

慢性疼痛発症モデルラットにおける Activity-induced Manganese-enhanced MRI を用いた脳賦活の検出

河合 裕子*

明治国際医療大学大学院鍼灸臨床医学

要 旨 【背景・目的】難治性の慢性疼痛の中でも、特に神経因性に発症する痛みに対しては有効な治療方法が確立されていない。近年、神経因性疼痛は脊髄レベルの研究が進展する一方で、脳内における痛み認知にも目が向けられ始めている。今回、脊髄神経結紮 (segmental spinal nerve ligation; SNL) モデルを用い、触刺激による痛み誘発時の脳賦活を、神経賦活磁気共鳴画像法 (activity-induced manganese-enhanced MRI; AIM MRI) にて検出することを目的とした。

【対象・方法】雄性 Sprague-Dawley ラット (n = 14) を SNL 群 (n = 9) と sham 群 (n = 5) に分けた。SNL 群は第 5, 第 6 脊髄神経を結紮し、慢性疼痛モデルを作成した。モデル作成後 1 ~ 2 週間後に AIM MRI を実施し、脳賦活画像を取得した。

【結果・考察】触刺激による痛みの誘発によって、第 2 次体性感覚野および大脳基底核とその周囲に有意な信号上昇が観察された。AIM MRI によって、慢性疼痛発症時の脳賦活を検出できた。

Key words 慢性疼痛 chronic pain, 神経因性疼痛 neuropathic pain, アロディニア allodynia, 脊髄神経結紮モデル SNL model, 神経賦活磁気共鳴画像法 AIM MRI

Received November 18, 2008; Accepted January 6, 2009

1. はじめに

痛みは人体における重要な警告信号であり、危険回避や異常状態の認知において欠かすことのできない体性感覚である。組織の傷害による侵害受容器の興奮と共に生じる痛みである急性痛に対し、様々な要因によって痛みが持続する状態は慢性痛に分類される。長期にわたって持続する痛みは QOL (Quality Of Life) を著しく低下させ、痛み自体が病的な状態を生じさせることから、慢性疼痛は社会問題となっている。痛みの制御は医療における大きな課題の一つであり、長年にわたって様々な研究が行われてきた。近年、分子生物学的手法の発達により、難治性疼痛の発症に伴うさまざまなメカニズムが報告され

始めている¹⁻⁵⁾。疼痛発症の根底にある分子プロセスが徐々に明らかになり始めているものの、詳細なメカニズムの解明には至っておらず、現在のところ有効な治療法は見いだされていない。慢性疼痛は痛み自体に加えて、身体的・心理的要素が複雑に絡み合うことで病態が複雑化している。末梢神経から脊髄や脳に至る神経回路で、通常痛み感覚と異なる情報処理過程が形成されていることが予想され、また、痛み感覚の一部は脳内の情報伝達の過程で作られている可能性もある。これらの経路・システムの視覚的評価法の確立は、痛みの客観的評価の一つとして重要な手段となり得る。より理想的な除痛を実現する為には、新たな鎮痛メカニズムやレセプターの研究、薬剤の開発が必要である。開発された薬剤や治療方法の臨床応用に際しては、画像による評価も重要な情報の一つになることから、イメージング分野もこれらの一端を担っていく必要がある。

慢性かつ難治性に推移する痛みの一つに神経因性

*連絡先: 〒 629-0392 京都府南丹市日吉町
明治国際医療大学大学院鍼灸臨床医学
TEL: 0771-72-1181, FAX: 0771-72-0234
E-mail: kawai@meiji-u.ac.jp

疼痛がある。神経因性疼痛は神経自体の傷害に起因する痛みであり、自発痛、痛覚過敏反応、アロディニアなどの症状を引き起こす⁶⁾。臨床的には帯状疱疹後神経痛や軽微な外傷に起因する難治性疼痛などでよく知られており、非ステロイド性抗炎症薬が無効で麻薬性鎮痛薬に抵抗性を示すという特徴がある。神経因性疼痛の発症機序解明のために多くの動物モデルが開発され、基礎研究が進められている。完全神経損傷としては axotomy モデル⁷⁾ が知られ、主に幻肢痛を反映しているとされる。部分的神経損傷では、CCI モデル (chronic constriction injury model; 絞扼性神経損傷モデル)⁸⁾、PSN モデル (partial sciatic nerve injury model; 坐骨神経部分損傷モデル)⁹⁾、SNL モデル (segmental spinal nerve ligation model; 脊髄神経結紮モデル)¹⁰⁾、SNI モデル (spared nerve injury model)¹¹⁾、Mosconi and Kruger モデル¹²⁾ が知られており、その他レーザー照射による脊髄虚血モデル¹³⁾ や坐骨神経の軽度炎症によるアロディニアモデル¹⁴⁾ が提案されている。これら神経因性疼痛の動物モデルでは、実際の臨床症状と同様に、痛覚過敏やアロディニアが見られる。

可視化技術の進歩により、これまで末梢から脊髄が中心であった疼痛に関する研究は、中枢での痛み伝導路イメージングに目が向けられるようになった。現在、痛みの感覚や認識については第1次体性感覚野 (primary somatosensory cortex; S1)、第2次体性感覚野 (secondary somatosensory cortex; S2) が関与し、情動や認知に関しては前帯状回で処理されることが明らかとなっている¹⁵⁾。しかしながら、研究の多くは急性痛を対象としており、慢性疼痛の脳機能イメージングは未だ詳細な検討が行われていない。また、痛みは主観的要素が大きいことに加え、慢性疼痛は痛みの持続期間や発症部位、重傷度の統一が困難であり、このことが中枢神経系とりわけ脳の画像的評価をより難しいものになっている。

脳の活動を可視化する手法としては PET (positron emission tomography)、SPECT (single photon emission computed tomography)、多チャンネルの EEG (electroencephalogram)、MEG (magnetoencephalogram)、MRI (magnetic resonance imaging) などがある。中でも MRI は、非侵襲的なイメージング手法の一つとして広く臨床で用いられている。MRI を用いた脳機能評価として、脳賦活に伴う血流の変化を反映する BOLD (blood oxygenation level dependent) 効果を利用した脳機能画像法 (functional MRI; fMRI)¹⁶⁾ が知られている。この手法は繰り返しの加算が容易であり、ベースラインの信号を無視できるという利点がある一方で、通常の T₁ 強調画像と比

べて空間分解能が期待できず、また信号変化が少ないことから、対象物が小さい動物実験においては明確な結果を得ることが難しい。加えて刺激の ON-OFF が必要なことから、持続的に痛みが生じる可能性のある慢性疼痛においては実験デザインの構築が複雑になる。一方、動物実験特有の手法として、Mn²⁺ を造影剤として投与するマンガン増感磁気共鳴画像法 (manganese-enhanced MRI; MEMRI) が知られている。Mn は MRI における良好な造影剤として知られており、縦緩和時間 (T₁) と横緩和時間 (T₂) の両方を短縮する効果がある^{17,18)}。MEMRI には、Mn を全身性に投与することで脳組織の構造を高分解能で観察できる neuroarchitectural MEMRI¹⁹⁻²¹⁾ や、皮下投与や滴下された Mn が軸索輸送によって運搬される性質を利用して、末梢神経や脳内の神経経路を追跡する Tract Tracing²²⁾、血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) を薬剤にて破綻させた状態で、刺激の施行と同時に Mn を投与し、脳賦活に伴って組織内に流入した Mn の造影効果で賦活領域を観察する神経賦活磁気共鳴画像法 (activity-induced manganese-enhanced MRI; AIM MRI)²³⁻²⁵⁾ などの手法がある。この AIM MRI は脳の神経賦活そのものを画像化する方法として利用されている。Mn²⁺ は同じ 2 価イオンの Ca²⁺ と似た動態を示し、脱分極時に Ca²⁺ とともにカルシウムチャネルを通過して細胞内に取り込まれる²⁶⁻³¹⁾。流入した Mn は組織の緩和時間を短縮させるため、T₁ 強調画像で Mn の取り込まれた領域の信号上昇が観察される。

本実験は、運動神経麻痺を伴わない神経因性疼痛の動物モデルとして知られる SNL モデルを使用し、AIM MRI の実施により痛み誘発時の脳賦活を検出することで、アロディニアの発症による脳賦活領域の変化を可視化することを目的とした。

II. 方法

1. 動物の処置および実験プロトコル

雄性 Sprague-Dawley ラット (n = 14) を無作為に SNL 群 (n = 9, 223 ± 13.7g) と sham 群 (n = 5, 227 ± 18.5g) に分けた。SNL 群は Chang らの方法¹⁰⁾ を参考に、第5、第6脊髄神経を結紮し、慢性疼痛モデルを作成した。sham 群は脊髄神経の結紮以外、SNL 群と同様の処置を行ったものとした。AIM MRI の実験プロトコルを Figure 1 に示す。ラットは、4.0% isoflurane 吸入麻酔薬 (フォーレン, アボットジャパン) に酸素と空気の混合ガスで導入麻酔し、気管挿管の後、手術中は小動物用の人工呼吸器 (SAR-830/AP, CWE 社製, 米国) を用いて 2.5% の

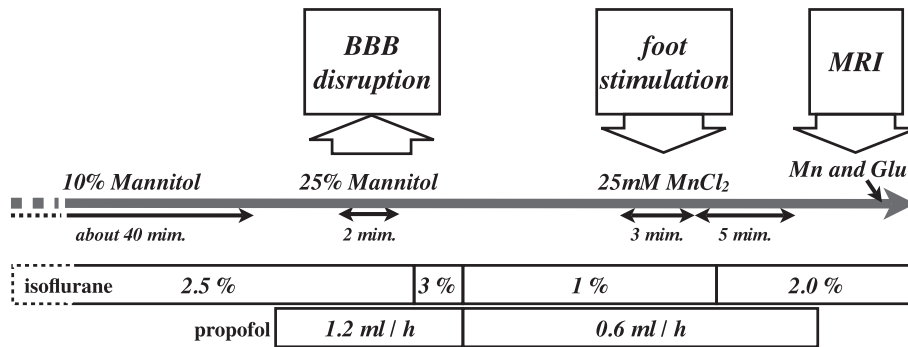


Fig. 1. AIM MRI のプロトコル。

Activity-induced manganese enhanced MRI (AIM MRI) の実験手順を経時的に示す。SNL モデルまたは sham モデルのラットに対し、脳賦活を検出するための AIM MRI を実施した。isoflurane と propofol の混合麻酔下で、25% Mannitol の頸動脈投与によって血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) を破綻させた。その後 25mM MnCl₂ の投与と同時に、右後肢の足底に対する軽度のブラシ擦過刺激を3分間行い、5分間の待機後に MR 撮像を行った。最後にグルタミン酸を混合した MnCl₂ を投与し、T₁ 強調画像にて BBB 破綻の確認を行った。

同麻酔薬で麻酔を維持した。直腸温を常時モニターし (E5GN, omron 社製), 直腸温が $37.5 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ になるよう制御された加温装置 (ゴムマットヒーター SG-15, 昭和精機工業社製) を用いて、体温を維持した。加えて、実験開始前および終了後に血中の pH, 酸素分圧 (pO₂), および二酸化炭素分圧 (pCO₂) を測定し (i-STAT 300F Analyzer, アイ・スタットコーポレーション社製, 米国), これらを生理学的範囲に維持した。

なお、本実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年文部科学省告示第 71 号) を遵守し、明治国際医療大学研究倫理委員会による承認 (平成 20 年 3 月 31 日; 19-8-1 号) を得て実施した。

2. SNL モデルの作成

ラット背部を正中切開し、右第 6 腰椎横突起を露出後にこれを切除し、直下に走行する第 5 腰髄 (L5) 神経を 5-0 シルク縫合糸 (GA05SW, アルフレッサファーマー社製) にて結紮した。続いて第 1 仙椎横突起を露出して一部を切除し、直下の第 6 腰髄 (L6) 神経の結紮を行った。SNL 群および sham 群ともに、手術後 1 週間から 2 週間の期間内で実験に使用し、AIM MRI 実施の前日に von Frey test による痛み閾値の測定を行った。von Frey test は神経因性疼痛の特徴であるアロディニアを評価する方法である。異なる太さの von Frey フィラメント (TOUCH-TEST SENSORY EVALUATOR, North Coast Medical 社製, 米国) を対象足底に対し垂直に押し当て、逃避反応を引き起こす閾値を測定した。手術側である右後肢および反対側の左後肢を対象とし、痛み閾値は「g」で示した。

3. AIM-MRI の方法

仰臥位のラットに対し、左大腿動静脈および左外頸動脈にポリエチレンチューブ (PE-50, Becton Dickinson, MD) を留置した。血液ガス分圧の測定を行った後、脳浮腫予防の目的で 10% mannitol (8ml/kg, D-Mannitol, sigma 社製, 米国) を大腿静脈よりシリンジポンプ (KD Scientific 社製, 米国) にて 2.5ml/h で投与し、大腿動脈より持続的に最高血圧の測定を行った (MP-100, Biopac Systems, Inc., CA)。10% mannitol 投与の終了を確認し、同経路より静脈麻酔である propofol (1% ディプリバン注, アストラゼネカ) の投与 (1.2ml/h) を開始した。propofol 投与開始の 5 分後に、頸動脈より 25% mannitol を投与 (6ml/kg, 108ml/h) することで BBB の可逆的破綻を行った。BBB の破綻後 3 分間は isoflurane を 3% に上げ、血圧の過剰な上昇を抑えた。その後 isoflurane を 1% に、propofol の投与速度を 0.6ml/h に下げ、7 分間維持した。血圧の安定を確認し、左頸動脈より 25mM MnCl₂ (0.6ml, MnCl₂·4H₂O, sigma-aldrich 社製, 米国) をシリンジポンプにて 12.0ml/h の速度で投与した。MnCl₂ の投与と同時に、痛み誘発の目的でブラシによる右後肢足底に対する軽度の擦過刺激 (0.2Hz) を 3 分間行った。ヒトの fMRI 実験において、触刺激はなるべく広範囲を刺激可能な刺激方法が選ばれることに倣い、ブラシによる擦過刺激を選択した。MnCl₂ 投与および刺激終了後 5 分経過した時点で 2 度目の血液ガス分圧の測定を行った。全行程の終了後に MRI にて T₁ 強調画像, T₂ 強調画像を撮像した。撮像中は、isoflurane を 2.0% に維持した。撮像終了後にグルタミン酸 (5%, 0.3ml, L-Glutamic acid, sigma 社製, 米国) を混合した MnCl₂ (12.5mM, 0.3ml) を頸動脈より投与し、T₁ 強調画像を取得すること

によって、BBB 破綻の状態を確認した。

4. MRI 測定

MRI 撮像には 4.7T 水平型実験用 MRI 装置 (Biospec, Bruker 社製, ドイツ) および内径 9cm の傾斜磁場コイル (Resonance Research, Inc 社製, ドイツ) を用い, 送信コイルとして内径 7cm の Volume coil (RAPID biomedical 社製, ドイツ) を, 受信コイルとして Surface coil (RAPID biomedical 社製, ドイツ) を使用した。

MEMRI の撮像には, T_1 強調画像と同様の撮像条件において, マルチスライスのスピン・エコー法により冠状断および水平断の撮像を行った。撮像パラメーターは, 繰り返し時間 (TR) = 400ms, エコー時間 (TE) = 10.5ms, マトリックスサイズ = 256 × 256, field of view (FOV) = 32mm, スライス数 = 15, スライス厚 = 1.0mm, 積算回数 = 6 であった。水平断はスライス数 = 10, スライス厚 = 0.7mm とし, その他のパラメーターは同一のものを使用した。

T_2 強調画像は冠状断とし, TR = 3,500ms, TE = 12ms, rare factor = 8, FOV = 32mm, マトリックスサイズ = 256 × 256, スライス厚 = 1.0mm, スライス数 = 10, 積算回数 = 1 で撮像した。

5. 画像処理および統計解析

画像処理には UNIX コンピュータ上で動作するソフトウェア MRVision (MRVision 社製, 米国) を使用した。関心領域 (Region of Interest; ROI) は, Paxinos らの脳地図³²⁾ を参考に, S1, S2, 帯状皮質 (cingulate cortex; Cg), 運動皮質 (motor cortex; M), 尾状核 - 被殻 (caudate putamen; CPu), 外側淡蒼球外節 (external globus pallidus; EGP), 腹側淡蒼球 (ventral pallidum; VP), 視床下部 (hypothalamus) に設定した (Fig. 2)。信号強度の比較は, 全て対側の対応する ROI に対する信号強度比を算出した。統計解析はコンピュータ (PowerPC G5, Apple 社製, 米国) 上で動作するソフト Prism (GraphPad Software 社製, 米国) を用い, 有意水準を 5% として全てのデータを平均値 ± 標準偏差で表した。

III. 結果

AIM MRI 実施前に行った von Frey test では, SNL 群の神経結紮側 (右後肢) における痛み閾値が 1.73 ± 0.92 g であり, 非結紮側 (左後肢) の 18.8 ± 7.12 g に対して有意な低下を示した。脊髄神経の結紮を行わない sham 群の閾値は 26.0 ± 0.0 g であり, 結紮側と非結紮側に痛み閾値の差は見られなかった。

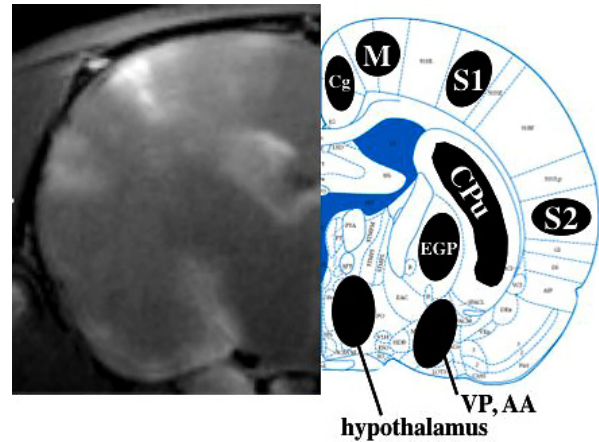


Fig. 2. 関心領域 (region of interest; ROI).

ROI の設定は, S1 (primary somatosensory cortex; 第 1 次体性感覚野), S2 (secondary somatosensory cortex; 第 2 次体性感覚野), Cg (cingulate cortex; 帯状皮質), M (motor cortex; 運動皮質), CPu (caudate putamen; 尾状核 - 被殻), EGP (external globus pallidus; 外側淡蒼球外節), VP (ventral pallidum; 腹側淡蒼球), hypothalamus (視床下部) とした。S1 は後肢相当部位 (primary somatosensory cortex, forelimb region; S1FL) とし, VP は AA (anterior amygdaloid area; 腹側扁桃核) を含む領域に設定した。

Table 1. 痛み閾値測定の結果

	spinal nerve ligation side (g)	contralateral side (no ligation) (g)
SNL group	$1.73 \pm 0.92^{a,b)}$	$18.8 \pm 7.12^c)$
sham group	26.0 ± 0.0	26.0 ± 0.0

von Frey test で得られた結果を示す。統計解析には一元配置分散分析 Bonferroni 法を使用した。a) SNL 群反対側に対する有意差 $p < 0.001$, b) sham 群結紮側に対する有意差 $p < 0.001$, c) sham 群結紮側に対する有意差 $p < 0.05$ 。SNL 群の脊髄神経結紮側である右後肢において, sham 群と比較して有意な痛み閾値の低下が観察された。また, 手術を施していない左後肢において, SNL 群では sham 群に比べて有意な痛み閾値の低下を示したが, sham 群において結紮側と非結紮側に痛み閾値の差は見られなかった。

SNL 群と sham 群の非結紮側の閾値を比較すると, SNL 群に有意な低下が観察された (Table 1)。

AIM MRI 実験前後での血液ガス分圧と直腸温の変化を比較すると, pCO_2 と pH に有意な上昇が確認された。ただし, 値は生理学的範囲内で維持された (Table 2)。

Figure 3 に AIM MRI で得られる画像の典型例を示す。SNL モデルに対するブラシ刺激時の AIM MRI において, 刺激対側に神経賦活を示す高い信号強度変化が観察された。特に S2, CPu, VP および hypothalamus 領域に信号上昇が観察された (Fig.

Table 2. AIM MRI 前後の生理条件

	SNL group		sham group	
	before AIM MRI	after AIM MRI	before AIM MRI	after AIM MRI
Blood pCO ₂ (mmHg)	33.0 ± 2.46 ^{a)}	39.5 ± 3.80	34.9 ± 1.39	39.7 ± 4.07
Blood pO ₂ (mmHg)	107.6 ± 15.1	105.3 ± 17.8	103.9 ± 9.46	102.7 ± 10.8
Blood pH (mmHg)	7.45 ± 0.02 ^{b)}	7.37 ± 0.06	7.45 ± 0.01 ^{c,d)}	7.34 ± 0.03
Rectal temperature (°C)	37.7 ± 0.2	37.2 ± 0.5	37.6 ± 0.5	37.4 ± 0.4

AIM MRI 実験前後の血液ガスと直腸温のデータを示す。血液ガスの統計解析には一元配置分散分析 Bonferroni 法を使用した。a) SNL 群および sham 群の after AIM MRI に対する有意差 $p < 0.01$, b) SNL 群および sham 群の after AIM MRI に対する有意差 $p < 0.001$, c) sham 群の after AIM MRI に対する有意差 $p < 0.01$, d) SNL 群の after AIM MRI に対する有意差 $p < 0.05$ 。実験前後での比較において、pCO₂ と pH に有意な上昇が確認されたが、これらの値は生理学的範囲内に維持された。

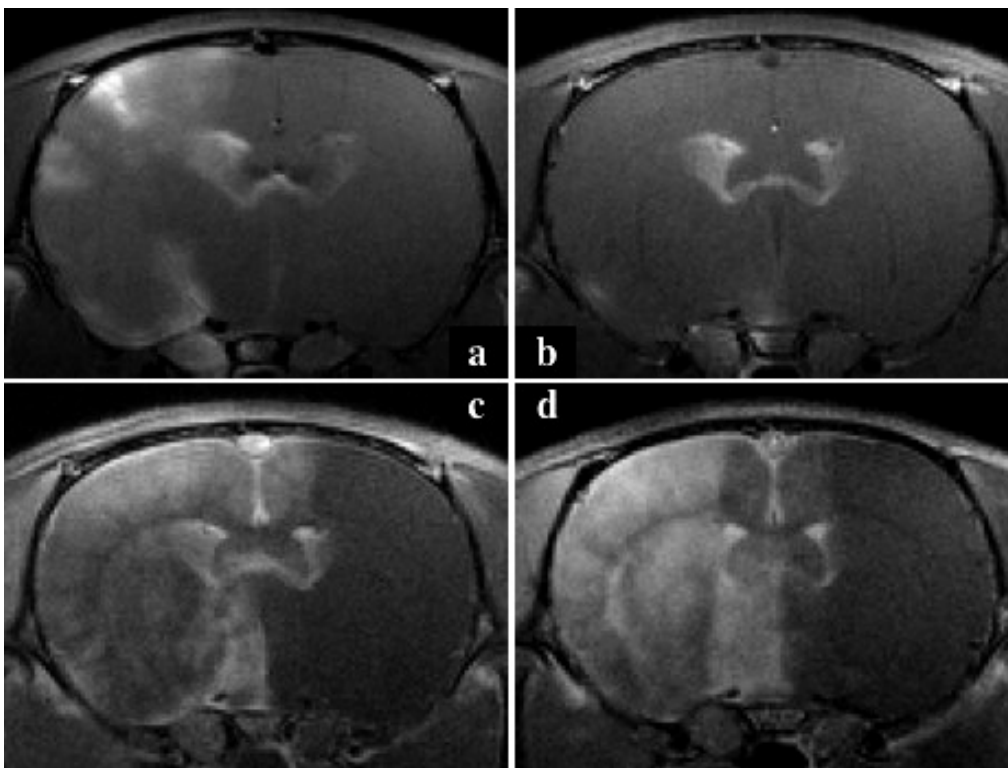


Fig. 3. AIM MRI の典型例。

AIM MRI で得られた SNL 群の典型例 (a, c) と sham 群の典型例 (b, d) を示す。SNL 群において刺激による脳の賦活領域が観察された (a)。sham 群では hypothalamuse に信号上昇が見られた (b)。グルタミン酸を混合した MnCl₂ の投与により、左半球全体の信号上昇が確認された (c, d)。これにより BBB が均一に破綻されていることが示された。

3a). sham モデルでは hypothalamus に信号上昇が見られたものの、その他の領域において信号強度変化は観察されなかった (Fig. 3b)。両群共に、グルタミン酸を加えた MnCl₂ 投与によって左半球全体の信号強度が上昇し、均一に BBB が破綻していることが示された (Fig. 3c, d)。

SNL 群と sham 群において、対側に対する信号強度比を比較すると、S2, CPu, VP, 領域に有意な信号上昇が確認された (Fig. 4)。

AIM MRI 実験において、Mn 投与および足底刺激

中の血圧変化に有意な変化は観察されなかった (Fig. 5)。

IV. 考 察

von Frey test の結果より、作成した SNL モデルで痛み閾値の低下が観察され、アロディニアが生じていることが推察された。神経の結紮を行っていない反対側においても閾値の低下が見られた。反対側の閾値低下に関しては明確な見解が得られていない

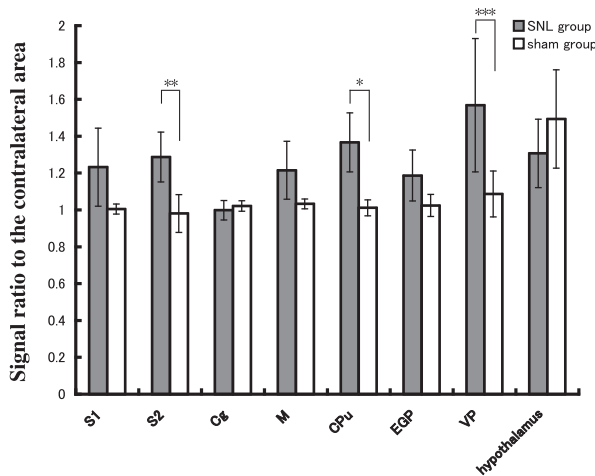


Fig. 4. AIM MRIにおける信号強度比の比較。

グラフに各領域における信号強度比を示す。信号強度は対側のROI対応領域に対する信号比を算出した。統計解析には一元配置分散分析 Tukey法を使用した。S2 (** $p < 0.01$), CPu (* $p < 0.05$), VP (***) $p < 0.001$) 領域に有意な信号変化が観察された。

が、慢性疼痛発症時の脊髄内ではミクログリアとアストロサイトの活性化が見られるという報告がある³³⁻³⁵。このことから、サイトカインやマクロファージの集積が脊髄レベルで2次ニューロンの活動を修飾し、非結紮側の閾値低下が生じている可能性が考えられる。

ヒトを対象にした報告では、急性の侵害刺激はS1およびS2、第1次運動野(primary motor cortex; M1)、補足運動野(supplementary; SMA)、島皮質(insular cortex; IC)、前帯状回(anterior cingulate cortex; ACC)、視床、基底核、前頭前野(prefrontal cortex; PFC)などに賦活が見られている^{15,36}。動物を対象にしたfMRIの検討では、 α -chloralose麻酔下のホルマリン皮下投与(前肢)によって、前頭葉、頭頂葉、梨状皮質、島皮質などに活動が検出されている³⁷。一方で、propofolを用いた深い麻酔下では、特に視床領域の活動が抑制される³⁸と報告されており、使用する麻酔の種類によって、脳賦活に差異が見られることが示されている。神経因性疼痛では、 α -chloralose麻酔下での脊髄損傷モデルに対するfMRIの報告³⁹があるが、S1以外の領域に関する検討は行われていない。

AIM MRI実験の結果では、SNL群のS2, CPu, VP, 領域に有意な信号上昇が確認された。S2領域は侵害刺激に対して賦活が見られるとされているものの、詳細は明らかになっていない。S2は両側性に反応することが多く⁴⁰、鍼刺激でも賦活が見られると言われている。SNL群でみられたS2の反応は、ブラシ擦過による刺激が侵害刺激として入力さ

れた結果であると考えられる。一方、CPu領域の賦活は、これまで報告されていないものの、痛みにおける大脳基底核への入力を考慮すると、この結果は妥当なものであると考えられる。AIM MRIで観察されたS2やCPuの神経賦活は、痛み情報の伝導路の一部を可視化したものと考えられる。VPはAA(anterior amygdaloid area)を含む領域をROIとして設定している。VPを含むループは情動の修飾に関連すると報告されており⁴¹、また扁桃体の一部であるAAは情動記憶などに関与している可能性が高い。痛み認知においては、情動に関わる扁桃体や島領域の関与が注目されている。さらに詳細な解析を行うことで、感覚的な痛みの伝達だけでなく、情動記憶や、それに伴う長期増強などを観察できる可能性がある。

ラットの足底に直接触れることで痛みを誘発する今回の手法では、閾値の低下を反映して、主にS1領域の信号上昇が観察されるものと予想された。しかし、実際にはS1に有意な信号変化は観察されなかった。ヒト(健常被験者)に対する非接触痛み刺激⁴²や鍼通電⁴³の結果では、主にS2領域の賦活が見られると報告されている。S1は侵害刺激の情報弁別も担っているが、侵害刺激の入力とS1の賦活の大きさは必ずしも一致しないものと考えられる。今回はSNL群、sham群ともにS1の賦活が見られなかったことから、単に全身麻酔に起因する賦活抑制である可能性も考えられる。

SNL, shamの両群において、hypothalamus領域に信号上昇が見られた。このような信号変化はノーマルラットに対するAIM MRIにおいても観察されることから、Mn投与時に生じている何らかの生理状態の変化を検出していると考えられる。しかしながら明確な原因は明らかになっておらず、今後の検討が必要である。

アロディニアは触刺激のような非侵襲刺激を痛みとして認知することから、今回の実験では浅い麻酔を維持して刺激を行うことで、痛みを誘発する必要があった。AIM MRIで得られる結果は麻酔深度に大きく依存するという特性がある。本実験の問題点として、触刺激が痛みとして入力されるか否かによって麻酔深度が変化している可能性が残される。浅い麻酔は非常に不安定であり、覚醒に向かうとせん妄や異常興奮などを引き起こす。よって、今回は麻酔状態を推し量る一つの指標として刺激中の血圧変動を用いた(Fig. 5)。SNL群とsham群の間で刺激中の血圧に有意な差は見られず、血圧での判断では両群間の麻酔深度に大きな差異はなかったと考えられる。また、両群共に同様の刺激を加えているも

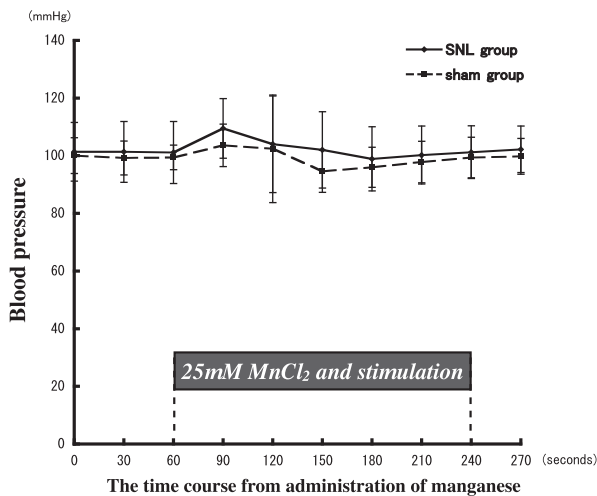


Fig. 5. Mn 投与および刺激中の血圧変動。

Mn 投与開始から4分30秒間の血圧変動をグラフに示す。チューブのデッドスペースを考慮し、実際にMnが体内に流入している時間は60秒後からの3分間であり、刺激時間も同様とした。統計解析には対応のないt検定を使用し、各時点におけるSNL群とsham群の血圧を比較した。SNL群とsham群の血圧に有意差は見られなかった。

この、shamでは感覚野であるS1に刺激に対する脳賦活が観察されなかった。今回と比べて浅めのpropofol麻酔下で、ノーマルラットに対して行った洞毛触刺激のAIM MRIでは、S1領域に顕著な信号上昇が観察されている(未発表データ)。このことに加え、本実験でのSNL群、sham群の血圧変動は共に小さく、また安定していたことから、刺激中の麻酔レベルが大きく変化したとは考えにくい。実験に用いた麻酔深度は通常の触覚遮断には十分な深度が得られていたと考えられる。

V. 結語

今回、慢性疼痛モデルを用いて痛み誘発時の神経賦活を、AIM MRIにて検出することができた。痛み伝導路の一部や、痛み認知の情動的側面に関わる領域の賦活を画像化できることが示された。本手法は、疼痛または疼痛治療の客観的評価につながる方法論の一つとなる可能性がある。AIM MRIで得られる結果に加え、fMRIや代謝物の検出が可能なMagnetic Resonance Spectroscopy (MRS)を動物実験に応用することで、画像情報による痛みの評価につながるものと考えられる。今後、慢性疼痛に対する鍼灸の関与が痛みの認知に及ぼす影響が明らかとなり、画像評価が可能となることを期待する。

謝辞 本研究に際し、終始ご指導を賜りました明治国際医療大学脳神経外科学教室田中忠蔵教授、樋

口敏宏教授に深甚なる謝意を捧げます。また、ご助言ならびにご協力を賜りました同医療情報学教室梅田雅宏准教授、渡邊康晴助教に深く感謝いたします。

文献

1. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B: TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, 38(3-4): 233-252, 2005.
2. Obata K, Yamanaka H, Dai Y, et al: Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase in primary afferent neurons regulates brain-derived neurotrophic factor expression after peripheral inflammation and nerve injury. *J Neurosci*, 23(10): 4117-4126, 2003.
3. Tonra JR, Curtis R, Wong V, et al: Axotomy up-regulates the anterograde transport and expression of brain-derived neurotrophic factor by sensory neurons. *J Neurosci*, 18(11): 4374-4383, 1998.
4. Coull JA, Boudreau D, Bachand K, et al: Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, 424(6951): 938-942, 2003.
5. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, et al: P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, 424(6950): 778-783, 2003.
6. Woolf CJ, Mannion RJ: Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*, 353(9168): 1959-1964, 1999.
- 7.Coderre TJ, Grimes RW, Melzack R: Deafferentation and chronic pain in animals: an evaluation of evidence suggesting autotomy is related to pain. *Pain*, 26(1): 61-84, 1986.
8. Bennett GJ, Xie YK: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33(1): 87-107, 1988.
9. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y: A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, 43(2): 205-218, 1990.
10. Kim SH, Chung JM: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 50(3): 355-363, 1992.
11. Decosterd I, Woolf CJ: Spared nerve injury: an

- animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, 87(2): 149-158, 2000.
12. Mosconi T, Kruger L: Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain*, 64(1): 37-57, 1996.
 13. Hao JX, Xu XJ, Aldskogius H, et al: Allodynia-like effects in rat after ischaemic spinal cord injury photochemically induced by laser irradiation. *Pain*, 45(2): 175-185, 1991.
 14. DeLeo JA, Coombs DW, Willenbring S, et al: Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. *Pain*, 56(1): 9-16, 1994.
 15. Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, et al: Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*, 9(4): 463-484, 2005.
 16. Ogawa S, Lee TM: Magnetic resonance imaging of blood vessels at high fields: in vivo and in vitro measurements and image simulation. *Magn Reson Med*, 16(1): 9-18, 1990.
 17. Mendonca-Dias MH, Gaggelli E, Lauterbur PC: Paramagnetic contrast agents in nuclear magnetic resonance medical imaging. *Semin Nucl Med*, 13(4): 364-376, 1983.
 18. Geraldes CF, Sherry AD, Brown RD, et al: Magnetic field dependence of solvent proton relaxation rates induced by Gd³⁺ and Mn²⁺ complexes of various polyaza macrocyclic ligands: implications for NMR imaging. *Magn Reson Med*, 3(2): 242-250, 1986.
 19. Aoki I, Wu YJ, Silva AC, et al: In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage*, 22(3): 1046-1059, 2004.
 20. Watanabe T, Frahm J, Michaelis T: Functional mapping of neural pathways in rodent brain in vivo using manganese-enhanced three-dimensional magnetic resonance imaging. *NMR Biomed*, 17(8): 554-568, 2004.
 21. Lin YJ: MRI of the Rat and Mouse Brain after Systemic Administration of MnCl₂. Pittsburgh: Carnegie Mellon University; p. 149, 1997.
 22. Pautler RG, Koretsky AP: Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroimage*, 16(2): 441-448, 2002.
 23. Lin YJ, Koretsky AP: Manganese ion enhances T1-weighted MRI during brain activation: an approach to direct imaging of brain function. *Magn Reson Med*, 38(3): 378-388, 1997.
 24. Aoki I, Tanaka C, Takegami T, et al: Dynamic activity-induced manganese-dependent contrast magnetic resonance imaging (DAIM MRI). *Magn Reson Med*, 48(6): 927-933, 2002.
 25. Aoki I, Naruse S, Tanaka C: Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of brain activity and applications to early detection of brain ischemia. *NMR Biomed*, 17(8): 569-580, 2004.
 26. Hunter DR, Komai H, Haworth RA, et al: Comparison of Ca²⁺, Sr²⁺, and Mn²⁺ fluxes in mitochondria of the perfused rat heart. *Circ Res*, 47(5): 721-727, 1980.
 27. Kita H, Narita K, Van der Kloot W: Tetanic stimulation increases the frequency of miniature end-plate potentials at the frog neuromuscular junction in Mn²⁺-, CO₂-, and Ni²⁺-saline solutions. *Brain Res*, 205(1): 111-121, 1981.
 28. Drapeau P, Nachshen DA: Manganese fluxes and manganese-dependent neurotransmitter release in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J Physiol*, 348: 493-510, 1984.
 29. Burnett KR, Goldstein EJ, Wolf GL, et al: The oral administration of MnCl₂: a potential alternative to IV injection for tissue contrast enhancement in magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging*, 2(4): 307-314, 1984.
 30. Narita K, Kawasaki F, Kita H: Mn and Mg influxes through Ca channels of motor nerve terminals are prevented by verapamil in frogs. *Brain Res*, 510(2): 289-295, 1990.
 31. Shibuya I, Douglas WW: Indications from Mn-quenching of Fura-2 fluorescence in melanotrophs that dopamine and baclofen close Ca channels that are spontaneously open but not those opened by high [K⁺]_o; and that Cd preferentially blocks the latter. *Cell Calcium*, 14(1): 33-44, 1993.
 32. Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press; 1998.
 33. Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, et al: Dis-

- sociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol*, 79(2): 163-175, 1997.
34. Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA: The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol*, 157(2): 289-304, 1999.
35. Winkelstein BA, Rutkowski MD, Sweitzer SM, et al: Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J Comp Neurol*, 439(2): 127-139, 2001.
36. Apkarian AV, Gelnar PA, Krauss BR, et al: Cortical responses to thermal pain depend on stimulus size: a functional MRI study. *J Neurophysiol*, 83(5): 3113-3122, 2000.
37. Tuor UI, Malisza K, Foniok T, et al: Functional magnetic resonance imaging in rats subjected to intense electrical and noxious chemical stimulation of the forepaw. *Pain*, 87(3): 315-324, 2000.
38. Yu O, Parizel N, Pain L, et al: Texture analysis of brain MRI evidences the amygdala activation by nociceptive stimuli under deep anesthesia in the propofol-formalin rat model. *Magn Reson Imaging*, 25(1): 144-146, 2007.
39. Endo T, Spenger C, Hao J, et al: Functional MRI of the brain detects neuropathic pain in experimental spinal cord injury. *Pain*, 138(2): 292-300, 2008.
40. Bromm B: Brain images of pain. *News Physiol Sci*, 16: 244-249, 2001.
41. Alexander GE, DeLong MR, Strick PL: Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci*, 9: 357-381, 1986.
42. Xu X, Fukuyama H, Yazawa S, et al: Functional localization of pain perception in the human brain studied by PET. *Neuroreport*, 8(2): 555-559, 1997.
43. 福永雅喜: 鍼通電刺激の脳高次機能におよぼす影響の検討: 機能的磁気共鳴画像法を用いて. *明治鍼灸医学*, 25: 7-19, 1999.

Detection of Brain Activity during Chronic Pain Using Activity-Induced Manganese-Enhanced MRI in the Rat

Yuko Kawai

*Department of Clinical Acupuncture and Moxibustion, Graduate school of Acupuncture and Moxibustion,
Meiji University of Integrative Medicine*

ABSTRACT

Introduction: Nerve injury occasionally induces neuropathic pain, which is a type of chronic pain. The cardinal symptom of neuropathic pain is spontaneous or touch-evoked pain. Spontaneous pain is either continuous or paroxysmal. Touch-evoked pain consists of allodynia and hyperalgesia. Allodynia is pain triggered by innocuous stimuli, and hyperalgesia is an exaggerated response to painful stimuli. Non-invasive imaging techniques such as positron emission tomography (PET) and magnetic resonance imaging (MRI) are useful for the visualization of brain responses to pain. It has been reported that activity-induced manganese-enhanced (AIM) MRI is not influenced by hemodynamic changes and can be used for brain functional observation. Mn^{2+} enters neurons through voltage-gated Ca^{2+} channels during a nerve action potential and leads to signal enhancement in active brain areas. This study detected brain activation during foot stimulation using AIM MRI in a segmental spinal nerve ligation (SNL) model. The SNL model is an experimental model of chronic pain that is accompanied by tactile allodynia.

Materials and Methods: Male Sprague-Dawley (SD) rats (n=14) were divided into 2 groups: SNL group (n=9) and sham group (n=5). The right L5-L6 spinal nerves were isolated and ligated distal to the dorsal root ganglia and proximal to the sciatic nerve formation using 5-0 silk sutures. Sham-operated rats underwent a similar surgical procedure, except that spinal nerves were not ligated. Animals were examined by AIM MRI one or two weeks after the surgery. AIM MRI was performed using the previously described methods (Aoki I, NMR in Biomed. 2004, 17: 1-12). The blood brain barrier was disrupted by rapidly injecting 25% D-mannitol through the carotid artery. The sole of the right foot was electrically stimulated with a current of 0.2 Hz frequency while infusing the $MnCl_2$ solution. After stimulation, T_1 -weighted images were acquired using a 4.7-T MRI system (Bruker) with the following parameters: spin-echo, repetition time (TR)/echo time (TE)=400/10.5 ms, field of view (FOV)=32 mm, and matrix size=256×256.

Results and Discussion: Pain-induced brain activation was successfully visualized using AIM MRI. Significant signal enhancement was observed in the second somatic sensory (S2), caudate putamen (CPu), and ventral pallidum (VP) areas. The area extending from the S2 cortex to the brainstem and thalamus is known as the pathway of somatosensory discriminative pain. In addition, the amygdala and medial regions of the frontal lobe are associated with the affective component of pain. Therefore, these findings suggest that AIM MRI is useful for the depiction of the conducting pathway of pain. Furthermore, it may be useful for investigation of neural connections that receive and modulate pain signals. Diagnostic imaging of chronic pain will play an important role in the clinical treatment of pain and the development of pain-relieving drugs. AIM MRI will also facilitate research on acupuncture for chronic pain.