

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791629

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛に対するフリーラジカル消去薬の鎮痛作用および予防効果に関する研究

研究課題名(英文) Antihyperalgesic effect of free radical scavenger in a rat neuropathic pain model.

研究代表者

中村 元洋 (NAKAMURA, Motohiro)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：30461578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの坐骨神経を結紮し神経障害性疼痛モデルを作製した。フリーラジカル消去薬の5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide(DMPO)、phenyl N-tert-butyl nitron(PBN)、ビタミンEは神経障害性疼痛モデルで発現した機械的痛覚過敏、冷的痛覚過敏を腹腔内投与と髄腔内投与で用量依存性に抑制した。しかし、脳室内投与ではいずれも抑制しなかった。このことから抗痛覚過敏作用には脊髄が関与していることが示唆された。一方、神経結紮直後に腹腔内に単回投与したビタミンCとビタミンEは痛覚過敏の発現を抑制できなかった。

研究成果の概要(英文)：Analgesic effect of free radical scavengers on neuropathic pain was examined using a rat chronic constriction injury model. Systemic and intrathecal administration of 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide(DMPO), phenyl N-tert-butyl nitron(PBN) and vitamin E dose-dependently attenuated mechanical and cold hyperalgesia, whereas intracerebroventricular administration of these drugs had no effect on the hyperalgesia. On the other hand, single peritoneal injection of vitamin C or vitamin E after nerve injury did not suppress the development of the neuropathic pain.

研究分野：麻酔科学

キーワード：フリーラジカル消去薬 神経障害性疼痛 行動薬理学 鎮痛薬

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は現在有効な治療薬が無く治療に難渋している。多くの人々が日常生活や労務に支障を来し、社会的損失を招いている。このため従来の治療薬と異なる作用機序を持つ副作用の少ない新しい治療薬の開発が強く望まれている。近年、精力的に神経障害性疼痛の病態の解明に関する研究が行われており、病態の複雑性が明らかになってきた。一方でその複雑さが有効性の高い薬物の開発に大きな障害となっている。侵害受容ニューロンの損傷によって生体内で侵害受容伝達を調節している興奮性および抑制性の複数の神経系に多様な可塑性が惹起されるため、一度病態が進行し完成してしまうと治療することが困難となる。従って、どのようにして神経障害性疼痛の病態の進行を抑制するかが薬物治療において重要であると考えられる。神経損傷後に産生されるフリーラジカルが神経障害性疼痛の初期の病態に関与していることが最近明らかになっている。フリーラジカルは損傷したニューロンに脱髄を起し、エファプスと呼ばれる短絡路が侵害受容性神経線維と交感神経線維や触刺激を伝える A 神経線維の間に形成されると局所の血流低下による疼痛閾値の低下や異常感覚を引き起こす。脱髄は脊髄後根神経節や後角でも認められるようになりアポトーシスも引き起こす。損傷初期に起こる脱髄をフリーラジカル消去薬が抑制することにより、神経障害性疼痛への進行を防ぐ可能性がある。

2. 研究の目的

エダラボン(edaravone)は脳神経保護作用があり、脳梗塞の治療薬として承認されている薬物で脳梗塞急性期に伴う神経症状・日常生活動作障害・機能障害を改善させることが知られている。エダラボンに加えて、フリーラジカル消去剤としてよく知られている5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide(DMPO)とphenyl N-tert-butyl nitrone(PBN)、強力な抗酸化作用をもつvitamin Cとvitamin Eについてラットを使った行動薬理学的手法でフリーラジカル消去薬に神経障害性疼痛に対する抗侵害作用があるか調べる。更に、神経損傷直後にこれらの薬物を全身投与することにより痛覚過敏の発現を抑制できるかについてvitamin Cとvitamin Eの投与量を変えて検討した。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデルの作製: 坐骨神経絞扼モデル(CCI)

Bennett and Xie の方法により、雄Sprague-Dawley(SD)ラットをペントバルビタール麻酔下に大腿骨上の皮膚を切開し片側の坐骨神経を4.0-silk糸で4箇所緩く結紮する。処置後4日目から患肢に痛覚過敏、アロディニアが発現し持続する。麻酔下に坐

骨神経を剥離・露出のみを行う sham operation を施し、坐骨神経損傷の影響を確認した。Ugo Basile 社製 圧刺激疼痛閾値測定装置を用いて痛覚過敏が認められたラットを用いて実験を行った。

(2) クモ膜下カテーテルおよび脳室カニューレ留置

薬物を髄腔内に投与するため、麻酔下に脳定位固定装置を用いてSDラットの大槽から尾側に向かってポリエチレンカテーテル(PE-10)を8.5cm挿入した。また、脳室内投与するため、ラット右側脳室に22Gのステンレス製のガイドカニューレを頭頂骨より4.0mm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、各種薬物または生理食塩水(対照群)10 μ Lをマイクロシリンジで緩徐に注入した。

(3) 熱・冷刺激および機械刺激過敏性に対する実験

5種類のフリーラジカル消去薬 edaravone、DMPO、PBN、vitamin C および vitamin E を腹腔内・脳室内・髄腔内に投与し、抗痛覚過敏作用を以下のテストにより評価した。

Plantar test (熱性痛覚過敏に対する用): Ugo Basile 社製を用いる。神経障害性疼痛に伴う熱刺激に対する痛覚過敏を評価するための検査で、患肢足底に放射熱を当て逃避反応(患肢を引き上げる)が起こるまでの潜時(秒)を測定した。結果は%MPEで表した。 $\%MPE = (\text{薬物投与群の潜時} - \text{溶媒投与群の潜時}) / (20 - \text{溶媒投与群の潜時}) \times 100$ 。

Cold plate test (熱性痛覚過敏に対する作用): Ugo Basile 社製 Hot/Cold plate を用いる。神経障害性疼痛により発現頻度が高く特徴的な冷刺激に対する痛覚過敏を評価する。4の冷板にラットを乗せ逃避反応(後肢を舐める・引き上げる・振り回す)が起こるまでの潜時(秒)を測定した。結果は%MPEで表した。 $\%MPE = (\text{薬物投与群の潜時} - \text{溶媒投与群の潜時}) / (180 - \text{溶媒投与群の潜時}) \times 100$ 。

Electronic von Frey test (機械的痛覚過敏に対する作用): Stoelting 社製 Touch-Test Sensory Evaluator Kit を用いる。患肢足底に上向きの力がかかるように filaments を押し当て、逃避反応(患肢を引き上げる)が起こる閾値(g)を測定した。

(4) 神経障害性疼痛発現の予防効果に関する実験

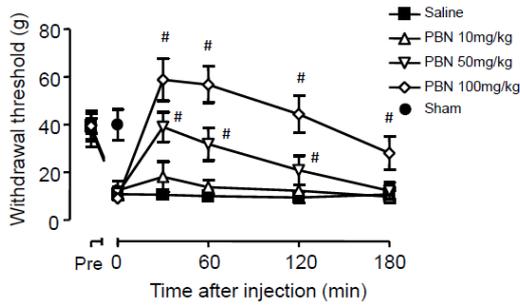
CCIラットに対して坐骨神経結紮後にvitamin C および vitamin E を50mg及び100mg腹腔内投与し、神経損傷時にフリーラジカル消去薬を単回投与することにより神経障害性疼痛の発現が抑制されるか検討した。評価には electronic von Frey test (機械的痛覚過敏に対する作用)を用いた。

4. 研究成果

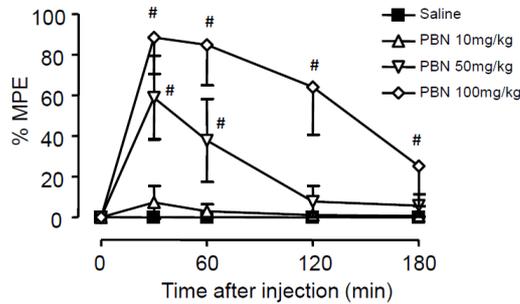
(1) 神経障害性疼痛に対するフリーラジカル消去薬の腹腔内投与の作用について

PBN(10, 50, 100mg/kg)、DMPO(50, 100mg/kg)と vitamin E (1, 5g/kg)は用量依存性に機械的痛覚過敏(Electronic von Frey test)と冷的痛覚過敏(Cold plate test)を抑制した。一方、どの薬物も熱的痛覚過敏(Plantar test)を抑制しなかった。

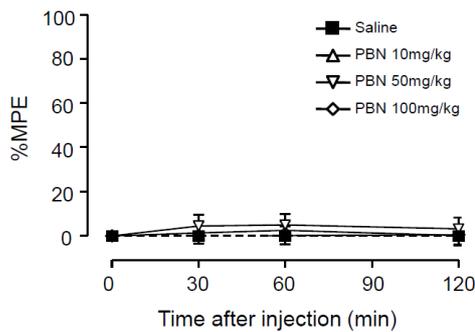
・ Electronic von Frey test



・ Cold plate test



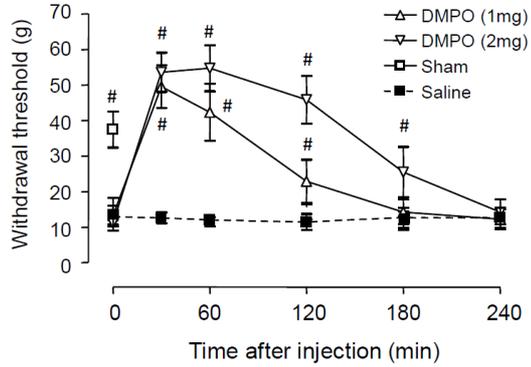
・ Plantar test



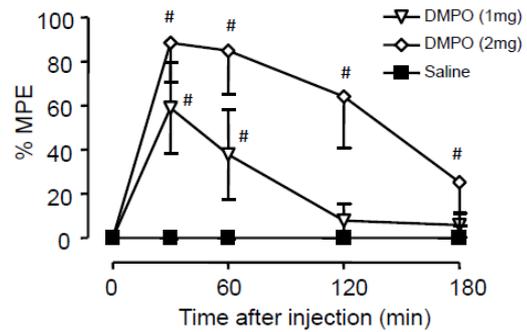
(2) 神経障害性疼痛に対するフリーラジカル消去薬の髄腔内投与の作用について

PBN(1, 2mg)、DMPO(1, 2mg)、 vitamin E (1, 2mg)は全て用量依存性に機械的痛覚過敏(Electronic von Frey test)と冷的痛覚過敏(Cold plate test)を抑制した。一方、腹腔内投与と同様にどの薬物も熱的痛覚過敏(Plantar test)を抑制しなかった。

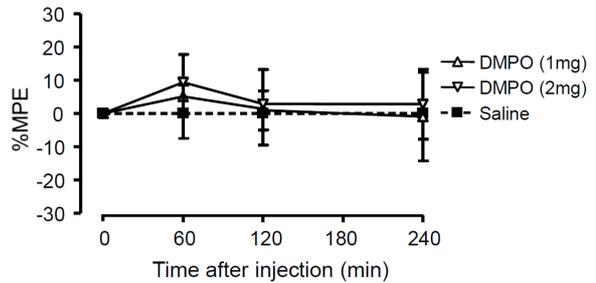
・ Electronic von Frey test



・ Cold plate test



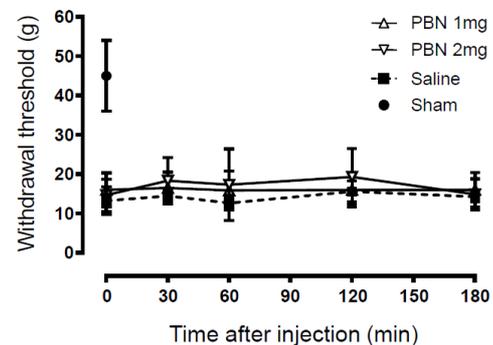
・ Plantar test



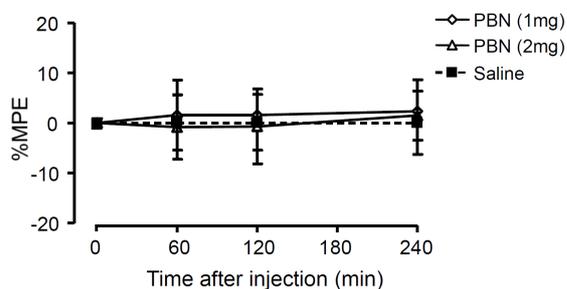
(3) 神経障害性疼痛に対するフリーラジカル消去薬の脳室内投与の作用について

PBN(1, 2mg)、DMPO(1, 2mg)と vitamin E (1, 2mg)は全て機械的痛覚過敏、冷的痛覚過敏、熱的痛覚過敏のいずれも抑制しなかった。

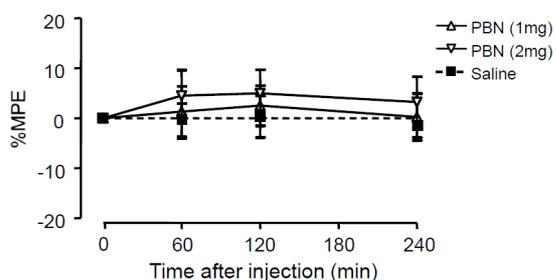
・ Electronic von Frey test



・ Cold plate test

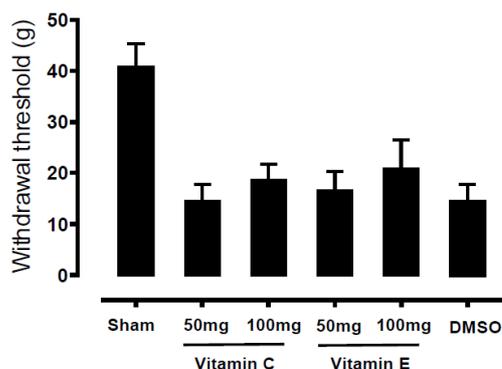


・ Plantar test



(4) 神経障害性疼痛に対するフリーラジカル消去薬の腹腔内投与の予防効果について
坐骨神経結紮後、速やかに vitamin C および vitamin E (50mg、100mg) を腹腔内投与した。1 週間後に機械的痛覚過敏の発現を electronic von Frey test で評価したところ、どちらの薬物も同量(0.5ml)の DMSO(対照群)と逃避反応の閾値(g)に差を認めなかった。

・ Electronic von Frey test



以上の結果から、ラット神経障害性疼痛モデルにおいてフリーラジカル消去薬を全身投与すると機械的痛覚過敏と冷的痛覚過敏を抑制したがその作用部位は主に脊髄であることが示唆された。一方脳はフリーラジカル消去薬の抗痛覚過敏作用にあまり関与していないと考えられた。また抗酸化作用を持つ vitamin C と vitamin E を神経障害直後に全身性に単回投与しても一週間後の機械的痛覚過敏の発現を抑制しなかった。今後投与量、投与経路、投与間隔についての検討が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- Hara K, Haranishi Y, Terada T, Takahashi Y, Nakamura M, Sata T. Effects of intrathecal and intracerebroventricular administration of luteolin in a rat neuropathic pain model. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;125:78-84. 査読有
doi: 10.1016/j.pbb.2014.08.011
- Hara K, Haranishi Y, Kataoka K, Takahashi Y, Terada T, Nakamura M, Sata T. Chlorogenic acid administered intrathecally alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Eur J Pharmacol* 2014;723:459-64. 査読有
doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.046.

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・非常勤医師
研究者番号： 30461578