

機関番号：31602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592183

研究課題名（和文） 口腔・顔面領域での神経因性疼痛発症・維持に伴う神経栄養因子の関与について

研究課題名（英文） Involvement of neurotrophic factors in the development of neuropathic pain evoked by the loose-ligation of peripheral nerves

研究代表者

米原典史（YONEHARA NORIFUMI）

奥羽大学・薬学部・教授

研究者番号：70124534

研究成果の概要（和文）：

本研究では神経因性疼痛の発症機序および治療方法を検討するため、神経因性疼痛を誘発する動物モデルを作成し、神経因性疼痛にたいする各種神経栄養因子（酸化型ガレクチン、血小板由来神経栄養因子（BDNF）、アルテミン）の効果を調べた。坐骨神経結紮により、結紮側（左側）で熱刺激に対する逃避時間の短縮（痛覚過敏）が生じた。結紮部位に神経栄養因子を塗布した群では、生理食塩水（生食）塗布群に比べ熱刺激に対する痛覚過敏の発症（逃避行動時間の短縮）が著しく遅延した。特に、酸化型ガレクチン塗布群では、結紮直後から 28 日目にかけて結紮側の逃避行動の延長（鎮痛効果）が観察された。アルテミンおよび血小板由来神経栄養因子（BDNF）塗布群では、痛覚過敏は抑制されたが、酸化型ガレクチンとは異なり鎮痛効果は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

It has been already known that various neurotrophic factors act on the repair of the damage site for neuronal regeneration following a peripheral nerve injury. In this study, therefore, to investigate whether or not neurotrophic factors affected the development and/or maintenance of such pathological pain states as the hyperalgesia and allodynia observed with peripheral nerve damage, loose-ligation on the left sciatic nerves of mouse were performed. The responses to thermal stimulation were then measured by the Plantar Test. Hypersensitivity to thermal stimulation developed on the ipsilateral side in ligated animals 3 days after surgery and lasted for at least 49 days. The direct application of neurotrophic factors such as oxidized galectin-1, artemin and platelet-derived neurotrophic factor (BDNF) at the nerve-ligation site showed remarkable inhibition against nerve injury-induced thermal hyperalgesia compared with the direct application of vehicle. Particularly, in the oxidized galectin-1 application group, marked analgesic effect was observed 3-28 days after application of this drug, that is, thermal hyperalgesia developed on the 31 days after injury. Unlike such result obtained by the oxidized galectin-1, however, in the group which applied artemin or platelet-derived neurotrophic factor (BDNF), prolongation of withdrawal latency (analgesic effect) was not observed

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：疼痛、神経因性疼痛、神経栄養因子、熱侵害刺激、逃避行動

### 1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は、神経損傷に伴う神経機能の異常に起因する難治性の疼痛(痛覚過敏、アロディニア)であり、神経損傷以外に糖尿病、ハンセン氏病、クローン病、がん性疼痛、ヘルペス等の疾患により発症する。慢性痛である神経因性疼痛は、それ自体が疾病であり、強力かつ持続的な痛みは患者のQOLを顕著に低下させることから積極的な治療が望まれている。しかしながら、これまでのところ有効な治療方法、治療薬は確立されていない。この一因としては痛みの慢性化に伴い病因により異なった二次的な器質的変化が生じ、高次中枢レベル(精神的側面)が影響を受け、痛みの発生機序が複雑化している可能性がある。そのため神経因性疼痛の適切な治療薬は現在までのところなく開発が切望されている。

### 2. 研究の目的

本研究では神経因性疼痛の発症機序および治療方法を検討するため、神経因性疼痛を誘発する動物モデルを作成し、神経因性疼痛にたいする各種神経栄養因子の効果を調べた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

雄性ICRマウス(体重約20-25g)を用いた。餌及び水は適宜与えた。動物は12時間の明/暗サイクル下で飼育した。

本実験の実験計画ならびに実験操作は奥羽大学内動物実験委員により審査され承認を得たもので、International Association for the Study of Painの規定にも沿うものである。

#### (2) 神経因性疼痛発症モデル動物の作成

神経因性疼痛発症モデル動物はBennettとXieによる圧搾性神経痛モデルを一部改変し作成した。マウスをペントバルビタールナトリウム(50mg/kg)の腹腔内投与により麻酔し、大腿部の左坐骨神経を露出し、クロミックの縫合糸(4-0)で坐骨神経を3ヶ所緩く結紮した。神経を露出し結紮を行わなかった動物を偽結紮動物とした。それぞれの対側(右側)は処置しなかった。神経栄養因子は、生理食塩水にて溶解し、結紮部に5 $\mu$ L直接投与した後、筋層および皮膚を縫合により閉創した。また対照群には同量の生理食塩水あるいは、コラーゲンを投与した。

#### (3) 神経栄養因子

① 酸化型ガレクチン:1 $\mu$ gの酸化型ガレクチンを結紮部に直接投与した。酸化型ガレクチンは前橋工科大学門屋利彦博士より供与されたものを使用した。

② アルテミン(GDNF、グリア細胞由来神経栄養因子):ヒトアルテミン(PEPRO TECH EC, LONDON)10 $\cdot$ gを生理食塩水30 $\cdot$ Lで溶解し、結紮部に直接投与した。

③ 血小板由来BDNF(脳由来神経栄養因子):

雄性 ICR マウスをエーテル麻酔下、24G 注射針にて 3.2%クエン酸ナトリウム 0.2mL を満たした注射筒(2.5mL)に約 2mL 心採血した。6 匹分をコニカルチューブ (FaLcon)にまとめ、全量を生理食塩水で 2 倍希釈し(ヘマトクリットを下げるため)、700~750 回転で 15 分間遠心した。上清 12mL に 1Mクエン酸を 48  $\mu$ L 加え(4  $\mu$ L/mL 上清)混合した。混合したものを 6mL ずつ 2 つに分け 2800 回転で 10 分間遠心した。沈殿物(血小板)に、ヘパリン 50  $\mu$ L と Washing Buffer (Ca<sup>2+</sup>free) 5cc、PGE1(1mg/mL)10  $\mu$ L をそれぞれ加え 37°C で 5 分間振盪した。その後 2800 回転で 10 分遠心し、再度上清を捨て、沈殿物に HEPES Tyrode's Buffer (Ca<sup>2+</sup> 1mM)を 0.5mL/1 チューブ加え、全量 1mL にまとめた。コラーゲン 100  $\mu$ L を加え凝集させた後、12000 回転で 5 分遠心し、上清を取ったものを血小板由来 BDNF を含む試料として結紮部に直接投与した。

#### (4) 逃避潜時の測定

逃避潜時は PLanter Test (Model 7370; UgoBasil, Varese, Italy)を用いて測定した。測定前動物は拘束せず、自由に探索行動が行えるようガラス板上の小ケージ内に放置し、装置に馴化させた。ガラス板下の輻射熱を後肢足蹠に照射した。輻射熱は反射性の逃避潜時 (Latency (L))が約 10-13 秒となるよう強さを調節した。またカットオフ時間は 24 秒に調節した。群間の変動を小さくするために、次の式に従って相対的な逃避潜時を計算した。(Lcont. - Ltreat.)/Lcont.  $\times$  100、ここで Lcont. 及び Ltreat. はそれぞれ無処置側及び処置側(結紮側)の後肢の逃避潜時を表す。得られた値は '熱痛覚過敏'として表した。

### 4. 研究成果

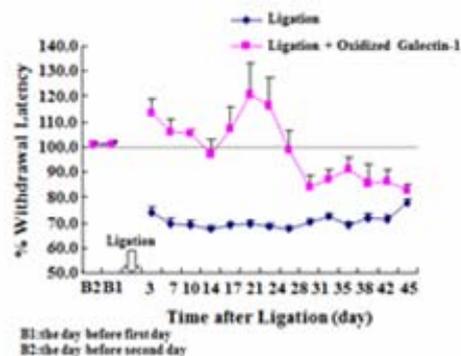
#### (1) 坐骨神経結紮の効果

熱刺激に対する逃避時間は、正常動物では左側では 9.3 $\pm$ 0.2 秒、右側は 9.1 $\pm$ 0.1 秒(例数

30 匹)であった。坐骨神経結紮により、結紮側(左側)では、結紮 7 日目から熱刺激に対する逃避時間の短縮(痛覚過敏)が生じ、10 日から 14 日目にかけて最大となった。この症状は2か月以上続いた。結紮 14 日目の逃避時間は、結紮側(左側:6.1 $\pm$ 0.09 秒)、正常側(右側:8.9 $\pm$ 0.1 秒、12 匹)であった。

#### (2) 薬物効果

① 酸化型ガレクチン:坐骨神経結紮時、結紮部位に酸化型ガレクチンを塗布した群では、生理食塩水(生食)塗布群に比べ熱刺激に対する痛覚過敏の発症(逃避行動時間の短縮)が著しく遅延した。加えて酸化型ガレクチン塗布群では、結紮直後から 28 日目にかけて結紮側の逃避行動の延長が観察された。逃避時間の短縮は、酸化型ガレクチン投与群では結紮後 31 日から認められ、最も短縮した結紮後 49 日目の逃避時間は、酸化型ガレクチン塗布群(左側:7.8 $\pm$ 0.1 秒、右側:9.0 $\pm$ 0.05 秒)であった。



② グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF:アルテミン):坐骨神経結紮時、アルテミンを塗布した群では、生食塗布群に比べ熱刺激に対する痛覚過敏の発症(逃避行動時間の短縮)が著しく抑制された。酸化型ガレクチン塗布群と異なり、結紮側の逃避行動の延長は観察されなかった。

③ 血小板由来 BDNF(脳由来神経栄養因子)含有分画の塗布:坐骨神経結紮時、血小板由来 BDNF(脳由来神経栄養因子)含有分画を塗布した群では、コラーゲン塗布群に比べ熱刺激

に対する痛覚過敏の発症(逃避行動時間の短縮)が著しく抑制された。この抑制様式はアルテミンの効果とほぼ一致するものであった。

#### 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 16 件)

- ① c-Fos expression within the L5 spinal cord dorsal horn after spinal nerve ligation in rats, Y.H. Jin, M. Takemura, N. Yonehara (7人中7番目) Neural Regeneration Res(査読有)5, 450-455, 2010
  - ② 神経障害性疼痛(慢性痛)におけるグルタミン酸とその受容体の役割、米原典史、古山昭(2人中1番目) 医薬品相互作用研究会(査読無)33, 81-90, 2010
  - ③ Capsaicin-induced glutamate release is implicated in nociceptive processing through activation of ionotropic glutamate receptors and group I metabotropic glutamate receptor in primary afferent fibers, Y.H. Jin, M. Takemura, A. Furuyama, N. Yonehara (6人中6番目) J. Pharmacol. Sci.(査読有)109,233-241, 2009
  - ④ Effects of systemic bicuculline or morphine on formalin-evoked pain-related behaviour and c-Fos expression in trigeminal nuclei after formalin injection into the lip or tongue in rats, N. Yonehara, M. Takemura (7人中5番目) Exp. Brain Res(査読有)196, 229-237, 2009
  - ⑤ Intraplantar morphine prevents the decrease of the rate of thermal withdrawal latencies evoked by glutamate and capsaicin, M. Takemura, N. Yonehara (5人中5番目) Acta Acad Med Jiangxi(査読有)48, 24-28, 2009
  - ⑥ Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon, M. Takemura (9人中8番目) Gut(査読有)58, 751-761, 2009
- [学会発表] (計 11 件)
- ① 山本正雅、小池勇一、熊野活行、米原典史、Biological resonance induced by electromagnetic waves from Yubi-NMR reduces oxidative stress in blood,第84回日本薬理学会年会、2011, 3, 22 - 3, 24、横浜
  - ② Yonehara N. and Koike Y., Involvement of glutamate receptors existing in peripheral ending of primary afferent fibers in nociception., 16<sup>th</sup> World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, 2010,7,17-7,23, Copenhagen, Denmark

- ③ Koike Y. and Yonehara N., Pharmacokinetic and Pharmacodynamic modeling of denopamine in patients with congestive heart failure., 16<sup>th</sup> World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, 2010,7,17-7,23, Copenhagen, Denmark
- ④ Yamamoto N., Koike Y. and Yonehara N., Radiation of electromagnetic waves to a finger using YUBI-MR reduces oxidative stress in blood by electron-transfer via negatively charged water formation., 16<sup>th</sup> World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, 2010,7,17-7,23, Copenhagen, Denmark
- ⑤ 古山昭、米原典史、カエル皮膚痛侵害受容体のトランスダクション機構におけるカプサイシン受容体の関与、日本ペインクリニック学会第43回大会、第31回日本疼痛学会、2009,7,16-18、名古屋

[図書] (計 2 件)

- ① Rang and Dale's Pharmacology Sixth ed. (H.P. Rang, M.M.Dale, J.M.Ritter,R.J.Flower)、西村書店、樋口宗史、前山一隆監訳、第10章 コリン作動性伝達、第15章カンナビノイド、2011

[産業財産権]

- 出願状況 (計 1 件)

名称：血液酸化抑制器具  
発明者：熊野活行、山本正雅、米原典史、小池勇一  
権利者：日本システム企画株式会社  
種類：国際特許  
番号：2010-134233  
出願年月日：平成22年6月11日  
国内外の別：外国

- 取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米原 典史 (YONEHARA NORIFUMI)

奥羽大学・薬学部・教授

研究者番号：70124534

(2) 研究分担者

竹村 元秀 (TAKEMURA MOTOHIDE)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：70192169

(3) 連携研究者

横瀬 敏志 (YOKOSE SATOSHI)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：90245803

小池 勇一 (KOIKE YUITI)

奥羽大学・薬学部・教授

研究者番号：90109421

古山 昭 (FURUYAM AKIRA)

奥羽大学・歯学部・助教

研究者番号：80364454