

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462245

研究課題名(和文) 脊髄functional MRIを用いた疼痛の定量評価法の確立

研究課題名(英文) Quantitative measurement of pain using functional magnetic resonance imaging

研究代表者

小田 良(Oda, Ryo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80516469

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)：われわれは末梢神経損傷後のラット脳神経活動の経過をfunctional MRIで評価した。Functional MRIでは坐骨神経圧挫損傷1週後に有意差を認めた部位の範囲は、3、6週後にかけて縮小した。一方で、9週後には新たに扁桃と海馬で有意な血流の増加が見られるようになった。また、c-Fosによる免疫組織科学的染色では、functional MRIで血流量の増加を示した部位で、c-Fosが活性化している結果を得ることができた。本研究により、末梢神経損傷後の脳神経活動の変化をfunctional MRIにより捉えることができた。この結果は、組織学的評価と矛盾しなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the course of rat brain nerve activation after the peripheral nerve injury by functional MRI. The results of functional MRI showed the activated regions were contracted 3 and 6 weeks after the injury. In contrast, a significant increase in blood flow was seen 9 weeks after the injury. In addition, the brain regions in which the blood flow increased were stained in immunohistochemical staining with c-Fos. The present study could detect the sequential change of the rat brain after peripheral nerve injury. The result was consistent with c-Fos staining.

研究分野：整形外科学

キーワード：functional MRI 磁気共鳴画像(MRI) 末梢神経障害 慢性疼痛

### 1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷は、外傷や薬剤、変性を契機として、疼痛やしびれ感、感覚障害などのさまざまな不快な症状の原因になり得る。現在もなお、多くの人々がこれらの症状に悩まされており、末梢神経損傷に関わる診療において大きな問題となっている。しかし、この症状を定量的に評価することは困難である。疼痛の評価として VAS (Visual Analogue Scale) や NRS (Numerical Rating Scale) が用いられているものの、あくまで主観的なものであり、個人差が結果に大きく影響を及ぼす。しびれ感や感覚障害に関しては、定量的に表すことは不可能である。

末梢神経損傷やそれにより引き起こされる症状に対しての治療方法の開発が待たれる状況であるが、そのためにはこれらの症状の評価を客観的に行う方法の模索が必要である。

MRI (Magnetic Resonance Imaging) が、単純 X 線像や CT 画像では評価できない脳の質的診断手法として研究、また臨床の場で使用されるようになって久しい。とくに近年、脳の血流量の変化を検出する functional MRI (fMRI) について研究が進んでいる。この fMRI は、生体に対して刺激 (fMRI task) を加える前後に MR 画像を撮像し、その信号強度の差を数値化し、マッピングする画像法である。活動の活発な部位は、fMRI task を与えた後にその他の部位と比較して血流量が多いため、信号量により大きい差が生じることになる。刺激を加えた際に脳の血流量が増加した部分を活性化された部位と捉えることで、刺激に対する脳の活動部位を検出することが行われている。

### 2. 研究の目的

末梢神経損傷を取り巻く上記のような状況を打破すべく、末梢神経損傷後に残存する痛覚過敏や慢性神経障害性疼痛に関与する脳活動部位を fMRI により同定し、組織学的評価との関連性を確認することを研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

全身麻酔下に雌性の Sprague Dawley ラットの右坐骨神経に脳血管用クリップを用いて圧挫損傷を加えることで末梢神経損傷モデルとした。このラットの fMRI を経時的に撮像した。また組織学的に検討するために sham 手術として、坐骨神経を露出するのみで損傷を加えない処置を行った。MR 画像は動物用の 7.04 T の横置き型 MRI 装置と 30x40mm 径のサーフェイスコイルを用いて撮像した。呼吸数をモニターしながら、イソフルランによる全身麻酔下に、アクリル製の頭蓋固定装置を用いてラットの頭部を固定した。ラットを腹臥位にしてクレードル

に設置し、体幹と頭蓋固定装置をクレードルに固定した。本研究では、fMRI task として右足底部に刺入した刺激電極の通電を選択した。尾静脈から経静脈的に超常磁性造影剤を投与した後、足底部の刺激前後にグラディエントエコー法による  $T_2^*$  強調像を撮像し、そのデータを解析ソフトで GLM 解析を行った。電気刺激を加えた状態での 40 秒間の撮像と、電気刺激を加えない状態での 40 秒間の撮像を交互に 3 度繰り返して行い、fMRI 画像を得た。それぞれの 40 秒間で、3 分おきに 10 回の撮像を行い、うち最初の 1 回は spoil した刺激の有無による信号強度の相違を T 値で定量的に評価した。この値でカラーマップを作成した。このカラーマップは、それぞれの脳部位における血流の変化を示していると考えた。MR 画像の撮像は、圧挫損傷を行った 1, 3, 6, 9 週間に行った。また、坐骨神経損傷後 3, 6, 9 週に右足底に電気刺激を行ったラットの脳を摘出して組織学的検討を行った。摘出した脳は凍結切片として、c-FOS を用いて免疫組織染色を行い、脳神経の活動状態を評価した。ラットの足底への電気刺激の後、home cage に返して 90 分間待機した。待機時間は、initial event の後 c-FOS の生産が peak となる 90 分後とした。90 分の待機時間後、10%ホルムアルデヒドで灌流固定を行い、脳を摘出した。摘出した脳を -20 に設定したクライオスタットで 40  $\mu$ m の冠状断とした。ウサギの c-Fos 抗体とストレプトアビジンを使用して c-Fos の染色を行った。c-Fos の活性化については、顕微鏡とデジタルカメラを用いて 40 倍と 400 倍で、坐骨神経圧挫を行った個体と sham 手術を行った個体について、比較と写真の撮影を行った。

### 4. 研究成果

本研究において fMRI の結果としては、坐骨神経圧挫損傷 1 週後に扁桃や大脳基底核、前帯状回で有意差を認めた。その後、3, 6 週間にかけて、血流量変化に有意差のある脳神経部位の範囲は縮小した。しかし、9 週間には扁桃と海馬で有意差が新たに見られるようになった。免疫組織科学的染色による評価では、これらの部位で、刺激後に c-Fos が活性化している結果を得ることができた。本研究により、末梢神経損傷後の脳神経活動の変化を fMRI により捉えることができた。この結果は、c-FOS 染色による組織学的評価と矛盾しなかった。

末梢神経の可逆性損傷後の疼痛に対する治療法を考える際に、関連する脳の部位を同定することは必要である。とくに動物を対象とする研究では、末梢神経損傷後の運動機能を評価することはできるが、感覚を直接的に評価することは困難である。疼痛に関連する脳の部位の興奮を捉える手段として本研究では fMRI を利用した。fMRI を用いて末梢神経損傷後の急性期および慢性期に

おける脳の刺激に対する反応を評価し、その経時的な変化を解析した。また fMRI の所見を c-FOS の免疫組織学的所見と比較した。本研究では fMRI の結果、末梢神経損傷後には前帯状回、島皮質、扁桃、大脳基底核など痛覚伝導路とは直接関連しない部位での神経活動を坐骨神経損傷後1週で認めた。扁桃や前頭前皮質、島皮質は情動系や認知機能に関与すると同時に、疼痛伝達経路以外の経路で疼痛に関係するとされている。いずれの部位も神経障害性疼痛により活動が惹起されたと考えられる。坐骨神経損傷後3週では有意な信号変化を来す範囲は縮小し、6週後では有意な信号変化は見られなくなった。しかし扁桃と海馬では神経損傷後9週に神経活動が活発化していた。

同時期に摘出した脳の組織学的評価において、statistic t-value map で有意な信号強度変化が示されている部位と同じ部位に c-FOS の expression を認めていることから、fMRI の信号変化は神経細胞の活性化と密接に関連すると考えた。

坐骨神経損傷後3週から6週にかけて fMRI での信号変化を来す部位が縮小したことは、坐骨神経損傷後6週までは疼痛が軽快していたことを示す。これまで行われてきたラットを用いた研究において、われわれと同様に脳血管用のクリップを用いた坐骨神経叢座損傷モデルでは、坐骨神経損傷後6-8週までには運動、知覚はほぼ回復していることが知られている。坐骨神経が回復したと考えられる神経損傷後9週の時期に、足底電気刺激に対して扁桃と海馬で神経活動があったこととなる。よって損傷後9週にみられる扁桃と海馬での神経活動は、末梢神経再生後に残存する hyperalgesia やアロディニアに大きく関与していることを示唆する。これを fMRI と c-FOS 染色で共に検出できた。扁桃や海馬は hyperalgesia やアロディニアと関連性があることは示されており、この結果を支持するものである。

また、本研究では超常磁性造影剤を使用して fMRI を撮像した。超常磁性造影剤は、細胞にラベリングすることで MRI により動態を追跡するのに使用されている。超常磁性造影剤は  $T_2$  緩和時間の短縮効果を有しているため、 $T_2$  強調画像において造影剤として MoDay ION を投与することで、陰性の造影効果を有した。この造影効果により fMRI を撮像することで、従来選択される  $T_2^*$  強調画像よりも BOLD の効果を強調することが可能であった。さらに fMRI の撮像には echo-planar imaging などの高速撮像法がよく用いられるが、本造影剤を使用することで、グラディエントエコー法を選択することができた。より質の良い画像を得た上で、脳血流量の変化を評価することが出来たと考えられる。またこの造影剤は数時間の半減期を有しており、MRI の造影効果を測るのに十分であった。撮像には最短でも2週間の期間において同一

個体で撮影を行っている。半減期を考慮すると造影効果が次回撮影に影響を及ぼしていないと考える。

本研究結果から、末梢神経損傷後の神経治癒過程において、疼痛刺激に対して情動などに関与する大脳辺縁系と島皮質の活動が活発化していることを MR 画像で捉え、c-FOS を用いた免疫組織学的検査でも確認した。更に末梢神経再生が完了していると考えられる神経損傷後9週において、疼痛刺激に対して fMRI 上で海馬と扁桃の活動が activate されており、さらに組織学的にも扁桃と海馬における神経活動が活発化していることを示した。これは、末梢神経損傷後に残存する痛覚異常に扁桃と海馬が関与していることを強く示唆するものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Onishi O, Ikoma K, Oda R, Yamazaki T, Fujiwara H, Yamada S, Tanaka M, Kubo T. Sequential variation in brain functional magnetic resonance imaging after peripheral nerve injury: A rat study. *Neurosci Lett*. 2018 Apr 23; 673: 150-156.

〔学会発表〕(計2件)

山崎 哲朗, 生駒 和也, 小田 良, 藤原 浩芳, 金谷 文則, 久保 俊一  
functional MRI を用いた末梢神経損傷後の中枢神経における活動部位の検討  
第29回日本整形外科学会基礎学術集会、2014年10月9-10日、鹿児島市

山崎 哲朗, 藤原 浩芳, 小田 良, 生駒 和也, 土田 真嗣, 久保 俊一  
拡散テンソル法を用いた in vivo 末梢神経再生の評価  
第35回日本運動器移植・再生医学研究会、2016年9月24日、広島市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

出願状況 なし

取得状況 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田 良 (ODA, Ryo)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教  
研究者番号: 80516469

### (2) 研究分担者

生駒 和也 (IKOMA, Kazuya)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号： 50516044

研究分担者

藤原 浩芳 (FUJIWARA, Hiroyoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究  
院)・講師

研究者番号： 90381962