

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592024

研究課題名（和文）

拡散強調 MR スペクトラムによる CRPS モデルでの末梢浮腫発生メカニズムの解明

研究課題名（英文）

Line Scan Diffusion MR Spectrum of Edema in the Rat skeletal Muscle of Neuropathic model

研究代表者

中村 俊康 (NAKAMURA TOSHIYASU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70265859

研究成果の概要（和文）：アロディニア、温度痛覚過敏が出現する CRPS 類似モデルである Chung モデルにおいて、筋肉内浮腫を示す T2 値は 3 週間かけて徐々に増加した。拡散の起こりやすさを示すみかけの ADC 値は術後 1 日目に急速に上昇し、その後、漸減した。一方、末梢神経の切断モデルでは T2 値は 4 週まで上昇を継続し、ADC 値の上昇は CRPS 類似モデル同様に損傷後 1 日で生じていた。ADC 値、T2 値ともに絶対比は慢性疼痛動物モデルの方が小さかった。免疫組織学的検討では水チャンネルアクアポリン 4 (AQ4) モノクローナル抗体を用いた染色を行ない、神経損傷モデルでの AQ4 の増加を確認した。

研究成果の概要（英文）：We could detect the extremely early edematous changes in the affected skeletal muscle in the neuropathic pain animal model and in the denervated muscle using diffusion MRI. T2 ratios increased gradually with a peak at three weeks in CRPS model and 4 weeks in denervated model. ADC ratios jumped up at one day after the surgery and began to decrease at one week in both models, while absolute ratio is much higher in denervated model. AQ4 monoclonal antibody staining indicated that slightly higher incidence of AQ4 in denervated model. Diffusion MRI can be a useful tool to detect the early edematous change of CRPS affected limbs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：複合性局所疼痛症候・慢性疼痛動物モデル・拡散強調 MRI・みかけの拡散係数・拡散強調 MR スペクトロスコーピー・T2 値・末梢浮腫・以上疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

複合性局所疼痛症候群 (Complex regional pain syndrome: CRPS) は軽微な外傷 (特に神経損傷) に続発し、異常な疼痛、allodynia、局所の浮腫、皮膚温の変化などの交感神経の異常興奮に関連した症状を呈する難治性疾患で、交感神経活動の亢進、脊髄での疼痛上行経路での触覚線維との混線などのさまざま

な原因が挙げられている。CRPS の診断基準は一律ではなく、早期診断できる症例が少ないため、慢性化により治療に難渋している。一方、早期診断がなされれば、難治性への移行を防ぐことができる可能性がある。また、CRPS 患者には針筋電図などの侵襲的検査は禁忌であり、非侵襲的かつ客観的である MRI は有効と考えられる。特に拡散強調 MRI およ

びMR スペクトロスコピーは末梢での水の移動や浮腫を鋭敏に描出可能である。

## 2. 研究の目的

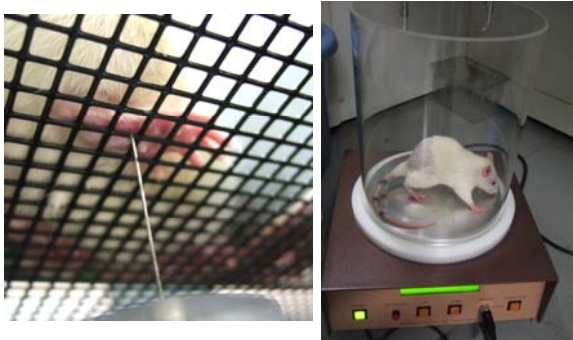
CRPS に類似したラット神経因性疼痛モデルを用いて、拡散強調MRIの浮腫診断能力をみかけの拡散係数(ADC値)と自由水分子値(T2値)を用いて検討する。さらに末梢神経損傷モデルとのADC値、T2値と比較することでCRPSでの特徴的な水の移動形態を明らかにする。さらに免疫組織学的手法でこの水の移動が何に起因するのかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) CRPS 類似の慢性疼痛動物モデルでの検討

①体重180~200gの雌Wistar系ラット5匹を使用。ペントバルビタールNa(ネンブタール)腹腔内麻酔下で、左L6横突起を切除し、左L5脊髄神経を6-0絹糸で結紮するChungモデルを作成。

②神経因性疼痛モデルとなっていることの確認のために、アロディニアはDynamic Plantar Aesthesiometer(室町機械)を用いて、温度痛覚過敏は50°Cに設定したHot plate testで評価した。処置前、処置後1・3・5日目、1~6週目までの各週で同一個体において評価した。



③臨床用の1.5T MRI装置(手関節用3インチ表面コイル)にラットを固定し、左右の腓腹筋をCPMG(Carr-Purcell-Meiboom-Gill)法Line scan diffusion imaging法(Oshio K. Magn Reson Med, 2000)で撮像し、T2値、みかけの拡散係数ADC(apparent diffusion coefficient)値を測定した。T2値の測定にはTEを20msecから77msecまで32ステップで変化させ、ADC値の測定にはb-valueを0sec/mm<sup>2</sup>から2000sec/mm<sup>2</sup>まで32ステップで変化させ、計測したデータをオーダーメイドのソフトに入力し値を出した。処置を行っていない右側との比較を行った。

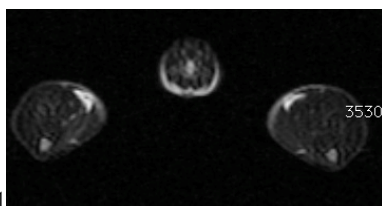
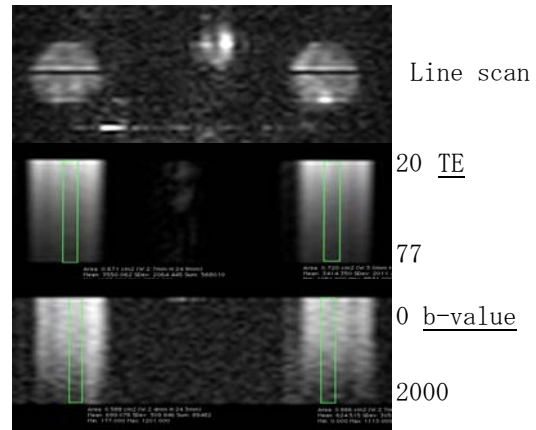


図1



(2) 末梢神経切断モデルでの検討

①体重180~200gの雌Wistar系ラット5匹を使用。ペントバルビタールNa(ネンブタール)腹腔内麻酔下で、左腓骨神経を切断結紮する神経切断モデル、神経を圧迫する神経圧挫モデル、神経を切断後に直ちに縫合する神経縫合モデルを作成し、CRPSモデル同様経時的にADC値の計測とT2値の計測を行った。

(3) 免疫組織学的検討

体重60~70gの雌マウスから採取した下腿三頭筋を凍結(液体窒素及びイソペンタン)し、cryostatでスライスを作成した。その後、乾燥(37度ホットプレートにover night)させたのちに、免疫染色を行った。免疫染色抗体は一次抗体;抗AQP4抗体(polyclonal rabbit anti-AQP4 C-terminal domain antibody): Sigma社製、二次抗体; Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG: Invitrogen社製を用いた

統計学的処理は、one-way analysis of variance with the Scheffe post hoc testにより行った。

## 4. 研究成果

(1)処置した左足の疼痛閾値は翌日より低下しており、アロディニアが出現していることが確認できた。疼痛閾値の低下した状態は、経過観察期間中持続していた。(図1)

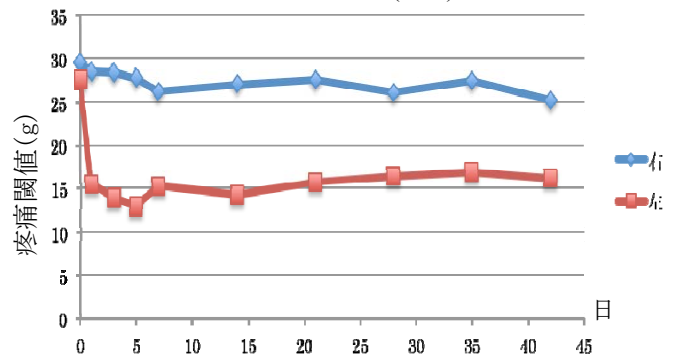


図1

(2) Hot plate test で逃避反応までの時間を計測したところ、処置後 5 日目より時間が短くなり、経過観察期間中持続した。温度痛覚過敏が 5 日目以降出現していることが確認できた。(図 2)

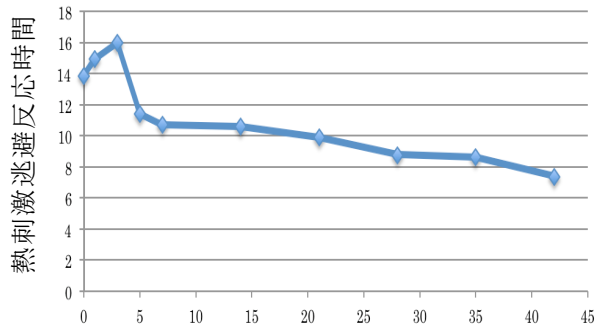


図 2

(3) T2 値は処置後 3 週目にかけて徐々に増加を示した。この T2 値上昇は筋肉内浮腫を反映していると考えられ、ラット Chung モデルにおいて、CRPS 同様の浮腫が出現していると思われる。(図 3)

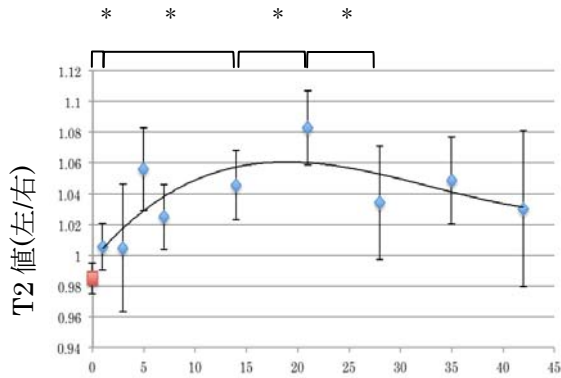


図 3

(4) ADC 値は処置後翌日に急速に上昇し、漸減した。ADC 値は拡散のおこりやすさを示しており、処置直後より上昇を示したことから、水の移動が早期より出現していることが確認できた。(図 4)

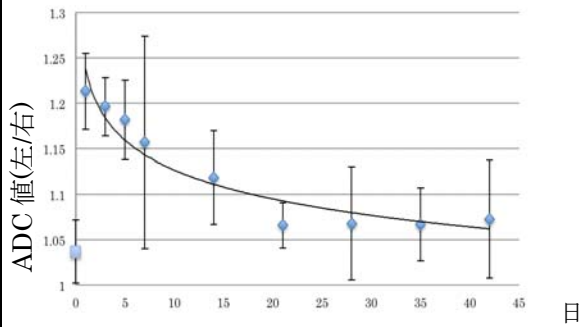
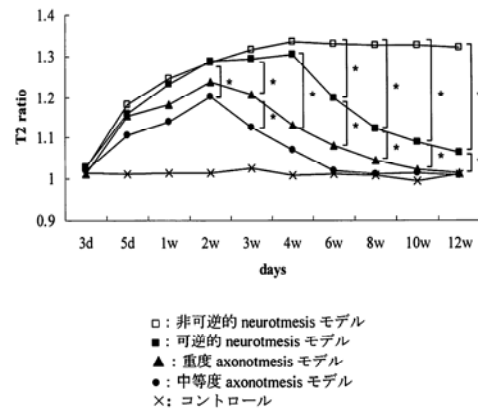


図 4

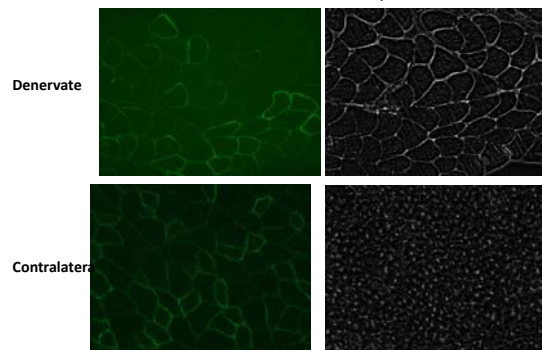
(5) 腓骨神経を切断、圧挫したラットの腓腹筋を MRI 撮像し、T2 値、ADC 値を計測した所、T2 値は切断および切断縫合も出るでは 4 週で T2 値の亢進が終了、切断モデルでは T2 値の亢進が継続した(図 5)が切断縫合モデルでは 4 週以降漸減した。一方、末梢神経圧挫モデルでは T2 値の上昇は緩やかで、回復も 2 週から開始していた。この比率は慢性疼痛モデルの方が少なかった

図 5



(6) 免疫組織学的検討

ワイルドタイプマウスの denervation モデルではコントロールである健側に比較して AQ4 の染色性が軽度増強し、コントラスト Phase 像では筋膜がより明瞭に描出された



このことから少なくとも神経損傷の際の水の移動は筋膜上の AQ4 が関与していると考えられる。

(7) CRPS 類似のラットのモデルは、他に Bennett モデル、Selzer モデル等があり、特徴が異なる。それらのモデルにおいても拡散強調 MRI での浮腫診断能力を検討していく予定である。また、AQ4 の knock-out マウスを用いて同様のモデルを作成し、水の移動性について拡散強調 MR 画像および MRS を用いて検討を行う予定である。

## 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)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

①阿部耕治、中村俊康、山部英行、戸山芳昭、池上博泰、CRPS type 2 類似のラット神経因性疼痛モデル (Chung model) の拡散強調 MRI による経時的変化の観察、第 55 回日本手外科学会学術集会、2012 年 4 月 19~20 日、パシフィコ横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 俊康 (NAKAMURA TOSHIYASU)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：70265859

### (2) 研究分担者

押尾 晃一 (OSHIO KOICHI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：90185588

### (3) 連携研究者

阿部 耕治 (ABE KOJI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：20445224

### (4) 研究協力者

山部 英行 (YAMABE EIKO)  
宮崎 阿部 (MIYAZAKI KAORI)