

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861908

研究課題名(和文)超音波とナノバブルを利用した分子デリバリーによる疼痛制御法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the pain control method by molecular delivery using ultrasound and nanobubbles

研究代表者

的場 あつ子(青井あつ子)(MATOBA, ATSUKO)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70547257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：後足切開法による術後疼痛モデルラットの足底に、ナノバブル(直径1 μ m未満の脂質二重膜微小気泡)と超音波によって、GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factor(グリア細胞株由来神経栄養因子)プラスミドを導入することで熱刺激・機械刺激・自発痛に対する鎮痛効果が得られた。しかしながら、疼痛関連のサイトカイン、神経細胞のアポトーシスに変化は見られず、さらなる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：Introduction of GDNF plasmid using nanobubbles and ultrasound into plantar muscle in postoperative pain model rat with plantar incision influence guarding behavior and heat/mechanical hyperalgesia. Analgesic effects are observed. However expression of pain-related cytokines and apoptosis of nerve cells are not changed. Further research will be necessary.

研究分野：医歯薬学

キーワード：術後疼痛制御 ナノバブル 分子デリバリー GDNF

1. 研究開始当初の背景

手術侵襲に伴う末梢神経損傷、それに引き続く炎症反応により、複雑な疼痛状態が引き起こされるが、この術後疼痛状態を通常の鎮痛薬や抗炎症薬で十分にコントロールすることは困難である。特に、非侵害刺激を激しい疼痛として認識するアロディニアをはじめとする神経因性疼痛に対しては、今現在も有効な治療法は確立されていないが、これまでまったく疼痛管理とは関係していないとされている薬剤での鎮痛効果が明らかとなってきた。

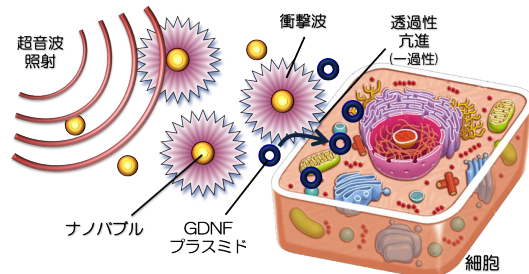
痛覚伝導経路には複雑な疼痛制御機構・因子があり、この制御機構の修飾が術後痛に関連していると考えられている。なかでも、神経栄養因子の一つである GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) は、脊髄運動神経や末梢神経細胞の分化・生存・アポトーシスに関与していることで知られ、GDNF 依存性ニューロンでの神経因性疼痛への関与⁽¹⁾が注目されている。神経結紮モデルにおいて多くの研究がなされてきたが、痛覚に対する GDNF の効果は、作用部位・病理学的状態によって異なり、一定の見解は得られていない。また、術後疼痛モデルでの GDNF 投与に対する疼痛反応の報告はないが、ラット術後疼痛モデルでの GDNF 発現量の変化は確認されており、GDNF の術後疼痛への関与が示唆されている。

現在、術後急性疼痛の疼痛管理としては、局所麻酔薬の局所注入や麻薬の静脈内持続投与が主体である。しかしながら、作用持続時間が短い、意識レベルの低下や呼吸抑制等の副作用が大きいという欠点がある。これに代わる新たな手法として、超音波とナノバブル (直径 1 μm 未満の微小気泡) を利用する分子デリバリー法がある。すでに様々な物理学的方法が医療分野に応用されるようになっており、持続的な振動による骨癒合促進作用や、超音波を用いた結石破碎・皮膚からの薬剤吸収促進作用がこれにあたる。本手法も物理学的方法の一つで、癌治療などの分野で研究が試みられているが、疼痛制御系での報告は皆無である。本手法の原理は、ナノバブルに超音波を照射することによってナノバブルを崩壊させ、この際に発生するキャピテーションバブルの衝撃波によって一過性の細胞膜透過性を誘導し、細胞外の分子を細胞内へと移行させると考えられている (図 1)。

申請者は、術後急性疼痛や慢性疼痛の制御の手段として、物理学的方法の一つである超音波とナノバブルを利用した分子デリバリー法を用い、疼痛部位や支配神経周囲へ GDNF を導入することによって、安全かつ副作用が少なく、良好な覚醒状態を維持した鎮痛療法を確立することは、臨床での疼痛制御の質の

向上に有意義な研究であると判断し、本研究を立案した。

図 1: 超音波とナノバブルを利用した分子デリバリー



デリバリー法のメカニズム ナノバブルとプラスミド DNA の混合液に超音波を照射すると、一過性の衝撃波によって細胞膜の透過性が変化し、プラスミド DNA が細胞内に取り込まれる。

2. 研究の目的

物理学的分子・薬剤デリバリー法の一つとして知られている超音波とナノバブルを利用した手法を用い、疼痛部位および支配神経周囲へ GDNF を導入することによって、安全で副作用が少なく、適切な覚醒状態を維持できる鎮痛療法を確立すること。

3. 研究の方法

(1) 術後疼痛に対する GDNF 鎮痛効果の確認 GDNF 導入

ナノバブルと GDNF プラスミドの混合液をラットの足底にマイクロシリンジで注入する。その後ただちに標的部位に超音波を照射し、GDNF 導入を行う。

鎮痛効果の評価

術後痛モデルは、ラットの後足切開により作成し、鎮痛効果は赤外線熱刺激試験、Von Frey 試験により、ラットの疼痛閾値を GDNF 導入前後で経時的に評価する。また、自発痛に対する評価はスコアリング法にておこなう。1 時間、5 分毎に 1 分間観察 (合計 24 点) 0 点: 両足に体重が均等にかかっている。1 点: 両足に体重が均等にかかってない。2 点: 切開足が明らかに浮いている。それぞれの評価は、GDNF 導入前 (Baseline)、導入後、足底切開前 (day 0)、足底切開後 1、2、3、7、10 日におこなった。

(2) 超音波とナノバブルによる分子デリバリーの影響の確認

神経・組織障害の検討

ロータロッド試験でラットの行動調査を行い、運動障害の有無を確認する。また、病理標本による神経・筋組織の変性等の確認を

実験終了後ならびに長期経過後に行う。

(3) GDNF の発現による、他の神経栄養因子・サイトカイン・神経細胞への影響の探索

GDNF 発現の確認

免疫組織化学染色を利用して発現の確認とともに発現部位の同定を行う。

RT-PCR、Western blotting、ELISA 法などの手法を利用して、GDNF 発現の定量を行う。

GDNF が他の神経栄養因子・サイトカインに与える影響の調査

疼痛に関連のある神経栄養因子・サイトカインとして知られている、BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)、Neurotrophin-3、Interleukin-6,10 等の発現量を定量 PCR で測定する。

神経細胞のアポトーシスの分析

GDNF は神経細胞の生存・アポトーシスに関連があることが知られている。そこで、ラット術後疼痛モデルの足底末梢神経・脊髄神経細胞におけるアポトーシスの影響を調査する。

4. 研究成果

(1) 術後疼痛に対する GDNF 鎮痛効果の確認

GDNF 導入

準備実験として GDNF と GFP:green fluorescence protein プラスミドの混合液を導入したところ、足底筋での GFP 発現が認められたため、手技の妥当性を確認できた (図 2)。

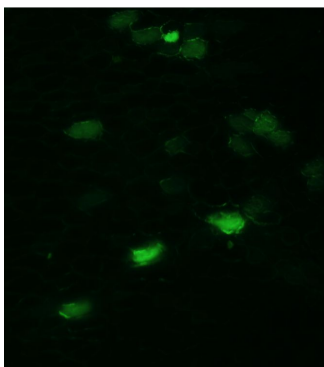


図 2 : ラット足底筋の蛍光顕微鏡写真

鎮痛効果の評価

生食群とナノバブル群で疼痛閾値・自発痛スコアに有意な差は認められなかった。GDNF+ナノバブル群では、他群と比較して、熱刺激・機械刺激に対する疼痛閾値が上昇し、その効果は足底切開の 10 日後まで続いた。また、自発痛スコアは 3 日後まで有意な差が得られた。(図 3, 4, 5)

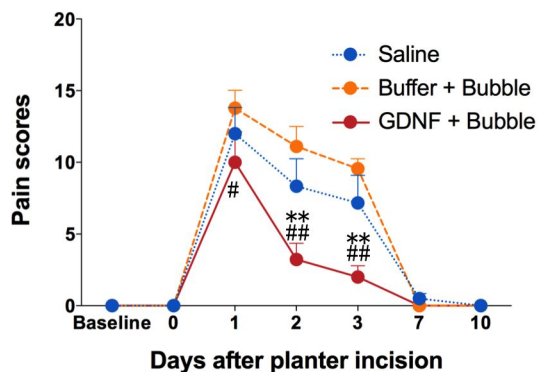


図 3 : Nonevoked guarding pain behavior after plantar incision

All data are expressed as mean ± SEM. N = 9.

**P < 0.01 compared with Saline

#P < 0.05, ##P < 0.01 compared with Buffer

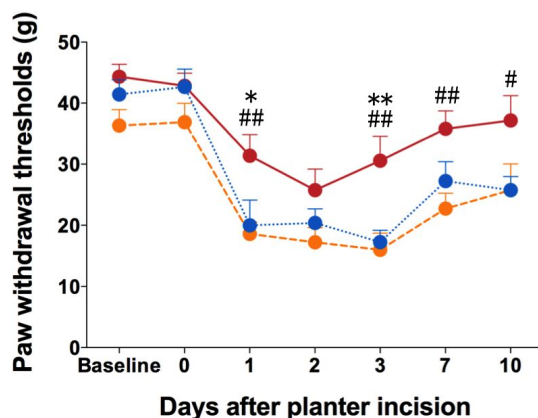


図 4 : Mechanical withdrawal threshold after plantar incision.

All data are expressed as mean ± SEM. N = 9.

*P < 0.05, **P < 0.01 compared with Saline

#P < 0.05, ##P < 0.01 compared with Buffer

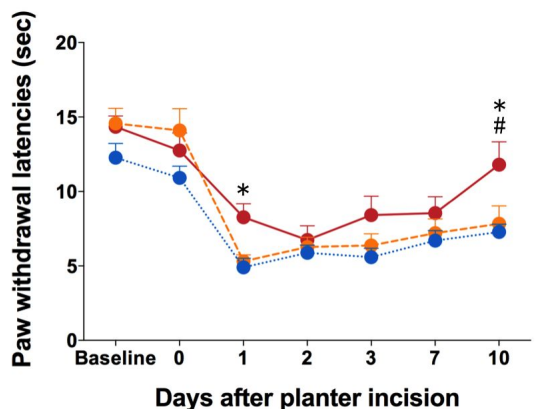


図 5 : Withdrawal latency to heat after plantar incision.

All data are expressed as mean ± SEM. N = 9.

= 9.

* $P < 0.05$ compared with Saline

$P < 0.05$ compared with Buffer

(2) 超音波とナノバブルによる分子デリバリーの影響の確認

神経・組織障害の検討

分子デリバリーの前後でラットの行動に差があるかどうかをロータロッド試験で確認したところ、有意な差は得られなかった。また、長期経過後（14日後）足底の神経・筋組織標本で炎症所見は認められなかった。

(3) GDNF の発現による、他の神経栄養因子・サイトカイン・神経細胞への影響の探索
GDNF 発現の確認

ラットの足底筋標本に免疫組織化学染色を用いて GDNF の発現部位を調査したが、染色部位は同定できなかった。また、タンパク質を抽出しウェスタンブロット法にて GDNF タンパクの確認をおこなったが、検出できなかった。GDNF の受容体に対しても同様に検出を試みたが、いずれも確認できなかった。

GDNF が他の神経栄養因子・サイトカインに与える影響の調査

GDNF の導入による、BDNF : brain derived neurotrophic factor(脳由来神経栄養因子)、インターロイキン6の発現量に有意な変化は認められなかった。

神経細胞のアポトーシスの分析

神経細胞のアポトーシスに対する有意な変化は確認されなかった。

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1件)

Ono H, Ohtani N, Matoba A, Kido K, Yasui Y, Masaki E. Efficacy of intrathecal esmolol on heat evoked responses in a postoperative pain model. *Am. J. Ther.* 22(2): 111-116, 2015. 査読有.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411610>

[学会発表](計1件)

的場あつ子、城戸幹太、水田健太郎、小玉哲也、正木英二、ナノバブルと超音波を用いた GDNF 遺伝子導入が術後疼痛に及ぼす影響、第 60 回日本麻酔科学会、2013 年 5 月 23 日、札幌

6 . 研究組織

(1)研究代表者

的場あつ子 (ATSUKO, MATOBA)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 70547257