できるようになるまでにかかなりの時間を要してしましたが、これらの脳内モノアミンのうち、ドパミンとセロトニンの測定値は再現性を認めるようになった。しかし、ドパミンやセロトニンに比べ、高速液体クロマトグラフで最初にピークが出現するノルアドレナリンの測定値については、ばらつきが大きく難渋している状態である。マイクロダイアライシスプローブの灌流液や移動相に工夫をすることで、脳内モノアミン濃度を正確に測定するよう努力を継続し、帯状疱疹後神経痛・複合性局所疼痛症候群・糖尿病性神経障害などを含めた神経因性疼痛の新たな治療法の開発に尽力する予定である。

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 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舟尾 友晴 (FUNAO TOMOHARU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70433307

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし