

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462452

研究課題名(和文)CRPS動物モデルにおける各種薬剤の末梢浮腫抑制効果

研究課題名(英文)Effect of decreasing swelling by CRPS drug in animal model

研究代表者

中村 俊康(Nakamura, Toshiyasu)

国際医療福祉大学・臨床医学研究センター・教授

研究者番号：70265859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疼痛動物モデルでの末梢浮腫の形成を拡散強調MR spectroscopyを用いてADC値とT2値を計測し、CRPS治療薬での浮腫改善を検討した。ノイロトロピンではallodyniaの改善を認めたが、浮腫改善効果は軽度であった。プレガバリン、リドカイン投与ではallodynia、浮腫いずれの改善も得られなかった。また、追加実験で行ったrealtime PCRの検討ではVEGF発現が低下したことから、還流障害が生じた結果、浮腫性変化が生じた可能性が考えられ、CRPSにおいては血管新生促進による浮腫改善効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed effect of Neurotropin, pregabalin and lidocaine in decrease of ADC and T2s of target organ in diffusion MR spectroscopy in chronic pain animal model (Chang model) to examine decrease of swelling. Changes of allodynia of lower extremity was also examined in the same animals. Allodynia increased 1 day after ligation of the L4 nerve root. Neurotropin decreased allodynia well while pregabalin and lidocaine had not changed allodynia. ADC and T2s had not changed with drugs application. Real-time PCR indicated no changes on TGF- α while decreased in VEGF that can suggest vascular disorder in lower extremity in chronic pain syndrome. Vascular conduction may be effective in edema of CRPS patients.

研究分野：整形外科

キーワード：慢性疼痛 末梢浮腫 拡散強調現象 磁気共鳴現象 慢性疼痛治療薬 異痛 神経損傷

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。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。

これまでに研究代表者および研究分担者は末梢神経切離および再縫合により脱神経筋および再神経支配筋モデルを作製、経時的にMRIで観察し、T2強調像での高輝度信号が脱神経の把握に有用なこと、再神経支配によって輝度の正常化がみられ、電気生理学的検査に約1週遅れることを明らかにした (Kikuchi Y, Nakamura T, Radiology, 2003)。この高輝度所見は筋内の浮腫、つまり細胞外水分量の増加に由来する。さらに、神経損傷の程度が軽い場合にはT2強調像での信号亢進が軽度で、神経損傷の重症化に伴いより高値のT2値がより長期間持続することがわかった (Yamabe E, Nakamura T, Oshio K, Radiology, 2008)。MR画像での末梢神経損傷診断の問題点である早期診断能力に関しても、超早期の細胞内外の水の移動に鋭敏な拡散強調MR画像で検討し、末梢神経損傷後1日の時点で拡散係数 (Apparent Diffusion Coefficient: ADC) の有意な亢進を認めた (Yamabe E, Nakamura T, JMRI, 2007)。つまり、浮腫が発症するとADC値の亢進が最初に生じ、その後T2値の上昇がおき、神経麻痺の改善とともにT2値が回復する。

さらに研究代表者はこの拡散強調MR画像を慢性疼痛動物モデル (Changモデル) に応用し、ADC値の亢進がモデル作成後1日で生じること、T2値の上昇は5日目に生じ、Allodyniaと浮腫に伴うT2値の高値は観察期間中継続することを突き止めた。

また、局所の浮腫を引き起こすメカニズムに関しても未だ不明なことが多い。損傷神経や全身でのサイトカイン変化に関する報告はあるが、今回MRIで浮腫性変化を計測した筋肉内のサイトカイン変化についての報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、CRPSに類似したラット神経因性疼痛モデルを用いて、CRPSの治療薬であるノイロトロピン、プレガバリン、リドカインなどの薬剤が慢性疼痛動物モデルの浮腫形成抑制にどのよう

な効果があるかを、拡散強調MRIの早期の水移動を表すみかけの拡散係数 (ADC値) と自由水分子値 (T2値) を計測することにより検討した。さらにラット神経因性疼痛モデルの筋肉内浮腫に、炎症や血管透過性の変化が関与するという仮定のもと、代表的炎症性サイトカインであるTNF- α や強力な血管透過性亢進作用のあるVEGFの発現量をreal-time PCRを用いて計測を行い、浮腫性変化のメカニズムを検討した。

3. 研究の方法

(1) CRPS類似の慢性疼痛動物モデルの作製と慢性疼痛状態の確認

(a) 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 (ネプタール) 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モデルを作成した。(b) 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 Planter Aesthesiometer (室町機械製) を用いて評価した (図1)。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。

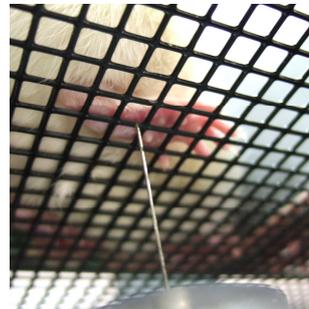


図1 Dynamic Planter Aesthesiometer による Allodynia の検査の様子

(2) 拡散強調MR spectroscopy解析

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値およびみかけの拡散係数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/mm²から2000sec/mm²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。

(3) CRPS類似ラット神経因性疼痛モデルへの疼痛治療薬投与での検討

(a) 体重180~200gの雌Wistar系ラット5匹を使用し、(1)同様にChungモデルを作成。処置後連日経静脈的にノイロトロピン (日本臓器) を100NU/kg投与し、1、3、5日目に評価を行った。(b) また、別の体重180~200gの雌Wistar系ラット5匹にガバペンチン (ファイザー) は生理食塩水に溶解後に20mg/Kgを3日間連日経口投与した。(c) 別の雌Wistar系ラット5匹にはモデル作成当

日に0.5%リドカイン0.5mlを局所注射投与した。
Dynamic Plantar Aesthesiometer(室町機械)を用いてアロディニアの変化を評価後に、1.5T MRI装置でみかけのADC値、T2値の変化を評価した。

(4) realtime PCRによるサイトカイン発現量検討
慢性疼痛動物モデルChungモデルを体重180~200gの雌Wistar系ラット6匹ずつ作成し、処置後1、3、7日目に両側腓腹筋を採取した。腓腹筋からTRI Reagent (Molecular Research Center社製)を用いてmRNAを抽出し、reverse transcriptase (Clontech社製)を用いてcDNAに逆転写した。さらにrealtime PCRをSYBR Premix ExTag (Takara Bio社製)を用いてDICE thermal cycler (Takara Bio社製)で施行し、TNF- α 、VEGFの発現をb-actinをコントロールとして計測した。

統計学的処理は、unpaired t-testおよびone-way analysis of variance with the Scheffe post hoc testにより行った。統計ソフトはSPSS ソフトパッケージ(IBM製)を用いた。

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2)

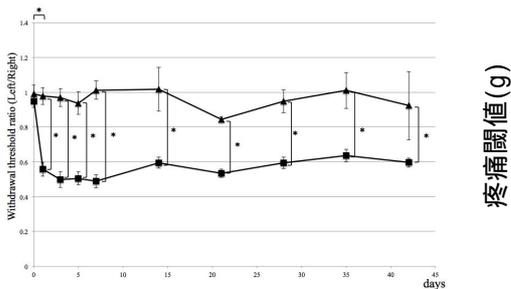


図2 疼痛閾値の経時変化

(2) 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)

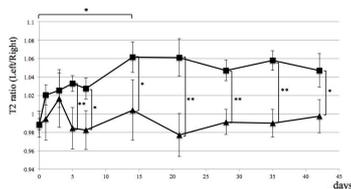


図3 T2値の経時変化

(3) 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より、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)

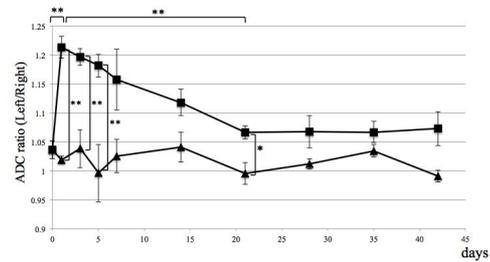


図4 ADC値の経時変化

(4) 疼痛治療薬投与の検討

処置後1、3、5日目のノイロトピン投与により、疼痛閾値の上昇傾向は認めるものの、control群と比較すると疼痛閾値は低かった(図5)。ガバペンチン、リドカイン投与群では疼痛閾値の値はコントロールと同値であり、改善を認めなかった。一方、ADC値、T2値の計測では、一定の傾向を捉えることはできなかった(図6,7)。投与開始後5日目までの短期間では、疼痛治療薬によるallodynia(異痛)改善効果は生じたが、浮腫性変化の抑制自体は生じていないと考えられた。

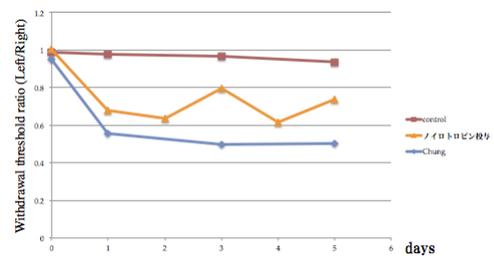


図5 ノイロトピン投与時の疼痛閾値の変化

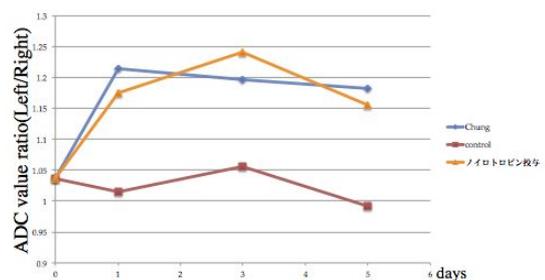


図6 ノイロトピン投与時のADC値変化

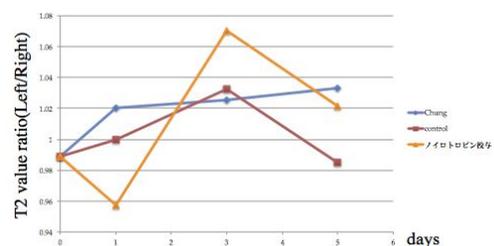


図7 ノイロトピン投与時のT2値変化

(5) real-time PCR計測の結果

TNF- α 発現量は、1、3、7日目いずれにおいても、処置側と非処置側の有意差は認めなかった(図8)。初期の筋肉内浮腫変化には局所の炎症性変化は関与していない可能性が示唆された。VEGF発現量は、1、3、7日目いずれにおいても、処置側で有意に低下を認めた(図9)。VEGF低下と浮腫との関係は、VEGF低下によりvascular homeostasisの維持の障害が生じ、還流障害が生じた結果、浮腫性変化が生じた可能性が考えられた。

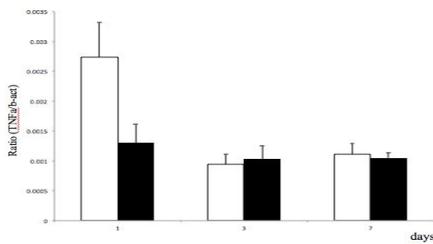


図8 TNF- α 発現量

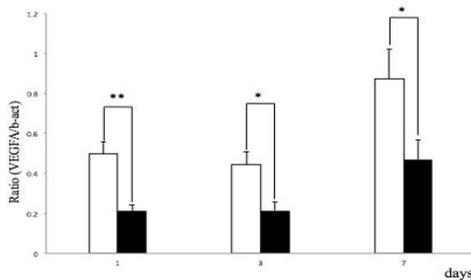


図9 VEGF発現量

研究成果のまとめ

慢性疼痛動物モデルChangモデルを作成し、末梢浮腫の形成を拡散強調MR spectroscopyを用いてADC値とT2値を計測した。慢性動物モデルではモデル作成翌日よりallodyniaの出現、ADC値およびT2値の亢進を認めた。CRPS治療薬であるノイロトロピンの経静脈投与ではallodyniaの改善を認めたが、ADC値、T2値の改善を認めず、浮腫改善効果は明らかではなかった。プレガバリン、リドカイン投与ではallodynia、ADC値、T2値いずれの改善も得られなかった。Real-time PCRでの検討では局所の炎症を表すTNF- α 発現量は変化しなかったが、局所の循環状態を表すVEGF発現量は、1、3、7日目いずれにおいても、処置側で有意に低下した。このことから、CRPSの場合、VEGF低下が生じ、vascular homeostasisの維持の障害が生じ、還流障害が生じた結果、局所の浮腫性変化が生じた可能性が考えられた。

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5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

2. 阿部耕治、中村俊康、山部英行、松村昇、岩本卓士、佐藤和毅、池上博泰、戸山芳昭、CRPS早期診断における拡散強調MRIの有用性に関する実験的研究、第27回日本整形外科学会基礎学術集会、2012

3. Abe K、Nakamura T、Yamabe E、Toyama Y. Line Scan Diffusion Spectrum of the Rat Skeletal Muscle of Neuropathic model, 2012 Annual meeting of American Society for Surgery of the Hand

4. Abe K、Nakamura T、Yamabe E、Matsumoto M、Nakamura M. Line Scan Diffusion MR Spectroscopy of the Rat Skeletal Muscle of Neuropathic model, Annual meeting of American Association of Hand Surgery, 2014

5. Abe K、Nakamura T、Yamabe E、Matsumoto M、Nakamura M. Line Scan Diffusion Spectrum of the Rat Skeletal Muscle of Neuropathic model, 6th Combined Meeting of ASSH & JSSH, 2015

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 俊康 (NAKAMURA, Toshiyasu)

国際医療福祉大学・臨床医学研究センター・教授

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)研究協力者

山部 英行 (YAMABE, Eiko)

阿部 耕治 (ABE, Koji)