

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19591814
 研究課題名 (和文) ニューロカインによる末梢侵害受容機構の修飾
 研究課題名 (英文) Modulation of Peripheral Nociceptor Activity by Neurokinins
 研究代表者 杉浦 健之 (SUGIURA TAKESHI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：20295611

研究成果の概要：

健常ラットを用いた実験では、感覚神経を支持している細胞が放出する神経栄養因子のひとつが、熱疼痛閾値を低下させている可能性が示唆された。また、侵害刺激後にドップラー血流計で血流変化をとらえることができ、新たな末梢神経機能解析方法として疼痛研究領域で応用が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
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： 麻酔・蘇生学

キーワード：ニューロカイン、カプサイシン、後根神経節、侵害受容器

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛に苦しむ患者の数は多く、痛みが患者の生活の質を低下させるばかりでなく、社会的にも経済的損失を招いている。さらに、その病態の複雑さゆえ、未だ慢性疼痛の治療はしばしば困難である。このような状況をふまえ、アメリカ合衆国では2000年代に入りDecade of Pain Control and Researchを宣言し、痛みの研究・治療が集学的に進められた。その結果、劇的な研究成果が多く挙げられ、“炎症や神経損傷に伴い末梢侵害受容神経が可塑的に変化し、痛覚過敏を形成する

一機序となる”ことが分子レベルで解明されたことは、たいへん大きな成果のひとつである。

神経損傷モデルにおける痛覚過敏については数多くの報告があり、痛覚過敏における侵害受容器の感作の関与は明らかである。しかし、その中で、一次感覚神経や脊髄後角神経、シナプスなどの研究に比べ、グリアとの関係に焦点を当てている研究は、世界的にみてもまだまだ数少ない。

2. 研究の目的

最近、神経因性疼痛の原因のひとつとして、グリアの関与が注目されてきており、グリアが侵害受容器の感作に影響を与えている可能性に着目した。

末梢神経では髄鞘の有無にかかわらず、シュワン細胞が神経を栄養、支持している。シュワン細胞は線維芽細胞増殖因子 (FGF) を初め、多くの栄養因子 (ニューロトロフィン) を産生し、損傷した神経線維に働きかけ、生存と再生に作用することがわかっている。

すでに神経栄養因子である神経成長因子 (NGF) や脳由来神経栄養因子 (BDNF) が、神経損傷モデルにおいて神経の過敏性亢進にかかわるとする報告もある。しかし、シュワン細胞が産生する毛様体神経栄養因子 (CNTF) , LIF, IL-6に関しては一次感覚神経への作用は未知の部分が多く、痛みにかかわる研究はわれわれの知る限り見当たらない。

そこで、本研究では、神経因性疼痛において、グリア (シュワン細胞) から分泌されるニューロカイン、特にCNTFを含むIL-6スーパーファミリーの侵害受容器に対する働きを研究することを目的とし、疼痛研究の中で新たな着目点を持っていると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 足底皮膚・筋に分布する神経の同定

麻酔下において、マウス(20-30g)の足底部分に、DMSOで溶解したdicarbocyanine dye DiIを27G針を用いて2 μ l注入する。DiIが脊髄後根神経節細胞まで逆向性輸送されるまで、1週間程度待つ。

1週間以降に脊髄後根神経節(L4-6)を取り出し、コラゲナーゼ、トリプシン処理後、神経細胞を単離培養し、細胞体に逆向性軸索移動したDiIを特殊フィルターを用いた顕微鏡下で観察し、足底部分に分布する一次求心神経を同定する。

応募者はすでに特定の臓器(消化管)に分布する感覚神経の同定方法を用いた実験系は確立しており(Sugiura et al., J Neurosci 2004, 2005)、これを応用した。

細胞培養方法

麻酔下のマウスを断頭し、すばやく両側のL4-6DRGを取り出す。DRGを冷やした培養液中でメス刃を用いて細かく刻み、コラゲナーゼ(type 1A, 2 mg/ml), トリプシン(type III, 1 mg/ml)と3 mM塩化カルシウムを含有したGibco®Neuro-basal A Media (Invitrogen, Carlsbad, CA)の中に入れて、37°C、50分間培養した。DRG断片を、シリコンコーティングされたパスツールピペットを用いて、やさしく機械的に分離したのち、800 rpmで5分間遠心分離した。単離したDRGニューロンは5% B27TM Supplement, 0.25% L-glutamine (200 mM)と1% penicillin-streptomycinを含有したNeurobasal-Aを用いて、poly-D-lysine コーティングしたカバースリップ上で、37°Cの培養器内で2-10時間培養した。

(2) パッチクランプ記録による侵害受容器の性質

培養後根神経節細胞を用いて、化学・侵害熱刺激に対する反応を調べた。皮膚一次求心神経におけるカプサイシン受容体の性質を調べる。応募者の所属する麻酔・危機管理学講

座には、すでに独自のパッチクランプ記録のセットアップを保有しており、電気生理学実験は現在稼動中のものを使用した。

パッチ電極を満たす、細胞内溶液の組成 (in mmol / L) は、KCl 100, EGTA 10, HEPES 40, MgCl₂ 5, と Na₂ATP 1, pH 7.4 に調整し、細胞外溶液の組成 (in mmol / L) は、NaCl 128, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 5, glucose 5.55, と HEPES 20 を用いた。カルシウム除去液を作製する場合、CaCl₂ の代わりに 5 mM EGTA を用いた。薬液は、記録細胞の約 150 μm 付近から投与した。薬液は急速投与装置 (SF-77B, Warner Instruments Inc, Hamden, CT) を用いて、20 ms 以内に変更した。

温度刺激の場合、チャンバー内の温度を、約 1.0-1.5 °C/s. の速度で変更した。温度計 (±0.1 °C) は細胞から約 100 μm の距離で測定した。

パッチクランプ記録は Axopatch 200B アンプ (Axon Instruments, Foster City, CA) を使用して行った。また、すべての実験は室温で行っている。

(3) CNTF を投与した疼痛行動学実験

麻酔下において、足底部に CNTF と DiI を注入したマウスを使用する。反対側には、Sham 手術の外科処置を加え、基剤のみを投与する。

行動実験は、すべて室温で行った。ケージに移したマウスを、環境に落ち着くまで 10 分程度慣らした。研究室にあるフォンフライヘアーを用いた機械刺激に対する反応と、ホットプレート式鎮痛効果測定装置 (室町機械、MK-350B) を用いて、熱刺激による反応を調べた。

(4) 侵害受容神経における神経分泌能解析

新たに末梢神経の神経伝達物質分泌能に着目し、末梢神経分泌機能の解析を行った。

末梢侵害受容神経は、情報の伝達のほかに神経分泌機能を有しているため、神経過敏の状態では、分泌機能も変化しているのではないかと考え、侵害刺激に対してドップラー血流計で皮膚血流量を測定し実験を行った。

4. 研究成果

(1) 逆行性染色法は、内臓感覚神経と同様に足底皮膚に分布する神経でも行うことができ、特殊フィルターを用いて確認された。

(2) マウス培養神経からのパッチクランプ記録では、酸に対する応答パターンが内臓神経と体性神経では異なることから、異なるイオンチャンネルがかかわることが示唆される。

(3) CNTF 投与後に、温熱刺激に対して疼痛閾値の低下を引き起こす可能性が示唆された。一方、機械刺激では閾値の変化を捉えることはできなかった。

(4) 侵害刺激後にドップラー血流計で測定される血流増加を認め、同時に測定した疼痛スケールも増加していた。

比較的低侵襲で客観的に末梢神経機能の状態が解析でき、新たな末梢神経機能解析方法として期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

杉浦健之、森田正人、藤田義人、笹野信子、笹野寛、春原啓一、祖父江和哉、健常皮膚におけるレーザー血流計を用いたカプサイシン誘導性末梢神経分泌機能検査、日本ペインクリニック学会、2008年7月20日 福岡
[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 健之 (SUGIURA TAKESHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20295611

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者