

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15789

研究課題名(和文)高周波パルス法の脊髄後角細胞における鎮痛作用機序の電気生理学的解明

研究課題名(英文)The effect of pulsed radiofrequency on electrophysiological analysis of the mechanism of analgesia in dorsal horn cells of the spinal cord

研究代表者

大迫 正一(Osako, Seiichi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・麻酔科診療主任

研究者番号：60582426

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): PRF(pulsed radiofrequency)とは、高周波電流を間欠的に通電することで発生する電場により神経に影響を与える鎮痛方法である。近年PRFは安全性が高いことから臨床応用され、主に神経障害性疼痛に対する長期的有効性が示されている。しかしながら本治療法についてはこれまで決定的な鎮痛作用機序は明らかにされていなかった。本研究では神経障害性疼痛モデル作成前にPRFを行い、免疫染色によって脊髄後角に発現するミクログリアを観察したところ、PRFを予め行った群のミクログリアの発現が対照群と比較して有意に少なかった。このことからPRFには神経障害性疼痛の発症を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、PRFを神経障害性疼痛モデル前に施行することで脊髄後角でのミクログリア発現を抑制していることが示唆された。これにより今後PRFの鎮痛作用機序の解明が進展することが期待できる。また神経障害性疼痛の発症を予防することが示唆されたことから、膝関節手術や開胸手術といった、時に神経障害性疼痛の要素を併せ持つ術後遷延痛をきたしやすい手術を行う前に本治療法を行うことで、術後遷延痛の予防に役立てることができるのではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文): PRF(pulsed radiofrequency) is an analgesic treatment affecting to the nerve cells by intermittent application of high-frequency current. In recent years, PRF has been used clinically for the treatment because of its high safety profile, and its long-term efficacy has been demonstrated mainly for neuropathic pain. However, the definitive analgesic mechanism of this treatment has not been clarified to date. In the present study, PRF was performed prior to the modeling of a neuropathic pain. We observed the spinal dorsal horn by immunostaining and found that microglial expression in the PRF pre-treated group was significantly less than the control group. This suggests that PRF has the potential to reduce the development of neuropathic pain.

研究分野：疼痛学

キーワード：神経障害性疼痛 高周波パルス法 ミクログリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) パルス高周波療法 (Pulsed Radiofrequency Treatment: PRF) の適応と有効性

PRFとは、高周波電流を42℃以下で間欠的に通電することで発生する電場により神経に影響を与える鎮痛方法である。近年、PRFは安全性が高いことから多数の臨床研究が行われ、主に神経障害性疼痛に対する長期的有効性(3~6ヶ月)が示されている(Chua NHら Acta Neurochir 2011)。

特に、頰椎症性神経根症に関してPRFは海外では最も推奨度の高い侵襲的治療法として位置づけられている(Van Zundert Jら Pain Pract 2011)。さらに近年になり、肩関節痛に対するPRFの長期的有効性(少なくとも12週間の効果持続)が3つの無作為化比較試験(Randomized Controlled Trial: RCT)によって示されている(Eyigor Cら Clin J Pain 2010, Gofeld Mら Pain Pract 2013, Wu YTら Anesth Analg 2014)。我々も、変形性膝関節症に伴う膝関節痛に対して末梢神経PRFを施行し、その長期的有効性や安全性について報告してきた。従って今後は、PRFの適応は慢性関節痛などにも拡大されることが予想される。

(2) PRFの作用機序

過去の基礎研究から推測される主な作用機序について表1に示す。関節・靭帯の損傷や炎症

など、末梢からの侵害入力(痛みを誘発する刺激)に起因する痛みである肩関節痛に対しPRFの有効性が確認されていることから、末梢からの侵害刺激入力の抑制がPRFの主たる作用機序であると考えられる。し

表1 PRFの作用機序

作用機序	文献
末梢神経における痛みシグナル伝達の抑制	
・ 神経微細構造の変化(Aδ、C>Aβ)	Erdine S et al. Pain Pract 2009
中枢神経系における修飾作用	
・ ミクログリア増加の抑制	Park HW et al. Pain Med 2012
・ 炎症性サイトカインの抑制	Vallejo R et al. Pain Physician 2013
・ 下行性抑制系を介した作用	Hagiwara S et al. Eur J Pain 2009

かし、これまでに行われてきた基礎研究は行動実験と免疫組織学的・分子生物学的手法を用いて中枢神経系における修飾作用を示したものがほとんどで、中枢神経におけるシナプス伝達への影響を直接評価する電気生理学的研究は全く行われておらず、PRFの抗侵害受容作用の詳細なメカニズムは不明である。脊髄後角ニューロンは、末梢からの侵害刺激を中枢へ伝達するのに重要な役割を果たしており、グルタミン酸(NMDA、AMPA)などの興奮性神経伝達とグリシンやGABAなどの抑制性神経伝達のバランスの上に成り立っている。申請者の所属する教室では、脊髄スライス標本を用いた電気生理学実験により、脊髄後角ニューロンにおける神経伝達と麻酔薬の作用メカニズムなどの研究が行われている。そこで、電気生理学手法により、PRFによる脊髄後角ニューロンの神経伝達の修飾作用を検証することで、PRFの抗侵害作用メカニズムを解明しようと本研究の着想に至った。

(3) PRFの適正な施行時間

頸部・腰部神経根症に対する神経根PRFの効果は、2分間よりも6分間施行群で6週間後の有効率が高いとする報告や(山上裕章ら ペインクリニック 2012、2011)、PRFのアロディニアに対する効果は2分間よりも6分間施行群が強いとの報告(Tanaka Nら Anesth Analg 2010)がある一方、有意差がないとの報告(Ozsoylar Oら Anesth Analg 2008)もあり、至適PRF施行時間について一定の見解は得られていない。申請者自身もPRFを治療に使用し効果を実感しているが、時に期待する治療効果を得られない場合もあり、作用メカニズムに沿った適正なPRF施行基準の必要性を実感している。

2. 研究の目的

前節での背景を踏まえ、本研究ではPRFの抗侵害作用のメカニズムを明らかにするために、神経障害性疼痛モデルである坐骨神経絞扼(CCI)ラットを用い、脊髄侵害受容投射経路の介在ニューロンである脊髄後角膠様質細胞(substantia gelatinosa; SG細胞)の侵害刺激伝達に及ぼす影響を、興奮性シナプス後電流(excitatory postsynaptic current:EPSC)に注目し検証する。つまり、

1. PRFは末梢からの侵害入力を直接抑制しているのか？また、抑制していることが明らかになった場合、そのメカニズムにどういった受容体などが関係しているのか？
2. PRFの施行時間の違いにより、侵害入力の抑制効果の程度に差はあるのか？また、施行時間の違いにより、抑制効果の持続時間に影響を与えるのか？

を明らかにすることを目的とした。

本研究により、PRFによる抗侵害受容作用のメカニズムを解明し、PRFの適切な施行時間についての有効な知見が得られることが期待でき、メカニズムに基づいたさらなる有効性と安全性の高められたPRFの開発につながると期待される。

3. 研究の方法

本研究では、神経障害性疼痛モデルとして坐骨神経絞扼ラットを作成し、PRF 施行による疼痛閾値の改善について行動学実験で検証する。さらに、ラットの後根付き脊髄スライス標本を用い、電気生理学的実験パッチクランプ法にて、脊髄後角 SG 細胞より EPSC の記録を行う。コントロール群と CCI 群、CCI に PRF 施行を施行した群の 3 群間で EPSC を比較検討し、PRF が SG 細胞の侵害受容伝達に与える修飾作用について検証する。また、PRF 施行時間を変え、施行時間の違いが EPSC の抑制効果に変化を与えるのかを検証し、PRF の最適施行時間の検証を行う。さらに、その修飾作用に關与する受容体について薬理的検証および免疫組織学手法を用い、PRF の抗侵害作用メカニズムを明らかにする。

(1) ラット坐骨神経絞扼モデルの作成および PRF 施行

セボフルラン吸入麻酔下に雄性 SD ラットの右側後肢より坐骨神経を露出し長さ 2mm の PE10 チューブで絞扼し、神経障害性疼痛モデルラットを作成した。PRF の神経細胞への影響を対照群と比較するため、PRF 群 (n=12) では、モデル作成前に PRF 刺激電極を絞扼部遠位に当て、5 万 Hz・45V の高周波を、0.5 秒間隔で 0.02 秒間通電した。刺激装置には TOYO Medic 製 NeuroTherm™ JK3 を使用した (図 1)。これまでの臨床経験から 6 分施行群と、非施行群 (n=12) を比較し疼痛閾値への影響を検証した。



図 1

(2) 行動実験による PRF の抗侵害作用の検証

CCI モデルラットの疼痛を Von Frey 式痛覚測定装置 (UGO BASILE 社 37450) による逃避潜時を計測し測定した。PRF 施行群と非施行群での侵害刺激閾値の変化を行動実験で検証し、PRF の鎮痛効果を検証した。

(3) 免疫染色による脊髄後角のミクログリア発現の検証

CCI モデルラットをパラホルムアルデヒド (PFA) で灌流固定し、第 4 腰椎 - 第 6 腰椎レベルの脊髄凍結切片を作成した。一次抗体には Iba-1 抗体、二次抗体には Rabbit IgG 抗体を用いて DAB 染色を行い、脊髄後角に発現しているミクログリアの様子を PRF 施行群と非施行群間で比較した。

4. 研究成果

研究期間内に行うことができたのは、前節で述べたラットの坐骨神経絞扼モデル作成および PRF 施行、行動実験による PRF の抗侵害作用の検証、免疫染色による脊髄後角のミクログリア発現の検証である。以下結果について述べる。

(1) 行動実験結果

Von Frey 試験では PRF 非施行群 (対照群) では CCI 作成後に逃避閾値が有意に低下したのに対し、PRF 群では CCI 前後で閾値に有意差は認めなかった。また、処置前後の閾値の変化量を 2 群で比較すると、PRF 群の方が小さく有意差が認められた (図 2)。以上

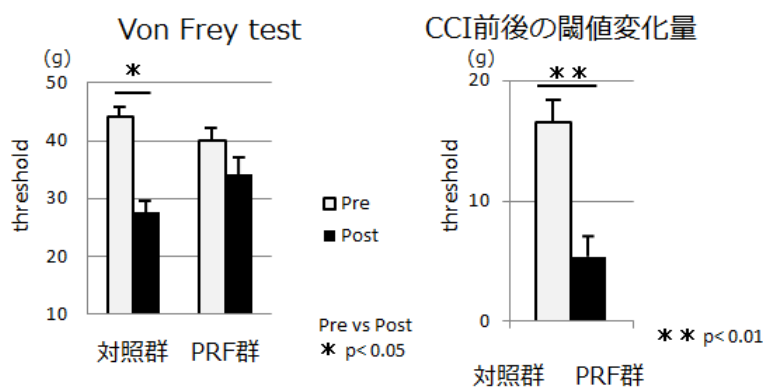


図 2

行動実験結果

の結果から PRF には神経障害性疼痛の発症を予防する効果があることが示唆された。

(2) 免疫染色結果

対照群では患側の脊髄後角でミクログリアの増加が認められたが、PRF 群ではミクログリアの増加が抑制されていた (図 3)。免疫染色で染色されたミクログリアの数を比較したところ、CCI を作成した側のミクログリアの数に両群間で有意差が認められた (図 4)。

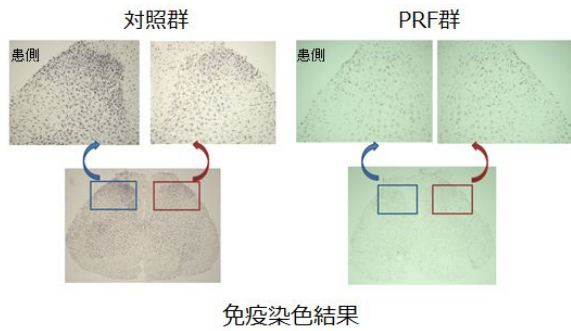


図 3

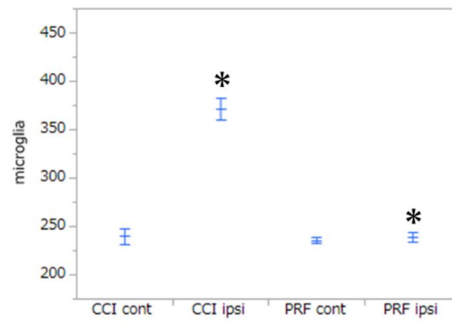


図 4

本研究により PRF を神経障害性疼痛モデル前に施行することで脊髄後角でのミクログリア発現を抑制していることが示唆された。これにより今後 PRF の鎮痛作用機序の解明が進展することが期待できる。また神経障害性疼痛の発症を予防することが示唆されたことから、膝関節手術や開胸手術といった、時に神経障害性疼痛の要素を併せ持つ術後遷延痛をきたしやすい手術を行う前に本治療法を行うことで、術後遷延痛の予防に役立てることができるのではないかと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大迫正一、高橋亜矢子、植松弘進、博多紗綾、清水優、溝渕敦子、藤野裕土、松田陽一
2. 発表標題 パルス高周波法がラット坐骨神経絞扼モデルの神経障害性疼痛発症に与える効果
3. 学会等名 日本ペインクリニック学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----