

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：35413

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650342

研究課題名(和文) ラット神経因性疼痛モデルに対する理学療法の電気生理学的指標による客観的評価の試み

研究課題名(英文) A study evaluating the effects of physical therapy on rat models of neuropathic pain based on electrophysiological parameters

研究代表者

山岡 薫 (Yamaoka, Kaoru)

広島国際大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：10200586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疼痛モデルラットとして神経損傷の方法を試み、それらに対し水浴、経皮的末梢神経電気刺激(TENS)、全身振動などの理学療法を用い、その効果を検討した。TENSは低下した温熱疼痛閾値を元に戻し鎮痛効果がみられた。神経損傷に加え、ギプスによる足関節の不動化により疼痛モデルが作成出来た。慢性疼痛肢を支配する感覚神経(後根神経節細胞)はTTX感受性のNaチャネルの機能発現の増加が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Effects of physical therapy on the chronic pain model of rat induced by neuronal damage was tested by using exercise training (swimming), transcutaneous electrical reversed nerve stimulation (TENS) and whole-body vibration. TENS reversed lowered thermal pain threshold of rats induced by nerve constriction. In addition to neuronal damage of sciatic nerve, immobilization of ankle joint successfully established a chronic pain model. Alteration of electrophysiological property, such as increased expression of TTX-sensitive sodium channels, of sensory nerve (dorsal root ganglion neuron) innervating the injured limb was suspected.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：慢性疼痛 電位依存性Naチャネル 後根神経節細胞 テトロドトキシン

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛とは単に時間の経過が慢性的というだけではなく、疼痛を発生させた原疾患が治癒したあとにも持続する疼痛や治癒困難な慢性疾患により長期間痛みが持続する過程で生じる疼痛を指す。慢性疼痛が急性疼痛と大きく異なる点は、本来は侵害刺激ではない触刺激や温刺激に対して疼痛を生じることであり、この痛みをアロディニアという。また、侵害刺激に対しては通常よりも強い疼痛を生じ、この状態を痛覚過敏という。

慢性疼痛とは複雑なメカニズムであり、辻井^[1]によると痛みの末梢原因である組織損傷などの侵害刺激がない慢性痛の治療の場合、そのメカニズムが解明されていない現在では、理学療法がそれらに対して何ができるかは不明ではあるという。そのため理学療法の治療効果を定量的に観察しそのメカニズムを明らかにする必要がある。

痛覚を伝える末梢性の感覚入力には後根神経節細胞、dorsal root ganglion (DRG) が担っている。DRG には体性感覚の複数のモダリティーを伝える神経が存在しており、その種類によって細胞の大きさが異なっている。小型細胞は無髄のC線維を担っており生理的に遅い痛覚の伝達を担い、主に TTX-R の Na_v1.8 や Na_v1.9 が多く発現している^[2]。組織の持続的炎症や神経損傷はこれらの Na チャネルの発現分布を変えることが、遺伝子や蛋白発現のレベルで報告されており^[3]、その結果感覚神経細胞や脊髄の二次ニューロンに異常自発活動が誘発され^[4]、侵害刺激が無くとも疼痛を感じる慢性疼痛の病態が考えられている。

本研究では、ラット疼痛モデルにおいて、理学療法の効果と電気生理学的性質の関係を示すことで、慢性疼痛のメカニズムを明らかにし、慢性疼痛の新たな治療方法の開発につなげたいと考える。

2. 研究の目的

(1) ラット疼痛モデル作成方法の確立

慢性疼痛動物の作成方法には 1988 年に Bennett らが報告した坐骨神経絞扼モデル (CCI モデル) などがある^[5]。Bennett らは一侧の坐骨神経を 4-0 クロム処理カットグートにて 4 回緩やかに絞扼した。しかし、現在では牛由来のカットグートは BSE のため販売中止となっている。そのため、絞扼モデル以外の抗がん剤モデルや不動化モデルなどを用いる方法について検討した。

(2) 慢性疼痛モデルラットにおける理学療法の効果の定量的判定

慢性疼痛ラットに対する理学療法による疼痛閾値の上昇についての定量的なデータは一部を除いてほとんど報告されていない。本研究では理学療法として、水浴運動、経皮的末梢神経電気刺激 (TENS)、全身振動を用いた。

(3) 慢性疼痛の細胞生理学的メカニズムの解明

DRG ニューロンに選択的に発現する Na チャネルタイプは少なくとも 3 種類あり、Na_v1.7 が TTX (テトロドトキシン) 感受性タイプ、Na_v1.8 と Na_v1.9 が TTX 抵抗性タイプである。従来から神経損傷や炎症により Na チャネルの発現が増すと報告されているが、どのタイプがどのように疼痛閾値を低下させるかについてはほとんど分かっていない。本研究では疼痛動物より採取した DRG 細胞の TTX 感受性 (TTX-S) および抵抗性 (TTX-R) Na チャネル発現の割合と細胞の大きさの関係を調べ、Na チャネルが慢性疼痛に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 疼痛動物の作成

神経損傷モデル

Wistar ラット雄、8 週齢を広島国際大学東広島キャンパス動物実験施設に入荷後、一週間は通常飼育を行った。その後無菌的にラットをソムノペンチル麻酔下 (体重 1kg あたり 0.5ml を腹腔内注入) に膝下部を切皮して、坐骨神経を露出。脛骨神経と総腓骨神経の分岐する近位端で切断、絞扼、部分損傷など行った。絞扼には 4-0、5-0、7-0 絹糸を用いた。

不動化モデル

で神経損傷処置の 1 週間後に左後肢の足関節を底屈状態でギプス固定を行った。ギプス固定はまず、ソムノペンチル麻酔下幅 5mm のテーピングテープを膝関節より足関節を超えるまで巻き、底屈状態を維持した。その後径 0.9mm のステンレス製針金で円筒状の枠をそのうえに作成、さらにその上からギプス用テープ (キャストライト、アルケア) を 5mm 幅にしたものを巻き付け用法に従い固定した。不動化は少なくとも 4 週間維持した。

抗がん剤モデル

Seong ら^[6]の方法を参考に行った。濃度を 2mg/ml にしたパクリタキセルを体重 100g あたり 200 μ l 腹腔内注射にて投与した。隔日 4 回投与を 1 セットとし、2 セット行った。

(2) 理学療法

経皮的末梢神経電気刺激 (TENS)

ラットの左後脚の毛をバリカンと除毛クリームで取り除き、左脛骨上 1/3 に両側から心電図用ディスプレイ電極 F ビトロードを張り付けた。TENS のプロトコルは Hong ら^[6]の研究を参考にして 1mA-1mA-2mA (各 10 分間) の電流をパルス幅 0.2 秒、周波数 100Hz で実施した。電流は電流計で測定しながら行った。

水浴療法

Chen ら^[7]を参考とした。タンク内に温浴 (35 \pm 5 $^{\circ}$) を張り、四肢が床面に接しない水位で行った。また、溺死防止のためラットの尾部に 50cc のプラスチック試験管を

装着し行った。本研究における水浴療法プロトコル(表1)は以下の通りである。

日	水浴時間(分)	休憩時間(分)	水浴時間合計(分)
1	30	15	90
2	45	15	90
3	60	15	90
4	75	15	90
5~10	90	0	90

表1. 水浴プロトコル

全身振動

全身振動装置 JET VIBE (Woojin System Co., Ltd, Korea)上に載せた段ボールの箱の中にラットを入れ 50Hz の振動を 5 分間与え、1 分間の休憩をとる組み合わせを 3 セット行い 1 セッションとした。治療群のラットは、2 週間の全身振動療法(1 日 1 セッション、週 5 セッション)を行い、振動暴露の合計時間は一日 15 分とした。

(3) 疼痛閾値の測定

疼痛動物作成 4 日前から、治療終了 4 日後までプランターテスト、von Frey テストによりそれぞれ温熱刺激、機械的刺激に対する疼痛逃避反応が起こるまでの痛覚閾値の測定を実施した。プランターテストはプランター式鎮痛効果測定装置(UGO BASILE 社)を用い、ラットを無拘束の状態ではガラスプレートの上に載せラットの後肢に赤外線熱刺激を与え、逃避反応が起こるまでの痛覚閾値を測定した。Von Frey テストはラットを無拘束の状態では金網の上に載せ、網の下からラットの足底に対して垂直にフィラメント(North Coast Medicine 社)が曲がるまで押し当て、逃避反応が出現した時のフィラメントの太さを機械的刺激の閾値とし測定した。

(4) DRG ニューロン採取

基本的には三五^[9]らの方法に従った。ラットにソムノペンチル(0.5ml/kg・体重)を腹腔内投与し麻酔後、ラットの背部の毛をバリカンにて剃った。その後、背部から皮膚を切開し、筋を除去し、脊柱を取り出した。脊柱を切開し、椎間孔から DRG ニューロンを採取した。採取した DRG ニューロンを F12 培養液 1.6ml 入れた試験管に後根神経節細胞を入れ、1%コラゲナーゼ 400 μ l を加え(0.2%コラゲナーゼ)、37 $^{\circ}$ C で 2 時間振とうした。その後 HANKS 液で 2 回洗浄、HANK 液に 0.25%トリプシンを加え 15 分間処理後、トリプシンインヒビターで反応を停止させた。さらに 30%パーコールによる密度勾配遠心分離(1,000 回転、5 分)により、ニューロンを分離した。回収したニューロンを血清入りの培養液で 2 回洗い、ポリリジンコートした培養ディ

シュに 10%ウシ胎児血清を含んだ DMEM 培養液を入れ、37 $^{\circ}$ C 95%O₂ 5%CO₂ 下に培養した。

(5) 電気生理実験

採取した DRG ニューロンは培養後 4~72 時間の間で培養ディッシュより取りだし電気生理実験に供した。パッチクランプ法によるホールセル Na 電流を記録した。ただし細胞外液は 70 mM NaCl, 67 mM N-methyl-D-glucamine, 1 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM glucose, and 5 mM HEPES (pH 7.4)。細胞内液(電極液)は 70 mM CsF, 60 mM CsCl, 12 mM NaF, 5 mM ethylene-bis (oxonitrilo) tetraacetic acid, and 5 mM HEPES (pH 7.4) とし、Na 電流以外の電流を除いた。電位依存性 Na 電流(VGSC)は電極液を含んだ電気抵抗が 1.5-3 M の間に入るよう調整した。電流は Axopatch 200B 増幅器 (Axon Instruments; Foster City, CA, USA), で 10kHz の high cut filter を通して記録し、電流が電極やシリーズレジスタンスを通過することによるエラーを電氣的に 80%まで補償した。その際、細胞の電気容量(キャパシタンス)も測定した。このキャパシタンスを細胞の大きさの目安とした。記録された電流は 12 ビットのサイズで 50-100 kHz 毎に アナログデジタルコンバーター-DigiData 1321A interface (Axon Instruments)でサンプリングし、パソコンのハードディスクに保存した。データの保存やパルスプロトコルのコントロール、Axopatch 200B 増幅器とのインターフェースには実験用ソフトウェア pClamp (Version 8; Axon Instruments)を用いた。なお、Na 電流は保持電位 -100 mV から -10 mV まで 10ms のパルスを与え膜電位固定法により記録した。また TTX-R 電流を記録するため、Na 電流が得られたところで、外液に 0.3 μ M の TTX を流し、TTX-S 電流をブロックした。残った Na 電流を TTX-R 電流とした。TTX-S 電流は元の電流から TTX-R 電流を差し引いたものとした。Na_v1.8 選択的 Na チャネル ブロッカー A803467 1 μ M (Sigma-Aldrich) を TTX(0.3 μ M)とともに灌流し、Na_v1.8 電流を求めた。

4. 研究成果

(1) 疼痛動物の作成について

神経絞扼モデル

4 回のトライアルを行った(それぞれ n=5, 3, 3, 4)。そのうち 2 回目(n=3)のトライアルで温熱閾値が 6.9 秒から 4.8 秒と有意に低下し疼痛動物の作成に成功した。ただし機械的閾値は 1.75g から 1.05g と低下したものの、有意ではなかった。4 回目のトライアル(n=4)では温熱、機械閾値ともそれぞれ 5.9 秒から 4.15 秒、1.0g から 0.45g と低下したが有意

ではなかった。

不動化モデル

現在進行中で神経絞扼に加え不動化を行った1例を報告する。右足の機械的閾値が8g、左足の閾値が8gであったが、左坐骨神経絞扼により左機械的閾値が6gから8gの間を変動し、不動化を4週間行った後は左足の機械的閾値が右足の8gと比べ6gに安定した。

抗がん剤モデル

2回のトライアルを行った(それぞれn=4, 4)。1回目において温熱閾値が左右それぞれ6.0秒から4.6秒、5.8秒から4.05秒に有意に低下し、機械的閾値は右のみ0.75gから0.25gに有意に低下した(左は1.9gから0.23gと低下したが有意ではなかった)。

(2)理学療法の効果について

経皮的末梢神経電気刺激(TENS)

坐骨神経絞扼を行った3例で温熱閾値が6.9秒から4.8秒に低下したものの2例についてTENSを施したところ、6.8秒に閾値が有意に増加した。機械的閾値の増加は有意ではなかった。

水浴療法

抗がん剤により機械的閾値が低下した群4例(0.6gから0.2gへ)のうち2例に水浴療法を施した。水浴療法を施した方が施さない2例に比べ閾値が低かった(0.23g vs 0.4g)。水浴そのものが治療というよりストレスになった可能性がある。

全身振動

部分切断、完全切断それぞれ1例ずつにおいて、全身振動を行ったが、切断による疼痛閾値の低下が認められなかったため、効果について判断出来なかった。

(3)電気生理学的検討

疼痛動物におけるNaチャンネル発現の変化
神経絞扼を行った2例と絞扼を行わなかった5例において、TTX(0.3 μ M)投与前後で電流を比較し、TTX感受性Na電流およびTTX抵抗性Na電流と細胞の大きさの関係について求めた(図1)。なお、細胞の大きさは電気生理実験でwhole-cell patch clampを行うときに得られた細胞のcapacitanceを指標とした。

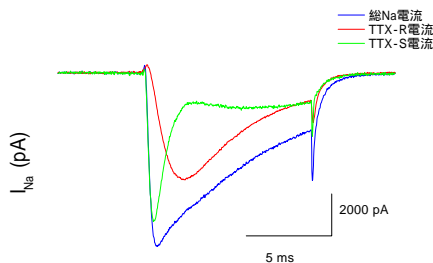


図1

図2のように絞扼を行なった群ではTTX感受

性電流は細胞サイズの大きさが小さいほど、電流密度が大きい結果となった。ただし有意な相関は得られなかった。一方、絞扼を行わなかったコントロール群ではそれほど強い関係が見られなかった。TTX抵抗電流については、絞扼を行った群、行わなかった群いずれも細胞サイズで電流の大きさの関係は認められなかった。

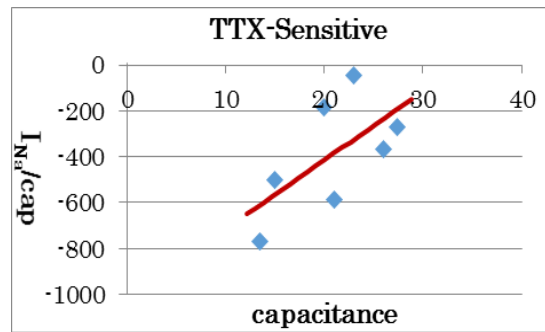


図2

神経損傷による電流の増大の原因が小細胞のTTX感受性Naチャンネルの発現に増大によることを示唆する。

Na_v1.8チャンネル電流の抽出

ここまではDRGニューロンにTTX感受性が抵抗性かについて、TTXを使うことによって区別した。最近Na_v1.8チャンネルを選択的にブロックするA803467が入手可能となったので、神経絞扼+不動化ラットで疼痛閾値が低下した側のDRGニューロンを採取し、電流を記録した。4つの細胞から記録できたのは1例のみで、その細胞のサイズは25.7pFで比較的大きい細胞であった(図3)。しかしTTX感受性細胞は細胞の大きさが小さいほど電流が大きくなる傾向が見られた。

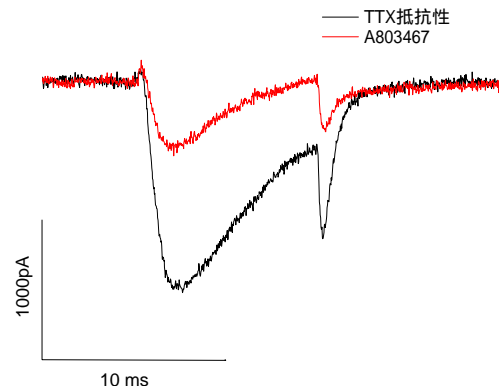


図3

まとめ

神経絞扼による慢性疼痛ラットモデルは作成できたが、その成功率は低かった。

TENS は疼痛閾値を上げる効果があることが確認できた。

神経絞扼や不動化による疼痛閾値の低下について、TTX 感受性電流の増大が予測されたが、TTX 抵抗性電流の役割については結論が得られなかった。

TTX 感受性電流の増大か、TTX 抵抗性電流の増大のいずれが慢性疼痛の原因であるかについて更なる研究が必要である。

(文献)

- [1] 辻井洋一郎：痛みに対する理学療法の効果 理学療法学 第20巻第2号:69-75,1993
- [2] Fukuoka, T et al. Comparative study of the distribution of the α -subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. J Comp Neurol 2008; 5: 188-206
- [3] Waxman SG et al. Sodium channels and pain. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 7635-7639
- [4] 緒方宣邦, 中本千泉. 慢性疼痛発現における電位依存性 Na チャネルの役割 医学のあゆみ 2004 ; 211: 359-364
- [5] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain 1998; 33(1):87-107
- [6] Hong-Xiang L, Jin-Bin T, Fei L et al. Repeated 100 Hz TENS for the Treatment of Chronic Inflammatory Hyperalgesia and Suppression of Spinal Release of Substance P in Monoarthritic Rats. eCAM. 2007; 4(1): 65-75
- [7] Chen Y-W, Li Y-T, Chen Y-T, et al. Exercise Training Attenuates Neuropathic Pain and Cytokine Expression After Chronic Constriction Injury of Rat Sciatic Nerve: Pain Mechanisms 2012; 114: 1330-1337
- [8] Seong SC, Won UK, Jae SN et al. Effect of Ethyl Pyruvate on Paclitaxel-Induced Neuropathic Pain in Rats. The Korean Journal of Pain. 2013; 26: 135-141
- [9] Sango K et al. Cultured adult animal neurons and Schwann cells give us new insights into diabetic neuropathy. Curr Diabetes Rev 2006; 2: 169-83.

5 . 主な発表論文等
未発表

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 薫 (YAMAOKA, Kaoru)

広島国際大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号： 10200586

(2) 研究分担者

小澤 淳也 (OZAWA, Junya)

広島国際大学・総合リハビリテーション学部・准教授

研究者番号： 00435059