

平成 22 年 4 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591786
 研究課題名（和文）神経原性疼痛過敏における一酸化窒素 c GMP 系の脊髄での役割に関する研究
 研究課題名（英文）Research for role of NO-cAMP system in spinal cord in neurogenic hyperalgesia
 研究代表者
 加藤 孝澄（KATOH TAKASUMI）
 浜松医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：80204478

研究成果の概要（和文）：

神経原性疼痛過敏における一酸化窒素 c GMP 系の脊髄での役割を調べるために、腹腔側からのアプローチによって神経を縛ることによるモデルを作成した。術野が広くとれるため、従来の背中側からのアプローチよりも容易に神経を縛ることが可能になった。施術が容易であり個体による過敏性の発生には差が少なくなったが、神経付近の交感神経も損傷してしまう可能性が考えられた。その結果神経過敏は生じるが、その程度は背中側からのアプローチほど強くないことが明らかになった。このことは、交感神経の機械的座滅で神経原性疼痛過敏を抑制できる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Neurogenic sharp pain -- in order to investigate the role in the spine of a nitric oxide cGMP system which can be set sensitively, the model by binding a nerve by approach from a abdominal side was created. Since surgical site took widely, it became possible to bind a nerve more easily than the approach from the conventional back side. Although an operation is easy and the difference decreased in generating of the anaphylaxis by the individual, a possibility of also damaging the sympathetic nerve near a nerve was able to be considered. Although oversensitivity was produced as a result, it became clear that it is not so strong as the approach from a back side the extent. This suggested a possibility that neurogenic sharp hyperalgesia could be controlled by mechanical injury of the sympathetic nerve.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：神経原性疼痛過敏 交感神経破壊、神経損傷モデル

1. 研究開始当初の背景

中枢神経では、一酸化窒素 (NO) は、N-methyl-D-aspartate (NMDA) あるいは、非 NMDA 受容体を介して興奮性アミノ酸の刺激に反応して一酸化窒素合成酵素 (NOS) によって産生され、神経伝達物質として働く。詳細は不明であるが、NO-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) の伝達系は、麻酔や鎮痛に関して重要な役割を果たしていることが示唆されている。NMDA-antagonist は、鎮静あるいは鎮痛作用を示すし、NOS の阻害薬は、揮発性麻酔薬の力価の指標である最小肺胞濃度 (MAC) を低下させることが示されており、反対に揮発性麻酔薬は、NMDA 受容体や NOS の活性を低下させることが報告されている。前脳除去ラットや、脊髄以外の中枢神経を選択的に麻酔したヤギを用いた研究で、揮発性麻酔薬の MAC は、主に脊髄における麻酔薬の作用で決定されることがわかってきた。さらに麻薬などの鎮痛薬で MAC は大きく低下することから、脊髄における鎮痛作用が MAC を決定する大きな因子であることが示唆されている。

一方神経因性疼痛の発症、維持に関わる神経機構について精力的に研究が行われ、未だ十分にその機構は解明されていない。末梢神経障害による疼痛過敏の発生は、脊髄後角での侵害刺激に対する反応の量的あるいは質的異常が、最も大きな原因の一つであると考えられている。NO はその主要な受容体である soluble guanylyl cyclase (sGC) のヘム蛋白に作用し、cGMP の産生に影響する。脊髄の cGMP は、侵害刺激の伝導およびその下向性抑制に関与しており、神経原性疼痛の発生に関して重大な働きをしていることが考えられるが、十分な研究は行われていない。

2. 研究の目的

脊髄クモ膜下に sGC の阻害薬であるメチレンブルー、逆に NO ドナーである 3-(2-hydroxy-1-methyl-2-nitroso-hydrazino)-N-methyl-1-propanamine (NOC7) を脊髄クモ膜下に埋め込んだ浸透圧マイクロポンプにより持続的に投与し、sGC の抑制による cGMP の低下と NO ドナーによる cGMP の上昇が脊髄における鎮痛作用に関与していかなる影響を与えるか末梢神経障害による脊髄後角における疼痛刺激によって誘導される c-fos および行動学的反応を観察することにより明らかにすることを目的とする。研究の特色・独創的な点及び予想される結果 NOS 阻害薬を投与して、麻酔作用と脳内の cGMP に関する影響を調べた報告は散見されるが、脊

髄レベルでの cGMP と鎮痛作用に関する報告はない。さらに sGC の阻害薬であるメチレンブルーや NO ドナーである NOC7 を疼痛刺激の一次受容部位である脊髄レベルで投与し、その鎮痛作用に対する影響に関する報告は見当たらない。末梢神経障害による神経因性疼痛及び知覚過敏は数週間以上に続くため、従来行われている単回投与による方法よりも、浸透圧マイクロポンプによる持続投与がより優れていると考えられる。神経因性疼痛の発生に関与する疼痛過敏に関しては、下向性抑制の関与はほとんど議論されていない。メチレンブルーは、sGC を阻害することにより脊髄における cGMP 濃度の低下を引き起こすことが考えられる。メチレンブルーの投与量に依存して疼痛閾値が上昇するであろうが、NOS 阻害薬で NO の産生を抑制させる場合と同様に、閾値の上昇に関し天井効果が現れることも考えられる。脊髄後角での c-fos の誘導は、メチレンブルーの投与により抑制されると考えられるが、この抑制の程度が閾値の上昇と相関するかは予測できない。これは、痛みに伴う行動の程度と c-fos の発現量の動きが必ずしも一致しないという報告もあるからである。NO ドナー (NOC7) の投与は、メチレンブルー投与の場合と逆に投与量に依存して疼痛閾値が低下すると予測される。脊髄後角での c-fos の誘導に関しては、これは先に述べた理由により予測が困難である。

3. 研究の方法

(1) 神経原性疼痛過敏モデルの作成

ラット腹腔アプローチ-交感神経幹切除の効果-方法 7 週齢 SD ラット n=9, 術者:S (全例) Sun Ho Kim, et al. Effect of sympathectomy on a rat model of peripheral neuropathy. Pain, 55(1993)85-92 に従い、術後 1 週間で交感神経幹を切除する。n=3: 腹腔アプローチ通常モデル (Group A) n=3: 腹腔アプローチ通常モデル + 1 週間目にシヤム開腹 (Group B) n=3: 腹腔アプローチ通常モデル + 1 週間目に交感神経幹切除 (Group C)

(2) 前年度の研究により、経腹腔アプローチは術野が広くとれるため、従来のチャンの SNL モデルより L5 神経の結紮は容易であるが、十分に注意して手術しても一定の割合で交感神経幹に障害を与えてしまう個体が出てしまう可能性が示唆された。神経原性疼痛モデルで、脊髄交感神経の損傷により疼痛反応が抑制される可能性があり、L5 神経の結紮より交感神経幹に障害を与える可能性が低くなる可能性を求めて、L4 神経の結紮を行う

モデル作成した。【方法】7週齢 SD ラット n=9。Effect of sympathectomy on a rat model of periferal neuropathy. Pain, 55(1993)85-92に従い、術後1週間で交感神経幹を切除した n=3: 腹腔アプローチ通常モデル(Group A)n=3: 腹腔アプローチ通常モデル+1週間目にシヤム開腹(Group B)n=3: 腹腔アプローチ通常モデル+1週間目に交感神経幹切除(Group C)

(3)当初の研究実計画では、浸透圧マイクロポンプにより持続的に投与し、sGCの抑制によるcGMPの低下が脊髄における鎮痛作用に関与していかなる影響を与えるか観察する予定であったが、浸透圧マイクロポンプの流量の安定性に問題があり、より安定した流量を得られる可能性があるポンプが必要となった。新たに機械式注入ポンプの流量の安定性を調べる実験を行った。

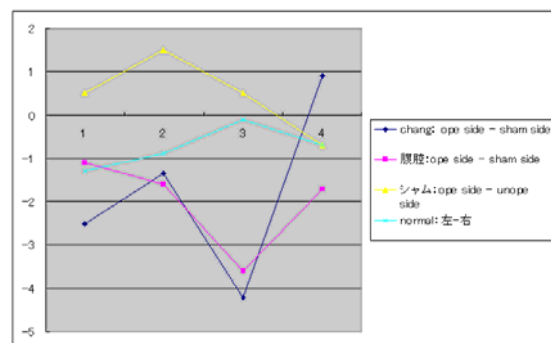
①脊髄クモ膜下投与メチレンブルーの神経原性疼痛、フォルマリン刺激c-fos発現、および脊髄内cGMP濃度に対する影響(In Vivo) SDラットを3群に分ける。脊髄L3/4クモ膜下に浸透圧マイクロポンプを挿入する。I群クモ膜下メチレンブルー投与、神経原性疼痛モデル手術(Chung)、脊髄後角c-fos測定 II群クモ膜下メチレンブルー投与、神経原性疼痛モデル擬似手術 脊髄L3/4 cGMP濃度測定 III群メチレンブルーなし 神経原性疼痛モデル手術(Chung) 脊髄L3/4 cGMP濃度測定 I群 (n=40) コントロール疼痛閾値。メチレンブルー(100 μ g)投与を浸透圧マイクロポンプで1週間かけて注入。5%フォルマリン(50 μ L)後足皮下注 30分後Zamboni固定液で還流固定。脊髄後角c-fos陽性細胞の計数を行う。II群 (n=40)メチレンブルー(100 μ g)投与を浸透圧マイクロポンプで1週間かけて注入に、microwave照射し脊髄取り出しホモゲナイズしcGMP濃度測定を行う。III群 (n=40)神経原性疼痛モデル手術(Chung)。プラセボ生理的食塩水を浸透圧マイクロポンプで1週間かけて注入しmicrowave照射し脊髄取り出しホモゲナイズしcGMP濃度測定を行う。脊髄後角c-fos陽性細胞の計数: polyclonal antibodyを使用しABC法で免疫染色する。脊髄後角の灰白質を4分(lamina I-II、III-IV、V-VI、VII-X)し各々c-fos陽性細胞を計数する。cGMP濃度測定: 酵素免疫法(キットRPN 226, Amersham Life Sciences)で測定する。

4. 研究成果

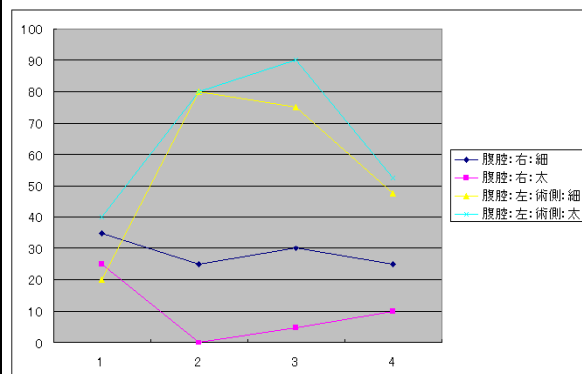
(1)Sun Ho Kim, et al. Pain, 55(1993)85-92によれば、交感神経幹を切除するとピタリと痛みが治まる。今回は症例8のみ同様の経過

をたどったが、論文の程度には痛みが低下しなかったため経腹腔アプローチは術野が広くとれるため、従来のチャンのSNLモデルよりL5神経の結紮は容易であるが、十分に注意して手術しても一定の割合で交感神経幹に障害を与えてしまう個体が出てしまう可能性がある。神経原性疼痛モデルで、脊髄交感神経の損傷により疼痛反応が抑制される可能性があり、疼痛モデルの再考を迫られた。

(2)前年度の研究により、経腹腔アプローチは術野が広くとれるため、従来のチャンのSNLモデルよりL5神経の結紮は容易であるが、十分に注意して手術しても一定の割合で交感神経幹に障害を与えてしまう個体が出てしまう可能性が示唆された。神経原性疼痛モデルで、脊髄交感神経の損傷により疼痛反応が抑制される可能性があり、L5神経の結紮より交感神経幹に障害を与える可能性が低くなる可能性を求めて、L4神経の結紮を行うモデル作成した。

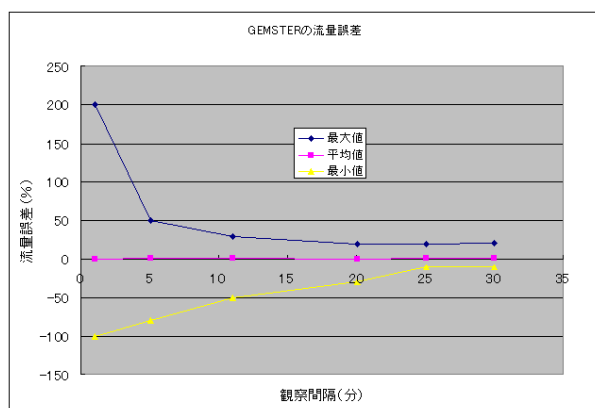


L5神経の結紮の場合より、神経過敏性の個体差が少なくなった傾向はあるが、L4神経の結紮では全体的に神経過敏の程度は低なった。これにより手術手技は容易であるが、手術は上手くいってもL5神経ほどの神経



疼痛過敏性が得られない可能性がわかった。

(3)浸透圧マイクロポンプにより持続的に投与し、sGCの抑制によるcGMPの低下が脊髄における鎮痛作用に関与していかなる影響を与えるか観察する予定であったが、浸透圧マイクロポンプの流量の安定性に問題があり、より安定した流量を得られる可能性があるポンプが必要となった。新たに機械式注入ポンプの流量の安定性を調べる実験を行い、十分に使用可能な安定性を有していることが確認された。



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1件)

①Yu S, Katoh T, Okada H, Makino H, Mimuro S, Sato S. Landiolol does not enhance the effect of ischemic preconditioning in isolated rat hearts. J Anesth. Published online 19 January 2010 査読あり

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 孝澄 (KATOH TAKASUMI)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80204478

(2)研究分担者