

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：37116

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791481

研究課題名（和文） ラット疼痛モデルを用いたポリフェノールの鎮痛作用に関する研究

研究課題名（英文） Study of Antinociceptive Effect of Polyphenols in Rat Experimental Models

研究代表者

中村 元洋（NAKAMURA MOTOHIRO）

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：30461578

研究成果の概要（和文）：ポリフェノールのうちナリングニン、クエルセチン、ルテオリン、クロロゲン酸、クルクミン、レスベラトロールは急性痛モデルにおいて髄腔内投与で抗侵害作用を示した。一方、ダイゼインは侵害刺激に対する反応潜時を短縮し痛覚閾値を低下させた。神経障害性疼痛モデルを用いた実験ではナリングニンとクロロゲン酸は機械的アロディニアに対して反応閾値を上昇させたが熱性痛覚過敏に対しては影響を与えなかった。また高用量ではいずれも運動機能を抑制した。

研究成果の概要（英文）：Several intrathecal polyphenols exerted antinociceptive effect on acute pain. In neuropathic pain model, some drugs attenuated mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia, suggesting a weak antinociceptive property.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：行動薬理学実験、ポリフェノール、神経障害性疼痛、鎮痛薬、動物モデル

1. 研究開始当初の背景

現在、慢性疼痛の成因の大部分を占める神経障害性疼痛には有効性の高い薬物が無い。神経障害性疼痛は臨床で最も治療が難しいタイプの疼痛で、慢性化するため多くの人が日常生活に支障をきたしている。疼痛研究の多くがこの機序と治療に注がれ、近年その複雑な病態が次第に明らかになってきた。病態が複雑なことから侵害受容ニューロンの活性を調節する様々な系統の物質の鎮痛効果が示されるようになってきたが、臨床応用されるに至っていない。

ポリフェノールは、芳香族ベンゼン環の水素が複数の水酸基（ヒドロキシ基）に置換さ

れた構造をもつ植物成分の総称で、ほとんどの植物に含有され、天然に5000種以上存在するといわれている。抗酸化作用があり、ポリフェノールを多く含む食物を摂取すると動脈硬化を抑制し脳梗塞・心筋梗塞のリスクを減らすことがわかっている。また抗腫瘍作用により発癌が抑制されるという疫学調査も報告され、治療薬としての臨床応用に関して現在非常に注目されている。一方、これまでにいくつかのポリフェノールに抗炎症作用・鎮痛作用があることも示されている。

多くのポリフェノールが天然に存在するが抗炎症・鎮痛作用が調べられているものはまだ非常に少なく、特に鎮痛作用の機序につ

いてはほとんど理解されていない。resveratrol には COX-1, 2 阻害作用があることが最近報告されているが、いくつかのポリフェノールの抗炎症・鎮痛作用が個々の分子構造に特異的な作用によるのかポリフェノール類の共通構造が関与するのか分かっていない。ポリフェノールは天然に存在する成分で主要な作用には抗酸化作用、抗腫瘍作用があるため過量摂取による副作用が少ないことが予想され、臨床応用の利点が大きいと考えられる。

2. 研究の目的

天然の植物に存在するポリフェノールには抗酸化作用、抗腫瘍作用などいくつかの薬理作用があるが、鎮痛作用、抗炎症作用を持つものも知られている。本研究で代表的なポリフェノールの急性疼痛および神経障害性疼痛(慢性疼痛)に対する鎮痛作用についてラットを用いた 6 種類の疼痛行動実験で検討する。ポリフェノール類に属する多くの物質の鎮痛作用の有無を調べることで鎮痛作用を発揮するために必要な化学構造を明らかにする。そして作用機序を解明すれば副作用の少ない新しい鎮痛薬の開発に繋がる可能性がある。急性痛及び慢性痛に対するポリフェノールの作用をラットの疼痛モデルを用いて調べる。

3. 研究の方法

(1) 急性疼痛に対する実験

無処置の雄 Sprague-Dawley ラットを用いる。

① テールフリック試験(脊髄反射への影響): Ugo Basile 社製 7360 を用いる。尻尾に radiant heat を当て逃避反応が起こるまでの潜時を測定する。

② ホットプレート試験(上位中枢への影響): Columbus Instruments 社製 Hotplate Analgesia Meter を用いる。熱板にラットを乗せ逃避反応が起こるまでの潜時を測定する。

③ Paw pressure 試験: 圧刺激疼痛閾値測定装置[Ugo Basile 社製 7200]を用いて機械刺激に対する逃避反応の閾値を測定する。

④ ホルマリン試験: 化学刺激による炎症性疼痛に対する作用を調べるテスト。5%ホルマリン 10 μ L をラット後肢の足底に皮下注入し疼痛行動(flinching)の回数をカウントし、Phase 1 と Phase 2 の影響を観察する。これらのテストについてポリフェノール類をラットの腹腔内および髄腔内に投与し、鎮痛効果を評価する。

(2) くも膜下カテーテル留置

薬物を髄腔内投与するため Yaksh らの方法により、ウレタン麻酔下に実体顕微鏡を用いてラットの大槽からポリエチレンカテーテル(PE-10)を尾側に向かって挿入する。

(3) 脳室カテーテル留置

脳室内投与のため右側脳室に 22G のステンレ

ス製のガイドカニューレを頭頂骨より 4.0 mm 挿入し、歯科用セメントとアンカースクリューで頭部に固定した。処置 1 週間後に 29G の注入用カニューレに PE-20 を接続しマイクロシリンジでゆっくり注入した。

(4) 神経障害性疼痛モデルの作成

Seltzer らの方法により、ウレタン麻酔下に雄 Sprague-Dawley ラットの片側の坐骨神経を 8.0-絹糸で 1/2-1/3 周部分結紮して作成する。これにより患肢に痛覚過敏、アロディニアが起こる。コントロール群には麻酔下に坐骨神経を剥離・露出させる sham operation を施す。paw pressure 試験: 圧刺激疼痛閾値測定装置[Ugo Basile 社製 7200]を用いて機械刺激の閾値を測定し痛覚過敏が認められたラットのみを実験に使用する。

(5) くも膜下カテーテル留置

(6) 脳室カテーテル留置

(7) 熱刺激および機械刺激過敏性に対する実験

① プランター試験(thermal hyperalgesia を調べる): Ugo Basile 社製 7370(現有)を用いる。神経障害性疼痛に随伴する熱刺激に対する痛覚過敏を評価するための検査で、患肢足底に radiant heat を当て逃避反応が起こるまでの時間(潜時)を測定する。

② Electronic von Frey 試験 (mechanical allodynia を調べる): 患肢足底に力がかかるように filaments を当て、逃避反応が起こる閾値(g)を測定する。electronic von Frey aesthesiometer (model 2391C; IITC Life Science)を用いる。

(8) 運動機能に対する実験

薬物が運動機能、運動協調機能、運動学習機能に影響を与えるか調べるため、ロータロッドテストを行う。鎮痛効果を有する物質の運動機能に関する副作用の有無をスクリーニングし、現在臨床使用できる鎮痛薬がもたらす運動失調などの副作用を軽減させた新薬の開発に有効な情報を得る。UGO BASILE 社製 Model 47700 を用いる。

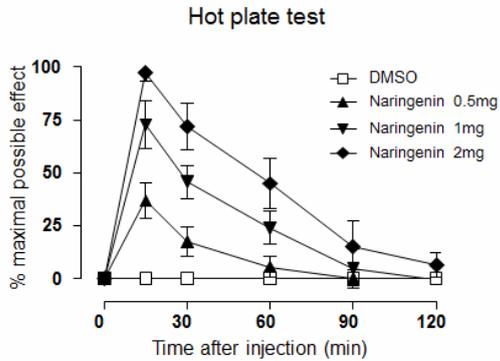
4. 研究成果

(1) ポリフェノールのうちナリンゲニン、クエルセチン、ルテオリン、クロロゲン酸、クルクミン、レスベラトロールは急性痛モデルにおいて髄腔内投与で抗侵害作用を示した。一方、ダイゼインは侵害刺激に対する反応潜時を短縮し痛覚閾値を低下させた。神経障害性疼痛モデルを用いた実験ではナリンゲニンとクロロゲン酸は機械的アロディニアに対して反応閾値を上昇させたが熱性痛覚過敏に対しては影響を与えなかった。また高用量ではいずれも運動機能を抑制した。脳室内投与では抗侵害作用を認めなかった。これらの結果からポリフェノールは脊髄で急性痛に対して強い鎮痛作用を示す一方、神経障害性疼痛に対しては弱い作用であると言える。

ナリンゲニンを代表に結果を以下に示す。

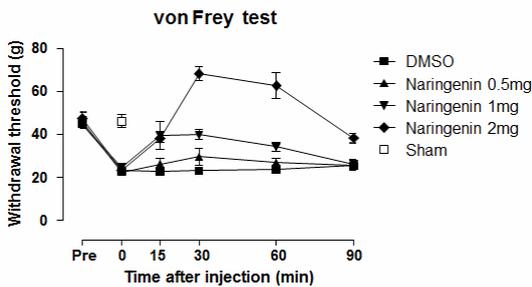
〈急性痛モデル〉

ポリフェノールは用量依存性に強い侵害刺激である熱性侵害刺激による逃避行動を脊髓反射(テールフリック試験)・上位中枢反応(ホットプレート試験)とも抑制した(下図)。一方、機械的侵害刺激(Paw pressure 試験)は抑制しなかった。

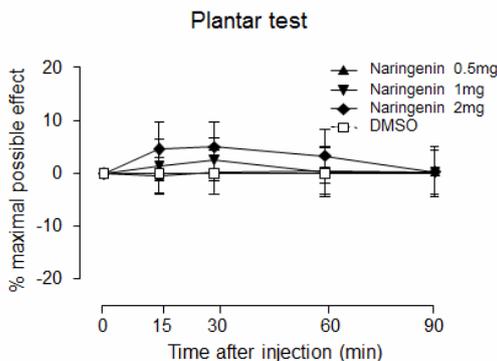


〈神経障害痛モデル〉

坐骨神経結紮により機械的アロディニアおよび熱性痛覚過敏が出現した。ポリフェノールは機械的アロディニアを用量依存性に抑制した(下図)。

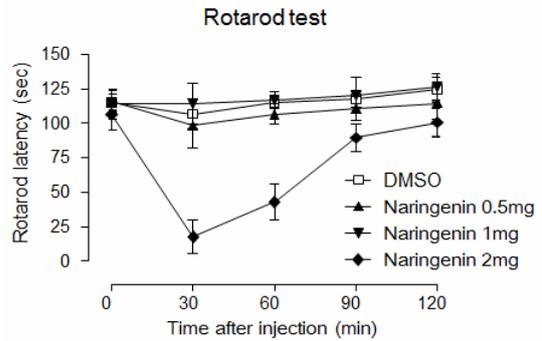


一方、ポリフェノールは熱性痛覚過敏を抑制しなかった(右上図)。神経障害痛モデルにおいてフォンフライ試験ではAβ線維が主に活性化されることから低閾値の刺激に対して鎮痛作用を持つことが分かった。プランターテストはAδ線維とC線維が関与した上位中枢反応で評価するがポリフェノールはこの反応を抑制しなかった。



〈運動機能への影響〉

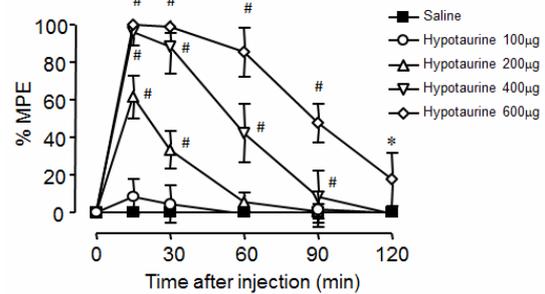
ポリフェノールは高用量で運動機能を抑制したが運動機能に影響しない用量から鎮痛作用が発現することが分かった(下図)。



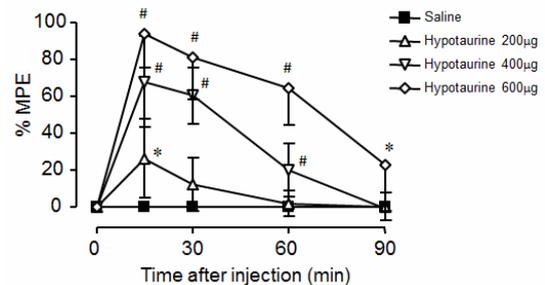
(2) ヒポタウリンの急性、炎症性、神経障害性疼痛に対するに関する研究。本研究はポリフェノールと同様に強い抗酸化作用をもつ中枢神経アミノ酸であるヒポタウリンの脊髓での抗侵害作用についても検討した。

① ヒポタウリンは急性痛モデルにおいて侵害性熱刺激と機械刺激とも用量依存性に抑制した。

侵害性熱刺激: tail flick test

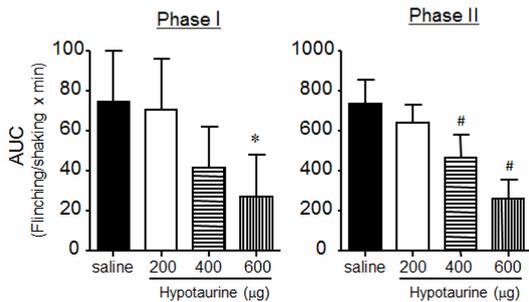
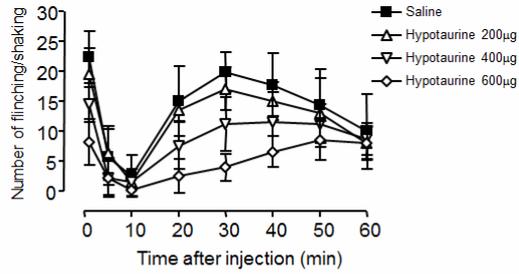


侵害性機械刺激: paw pressure test



Vocalization 閾値を用量依存性に増加させた。オピオイドのように強い抗侵害作用が示唆された。

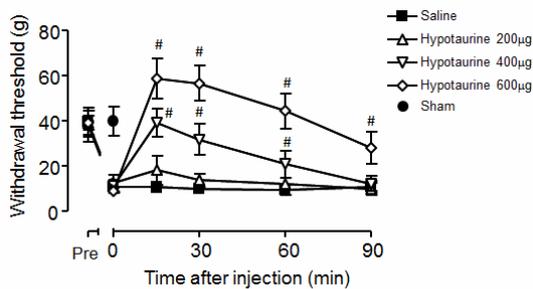
- ② ヒポタウリンは炎症性侵害刺激であるホルマリンの注入後に見られる第一相と第二相の両方の反応を用量依存性に抑制した。



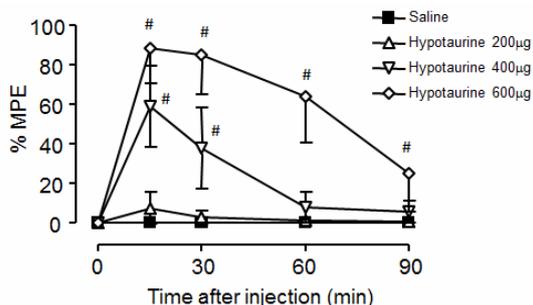
第一相はホルマリンによる強い化学刺激で A-delta 線維と C 線維が活性化される。この第一相の抑制は C 線維が優勢の第二相の強力な鎮痛作用で認められる。ヒポタウリンは炎症性疼痛に対しても強い鎮痛作用を示した。

- ③ ヒポタウリンは神経障害性疼痛モデルに出現した機械的アロディニアと熱性痛覚過敏の両方を用量依存性に抑制した。

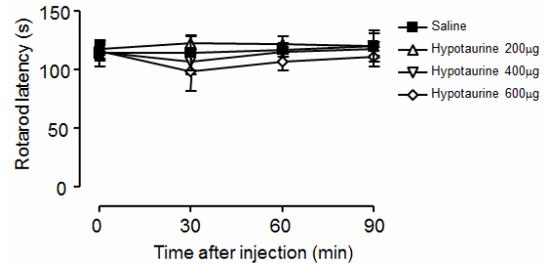
機械的アロディニア : electronic von Frey test



熱性痛覚過敏 : plantar test

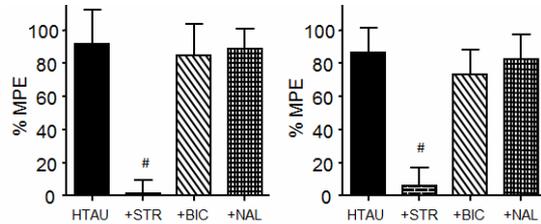


- ④ 一方、ヒポタウリンは最大の鎮痛効果を示す高用量でも運動機能には影響を与えなかった。運動機能 : Rotarod test



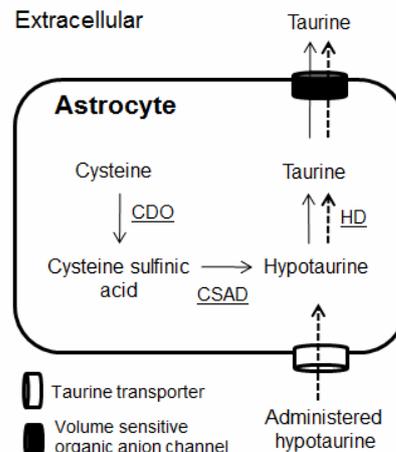
- ⑤ ヒポタウリンの抗侵害作用機序

ヒポタウリン最大効果に対する各種受容体阻害薬の抑制作用を検討した。Paw pressure test (左図)、Plantar test (右図)



ヒポタウリンの鎮痛作用は直前に髄腔内投与したグリシン受容体阻害薬のストリキニーネ (5 microg) により完全に拮抗されたが GABAA 受容体阻害薬のピククリン (10 microg) および mu オピオイド受容体阻害薬のナロキソン (10 microg) では全く拮抗されなかった。この結果から髄腔内に投与されたヒポタウリンの抗侵害作用には脊髄のグリシン受容体が関与していることが示唆された。

推測されるグリア細胞におけるヒポタウリン代謝



これらの結果からヒポタウリンは抗酸化作

用のほかに強力な鎮痛作用を持つことが分かった。ヒポタウリンは様々な病態の疼痛に対する新規の鎮痛薬となる可能性がある。今後、脳内に投与した場合の作用や最適な投与経路を探るために更に研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Hara K., Nakamura M., Haranishi Y., Terada T., Kataoka K., Sata T.
Antinociceptive effect of intrathecal administration of hypotaurine in rat models of inflammatory and neuropathic pain. Amino Acids 2012 (In press) DOI : 10.1007/s00726-011-1094-9 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 元洋 (NAKAMURA MOTOHIRO)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 30461578