

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791015

研究課題名（和文） ガンマナイフが三叉神経痛に対して治療効果を発現する機序の解析

研究課題名（英文） Effect of gamma knife irradiation on rat neuropathic pain model

研究代表者

矢ヶ崎 有希 (YAGASAKI YUKI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90392422

研究成果の概要：慢性疼痛モデルラットの末梢神経にガンマナイフを照射する方法を確立し、ガンマナイフ照射が疼痛行動に与える影響を検討した。本研究により、慢性疼痛モデルラットへのガンマナイフ照射でのみ、照射後 2 週間ほどで鎮痛効果が現れることが明らかとなった。また、ガンマナイフ照射により照射部位にマクロファージが集積することから、この集積したマクロファージが何らかの形で鎮痛効果に関与している可能性があることが予測された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：ガンマナイフ，三叉神経痛，慢性疼痛モデルラット

## 1. 研究開始当初の背景

三叉神経痛とは顔の神経をつかさどる三叉神経に何らかの異常が生じて、その感覚の領域に主に発作的に電撃痛や焼け火箸を突き刺されるような痛みを生じる病気である。三叉神経痛の原因は明らかではないが、神経が血管等により圧迫されることによる神経障害であることが推測され、外科的な減圧治療が施行される。さらに治療薬として、抗てんかん薬や GABA 伝達系薬剤が有効であることから、これを一種の神経因性疼痛とみなすことが出来る。

近年、三叉神経痛に対してガンマナイフの治療効果が認められているが、この治療効果のメカニズムは不明であり、ガンマナイフは対症療法として利用されているのが現状である。また、ガンマナイフの三叉神経痛に対する研究は患者を対象とした Follow-up study が中心で、基礎医学的な研究は少ない状況であった。

一方、神経因性疼痛に関する研究報告は歴史が長く、多くの動物実験研究モデルが作成されており、いずれの動物モデルも手術後、数日以内に温熱性痛覚過過敏と機械刺激性

アロディニアが誘発されることが知られていた。さらに、神経因性疼痛誘発に関する因子として、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネル、CaMK、NMDA 受容体、MAPK、SAPK、神経栄養因子など様々な因子が同定されていた。最近では、神経因性疼痛の発症とミクログリアの関係も多数報告されていた。

また、脊髄に作用する疼痛抑制系に関しては、中枢からのセロトニン、ノルアドレナリンによる下行性疼痛抑制系、GABA などの抑制性伝達物質による作用、受容体のインターナリゼーションによる脱感作などの関与が明らかとなっていた。ガンマナイフ照射による鎮痛作用の発現には、上述のような神経因性疼痛を発症させるシグナルの抑制、又は鎮痛作用をもたらすシグナルの活性化の関与が予測された。

そこで、ガンマナイフ照射による鎮痛効果発現のメカニズムを解明する手段のひとつとして、慢性疼痛ラットを用いて、ガンマナイフ照射後の疼痛行動の変化及び組織学的変化を解析することとした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はガンマナイフの三叉神経痛に対する治療効果発現メカニズムを明らかにすることであった。

具体的には、(1)慢性疼痛モデルラットの坐骨神経にガンマナイフを照射し、疼痛行動への影響を検討する、(2)坐骨神経へのガンマナイフ照射が脊髄、後根神経節及び、坐骨神経に与える影響を組織学的・分子生物学的に解析することにより、ガンマナイフ照射における鎮痛効果の発現メカニズムの手がかりを得ることを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1)慢性疼痛モデルの作成

Seltzer らのモデル (Neurosci Lett. 115:62-7, 1990) を参考に、右後肢の 1/2~1/3 の坐骨神経を強く結紮することにより慢性疼痛モデルラットを作成した。また、坐骨神経を露出するが結紮しないラットを sham 群とした。機械刺激による痛覚を Automated Von Frey type system により評価した。

### (2)ガンマナイフ照射部位の planning

ラットはペントバルビタール (50 mg/kg) で麻酔し、Regis-Valliccioni frame にテープで固定した。Heavy-T2 による MRI 画像を取得した。取得した MRI 画像を元に Leksell GammaPlan treatment planning system により、照射部位の中心が坐骨神経となるよう

に planning を行った。中心最大線量は 90 Gy とした。

### (3)ガンマナイフ照射後の行動解析

ガンマナイフ照射後の機械刺激による痛覚反応を経時的に (5日~8週まで) Automated Von Frey type system (Ugo Basile, Milan, Italy) により検討した。具体的には、直径 0.5 mm のフィラメントをラットの後肢足底に毎秒 2.5 g ずつ加圧するように押しつけ、逃避反応を起こした閾値をグラム重として実測した。測定は両側それぞれ 3 回ずつ行い、平均値を閾値とした。それぞれの測定は 3 分以上の間隔を空けて行った。

### (4)脊髄における検討

脊髄 (L4, L5) において、ミクログリアのマーカーである Iba1 タンパク質の発現変化をウエスタンブロット法により解析した。同様に免疫染色法により脊髄におけるミクログリアの局在部位および形態を検討した。また、解析は ImageJ を用いて行った。

### (5)後根神経節における検討

坐骨神経を結紮しただけでは、後根神経節のニューロンが脱落することはないことが知られているが、ガンマナイフ照射によりニューロンの脱落が起こらないという証明はされていない。そこで、後根神経節の凍結切片を作成にフルオロジェードで染色することにより変性したニューロンがあるか検討した。

### (6)坐骨神経における検討

Iba1 タンパク質はミクログリアのマーカーとして利用されるが、同様にマクロファージのマーカーとしても利用されている。坐骨神経において、Iba1 タンパク質の発現量の変化をウエスタンブロット法により解析した。同様に免疫染色法により坐骨神経におけるマクロファージの発現を検討した。また、変性したミエリンおよびマクロファージに貪食されたミエリン debris のみ染色される Oil Red O 染色を行った。Oil Red O 陽性の濾胞の解析は ImageJ を用いて行った。

## 4. 研究成果

(1)今回作製した慢性疼痛モデルラットは 4 日目から結紮側でのみ allodynia が現れ、約 6 週間は allodynia が継続することを確認した。6 週以降で徐々に閾値の上昇がみられ、9 週後では sham 群と有意な差が見られなくなることが明らかとなった。また、sham 群では allodynia が起こらないことを確認した。

(2)MRI 画像を元に Leksell GammaPlan treatment planning system を用いて坐骨神

痛に照射した。また、(1)の結果より、結紮後7日目(allodynia発生時)にガンマナイフを照射することとした。ガンマナイフの中心最大線量は90Gyとした。

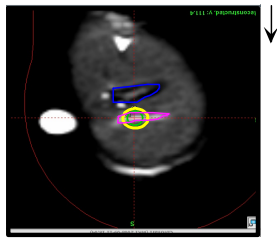


図1 planningの1例

ピンク;坐骨神経。青;大腿骨。緑;80% isodose area。黄色;50% isodose area。

(3)ガンマナイフ照射後の機械刺激による痛覚反応をAutomated Von Frey type systemにより検討した。慢性疼痛モデルラットにおいて、ガンマナイフ照射2週間後に非照射群と比較して有意な逃避反応の閾値の上昇がみられた。照射群(結紮+ガンマナイフ);  $18.8 \pm 3.6$  sec, 非照射群(結紮のみ);  $11.2 \pm 1.8$  sec,  $p < 0.05$ )。また、慢性疼痛モデルラットのガンマナイフ照射群は照射3週間後にはsham群と同程度まで逃避反応の閾値が回復することが明らかとなった。この効果は本研究で測定した最長期間(9週間後)までは継続していた。一方、sham群にガンマナイフを照射しても逃避反応の閾値には変化が見られなかった。つまり、allodynia発症時(神経損傷時)にガンマナイフを照射した場合のみ鎮痛効果(疼痛からの回復効果)が現れ、逆に正常時にガンマナイフを照射した場合には影響を与えないことが明らかとなった。

以上より、損傷を受けていない神経にガンマナイフを照射した場合と、損傷神経にガンマナイフを照射した場合とでは、その後の反応に何らかの違いがあることが予測された。

(4)慢性疼痛においては、末梢感覚神経等の損傷により、損傷神経のみならず、その線維が投射する脊髄後角、さらには上位中枢で、神経化学的变化が起こり、その変化による痛み伝達ネットワークの再構築が神経因性疼痛の成因であろうと想定されている。最近、脊髄後角のグリア細胞、特にミクログリアの重要性を示唆する知見が報告されている。そこで、本研究では、ガンマナイフ照射2週間後の脊髄(L4-5)におけるIba1タンパク質(ミクログリアのマーカー)の発現量をウエスタンブロット法により検討した。坐骨神経を結紮することにより、脊髄(L4-5)において、Iba1タンパク質の発現量の増加がみられた。しかし、Sham群および結紮群にガ

ンマナイフを照射しても、Iba1タンパク質の発現量に変化はみられなかった(sham群+ガンマナイフ;  $0.99 \pm 0.1$ 倍(sham群と比較)  $p = 0.7$ , 結紮群+ガンマナイフ;  $1.0 \pm 0.2$ 倍(結紮群と比較)  $p = 0.9$ )。

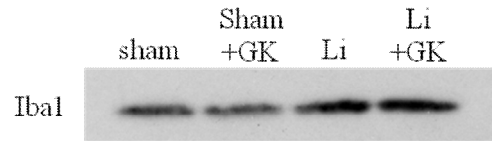


図2 脊髄におけるウエスタンブロット

また、抗Iba1抗体による免疫染色を行い、ミクログリアの形態及び局在を検討した。坐骨神経結紮1週間後の脊髄後角のミクログリアは、その細胞体の肥大化、突起の退縮および細胞増殖など、典型的な活性化型の形態を示していた。3週間後も同様に活性化型ミクログリアが存在していた。また、ガンマナイフ照射後においても活性化型ミクログリアの存在が認められ、非照射群との間に有意な差は認められなかった。

(5)ガンマナイフ照射2週間後の後根神経節(L4, L5)の凍結切片を作成し、フルオロジェードで染色し、変性したニューロンがあるか検討した。ガンマナイフ照射2週間後の後根神経節において、フルオロジェードで染色される細胞は認められなかった。同様に非照射群においてもフルオロジェードで染色される細胞は見られなかった。このことから、坐骨神経にガンマナイフを照射することにより後根神経節のニューロンにネクローシスもしくはアポトーシスが生じることはないと考えられた。

(6)坐骨神経におけるマクロファージの発現量をウエスタンブロット法により検討した。結紮後、坐骨神経の1週間~3週間でIba1タンパク質の発現量は約3倍に増加し、徐々に減少することが明らかとなった。

ガンマナイフ照射2週間後の坐骨神経におけるIba1タンパク質の発現量を検討したところ、結紮群においてIba1タンパク質の発現量がさらに増加することが明らかとなった( $1.8 \pm 0.1$ 倍;結紮群と比較,  $p < 0.01$ )。しかし、sham群にガンマナイフを照射した場合においては、Iba1タンパク質の発現量の増加はみられなかった( $1.2 \pm 0.2$ 倍; sham群と比較,  $p = 0.55$ )。このことから、損傷した神経にガンマナイフを照射した場合にのみ、マクロファージのさらなる集積が引き起こされることが明らかとなった。

さらに、凍結切片を作成し、抗Iba1抗体を用いて免疫染色を行い、マクロファージの局在を検討した。結紮1週間後、および3週間後においては、坐骨神経の結紮部周辺にマ

クローファージが集積することが明らかとなった。ガンマナイフ照射2週間後では、非照射群と比較して、結紮部より遠位側にさらなるマクロファージの集積が認められた。さらに、ガンマナイフ照射後のマクロファージは貪食後の泡沫化したマクロファージが多く存在していることが明らかとなった。

以上より、ガンマナイフ照射によりマクロファージの貪食が増加している可能性が予想された。そこで、ミエリンのdebris及びマクロファージが貪食したミエリンのみ染色される、Oil Red O染色を行った。慢性疼痛モデルラットの坐骨神経において結紮1週間後には結紮部より遠位側にOil Red O陽性の濾胞が多数出現することが確かめられた。また、結紮8週間後の坐骨神経では、Oil Red O陽性の濾胞がほとんど確認されないことから、ミエリンdebrisはマクロファージにより貪食され、だんだんと除去されていくことが考えられた。一方、慢性疼痛モデルラットにガンマナイフ照射すると、2週間後には結紮部から遠位側のOil Red O陽性の濾胞が非照射群と比較して有意に減少することが明らかとなった。上述のように、ガンマナイフ照射により坐骨神経の結紮より遠位部のマクロファージの増加が見られることから、マクロファージの貪食が増加することにより、ミエリンdebrisの除去が促進したと考えられた。

以上の実験結果から、ラット慢性疼痛モデルラットにガンマナイフを照射することによっても、臨床結果と同様に鎮痛効果が得られることが明らかになった。しかし、正常な神経にガンマナイフを照射した場合においては疼痛行動に変化が見られないことから、損傷した神経にガンマナイフを照射した場合にのみこのような鎮痛効果が得られると考えられた。また、臨床結果では鎮痛効果が得られるまで、約1ヶ月程度かかると考えられているが、今回は2週間で鎮痛効果がみられた。ラットはヒトなどの高等哺乳類と比較して再生能力が高いと考えられている。種差により、ラットの方が早くガンマナイフによる効果が現れた可能性が考えられる。

また、ウエスタンブロット法及び免疫染色法により、ガンマナイフ照射後の慢性疼痛モデルラットの坐骨神経にマクロファージの集積が認められた。ガンマナイフ照射後に脳内でマクロファージが集積することが報告されている。ガンマナイフ照射によりどのようにマクロファージが集積するのかは不明であるが末梢神経でも中枢神経と同様の機序でマクロファージの集積が起こる可能性が考えられる。さらに、慢性疼痛ラットの疼痛からの回復時期にミエリンdebrisの除去の大半が終了すること、ガンマナイフ照射後

の鎮痛効果と同時期にマクロファージのさらなる増加が起こり、ミエリンdebrisの除去が促進されることを考えると、ミエリンdebrisの除去と慢性疼痛からの回復が関係している可能性も考えられる。また、末梢神経損傷時の軸索再生において、マクロファージの活性化が重要な役割を担っているという報告もある。ガンマナイフ照射によってマクロファージが活性化されることで回復効果が早期に現れ、軸索再生が促進された可能性も期待される。今後は、実際にマクロファージの増加が鎮痛効果に直接関与しているのか、阻害剤などを用いて明らかにしたい。

また、現段階では下行性抑制系の関与に関する解析、及び脊髄レベルにおけるミクログリア以外の解析は行っていない。今後上述のような点からも解析を進め、ガンマナイフによる鎮痛メカニズムの本質へ迫りたい。

この成果は第31回日本神経科学大会でポスター発表した。現在、国際雑誌に投稿するため論文を作成中である。

#### 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)

[学会発表](計2件)

矢ヶ崎有希, 林基弘, 白倉政雄, 田村徳子, 小野由子, 川上順子, ラット慢性疼痛モデルを用いたガンマナイフ照射による鎮痛効果の解析～三叉神経痛治療効果のメカニズム解析のひとつとして～ 第13回ガンマナイフ研究会, 2009.2.6, つくば市

矢ヶ崎有希, 林基弘, 井沢優美, 川上順子, ガンマナイフ照射により坐骨神経部分結紮モデルラットの痛み反応は減少する, 第31回日本神経科学大会, 2008.7.9, 東京

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

矢ヶ崎 有希 (YAGASAKI YUKI)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90392422

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携分担者

なし