

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10561

研究課題名(和文) in vitro神経傷害モデルを用いた神経障害性疼痛発症のメカニズム解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of neuropathic pain using in vitro nerve injury model

研究代表者

細川 豊史 (HOSOKAWA, Toyoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80165555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛についてin vivoおよびin vitro神経障害モデルでそのメカニズム解明に努めた。in vivoモデルではSNIモデルを作成し、術後1日目より機械刺激に対する痛覚閾値が低下し、術後14日目まで痛覚閾値の低下が認められた。免疫組織染色では神経損傷部位に一致して、術後3日目よりIba-1陽性細胞の集積が認められた。in vitroモデルではマウス後根神経節より採取した神経細胞をCampanot Chamberを用いて培養した。中央コンパートメント内では神経細胞の軸索延長が認められたが、両側の軸索コンパートメントでは有効な軸索伸長が認められなかった。

研究成果の概要(英文)：In vivo and in vitro neuropathic models were used to investigate the mechanisms of neuropathic pain. SNI model was used as in vivo model. Mechanical thresholds was dramatically decreased from day 1 after SNI procedure, and was kept on day 14 after SNI. Immunohistochemical analysis revealed that the accumulation of Iba-1 positive cells in both dorsal and ventral horn consisted with nerve injury from day 3 after SNI. Neurons dissected from dorsal root ganglion of mice were cultured using Campanot chamber in vitro model. Axons growth in the central compartment of Campanot chamber were observed, however those were not observed in both side compartments.

研究分野：神経障害性疼痛

キーワード：神経障害性疼痛 コンパートメントカルチャー マイクログリア 一次知覚神経

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛発症のメカニズムには神経細胞のみならず、マイクログリア、アストロサイト、リンパ球など様々な細胞が関与する。またその病態も神経系の直接損傷や炎症、糖尿病など多岐に渡り、難治性であるため、有効な治療法開発が求められる。これまで様々な動物モデルが考案され、そのメカニズム解明がなされてきた。また近年、脊髄グリア細胞などの免疫担当細胞と神経細胞の相互作用 (Neuro-immuno Communication) が注目されている。そのため神経細胞や脊髄グリアなどの免疫担当細胞の相互作用に焦点を絞った研究の必要性が増してきている。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛は神経系の疾患で、そのメカニズム解明に様々な動物モデルが作成され、研究が行われてきた。近年、マイクログリアなどの脊髄グリア細胞と神経細胞の相互関係が重要であることがわかってきた。本研究では *in vivo* 神経障害性疼痛モデルとして SNI (Spared Nerve Injury) モデルを用い、脊髄でどのような変化が起こっているのかを観察する。次に *in vitro* 神経傷害モデルとして、コンパートメントカルチャーを用い、神経細胞を細胞体、軸索を分けて培養し、*in vivo* 神経傷害モデルで生じていることを単純化することで、神経障害性疼痛発症のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 動物の処置と行動解析

雄性マウス (C57BL/6) 10w を実験に用いた。イソフルランによる麻酔下で、坐骨神経の枝である総腓骨神経と脛骨神経を結紮、切離する SNI モデルを作成した。SNI モデルマウス及び未処置マウスに対し、von Frey Filaments を用い機械刺激に対する痛覚閾値を測定し、痛覚閾値の経時的変化を調査した。

(2) 免疫組織染色

SNI モデルマウス及び未処置マウスをイソフルランによる深麻酔下で、DPBS で前灌流し、4%パラフォルムアルデヒドを用いて灌流固定した後、脊髄を採取した。10 μ m の凍結切片を作成後、マイクログリアの表面抗原である CD11b、Iba-1 で免疫組織染色をおこない、脊髄でのマイクログリアについて経時的に調査した。

(3) コンパートメントカルチャー

35mm の petri dish を Poly-D-lysine 及び Lamine でコーティングした後、Campanot

Chamber に薄くグリースを塗布し、コンパートメントカルチャーの準備をした。

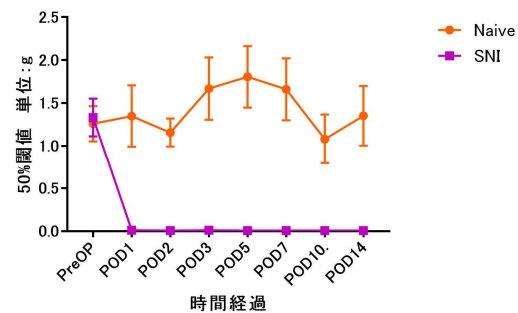
その後、未処置のマウスからイソフルラン深麻酔下で、頸椎から腰椎までの後根神経節 (DRG; Dorsal Root Ganglion) を採取し、神経細胞を取り出した。取り出した神経細胞を Campanot Chamber の中央コンパートメントの部分に入れ、培養を開始した。その後、中央コンパートメントと両側コンパートメントの培養液に含まれる神経栄養因子 (NGF; Nerve Growth Factor) の濃度を変え、軸索伸長するかどうかを観察した。

4. 研究成果

(1) SNI モデルと行動解析

神経障害性疼痛について *in vivo* および *in vitro* 神経障害モデルでそのメカニズム解明に努めた。

in vivo モデルでは SNI モデルを作成し、術後 1 日目より機械刺激に対する痛覚閾値が低下し、術後 14 日目まで痛覚閾値の低下が認められた。図 1 に行動解析の結果を示す。

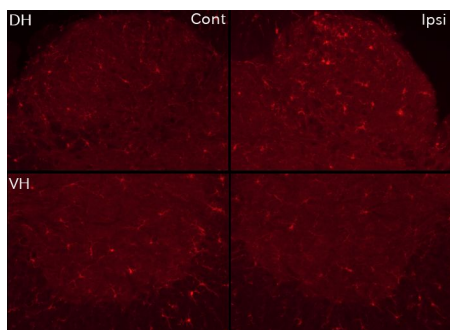


(図 1) 行動解析結果。機械刺激に対する痛覚閾値の経時的変化。

(2) SNI モデルにおける免疫組織学的検討

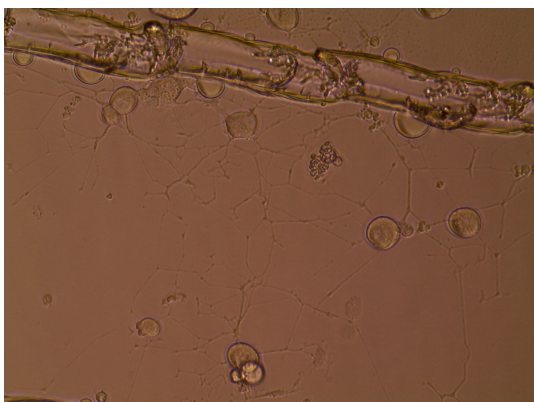
SNI モデルマウスの脊髄免疫組織染色では CD11b の発現が観察できなかった。

次に同じマイクログリアの表面抗原である Iba-1 を用いた免疫組織染色では神経損傷部位に一致して、傷害側の後角および前角に Iba-1 陽性細胞の集積が認められた。Iba-1 陽性細胞の集積は SNI モデル作成後 3 日目より明らかとなり、その後 Iba-1 の陽性細胞の増加が認められた。



(図2) Iba-1 陽性細胞の集積。
SNI モデルマウス術後 3 日目の脊髄の免疫組織染色。

(3) コンパートメントカルチャー
in vitro モデルではマウス後根神経節より採取した神経細胞を Campenot Chamber を用いて培養した。中央コンパートメント内では神経細胞の軸索延長が認められたが、両側の軸索コンパートメントでは有効な軸索伸長が認められなかった。



(図3) 神経細胞の培養
Campenot Chamber 中央コンパートメント内の神経細胞。

今回の研究では SNI モデルで神経損傷部位に一致して脊髄で Iba-1 陽性細胞の集積が認められた。また SNI モデルにより機械刺激による痛覚閾値の低下が認められた。しかしながら、コンパートメントカルチャーでは神経細胞が軸索伸長を確認できたが、両側のコンパートメントまで軸索伸長させることができなかった。この点について、今回の知見を活かし、今後の研究に引き継いで行くことを考えている。

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 8 件)

- 1 細川豊史, 佐伯 茂. 慢性痛患者の治療と

周術期管理・最近の話題によせて. 日本臨床麻酔学会誌, 査読無, 37(3) 380, 2017

- 2 大西佳子, 細川豊史. 痛みに対応しよう 痛みの評価と治療の選択. レジデント, 査読無, 9(7): 32-37, 2016.
- 3 大西佳子, 細川豊史. 選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI), セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(SNRI). ペインクリニック, 査読無, 37(5): 583 - 592, 2016.
- 4 波多野貴彦, 細川豊史. 腕神経浸潤による神経障害性疼痛. 緩和ケア, 査読無, 26(1): 24-29, 2016.
- 5 谷口彩乃, 権哲, 山代亜紀子, 細川豊史. 痛みの原因となった腫瘍消失後も遷延する痛みをもつ患者に, オピオイド鎮痛薬の薬物関連異常行動を認めた悪性リンパ腫の 1 例. Palliative Care Research. 査読有, 11(3): 548-552, 2016
- 6 Amaya F, Hosokawa T, Okamoto A, Matsuda M, Yamaguchi Y, Yamakita S, Taguchi T, Sawa T. Can Acute Pain Treatment Reduce Postsurgical Comorbidity after Breast Cancer Surgery? A Literature Review. Bio Med Research International. Article, 査読有, ID641508:1-8, 2015
- 7 権哲, 細川豊史. 1. 症状緩和の今 3) 鎮痛補助薬. ペインクリニック, 査読無, 36 別冊秋号: S394-S401, 2015.
- 8 大西佳子, 細川豊史. 1. 症状緩和の今 2) オピオイド鎮痛薬. ペインクリニック, 査読無, 36 別冊秋号: S381-393, 2015.

[学会発表](計 15 件)

- 1 細川豊史. Neural Blockade in Cancer Patients. 中国医師協会疼痛医師専門委員会年会, 中華人民共和国(南昌), 2016.7.16
- 2 細川豊史. The History, Present Status and the Future of the Pain Clinic in Japan. The 63rd Annual Meeting of Korean Pain Society, 2016.11.19, Seoul.
- 3 細川豊史. 日本におけるペインクリニ

- ックの現状と未来．国際シンポジウム「アジアにおけるペインクリニックの現状と未来」．日本ペインクリニック学会第 50 回大会，2016.7.9，横浜．
- 4 上野博司，深澤圭太，大西佳子，権哲，谷口彩乃，山代亜紀子，波多野貴彦，細川豊史．上顎洞癌に対する陽子線治療後に生じた顔面痛に三叉神経節ブロックが有効であった症例．第 45 回日本慢性疼痛学会，2016.2.27，佐賀．
 - 5 権哲，細川豊史，深澤圭太，上野博司，山下智充，岡本明子，岡田恵．小児がん患者に生じる様々な痛みに対する当院における痛みのケアについての検討と分析．日本ペインクリニック学会第 50 回大会，2016.7.26，横浜．
 - 6 大西佳子，細川豊史，深澤圭太，上野博司，権哲，谷口彩乃，山代亜紀子，波多野貴彦，岡本明子．下肢リンパ浮腫に伴う難治性疼痛に神経ブロックが奏功した 1 例．第 45 回日本慢性疼痛学会学術大会，2016.2.26，佐賀．
 - 7 山代亜紀子，細川豊史，岡本明子，波多野貴彦，谷口彩乃，権哲，大西佳子，深澤圭太，上野博司．痛みのコントロールに注意が必要であった慢性痛患者に生じたがん疼痛の 2 例．第 45 回日本慢性疼痛学会，2016.2.27，佐賀
 - 8 山代亜紀子，細川豊史，田中萌生，波多野貴彦，深澤圭太．急性期の末梢性顔面神経麻痺に対し集中的に星状神経節ブロックを施行し良好な予後を得た 4 症例．第 46 回関西ペインクリニック学会学術集会，2016.5.14，大阪．
 - 9 波多野貴彦，細川豊史，深澤圭太，上野博司．超音波ガイド下星状神経節ブロックにおける局所麻酔薬注入量についての検討．日本ペインクリニック学会第 50 回大会，2016.7.8，横浜．
 - 10 波多野貴彦，深澤圭太，上野博司，細川豊史．当科での慢性疼痛に対するトラマドール塩酸塩徐放性製剤(ワントラム)の使用経験．第 45 回日本慢性疼痛学会，2016.2.26，佐賀．
 - 11 細川豊史．ペインクリニックにおける診断の重要性 臨床例から学ぶ多くのこと．第 45 回関西ペインクリニック学会学術集会，2015.5.16，大阪．
 - 12 Hosokawa T. Accredited Speciality Board of Pain Clinic in Japan & Guideline for Pharmacologic Management of Neuropathic Pain. Pain Forum in Beijing University, 2015.6.13, Beijing.
 - 13 細川豊史．教育講演 3；早期からのがん疼痛緩和の重要性と新しい鎮痛薬 その理論と臨床での上手な使い方．第 9 回日本緩和医療薬学会年会，2015.10.3，横浜．
 - 14 細川豊史．ランチョンセミナー；知ってほしい痛みの話～慢性疼痛と薬物療法～．第 31 回北海道ペインクリニック学会，2015.10.18，北海道．
 - 15 細川豊史．イブニングセミナー03；がん性疼痛ケアの最新の話 CIPN を含めた“がん”に伴う神経障害性疼痛の予防と治療．第 53 回日本癌治療学会学術集会，2015.10.31，京都．
- 〔図書〕(計 7 件)
- 1 大西佳子，細川豊史．非がん性慢性疼痛患者における注意点．スーパー総合医緩和医療・終末期ケア，中山書店，東京：38-42，2017
 - 2 Kanbayashi Y, Hosokawa T. Peripheral Neuropathies Especially in Cancer Patients: In Focus on Chemotherapy-induced Peripheral Neuropathies and Post-Herpetic Neuralgia: Horizons in Cancer Research. Volume 57, edited by Hiroto S. Watanabe Nova Science Publishers, New York: pp71-84, 2015.
 - 3 細川豊史．がん性疼痛(がん治療に伴う痛みも含む)．メカニズムから読み解く痛みの臨床テキスト，小川節郎 編，南江堂，東京：pp29-34，2015．
 - 4 細川豊史．慢性疼痛治療 現場で役立つオピオイド鎮痛薬の必須知識．細川豊史 編．医薬ジャーナル社，大阪：2015．
 - 5 上野博司，細川豊史．各疾患におけるオピオイド治療の実際 4)有痛性糖尿病性ニューロパチー．慢性疼痛治療 現場で役立つオピオイド鎮痛薬の必須知識．細川豊史 編．医薬ジャーナル社，大阪：pp219-229，2015．

- 6 権哲, 細川豊史. がん患者の非ガン性慢性疼痛. 慢性疼痛治療 現場で役立つオピオイド鎮痛薬の必須知識. 細川豊史 編. 医薬ジャーナル社, 大阪: pp239-247, 2015.
 - 7 大西佳子, 細川豊史. オピオイド鎮痛薬での慢性痛通治療の実際 1)同意書. 慢性疼痛治療 現場で役立つオピオイド鎮痛薬の必須知識. 細川豊史 編. 医薬ジャーナル社, 大阪: pp96-105, 2015.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
細川 豊史 (HOSOKAWA, Toyoshi)
京都府立医科大学・疼痛緩和医療学教室・教授
研究者番号: 80165555
 - (2) 研究分担者
上野 博司 (UENO, Hiroshi)
京都府立医科大学・疼痛緩和医療学教室・准教授
研究者番号: 20381965
 - (3) 深澤 圭太 (FUKAZAWA, Keita)
京都府立医科大学・疼痛緩和医療学教室・講師
研究者番号: 90398404
 - (4) 原田 秋穂 (HARADA, Akiho)
京都府立医科大学・疼痛緩和医療学教室・専攻医
研究者番号: 80433259
 - (5) 柴崎 雅志 (SHIBASAKI, Masayuki)
京都府立医科大学・麻酔科学教室・学内講師
研究者番号: 20405319