

令和 3 年 5 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16459

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛におけるオフセット鎮痛変容の機序解明 - 脊髄後角での電気生理学的検討

研究課題名(英文) Mechanism of offset analgesia modulation in rats with neuropathic pain: an electrophysiological analysis in the dorsal horn

研究代表者

舟井 優介 (Funai, Yusuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60722486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オフセット鎮痛(OA)とは、温度刺激をわずかに増減させた際に痛み感覚が予想されるよりも大幅に変化する事を指す。OAには下行性疼痛抑制系の関与などが示唆されてきたが、その機序は十分に解明されていない。温痛覚計(UDH-300)を用いて様々な熱刺激シーケンスを与えながら、ラット脊髄後角より細胞外記録を行った。初期温度を43～49℃、上昇幅を1～3℃、刺激時間を5～20秒と変化させるも、オフセット現象の記録が出来なかった。その原因として、機器が発生する電氣的ノイズが大きすぎる事が判明した。機器の内部回路の詳細な見直しやプローベ修理などを行ったがノイズは除去できず、当初の研究目的を果たせなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オフセット鎮痛(Offset analgesia; OA)とは、熱刺激を短時間で増減させた際に痛み感覚が温度変化と不釣り合いに大幅に減少する現象を指すが、脊髄後角レベルでの機序は明らかでなかった。これまで下行性疼痛抑制系の関与や、神経障害性疼痛患者ではオフセット鎮痛が減弱することが示されてきた。OAの機序を解明することで神経障害性疼痛の治療に応用できる可能性があると考え、我々の持つ実験技術を用いて脊髄後角でのOA反応を明らかにする着想に至った。

研究成果の概要(英文)：Offset analgesia (OA) is a significant change in pain sensation during a slight decrease of a noxious heat stimulus that is more pronounced than would be expected by the temperature change. Although the involvement of the descending pain inhibitory system has been suggested, the mechanism of OA is not fully understood. We performed extracellular recordings in rat spinal dorsal horn with applying various thermal stimulus sequences using a precise thermal stimulator (UDH-300). We tried various thermal protocol in combination with some parameters as below, the initial temperature was ranged to 43-49℃, the rise range was 1-3℃, and the duration of stimuli was 5-20 seconds, but the significant OA phenomenon could not be recorded because of the too much electrical noise from the thermal stimulator. Regardless of the detailed verification and repair of the internal circuit and the thermal probe, the electrical noise could not be removed enough to accomplish our initial research purpose.

研究分野：麻酔科学

キーワード：オフセット鎮痛 脊髄後角 下行性疼痛抑制系

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

当研究室で行ってきた脊髄後角 *in vivo* パッチクランプ法や細胞外記録法は、全身投与した薬剤の影響を知りうること、痛み刺激・温度刺激など生理的的刺激に対する応答が記録可能であること、下行性疼痛抑制系などの中枢神経系のネットワークが温存されている、といった優れた特長を持つ手法である。

2002年に Grill と Coghill は、熱疼痛刺激を短時間でわずかに増減させた時に、痛み感覚が大幅に減少する現象を見出し、オフセット鎮痛 (Offset Analgesia; OA) と名付けた<sup>1)</sup>。原法では、47~49℃で5秒間熱刺激を与え (T1)、+1~3℃で5秒間熱刺激を増強させ (T2)、T1の温度に戻す (T3) ことで大幅に痛み感覚が減少する。その後の fMRI を用いた検討などで、OA が生じる際には中脳水道周囲灰白質・吻側延髄腹内側部・青班核など下行性疼痛抑制系の中核が活性化することが示されてきた<sup>2)3)</sup>。また、慢性神経障害性痛患者では下行性疼痛抑制系の機能が減弱しているため、OA も減弱していることが知られている<sup>4)</sup>。これらの脊髄後角レベルでの詳細な機序は判明していない。これらの知見から、OA の機序を解明することで神経障害性疼痛の治療に応用できる可能性があると考え、我々の持つ実験技術を用いて脊髄後角での OA 反応を明らかにする着想に至った。

### 2. 研究の目的

末梢の侵害受容器が感知した侵害刺激は一次求心性線維を介して脊髄後角へ入力する。膠様質細胞は脊髄後角第 1 層に存在し、A 線維・C 線維の双方より興奮性入力を受けるとともに抑制性ニューロンからの抑制性入力も受け、それらの情報を統合して投射ニューロンへ痛覚情報を伝達する。本研究では、痛覚伝達の要所である膠様質細胞から細胞外記録法および *in vivo* パッチクランプ法を行う。本手法では活動電位や興奮性/抑制性シナプス後電位などを分離して記録できることで、詳細な痛覚伝達が明らかになる。初めに正常ラットを用い、高精度の温痛覚計を用いてオフセット刺激を与えながら電気生理学的記録を行うことで、脊髄レベルでの OA の詳細機序を明らかにする。さらに、修正 Chung モデル (神経障害性疼痛モデル) を用いて同様の記録を行うことで、OA 減弱の詳細な機序も明らかにすることが目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) *In vivo* 標本の作成

雄性 6-9 週齢 Sprague-Dawley ラットを用い、腹腔内にウレタンを投与 (1.2-1.5g/kg) し麻酔を行った。背部を切開し筋組織を剥離し、Th12-L2 レベルの椎弓切除を行い、脊髄腰膨大部を露出した。ラットを固定装置に移し硬膜・軟膜を開窓し、後根入力部に記録電極が刺入できるスペースを作った。脊髄表面を 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> でバブリングした Krebs 液 (NaCl, 117 mM; KCl, 3.6 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM; glucose, 11 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM) を 37 度に加温して還流する。

#### (2) 電気生理記録

脊髄後角第 1 層 (深さ 30-200 μm) の膠様質細胞を目標に電極を刺入した。細胞外記録の場合はタングステン電極 (1.3-1.5 MΩ) を、パッチクランプ法の場合はガラス電極 (内液を満たした際の抵抗が 8-15 MΩ のもの) を用いた。マイクロマニピュレーターを用いて電極を刺入し、後述のオフセット刺激を与えながら細胞外記録による活動電位測定もしくはホールセル法による興奮性 (抑制性) シナプス後電流の記録を行った。

#### (3) オフセット刺激

温痛覚計 (UDH-300-S) を用いて右後肢に温痛刺激を与えた。最も有効なオフセット鎮痛を得るため、原法を参考に、初期温度を 43~49℃、上昇幅を +1~3℃、刺激時間を 5~20 秒など様々に変化させ、熱刺激シーケンスを与えた。

#### (4) 吸入麻酔薬の脊髄鎮痛作用についての実験

当初の研究計画書の内容に含まれてはいないが、以前より取り組んでいた「吸入麻酔薬の脊髄鎮痛機序についての研究」について、薬品や動物購入費用に本研究費の一部を充てたため、ここに合わせて記載する。ラットの手術については概ね (1) (2) と同様であるが、吸入麻酔薬の投与のために気管切開を行い、麻酔用気化器と麻酔薬濃度計を接続した麻酔回路に接続して人工呼吸を行った。吸入麻酔薬としてセボフルランまたはデスフルランを 0.1~2 MAC (MAC; minimum alveolar concentration、最小肺泡濃度) で投与した。ピンチメーターを使用し後肢に一定の痛み刺激を与え応答を記録した。また、Hot/Cold Plate を用いた行動実験も行った。

### 4. 研究成果

### (1) オフセット鎮痛の記録

前述のように種々の温痛覚刺激を行いながら脊髄後角より細胞外記録を行った。刺激条件を様々に変えて記録を行ったが、熱刺激・冷刺激のいずれに対してもオフセット鎮痛は認められなかった。その原因として、機器のペルチエ素子から発生する電気的ノイズである事が特定された。メーカーと協力し、かなりの時間をかけて内部回路の見直しや熱刺激プローベのノイズリダクションなど苦心したが根本的解決には至らなかった。さらに新型コロナウイルスの蔓延による緊急事態宣言などの影響で研究活動が大幅に滞ったため、研究目的を果たせなかった。

### (2) 吸入麻酔薬の脊髄鎮痛作用

セボフルランは 0.1-2MAC の範囲で濃度依存的に疼痛誘起性の活動電位を減少させ（図 1、図 2）、興奮性シナプス後電位の頻度と振幅を減少させた（図 3）。テトロドトキシンの存在下の微小シナプス後電流には影響を与えなかったことから、シナプス前部での一次求心性線維または侵害受容器に作用して興奮性伝達を抑制することが示された。また、抑制性シナプス後電流は用量依存的に減少したため、下行性疼痛抑制系の関与は否定的であった。

しかしデスフルランは濃度に応じて二相性の反応を示した。すなわち、麻酔濃度以下（0.2MAC 以下）では逆説的に疼痛誘起性の活動電位を増加させ（図 1、図 2）、興奮性シナプス後電位の頻度と振幅を増加させ（図 3）、痛覚過敏を来した。微小シナプス後電流には影響しなかったため、シナプス前部で一次求心性線維または侵害受容器に作用して疼痛伝達を促進することが示唆された。麻酔濃度（0.5MAC 以上）のデスフルランは、セボフルランと同様に濃度依存的に興奮性伝達を抑制した（図 1、図 2、図 3）。行動実験でも電気生理記録と同様の傾向が確認された。以上の内容は英文誌に掲載された 5)。

図 1 疼痛誘起性の活動電位の記録 低濃度デスフルランでの増加が特徴的

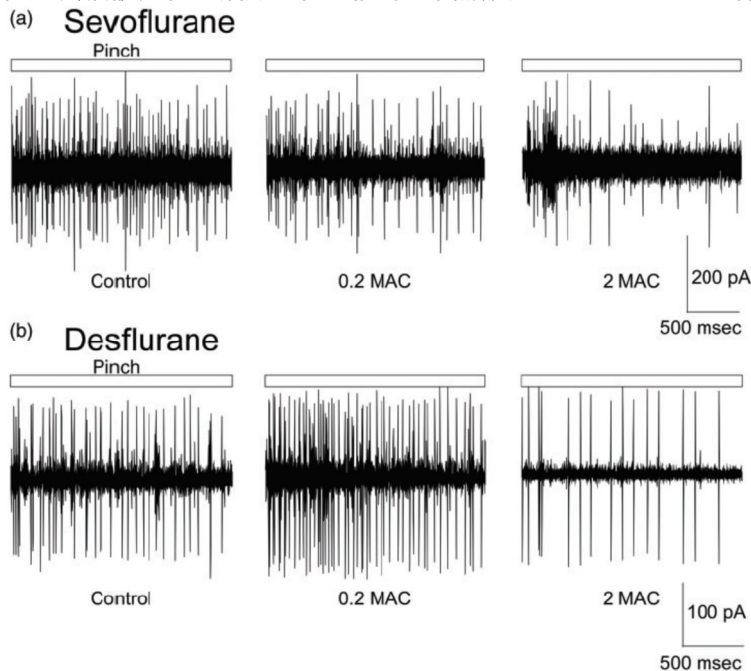


図 2 吸入麻酔薬濃度別の疼痛誘起性活動電位 デスフルランのみ二相性の反応を示す

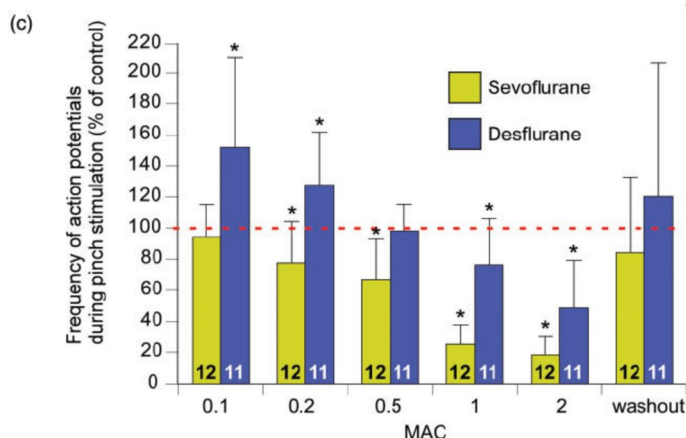
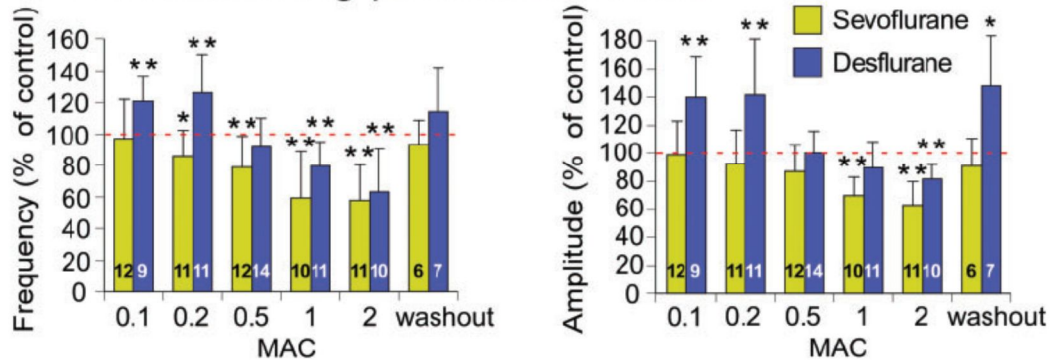


図 3 疼痛誘起性興奮性シナプス後電流 (EPSCs) の頻度と振幅

(c) EPSCs during pinch stimulation



< 引用文献 >

- 1) Grill JD et al. J Neurophysiol 2002; 87: 2205-8.
- 2) Yelle MD et al. J Neurosci 2009; 29: 10264-71.
- 3) Derbyshire SWG et al. Neuroimage 2009; 47: 1002-6.
- 4) Marieke N et al. Anesthesiology 2011; 115: 1063-71.
- 5) Inada Y et al. Mol Pain 2020; 16: 1744806920903149.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Inada Yosuke, Funai Yusuke, Yamasaki Hiroyuki, Mori Takashi, Nishikawa Kiyonobu   | 4. 巻<br>16              |
| 2. 論文標題<br>Effects of sevoflurane and desflurane on the nociceptive responses of substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord dorsal horn: An in vivo patch-clamp analysis  | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Pain  | 6. 最初と最後の頁<br>1-14      |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1177/1744806920903149   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Tsuchiya Masahiko, Terai Hidetomi, Mizutani Koh, Funai Yusuke, Tanaka Katsuaki, Yamada Tokuhiko, Mori Takashi, Nishikawa Kiyonobu   | 4. 巻<br>28              |
| 2. 論文標題<br>General Anesthesia Management for Adult Mucopolysaccharidosis Patients Undergoing Major Spine Surgery  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Medical Principles and Practice   | 6. 最初と最後の頁<br>581 ~ 585 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1159/000503051  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Mukai A, Suehiro K, Kimura A, Funai Y, Matsuura T, Tanaka K, Yamada T, Mori T, Nishikawa K.   | 4. 巻<br>34              |
| 2. 論文標題<br>Comparison of the venous-arterial CO <sub>2</sub> to arterial-venous O <sub>2</sub> content difference ratio with the venous-arterial CO <sub>2</sub> gradient for the predictability of adverse outcomes after cardiac surgery. | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>J Clin Monit Comput   | 6. 最初と最後の頁<br>41-53     |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s10877-019-00286-z   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Yosuke Inada, Yusuke Funai, Takashi Shutou, Takashi Mori, Kiyonobu Nishikawa  | 4. 巻<br>65              |
| 2. 論文標題<br>Microcuff Pediatric Endotracheal Tube Decreases the Tube Exchange Ratio without Increasing Postoperative Complications in Japanese Children: A Single Center Retrospective Cohort Study  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Osaka City Medical Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>109-118   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yosuke Inada, Yusuke Funai, Hiroyuki Yamasaki, Takashi Mori, Kiyonobu Nishikawa                                  |
| 2. 発表標題<br>The effects of desflurane and sevoflurane on nociceptive responses in dorsal horn : in vivo patch-clamp analyses |
| 3. 学会等名<br>Anesthesiology 2018 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|