

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20032

研究課題名(和文)フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いた疼痛評価系の確立

研究課題名(英文)Pain evaluation using flavoprotein fluorescence imaging

研究代表者

渡部 達範(WATANABE, Tatsunori)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：30748330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体を用いた疼痛研究は臨床と同じ投与経路での鎮痛薬の作用機序を探索するうえで重要である。今回、内因性のフラビン蛋白の性質を利用したフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて一次体性感覚野の応答を観察することで痛みを評価できるか検討した。カラゲニンを投与後し疼痛モデルを作成した。投与後30分よりvon Frey testによる後肢逃避閾値は有意に低下し、同時期に左後肢振動刺激に対する一次体性感覚野の応答は増強した。同モデルに鎮痛薬であるケトプロフェンを投与すると、後肢逃避閾値は有意に上昇し、同時に一次体性感覚野の応答は減弱した。同方法を用いることで生体の痛みを測定できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In vivo pain experiments using the administration route similar to that used in clinical practice are important for the research of the mechanism of action of analgesic drugs. In this study, we investigated whether the ongoing pain can be evaluated by observing the response of the primary somatosensory area using flavoprotein fluorescence imaging, a method that uses the properties of endogenous flavoprotein. A pain model of carrageenan-induced inflammation was used. Thirty minutes after carrageenan injection the hindpaw withdrawal thresholds measured by the von Frey filaments decreased significantly. At the same time the response of the primary somatosensory area to the left hindpaw vibratory stimulation increased significantly. Administration of ketoprofen increased significantly hindpaw withdrawal thresholds and also decreased the response of the primary somatosensory area. These results suggest that in vivo pain can be measured by flavoprotein fluorescence imaging method.

研究分野：疼痛学

キーワード：フラビン蛋白蛍光イメージング法 痛み

1. 研究開始当初の背景

生体を用いた疼痛研究は臨床と同じ投与経路での鎮痛薬や麻酔薬の作用機序を探索するうえで極めて重要である。これまでに生体の痛みの神経活動を評価する方法として電気生理学的に評価する方法が用いられてきたが、難易度が高いことや空間分解能が低いという欠点がある。本研究で用いたフラビン蛋白蛍光イメージング法は内因性のフラビン蛋白の性質を利用し神経活動を可視化する方法である。そのため、外因性色素の注入が必要なく容易に生体での神経活動を可視化できる。また、マウスの頭蓋骨は薄く、透過性が高いため、開頭することなく脳表を観察することができるため、容易かつ低侵襲に神経活動を測定することができる。さらに、神経活動の広がりも可視化されるため空間分解能が高く、これまでの方法の欠点を補うことができる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いた痛みの評価法を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

7-10 週齢の C57BL/6 雄性マウスを使用した。

(2) 疼痛モデルの作成

1%カラゲニン (Carrageenan) 20 μ l を左後肢足底に皮下投与し炎症性疼痛モデルを作成した。皮下投与後 30 分ごとに 180 分まで von Frey test およびフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて測定を行った。

(3) ケトプロフェンの投与

カラゲニンを投与し後肢逃避閾値が低下したマウス(カラゲニン投与後 60 分後)にケトプロフェン 100mg/kg を皮下投与した。皮下投与後 30 分ごとに 120 分まで von Frey test およびフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて測定を行った。

(4) von Frey test による後肢逃避閾値測定

マウスをメッシュ状の台の上に置き、透明な箱の中に個別にわけ、30~60 分程度その状態に慣らした。後肢足底にフィラメントを用いて刺激を与え、8 回中 2 回以上の後肢逃避行動がみられる、または足振り行動 (flinching) がみられたものを陽性とした。

(5) 大脳体性感覚野のフラビン蛋白蛍光イメージング

7-10 週齢の C57BL/6 マウスにウレタン 1.65 g/kg を腹腔内投与によって麻酔した。気管切開により気道確保を行い、自発呼吸下に測定を行った。マウスの頭部皮膚を切除し、暗視下に置いた。頭蓋骨表面の乾燥を防いで透明性を維持するために流動パラフィンを用いた。

塗布した。経頭蓋的に青色励起光 (450-490 nm) を脳表に照射し、脳表より放射される緑色自家蛍光 (500-550 nm) を冷却 CCD カメラにより撮影した。体温は 36~37 に維持した。反応は大脳体性感覚野より 1 秒あたり 9 フレームの頻度で撮影した。50 秒毎に繰り返して得られた画像データを 24 回試行分加算平均した後、5 \times 5 マトリックスフィルターで平滑化して画質を向上させた。刺激直前の 5 フレームの平均に対する各フレームの蛍光強度変化 (F/F) を算出し、擬似カラー表示した。左足底を刺激し、右体性感覚野のフラビン蛋白応答を観察し、そのピーク値、経時変化、を解析した。

4. 研究成果

(1) カラゲニン投与後、後肢逃避閾値の低下に一致したフラビン応答の増強を認めた。カラゲニン投与後、30 分から後肢逃避閾値は低下し、測定した 180 分までは後肢逃避閾値の低下が持続した (図 1)。フラビン蛋白蛍光イメージング法での測定では、右体性感覚野の応答は増強し、行動実験と同様に観察した 180 分まで増強が持続した (図 2)。

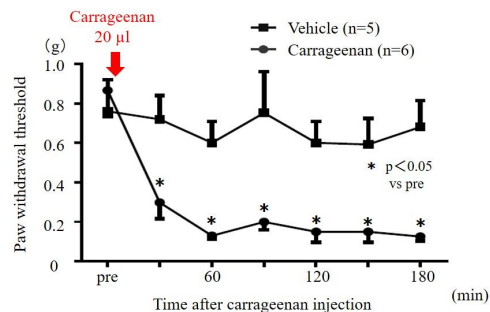


図 1: von Frey test による後肢逃避閾値の変化

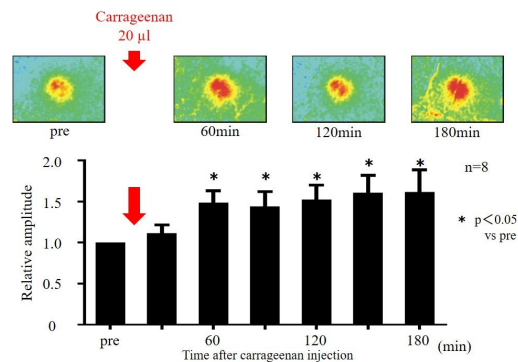


図 2: カラゲニン投与前後での左振動刺激に対する右体性感覚野応答、上段: 各ピーク時の画像、下段: 各ピーク時の活動強度

(2) ケトプロフェン (Ketoprofen) 投与後後肢逃避閾値の上昇に一致したフラビン応答の減弱を認めた。

非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)であるケトプロフェンによる鎮痛効果を観察した。von Frey test では 30 分後、60 分後で有意な後肢逃避閾値の上昇を認め、90 分、120 分では閾値の最低下を認めた。フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いた測定では、後肢逃避閾値の上昇に一致してフラビン応答の減弱を認めた。行動実験で効果が認められなくなる 90 分、120 分では再度応答の増強を認めた。

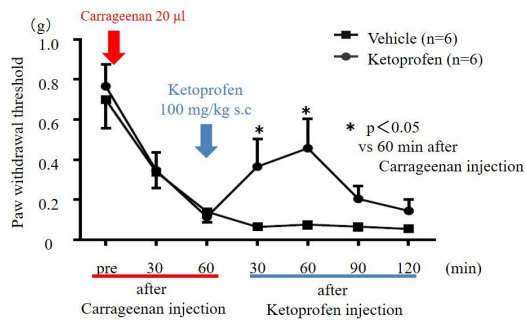


図 3 : von Frey test による後肢逃避閾値の変化

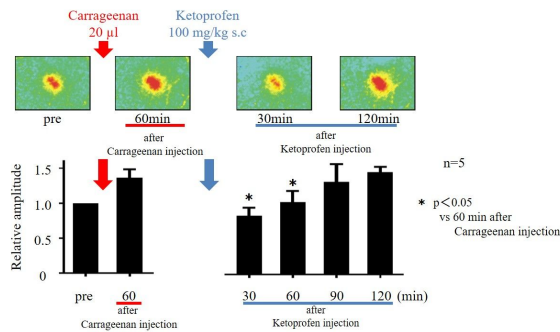


図 4 : カラゲニンおよびケトプロフェン投与前後での左振動刺激に対する右体性感覚野応答、上段：各ピーク時の画像、下段：各ピーク時の活動強度

(3)過去にカプサイシンにより誘発された疼痛では機械的刺激に対する逃避閾値の低下を生じ、体性感覚野のフラビン応答では増強としてとらえられることが報告されている。本研究で用いた炎症性疼痛モデルでも機械刺激に対する後肢逃避閾値の低下が認められており、体性感覚野のフラビン応答の増強は痛みの応答を反映したものと考えられる。また鎮痛薬であるケトプロフェンを投与した後に応答が減弱していることから体性感覚野の応答の変化は痛みの強弱を反映していると考えられる。

(4)現在の生体における痛みの評価は行動学的実験によるものが主流である。しかし、同方法は環境や測定する時間(マウスは夜行性であるため日中と夜間で測定結果が大幅に異なる)等に影響される部分が大きく、判定

に苦慮する場合も多い。今回用いたフラビン蛋白蛍光イメージング法は麻酔下に測定することができるため、環境要因をほぼ排除した状態で測定することが可能である。同方法は、鎮痛薬を創薬するにあたり効果判定方法として有用な測定系になりうることを示唆された。

<引用文献>

- 1, Watanabe T, Sasaki M, Komagata S, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Baba H, Shibuki K. Spinal mechanisms underlying potentiation of hindpaw responses observed after transient hindpaw ischemia in mice. Scientific Reports. 2015 13; 5:11191.
2. Komagata S, Tamaki K, Hishida R, Takeshita N, Shibuki K. Nociceptive cortical responses during capsaicin-induced tactile allodynia in mice with spinal dorsal column lesioning. Neurosci Res. 2011;69(4):348-51.

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)

[学会発表](計1件)

渡部 達範、大西 毅、番場 景子、馬場 洋

フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いた疼痛評価法の検討

2017年6月9日

日本麻酔科学会第64回学術集会(兵庫県神戸市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡部 達範 (WATANABE, Tatsunori)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：30748330

(2)研究協力者

馬場 洋 (BABA, Hiroshi)

渋谷 克栄 (SHIBUKI, Katsuei)

大西 毅 (ONISHI, Takeshi)

番場 景子 (BAMBA, Keiko)

