

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19603014
 研究課題名（和文） 虚血性筋肉痛を伝える侵害受容性感覚神経の電気生理学的解析
 研究課題名（英文） Electrophysiological Analysis in Nociceptive Sensory Neurons that Mediate Muscle Ischemic Pain
 研究代表者
 八木 淳一（Yagi Junichi）
 杏林大学・医学部・講師
 研究者番号：90265760

研究成果の概要：

筋肉内部の血流が滞った状態（虚血状態）で筋肉を収縮させると、強い痛みが生じる。この時、痛みを伝える感覚神経は、筋肉組織で起こるいかなる変化を感知して興奮するのであろうか？ そこで、筋肉を支配する感覚神経の性質を詳しく調べるため、ラットを用いた新しい実験方法を開発した。これまでに、痛みを伝える感覚神経の一部は、虚血による筋肉の「酸性化」を感知する可能性があることがわかった。今後も実験を継続し、虚血性筋肉痛の成り立ちを解明することが目標である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：痛覚学

キーワード：神経科学、痛み、後根神経節ニューロン、In Vivo Patch Clamp、酸感受性、
虚血性筋収縮、閉塞性動脈硬化症

1. 研究開始当初の背景

(1) 虚血下で骨格筋を収縮させると強い痛みが生じる。「閉塞性動脈硬化症」、「Buerger病」で起こる間歇性跛行の痛みがその典型である。しかしながら、虚血性筋収縮時の痛み

の発生機序については、これまで有用な実験法がなく、その詳細は未だ明らかにされていない。

(2) 本研究代表者は、脊髄後根神経節

(DRG) ニューロンにおける侵害情報の受容と符号化のメカニズムを「生体レベル」で説明することを目的とし、「ラット in vivo 標本による DRG ニューロンホールセルパッチクランプ法」を独自に開発した。第一段階として「皮膚」を支配する DRG ニューロンの様々な性質（受容野応答特性、受容体・イオンチャネルの発現パターン、軸索の伝導速度、活動電位の形状、解剖学的性質等）を統合的に解析し、DRG ニューロンの系統的分類を行ってきた（萌芽研究, 平成 17-18 年；日誌, Vol. 65, 2003）。

2. 研究の目的

骨格筋を支配する DRG ニューロン（骨格筋 DRG ニューロン）の一部には、酸感受性イオンチャネル 3（ASIC3）が発現している。そこで、本研究代表者は、「虚血時、ASIC3 を発現する骨格筋 DRG ニューロンが、虚血による細胞外液の組織酸性化を感知し、虚血性筋収縮時の痛みを起す」との仮説立てた。この問題を解決するには、虚血性筋収縮時に筋内部で起こる細胞外環境変化を再現し、その時の骨格筋 DRG ニューロンの活動を記録する必要がある。本研究において、「ラット In vivo 標本による DRG ニューロンホールセルパッチクランプ法」を、骨格筋 DRG ニューロンに適用し、骨格筋 DRG ニューロンの性質を統合的に解析する。さらに、虚血性筋収縮を実験的に再現し、上記の仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋 DRG ニューロンの標識

骨格筋 DRG ニューロンの細胞体を標識する目的で、予め骨格筋に神経トレーサー DiI を以下の方法で注入した。まず、ラット (Sprague Dawley 系、雌、6-7 週齢) をネンブタール (50 mg/kg, ip.) で麻酔し、左後肢の前脛骨筋上の皮膚を切開した。DiI (2.5 mg/ml) を前脛骨筋内 (深さ 1-2 mm) に 5 μ l 注入した。切開した皮膚を縫合し、ラットを回復させた。

(2) 麻酔下全動物標本の作成

DiI 注入から 3-6 週間後、記録を行った。ラットをネンブタールの腹腔内投与 (50

mg/kg) によって麻酔し、左側の頸静脈にカニューレを留置した。術中および記録時、心電図、直腸温度ならびに末梢循環状態をモニターして、麻酔深度が浅い場合は、適宜、ネンブタールを静脈内投与 (5 mg/kg) した。十分な麻酔深度下で、椎弓切除を行い、左側の L4 レベルの DRG (L4-DRG) を露出した。さらに、L4-DRG に続く坐骨神経を膝関節部まで露出し、側枝を切断しながら剥離して 1 本の神経幹とした。また、膝関節部で、腓腹神経と脛骨神経を切断し、前脛骨筋へ向かう腓骨神経のみを残した。坐骨神経の電気刺激で前脛骨筋を収縮させた時、スムーズな足の背屈が起こるようにするためである。DRG を取り巻く神経上膜を除去し、L4-DRG 中枢端の前根と後根を切除した。ラットを正立顕微鏡のステージにマウントした後、L4-DRG をステージ上のチェムバー内に固定した。チェムバー内は、95% O₂、5% CO₂ でバブルした人工脳脊髄液 (ACSF、組成 mM; 125 NaCl, 3.8 KCl, 2.0 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 glucose) (pH = 7.4) を灌流した (2-3 ml/min)。坐骨神経は、チェムバーに接続したプラスチック製の細長い半円柱容器に横たえ、固形パラフィンとワセリンの混合物で覆った。この容器の内側には、2 組の銀線双極電極を沿わせてあり、坐骨神経の電気刺激を行うことができる。左側の下腿の皮膚を除去し、下腿に張り出した大腿二頭の一部を除去して、膝関節部と前脛骨筋を露出した (図 1)。

(3) 骨格筋 DRG ニューロンからのホールセルパッチクランプ記録

落射蛍光下で DiI 陽性ニューロンを探し、記録する DRG ニューロンを決めた。ターゲットとなる DRG ニューロン周囲に、コラゲナーゼ (5-10 mg/ml) をピペットから局所投与し (10-30 分間)、結合組織を軟化した。陽圧をかけた記録用ピペット先端で DRG ニューロンの細胞体を覆う Satellite 細胞を破った後、DRG ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行った。記録用ピペット内の溶液の組成 (mM) は、122 K gluconate, 20 KCl, 5 NaCl, 0.01 CaCl₂, 5 MgCl₂, 1 EGTA, 5 HEPES, 2 Na₂ATP, 0.2 Na₃GTP (pH = 7.2) であった。

(4) 虚血と虚血性筋収縮の実験

骨格筋が虚血に陥った場合、さらには、虚血下で筋収縮した場合、骨格筋 DRG ニューロ

ンが興奮するかどうかを調べるため、以下の実験を行った。まず、左足関節が動かぬよう、足首を支柱に適度な強さで固定した。前脛骨筋を虚血状態にするため、腓骨神経を避けながら膝の直下をたこ糸で結紮した。前脛骨筋が虚血に陥ったことを確認するために、血流計のプローブを前脛骨筋の表面に貼付けて、この部位の血流量を測定した。血流が低下して虚血に陥った状態で1分経過したところで、虚血状態を保持したまま、坐骨神経を50 Hzで電気刺激して、前脛骨筋が等尺性の強縮を起こすようにした。

本実験の計画は、杏林大学医学部動物実験委員会により承認されている。

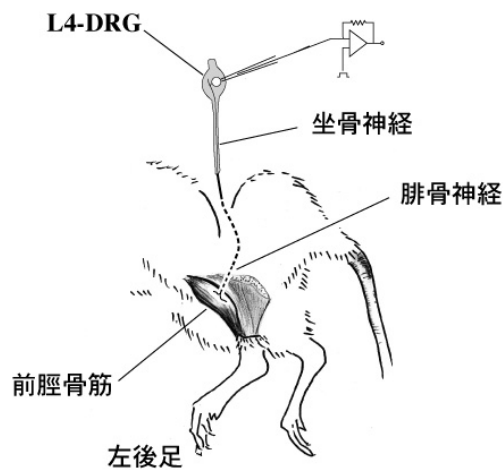


図1 実験のセットアップ

4. 研究成果

(1) 骨格筋 DRG ニューロンの電気生理学的性質

麻酔下のラットにおいて骨格筋 DRG ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行う新規の技法を開発した。今回の実験で、小型及び中型（直径：26～33 mm）の骨格筋 DRG ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を試み、これまでにC線維を有する DRG ニューロン（C-type DRG ニューロン）2種類と、A δ 線維を有する DRG ニューロン（A δ -type DRG ニューロン）1種類を記録した。Von Frey フィラメントで筋肉上の受容野を刺激するといずれも強い刺激に応答する高閾値型であった。受容野の大きさはいずれも小さく、スポット状か、比較的大きいものでも直径2, 3 mm 程度であった。記録した8個のC-type

DRG ニューロン中4個は、温刺激に応じた（応答閾値 39～41℃）。すなわち、C-type では、高閾値機械受容型（C-HTM; n = 4）と温受容-高閾値機械受容型（C-Warm-HTM; n = 4）、A δ -type では、高閾値機械受容型（A δ -HTM; n = 2）を記録した。軸索の伝導速度は、C-HTM では、0.46～0.66 m/s (mean \pm SE; 0.56 \pm 0.04 m/s)、C-Warm-HTM では、0.42～0.70 m/s (0.54 \pm 0.06 m/s)、A δ -HTM では、3.6 m/s と 7.2 m/s であった。また、C-HTM と A δ -HTM は、刺激が加わらないかぎり放電することはなかったが、C-Warm-HTM では、1分間に数発の自発放電が認められた。C-HTM と C-Warm-HTM の活動電位の形状は、幅が広く、下降相に顕著な屈折点が認められた（図2Aa）。A δ -HTM の活動電位は、C-type のものよりも幅が狭かった。次に、電位固定モードで過分極パルス（-60 mV から-120 mV へのステップパルス）を与えて、発生するイオン電流のパターン（current signature）を分析した。C-type では、緩徐な過分極誘発内向き電流（H 電流）がわずかに生じ（図2Ab）（C-HTM; 73.3 \pm 20.7 pA, C-Warm-HTM; 92.8 \pm 32.4 pA）、A δ -HTM では、C-type より大きな H 電流が発生した（634 pA と 325 pA）。

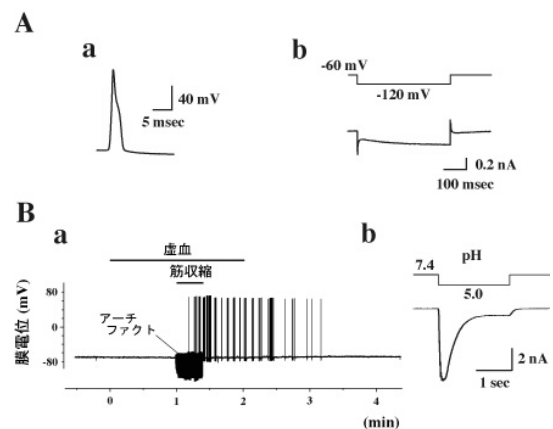


図2 骨格筋 DRG ニューロンからの記録例

(2) 虚血性筋収縮時に興奮する骨格筋 DRG ニューロン

C-type の骨格筋 DRG ニューロンにおいて、その膜電位を記録しながら、前脛骨筋を虚血状態にし、さらに虚血下で筋収縮を起こす実験を行った。C-HTM 4個中3個、C-Warm-HTM 4個中3個が虚血性筋収縮下で興奮した（図

2Ba)。虚血性筋収縮時に興奮した骨格筋 DRG ニューロンの細胞体に、電位固定モードで酸性液 (pH 5) を投与すると、一過性の内向き電流が記録された (図 2Bb)。電流応答の脱感作の時定数が 1 秒以下であることから、この電流応答は、サブユニットの一つに ASIC3 を含む ASIC の活性化による Na⁺電流であると推察された。

(3) まとめと考察

今回の実験で記録した骨格筋 DRG ニューロンは、1) C 線維を有する、2) HTM タイプ、3) 活動電位の幅が広い、4) わずかな H 電流を生じる、などの特性から侵害受容性ニューロンと考えられた。また、これらのニューロンの多くが虚血性筋収縮時に放電した。したがって、この放電が虚血性筋収縮時の痛みを伝えるシグナルと考えられる。さらに、虚血性筋収縮時に興奮する骨格筋 DRG ニューロンの細胞体には、ASIC3 が発現していることが示唆された。ASIC3 は、ASIC のサブタイプの中で酸に対して最も感度が高く、細胞外のわずかな酸性化 (pH 7.0) を感知し、持続的な内向き Na⁺電流を発生することでニューロンを脱分極させることがわかっている (Yagi ら, *Cir. Res.*, 2006)。よって、当初の仮説通り、ASIC3 が虚血性筋収縮時の組織酸性化を感知して骨格筋 DRG ニューロンを興奮させる可能性が示された。しかし、現段階では、記録の例数も少なく、虚血性筋収縮時の ASIC3 の活性化と骨格筋 DRG ニューロンの放電を結びつける直接的証拠は得られていない。今後の戦略として、1) 骨格筋 DRG ニューロンの系統的分類 (どのタイプが虚血性筋収縮時に興奮するのか)、2) ASIC3 の発現量あるいは虚血性筋収縮時の筋内部の pH 値が、骨格筋 DRG ニューロンの興奮とどのような相関関係にあるのか、3) 骨格筋 DRG ニューロンの受容野に、pH 緩衝液、ASIC3 阻害剤を注入した場合に、虚血性筋収縮時の骨格筋 DRG ニューロンの反応がどのように変化するのか、等を分析することにより、虚血性筋収縮時の侵害情報処理機構の解明を目指す。

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)

- ① 八木淳一、小林靖、平井直樹、麻酔下全動物標本による「骨格筋 DRG ニューロン」のホールセルパッチクランプ記録、*Pain Research*、(印刷中)、査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 八木淳一、虚血性筋肉痛における酸感受性イオンチャンネル 3 (ASIC3) の役割、第 37 回杏林医学会総会、2008 年 11 月 15 日、東京
- ② J. Yagi: In vivo patch-clamp recordings of rat DRG neurons, The Spring Pain Conference 2008, Apr. 26th - May 3rd 2008, Grand Cayman.
- ③ J. Yagi, Y. Kobayashi and N. Hirai Hirai, In vivo patch clamp recording from musculoskeletal DRG neurons in rats. 12th World congress on pain, Scotland, Aug. 17-22 2008, Glasgow.
- ④ 八木淳一、小林靖、平井直樹：麻酔下全動物標本による「骨格筋 DRG ニューロン」のホールセルパッチクランプ記録、第 30 回日本疼痛学会、2008 年 7 月 19-20 日、福岡
- ⑤ J. Yagi, Y. Kobayashi and N. Hirai: Classification of Cutaneous DRG neurons by In Vivo Patch Clamp Recording, The 3rd Asian Pain Symposium, Jul. 18-19 2008, Fukuoka.

[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〕

- ① The 3rd Asian Pain Symposium, Jul. 18-19
2008, Fukuokaにて、「ポスター賞」受賞
- ② 第30回日本疼痛学会、2008年7月19-20
日、福岡にて、「優秀演題」に選出される。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 淳一 (YAGI JUNICHI)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：90265760

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし