

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592174

研究課題名(和文) 腰椎椎間孔外側病変ならびにダブルクラッシュ病変における疼痛メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pain mechanisms in the extra-foraminal and double crush lesions of the L5 spinal nerve

研究代表者

橋爪 洋 (Hashizume, Hiroshi)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10326382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはラットのL5神経を後根神経節(DRG)よりも中枢で結紮するモデル、DRGで結紮するモデル、DRGの末梢で結紮するモデル、前述の2部位を結紮するダブルクラッシュモデルを作成し、疼痛回避反応、脊髄後角細胞内電位と組織所見を検討した。結果、DRG結紮モデルにおいて痛みが最も強く、脊髄後角でのミクログリア発現数も最多なこと、DRGを含むダブルクラッシュモデルはDRG単独損傷モデルと疼痛強度に差がないことを明らかにした。さらにDRG結紮モデルにおいて腰部交感神経を切除すると痛みが抑制されることを見出した。本研究結果は臨床的に最も多いL5神経障害の疼痛メカニズムを理解する上で重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：The lumbar radiculopathy rat model was created by ligating the dorsal root ganglia (DRG) of the L5 spinal nerve, 2 mm proximal to the DRG or 2 mm distal to the DRG, and the two sites of them (i.e. double crush) with 6.0 silk. We examined the degree of the radiculopathy using mechanical sensitivity, immunohistochemistry and in vivo patch-clamp recordings, 7 days after surgery. The rats injured the DRG was most sensitive, and the rats injured distal to the DRG were more sensitive than those rats injured proximal to the DRG in the behavioral study. The number of activated microglia in laminae I-II of the L5 segmental level and the amplitudes and frequencies of EPSC in the rats increased in the same order with the behavioral study. There was no significant difference between the double crush models and the DRG injured model. Moreover, we found that lumbar sympathectomy decreased the mechanical sensitivity and the frequencies of EPSC in the DRG injured model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：神経障害性疼痛 動物モデル 後根神経節 脊髄後角 パッチクランプ法 腰部脊柱管狭窄症 椎間孔部障害

1. 研究開始当初の背景

有病率が高齢者の 20% を占める腰部脊柱管狭窄症の中で、神経根型の臨床症状は脊柱管内病変（外側陥凹部病変）によって腰髄神経が圧迫されて生じることが最も多い。しかしながら脊柱管外病変（椎間孔部・椎間孔外側病変）も 5 ~ 20% 存在する。さらに脊柱管内病変と脊柱管外側病変が合併する場合（ダブルクラッシュ病変）もある。脊柱管外病変やダブルクラッシュ病変は画像診断が難しいことに加え、神経痛の発症メカニズムに不明な点が多いことから、見落とされやすく、術後成績不良の第一要因となっている。

2. 研究の目的

本研究はラットのモデルを用いて上記病変の発症機序を解明し、臨床に還元すること、具体的には 3 年間で 外側病変、ダブルクラッシュ病変の動物モデルを確立、脊髄後角ならびに後根神経節における組織学的変化を遺伝子レベルまで観察、in vivo パッチクランプ法を用いて脊髄後角細胞の電気生理学的変化を観察、することによって外側病変ならびにダブルクラッシュ病変の疼痛メカニズムを臨床への還元が可能なレベルまで解明することを到達目標とした。

3. 研究の方法

A. 傷害部位の異なる L5 神経障害性疼痛モデルの作成と疼痛発現強度の検討 5 週齢 Sprague-Dawley ラットを使用した。右 L5 laminectomy, foraminotomy を行い、右 L5 神経根全体を露出した。6-0 絹糸で DRG より 2mm 中枢側を結紮した群を 群, DRG を結紮した群を 群, DRG の 2mm 末梢側を結紮した群を 群とランダムに選択し処置した。処置後 7 日で、10g von Frey hair 10 回刺激による逃避回数, in vivo patch clamp 法による L5 髄節の脊髄後角の興奮性シナプス後電流 (EPSC) の頻度, 振幅, L5 髄節の脊髄後角における活性化ミクログリア発現数 (抗 Iba 1 抗体による免疫組織染色) を解析した。

B. ダブルクラッシュ病変モデルの作成と疼痛メカニズムの解明

DRG より近位 2mm 中枢部位と DRG を同時に結紮した群を 群, DRG と DRG より遠位 2mm を同時に結紮した群を 群としてランダムに選択し処置した。処置後 7 日で, in vivo patch clamp 法による L5 髄節の脊髄後角の EPSC の頻度, 振幅, L5 髄節の脊髄後角における活性化ミクログリア発現数 (抗 Iba 1 抗体による免疫組織染色) を調べ, その結果を 群 (; DRG 結紮群) と比較した。

C. L5 DRG 結紮モデルにおける疼痛増強メカニズムの解明

神経障害性疼痛の発症・増強に交感神経が関与しているかどうか, 脊髄 in vivo パッチクランプ法を用いて電気生理学的に解析

した。神経障害性疼痛モデルとして SD 系雄性ラットに第 5 腰神経後根神経節結紮術を施行したモデル (sham 群) を作成した。さらに第 5 腰神経後根神経節結紮術に腰部交感神経切除を加えたモデル (交感神経節切除群) を作成し, 両群における腰部脊髄膠様質細胞の EPSC を解析した。

4. 研究成果

A. 10g von Frey hair を用いた疼痛誘発試験では 群 3.9 ± 0.5 回, 群 7.9 ± 0.5 回, 群 6.2 ± 0.3 回であった ($n=10$)。EPSC の頻度は 群 14.6 ± 1.7 Hz, 群 19.2 ± 2.0 Hz, 群 17.3 ± 2.1 Hz, 振幅は 群 19.8 ± 1.6 pA, 群 37.7 ± 2.2 pA, 群 28.3 ± 2.4 pA であった ($n=10$)。L5 髄節の脊髄後角における活性化ミクログリアの発現数は, 群 202 ± 8.0 , 群 354 ± 8.1 , 群 292 ± 6.6 であった ($n=5$)。統計処理したところ (ANOVA, Tukey-Kramer 法), いずれの項目においても有意差を認め, その強度は 群, 群, 群の順となった。

B. EPSC の頻度は 群 23.1 ± 1.6 Hz, 群 19.2 ± 2.0 Hz, 振幅は 群 39.2 ± 2.9 pA, 群 40.2 ± 2.3 pA であった ($n=10$)。L5 髄節の脊髄後角における活性化ミクログリアの発現数は, 群 366 ± 9.11 , 群 376 ± 11.7 であった ($n=5$)。統計処理したところ (ANOVA, Tukey-Kramer 法), 群に比べ 群, 群で EPSC の頻度, 振幅ともに高く, 活性化ミクログリアの発現数は多い傾向にあったが, 統計学的有意差は認められなかった。

C. 交感神経節切除群は sham 群と比べ EPSC の振幅には有意差は認められなかったが, 頻度は優位な減少を認めた。これらの結果から, 腰部交感神経は DRG 結紮による神経障害性疼痛に対して疼痛を増強させる働きがあることがわかった。

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 4 件)

1. Iwasaki H, Yoshida M, Yamada H, Hashizume H, Minamide A, Nakagawa Y, Kawai M, Tsutsui S. A new electrophysiological method for the diagnosis of extraforaminal stenosis at L5-s1. Asian Spine J. 2014 Apr;8(2):145-9. doi:10.4184/asj.2014.8.2.145. (査読有)
2. Nishio N, Taniguchi W, Sugimura YK, Takiguchi N, Yamanaka M, Kiyoyuki Y, Yamada H, Miyazaki N, Yoshida M,

Nakatsuka T. Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. *Neuroscience*. 2013 Sep 5;247:201-12.

doi:10.1016/j.neuroscience.2013.05.023. (査読有)

3. Yamada H, Yoshida M, Hashizume H, Minamide A, Nakagawa Y, Kawai M, Iwasaki H, Tsutsui S. Efficacy of novel minimally invasive surgery using spinal microendoscope for treating extraforaminal stenosis at the lumbosacral junction. *J Spinal Disord Tech* 2012, 25: 268-76, DOI: 10.1097/BSD.0b013e3182206dd3. (査読有)
4. Takiguchi N, Yoshida M, Taniguchi W, Hashizume H, Yamada H, Miyazaki N, Nishio N, Nakatsuka T. Distinct degree of radiculopathy at different levels of peripheral nerve injury. *Mol Pain*. 2012 Apr 26;8:31. DOI: 10.1186/1744-8069-8-31. (査読有)

{学会発表}(計12件)

1. 阿部唯一, 谷口亘, 峰巨, 山中学, 曾根勝真弓, 筒井俊二, 橋爪洋, 山田宏, 中塚映政, 吉田宗人: バクロフェンの脊髄運動ニューロンに対する興奮抑制メカニズム. 第43回日本脊椎脊髄病学会, 京都, 2014, 4
2. 曾根勝真弓, 谷口亘, 筒井俊二, 山中学, 西尾尚子, 阿部唯一, 峰巨, 橋爪洋, 山田宏, 中塚映政, 吉田宗人: アストロサイト由来伝達物質D-セリンは脊髄後角における痛覚刺激を増強する. 第43回日本脊椎脊髄病学会, 京都, 2014, 4

3. 山中学, 谷口亘, 曾根勝真弓, 阿部唯一, 峰巨, 筒井俊二, 橋爪洋, 山田宏, 中塚映政, 吉田宗人: 脊髄後角 TRPA1/TRPM8 の活性化による痛覚伝達の変調: in vivo パッチクランプ法による解析. 第43回日本脊椎脊髄病学会, 京都, 2014, 4

4. 峰巨, 谷口亘, 阿部唯一, 山中学, 曾根勝真弓, 筒井俊二, 橋爪洋, 山田宏, 中塚映政, 吉田宗人: ニコチン性アセチルコリン受容体の脊髄運動前角細胞におけるシナプス制御機構の解析. 第43回日本脊椎脊髄病学会, 京都, 2014, 4

5. 谷口亘, 山中学, 西尾尚子, 曾根勝真弓, 阿部唯一, 峰巨, 筒井俊二, 橋爪洋, 山田宏, 中塚映政, 吉田宗人: ドパミン視床下部脊髄路は第3の下向性疼痛抑制系の作用を形成する. 第43回日本脊椎脊髄病学会, 京都, 2014, 4

6. 谷口亘, 山中学, 西尾尚子, 曾根勝真弓, 阿部唯一, 峰巨, 筒井俊二, 橋爪洋, 山田宏, 中塚映政, 吉田宗人: 情動中枢前帯状皮質の活性化は脊髄後角で直接痛みを増強する. 第43回日本脊椎脊髄病学会, 京都, 2014, 4

7. 西尾尚子, 谷口亘, 山中学, 曾根勝真弓, 阿部唯一, 峰巨, 筒井俊二, 橋爪洋, 山田宏, 中塚映政, 吉田宗人: 活性酸素による脊髄後角 TRPA1, TRPV1 を介した興奮性シナプス伝達増強の作用機序. 第43回日本脊椎脊髄病学会, 京都, 2014, 4

8. 瀧口登, 谷口亘, 橋爪洋, 峰巨, 阿部唯一, 宮崎展行, 西尾尚子, 山田宏, 中塚映政, 吉田宗人: 腰神経傷害部位の違いによる根性疼痛発現強度の検討. 第5回日本運動器疼痛学会, 東京, 2012, 11

9. 瀧口登, 谷口亘, 山田宏, 橋爪洋, 宮崎展行, 峰巨, 中塚映政, 吉田宗人: 腰神

経の傷害部位の違いは神経障害性疼痛
の発現にいかなる影響を与えるか .第27
回日本整形外科学会基礎学術集会 ,名古
屋 , 2012 , 10

10. Takiguchi N, Yoshida M, Taniguchi W,
Hashizume H, Miyazaki N, Nishio N,
Nakatsuka T: Distinct degree of
radiculopathy at different levels of
peripheral nerve injury, 42th Annual
Meeting of Society for Neuroscience,
New Orleans, 2012, 10
11. 瀧口登, 吉田宗人, 谷口亘, 杉村弥恵,
西尾尚子, 中塚映政:末梢神経傷害部位
の違いから生じる根性疼痛の発現につ
いて, 第 34 回日本疼痛学会, 熊本,
2012, 07
12. 瀧口登, 谷口亘, 山田宏, 橋爪洋, 宮
崎展行, 峰巨 , 中塚映政 , 吉田宗人:
腰神経根傷害部位で根性疼痛の発現強
度に差は生じるのか 動物モデルを用
いた行動学,組織学,電気生理学的解析
 , 第 41 回日本脊椎脊髄病学会, 久留
米, 2012, 04

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋爪 洋 (Hashizume, Hiroshi)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 10326382

(2)研究分担者

中塚映政 (Nakatsuka, Terumasa)
関西医療大学・保健医療学部・客員教授
研究者番号 : 30380572