

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22592253

研究課題名(和文) 神経因性疼痛の治療法の開発 -イオントフォレーシス効果の基礎的研究-

研究課題名(英文) Development of the method of treatment for neuropathic pain -Basic study of the effect of iontophoresis-

研究代表者

嶋田 昌彦 (SHIMADA, Masahiko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40170948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：我々は交流電流を用いたイオントフォレーシス(AC IOP)と直流電流を用いたイオントフォレーシス(DC IOP)との比較研究を行った。行動実験や免疫組織学実験の結果、DC IOPは短時間で効果が発現するが持続せず、AC IOPは効果発現まで時間がかかるが効果は長時間持続することが分かった。これらの効果は血中リドカイン濃度の測定により、リドカインが全身投与されて発現しているのではないことを確認した。また本実験の刺激強度であればエバンスブルーの血管外漏出を起こす程度の皮膚損傷は認められないことも確認した。以上より、慢性疼痛患者には長時間効果が持続するAC IOPが有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to compare the effect of alternating current iontophoresis (AC IOP) with direct current iontophoresis (DC IOP). As a result of behavior and immunohistological experiment, DC IOP have a fast onset time and a short effect time, while AC IOP have a slow onset time and a long effect time. According to the result of the blood concentration of lidocaine, we confirmed that those effects were not caused by systemic administration of lidocaine. Additionally, those electrical powers we applied did not lead to extravasation of Evans Blue in the skins under the electrodes. Thus, these findings of this study suggest that AC IOP is useful for patients suffering from chronic pain because of its long effect time.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ACイオントフォレーシス DCイオントフォレーシス 神経因性疼痛 CCI Fos

1. 研究開始当初の背景

神経損傷が原因となって引き起こされる神経因性疼痛は、持続的な痛覚過敏を伴い、患者の日常生活の営みを妨げ、精神を疲労させ、QOL を著しく低下させる。神経因性疼痛には、三叉神経痛や舌咽神経痛、帯状疱疹後神経痛、外傷による神経痛ならびに抜歯やインプラント埋入後の神経痛などがある。三叉神経痛や舌咽神経痛は比較的奏功する薬剤や処置法が確立している反面、帯状疱疹後神経痛や外傷による神経痛には、治療に当たる医師も鎮痛薬や鎮痛法に苦慮することが多い。これら難治性の神経痛に対して、当科では交流電流を用いた AC イオンフォレーシス (AC IOP) を行い、良好な結果を報告している。

これまでの研究結果より、使用している AC IOP は、直流電流を用いる DC イオンフォレーシス (DC IOP) の欠点を克服するために開発された。DC IOP の欠点は、分極による皮膚内への薬物浸透量低下や薬物の電気分解などである。一方で、AC IOP の欠点として、薬物輸送に時間がかかることが挙げられる。

先行研究により、4%リドカインを用いた AC イオンフォレーシスの効果は、リドカインが皮膚内に輸送されることと、電気刺激が局所に与えられることにより、三叉神経脊髄路核尾側亜核での侵害受容の中枢伝達を調節する可能性があることが明らかとなった。しかし、DC IOP が侵害受容性中枢伝達経路に与える影響は調査していないため、AC IOP および DC IOP の疼痛を抑制する効果に、どのような違いがあるのかは不明であった。

2. 研究の目的

AC IOP および DC IOP それぞれの侵害受容性中枢伝達経路への効果について、比較・検討はほとんど行われてこなかった。そこで本研究では、神経因性疼痛モデルの一つである眼窩下神経 Chronic constriction injury (CCI) モデルラットを用いて直流、交流双方のイオンフォレーシスを行い、それぞれのイオンフォレーシスが疼痛伝達経路にどのように影響を与えるかを調査することとした。さらに相違点を比較し、慢性疼痛患者に有利な治療法を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

< 眼窩下神経 CCI モデルラットの作製法 >

300 ~ 400 g の SD 雄性ラットに、ペントバルビタール (50mg/kg) を腹腔内投与し全身麻酔を施す。

口腔内より切開し、眼窩下神経を剖出した後、クロミットガット系 (4 - 0) にて神経を結紮し、7 日間生存させ、神経因性疼痛を発生させる。

< von Frey Hair による

逃避行動閾値の測定 >

- (1) ペントバルビタール (50mg/kg) による全身麻酔下に左鼻毛部の毛を除去し、1 日休ませる。
- (2) CCI 手術直前に von Frey Hair による逃避行動閾値を測定する。
- (3) ペントバルビタールによる全身麻酔下に CCI 手術を行った後、生存させる。
- (4) 6 日目に再び鼻毛部の毛を除去する。
- (5) 7 日目の処置直前に von Frey Hair による逃避行動閾値を測定する。
- (6) ラットを以下の 6 群に分け、それぞれの処置を行う。

0.9%生理食塩水貼付群

(コントロール群)

：電極に 0.9%生理食塩水 0.05ml を浸透させ、顔面皮膚に貼付

4%リドカイン貼付群

：電極に 4%リドカイン 0.05ml を浸透させ、顔面皮膚に貼付

0.9%生理食塩水 AC IOP 群

：電極に 0.9%生理食塩水 0.05ml を浸透させ、50Hz の双極性スパイク波を用いて 1V の刺激を与える

0.9%生理食塩水 DC IOP 群

：電極に 0.9%生理食塩水 0.05ml を浸透させ、0.1mA の持続刺激を与える

4%リドカイン AC IOP 群

：電極に 4%リドカイン 0.05ml を浸透させ、50Hz の双極性スパイク波を用いて 1V の刺激を与える

4%リドカイン DC IOP 群

：電極に 4%リドカイン 0.05ml を浸透させ、0.1mA の持続刺激を与える

使用器具：・iOMED 社製

phoresor® II Auto (DC IOP)

・三共電子株式会社製

Lasper CS-504 (AC IOP)

・TTI・エルビュー社製

銀塩化銀電極を用いた

イオンフォレーシスパッチ

逃避行動閾値の測定は、処置開始から、5 分後、10 分後、20 分後、40 分後、60 分後とし、それぞれ処置終了から 30 分後、60 分後、90 分後、120 分後にも測定した。

< Fos 様タンパク陽性細胞の免疫染色 >

- (1) von Frey Hair による逃避行動閾値の測定 (1) ~ (4) を同様に行った。
- (2) 7 日目に機械刺激による逃避行動閾値を測定し、ウレタン (1200mg/kg) にて麻酔を行った。
- (3) ラットを von Frey Hair による逃避行動閾値の測定と同様に 6 群に分け処置した。
- (4) ラットに 60g の機械刺激を von Frey Hair にて 1 Hz、10 分間与えた。
- (5) 致死量のペントバルビタールを投与した後、0.9%生理食塩水と 4%パラホル

ムアルデヒド 0.1 M リン酸緩衝生理食塩水(PBS)にて灌流固定を行い、延髄を取り出した。

- (6) 4%パラホルムアルデヒド 0.1 M PBS にて後固定の後、30% シュークローズに 7 8 時間以上浸漬し、30 μ m の連続切片を作製し、4 切片ごとに PBS に収集された。
- (7) 切片は PBS で洗浄の後、3% H2O2 にて 10 分間処理し、3% normal foat serum(NGS)に 25 で 2 時間浸漬され、その後 rabbit anti-Fos(1:10,000; c-fos ab-5, Oncogene, MA, USA)および 3% NGS 混合液に 25 で一晩、浸漬した。PBS で洗浄後、biotinylated secondary IgG(1:200; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) に 25 で 2 時間浸漬した。PBS で洗浄後、peroxidase-conjugated avidin-biotin complex (1:100; ABC, Vector Labs)にて 25 で 2 時間浸漬した。
- (8) 切片を 0.035% 3,3'-diaminobenzidine-tetra HCl(DAB; Sigma), 0.2% nickel ammonium sulfate, 0.05% peroxide および 0.05M Tris-buffer(TB)混合液に浸漬した。PBS にて洗浄の後、スライドグラスにマウントした。
- (9) 三叉神経核における細胞数測定部位は、以前の研究で、一番発現細胞数の変化が認められた、Obex より尾側へ 1200 μ m ~ 1800 μ m の三叉神経脊髄路核尾側亜核相当部の黒く染色された Fos 様タンパク陽性細胞数を測定した。この間で、5 枚の切片が得られるため、その平均を測定値とした。

<電極直下の皮膚状態の観察>

- (1) von Frey Hair による逃避行動閾値の測定(1)~(4)を同様に行った。
- (2) これらのラットを von Frey Hair による逃避行動閾値の測定と同様に 6 群に分けた。
- (3) ウレタン 1200mg/kg 投与後、処置の 30 分前に、エバンスブルー50mg/kg を尾静脈より投与し、それぞれの群に、5, 10, 20, 40 および 60 分間の処置を行った。(0.9%生理食塩水貼付群では、0.9%生理食塩水貼付を 60 分間の処置のみとし、これをコントロールとした。また皮膚状態の観察実験のみ、両側に電極を装着し、同じ処置を施している。)
- (4) 処置直後に 0.9%生理食塩水 500ml にて灌流を行い、電極直下の皮膚を直径 6mm 採取した。
- (5) 採取した皮膚を細断し、皮膚組織を 4% パラホルムアルデヒド 0.5ml に室温にて 24 時間浸漬し、分光光度計にて 620nm の波長の吸光度を測定した。吸光度より、事前に得た検量線を使用して溶媒中のエバンスブルー濃度を算出した。

<血中リドカイン濃度の測定>

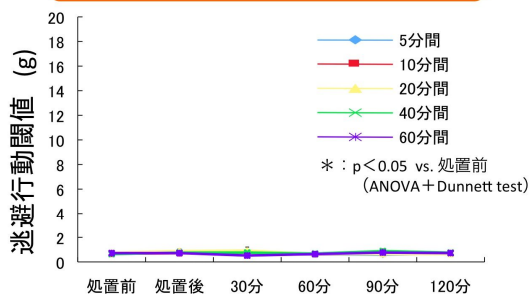
- (1) von Frey Hair による逃避行動閾値の測定(1)~(4)を同様に行った。
- (2) これらのラットをリドカイン貼付群、リドカイン AC IOP 群、リドカイン DC IOP 群の 3 群に分けた。それぞれの群において 5, 10, 20, 40 および 60 分間の処置を行った。
- (3) 処置直後および処置 1 時間後に外頸静脈より 1ml の採血を行った。
- (4) 採血管を室温にて 1 時間、4 にて一晩放置し、翌日、6,500rpm の遠心分離を行い、分離された血清から 0.3ml の検体を採取した。
- (5) 検体は-20 にて冷凍保存し、血中リドカイン濃度測定は、外部機関に依頼した。

4. 研究成果

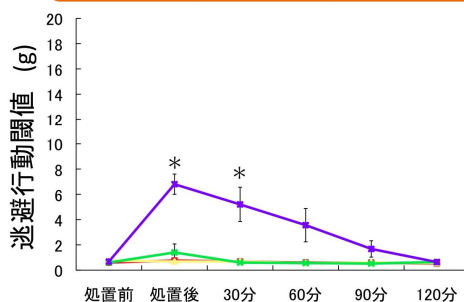
<von Frey Hair による 逃避行動閾値の測定> (n = 5)

- (1) 処置側の逃避行動閾値の変化

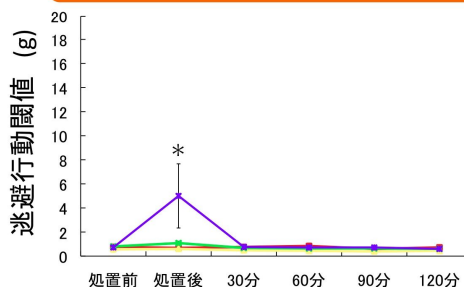
0.9%生理食塩水貼付



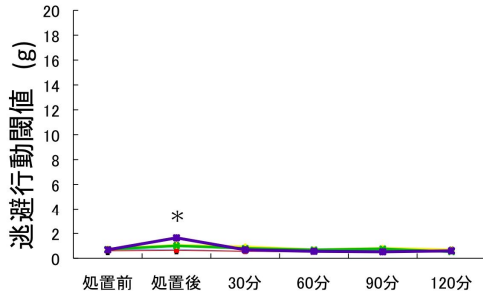
0.9%生理食塩水 AC IOP



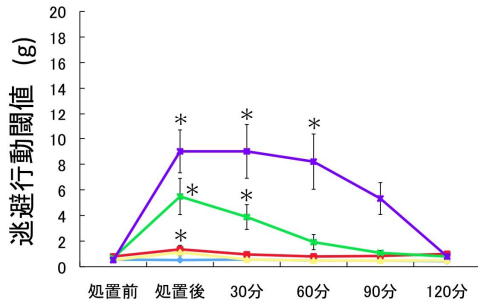
0.9%生理食塩水 DC IOP



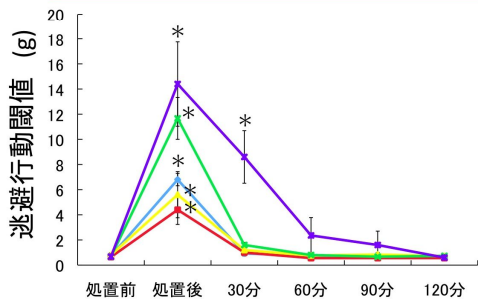
4%リドカイン貼付



4%リドカイン AC IOP



4%リドカイン DC IOP



(2) 対側の逃避行動閾値の変化
いずれの群においても、処置後に有意な逃避行動閾値の上昇は認めなかった。

- AC IOP では、4%リドカイン 20 分処置から逃避行動閾値の上昇が認められ、60 分 処置にて処置後 60 分まで、0.9%生理食塩水 60 分処置においても、処置後 30 分 まで逃避行動閾値が上昇した。
- DC IOP では、4%リドカイン 5 分処置から逃避行動閾値の上昇が認められ 60 分処置にて処置後 30 分まで、0.9%生理食塩水 60 分処置においては、処置直後のみ逃避行動閾値が上昇した

考察：

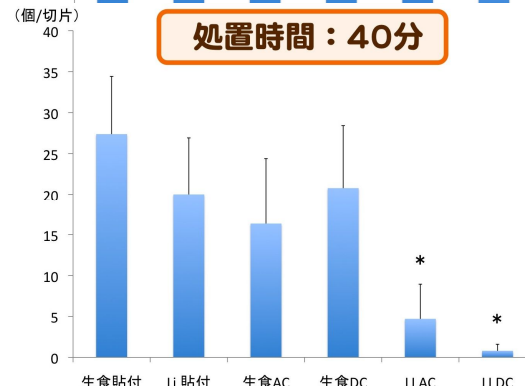
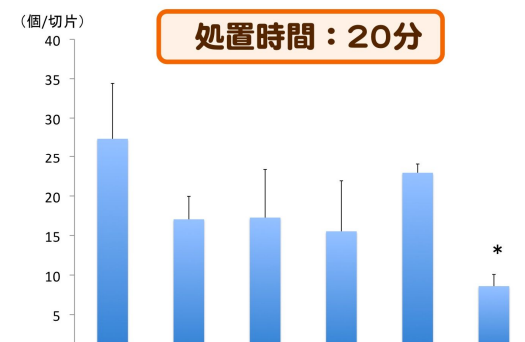
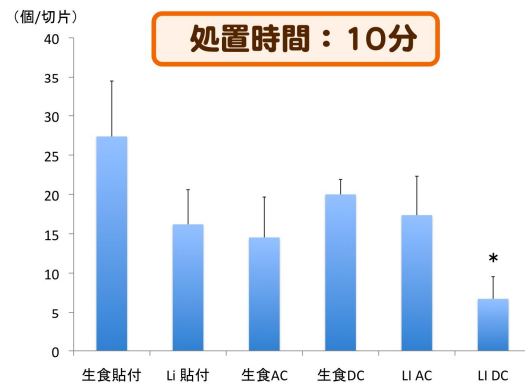
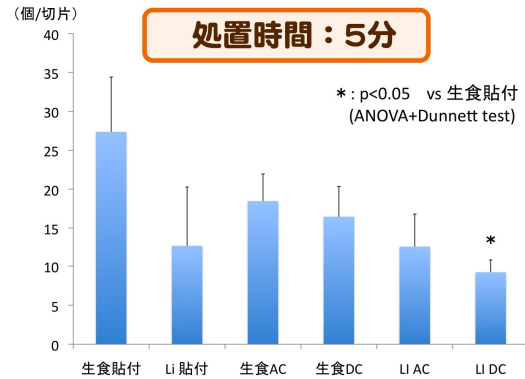
- (1) DC IOP では、5 分の処置であっても、有意な逃避行動閾値の上昇を認めた。これはリドカインの輸送が AC IOP よりも効率的に行われている可能性がある。
- (2) DC IOP と AC IOP では、逃避行動閾値が上昇している時間の長さが異なった。こ

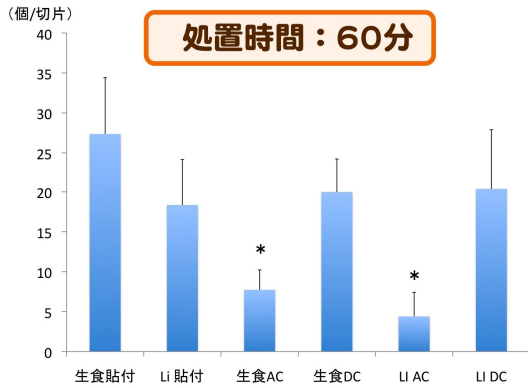
れにより、鎮痛効果が持続する可能性があるため、AC IOP の使用は慢性痛の治療に有効であると思われる。

- (3) 生理食塩水による電気刺激でも、疼痛閾値に変化が認められた。よって電気刺激は、リドカインの輸送以外の変化を生体に与えている可能性があると思われた。

< Fos 様タンパク陽性細胞の免疫染色 >
(n = 3)

- (1) 処置側の Fos 様タンパク陽性細胞数の変化





(2) 対側の Fos 様タンパク陽性細胞数の変化
対側の Fos 様タンパク陽性細胞数に、群間差は認めなかった。

- AC IOP では、4%リドカイン 40 分および 60 分処置において Fos 様タンパク陽性細胞数の減少が認められ、0.9%生理食塩水 60 分処置においても Fos 様タンパク陽性細胞数は減少した。
- DC IOP では、4%リドカイン 5 分処置から Fos 様タンパク陽性細胞数の減少が認められた。

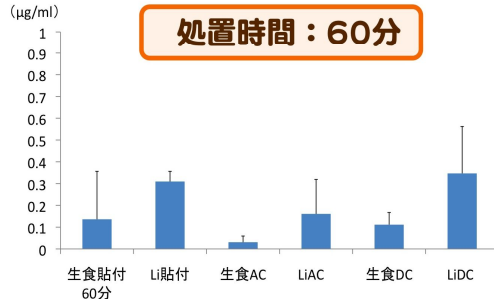
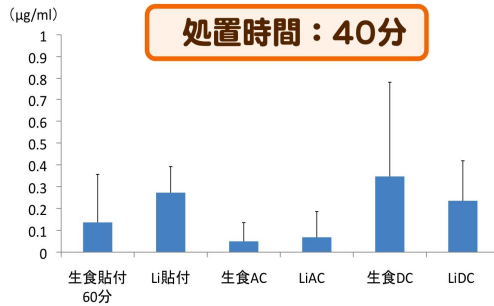
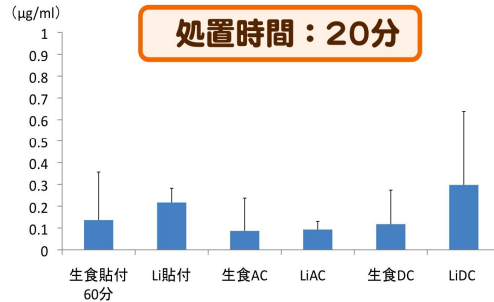
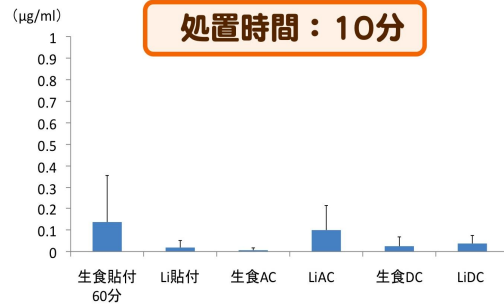
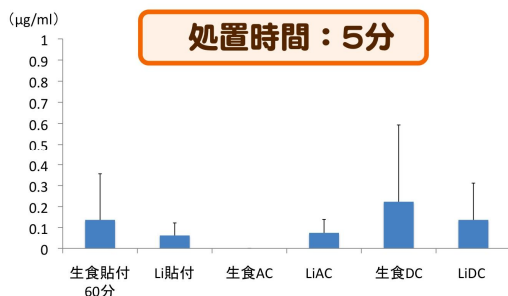
考察：

- (1) Li DC 群では、5 分の処置であっても、有意な Fos 様タンパク陽性細胞数の減少を認めた。これはリドカインの輸送が AC IOP よりも効率的に行われている可能性があるといえる。
- (2) AC IOP では生理食塩水による電気刺激でも、有意な Fos 様タンパク陽性細胞数の減少が認められた。よって AC IOP の電気刺激は、リドカインの輸送以外の変化を生体に与えている可能性がある。
- (3) Li DC 群では、60 分処置で生食貼付群との有意差が認められなくなっている。明らかではなかったが、組織の炎症など、有害事象が発生している可能性がある。

< 電極直下の皮膚状態の観察 >

(n = 3)

溶媒中に溶出した
エバンスブルー濃度 (CCI 側)



エバンスブルーの血管外漏出量に統計 (ANOVA) 上、有意差は認められなかった。

しかし、AC IOP および DC IOP 双方で、40 分および 60 分の処置後、数匹のラットにおいて電極直下の皮膚に、エバンスブルーの点状の漏出を認めた。

考察：

- (1) エバンスブルーの血管外漏出量に統計 (ANOVA) 上、有意差は認められなかった。よって実験で使用した電気刺激の強度 (AC: 1V 50Hz 双極スパイク波, DC: 0.1mA 持続刺激) であれば、明らかな炎症を引き起こす可能性は低いと思われる。
- (2) しかし、肉眼的には数匹のラットにエバンスブルーの皮膚への点状の漏出を認めた。そのため、エバンスブルーの血管

外漏出量に有意差はなかったが、長時間の処置の場合、電極直下の皮膚に何らかの変化が発生している可能性は捨てきれない。

< 血中リドカイン濃度の測定 >

(n = 1 ~ 2)

この実験は、本学の動物実験室の改修工事が急遽開始されてしまったため、十分な n 数が確保できなかった。

前述の行動実験より、AC IOP と DC IOP の効果の持続性の相違が明確に現れる時間は処置後 60 分と予想された。

しかし、リドカイン貼付群、リドカイン AC IOP 群、リドカイン DC IOP 群の 3 群すべて、処置直後と処置後 60 分ともに検出限界以下の濃度であった。

考察：

- (1) AC IOP および DC IOP とともに発現する効果は、体内へ輸送され全身投与されたリドカインによる効果ではないことが示唆された。従って、これらの効果は皮膚組織内に輸送されたリドカインや、皮膚の電気刺激による侵害受容伝達経路の変容によって発現している可能性が示唆された。

まとめ：

4 年間の本実験の結果、DC IOP は短時間で効果が発現するものの持続せず、AC IOP は効果発現まで時間がかかるが長時間効果が持続することが分かった。これらの効果はリドカインの全身投与によるものではなかった。また、本実験の刺激強度であればエバンスブルーの血管外漏出を起こすほどの皮膚損傷は認められなかった。しかし、肉眼上で点状漏出を認めた個体もあったことから、組織像の確認が必要と思われた。

以上より、AC IOP は神経障害性疼痛患者の疼痛コントロールに安全に使用できる可能性が示唆された。また三叉神経脊髄路核尾側亜核に変化を発現させることから、神経障害性疼痛患者のみならず、慢性疼痛患者全般にも使用できる可能性があると考えている。

今後は皮膚に取り込まれたリドカイン量や、内因性オピオイドの関与の有無を検討していく必要があると考える。

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 1 件)

1. Yamazaki Y, Umino M, Fukayama H, Shimada M., The effect of alternating current iontophoresis on rats with the chronic constriction injury to the infraorbital nerve, Int J Dent., 査読有, doi: 10.1155/2012/405292., 2012.

[学会発表] (計 4 件)

1. 山崎 陽子, 新美 知子, 安藤 祐子, 富澤 大佑, 井村 紘子, 細田 明利, 川島 正人, 嶋田 昌彦, ラットの顔面皮膚における直流および交流電流を用いたイオントフォレーシスの電極下の皮膚状態の検討, 第 41 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2013 年 10 月 4 日, 横浜
2. 山崎 陽子, 新美 知子, 安藤 祐子, 富澤 大佑, 井村 紘子, 細田 明利, 川島 正人, 嶋田 昌彦, 直流および交流電流を用いたイオントフォレーシスのラットの三叉神経核における Fos 用タンパク陽性細胞発現数の比較, 第 40 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2012 年 10 月 5 日, 福岡
3. 山崎陽子, 新美知子, 安藤祐子, 富澤大佑, 井村紘子, 細田明利, 川島正人, 嶋田昌彦, ラットの行動実験による直流および交流電流を用いたイオントフォレーシスの効果の比較, 第 39 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2011 年 10 月 8 日, 神戸
4. 山崎陽子, 嶋田昌彦, 直流および交流電流を用いたイオントフォレーシスによるラットの逃避行動への効果の比較, 第 40 回日本慢性疼痛学会, 2011 年 2 月 25 日, 東京

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 昌彦 (SHIMADA, Masahiko)
東京医科歯科大学・医歯 (薬) 学総合研究科・教授
研究者番号 : 4 0 1 7 0 9 4 8

(2) 研究分担者

山崎 陽子 (YAMAZAKI, Yoko)
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号 : 9 0 3 6 6 6 0 9