

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791693

研究課題名（和文） 下行性疼痛抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文） Research on descending pain control mechanism

研究代表者

杉山 大介 (SUGIYAMA DAISUKE)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：40467189

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ラット脳幹青斑核神経細胞からの *in vivo* whole-cell 記録に成功した。今回成功した方法を用いることにより、下行性疼痛抑制系におけるノルアドレナリン起始核である脳幹青斑核神経細胞のシナプス応答を詳細に検討し、下行性抑制系のメカニズムを解明することが可能となった。脳幹青斑核からの *in vivo* パッチクランプ記録法を使用して、青斑核ノルアドレナリン細胞の電気生理学的特性を解析する実験を行った。今回の方法により閾値下の興奮性シナプス後電流や抑制性シナプス後電流を記録できた。

研究成果の概要（英文）：

To address the cellular mechanisms underlying pain modulation we have developed a patch-clamp recording technique from LC neurones in anaesthetized rats. These recordings showed LC discharge *in vivo* to be driven by both spontaneous membrane potential oscillations. This approach allows detailed characterisation of the synaptic and integrative mechanisms of LC responses to naturalistic stimulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔科学

キーワード：下行性抑制系，ノルアドレナリン，青斑核

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 下行性疼痛抑制系

一次感覚神経から脊髄後角に入力する侵害刺激情報は、上位中枢から投射している疼痛調節機構によって修飾を受けている。この調節機構の一つに、脳幹から脊髄後角へと投射

している下行性抑制系があり、下行性ノルアドレナリン作動神経と下行性セロトニン作動神経が知られている。下行性ノルアドレナリン作動神経及び下行性セロトニン作動性神経は、それぞれ青斑核 (locus coeruleus; LC) と延髄腹内側部 (rostral ventromedial

medulla; RVM) から軸索を投射しており、脊髄後角でノルアドレナリン、セロトニンを放出している。また、LC と RVM は中脳水道周囲灰白質 (periaqueductal gray; PAG) から伸びる軸索によって直接的な制御を受けている。

## (2) 下行性ノルアドレナリン神経

ノルアドレナリン作動神経の細胞体は、橋から中脳にかけて広範に存在しており A1-A7 に分類されている。その中でも、A5 (橋後外側核) や A6 (青斑核)、A7 (青斑下核) にあるノルアドレナリン作動神経の細胞体からは、脊髄へと軸索を投射しており、脊髄を神経支配している。この下行性ノルアドレナリン作動神経の終末は、脊髄後角の全層 (I~X) に分布しており、軸索-細胞体間シナプスや軸索-樹状突起間シナプス、軸索間シナプスを形成している。

## (3) 青斑核におけるシナプス応答

これまで脊髄におけるノルアドレナリンの鎮痛機構は、近年の研究からシナプスレベルで詳細に調べられてきた。しかし、ノルアドレナリン起始核である青斑核ニューロンの活動をコントロールするメカニズムの詳細は不明である。その理由として、これまで *in vivo* での青斑核ノルアドレナリン神経のシナプス応答を解析する方法がなく、スライスでの実験ではシナプスが切断されてしまっていたためである。

### 2. 研究の目的

本研究では、ラットを用いて青斑核神経細胞から *in vivo* パッチクランプ法を用いてシナプス応答を解析することにより、ノルアドレナリンによる下行性疼痛抑制系のメカニズムを解明することを目的とした。これまでに青斑核神経細胞からの *in vivo* whole cell

記録の報告はなく、閾値下のシナプス応答は不明な点が多かったが、今回の方法を用いることにより、下行性疼痛抑制系におけるノルアドレナリン起始核である脳幹青斑核神経細胞のシナプス応答を詳細に検討し、下行性抑制系のメカニズムを解明することが可能となる。また、セボフルラン、イソフルランなどの吸入麻酔薬、プロポフォールなどの静脈麻酔薬、モルヒネ、フェンタニルなどのオピオイドの青斑核ノルアドレナリン細胞でのシナプス応答に与える影響の解明も可能であれば行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 電気生理学的検討

##### ①ラット青斑核ノルアドレナリン細胞からの *in vivo* パッチクランプ記録の確立

4週齢から6週齢のSDラットをウレタンの腹腔内投与にて麻酔状態を得たのちに、気管切開・気管挿管を施行し人工呼吸にて呼吸管理を行った。出血に対する補液と薬剤投与の目的で、大腿静脈にカニューレを施行した。体温を一定に保つために赤外線光を用いたランプを照射すると同時に、ラットは温熱パットの上に置いた状態で手術を施行した。ラットの頭部を定位固定装置で固定し、後頭部の小脳直上にて開頭を行った。吸引を用いて小脳は摘除し、脳幹部を露出した。小脳摘除の際に出血した場合は、出血量に応じて輸液を施行した。露出した脳幹部は Krebs 液にて灌流した。顕微鏡下に脳幹青斑核の部位を直視しながら、パッチクランプ電極を青斑核へと刺入し、ブラインドパッチクランプ法を用いて *in vivo* パッチクランプ記録を行った。

##### ②青斑核ノルアドレナリン細胞の電気生理学的性質の解析

これまで観察することのできなかつた *in vivo* での青斑核ノルアドレナリン細胞の電気生理学的な性質を解析した。*In vivo* パッチクランプを青斑核ノルアドレナリン細胞に施行した状態で、電位固定法にて興奮性シナプス後電流と抑制性シナプス後電流を記録して解析した。また、電流固定法にて興奮性シナプス後電位の記録を行い解析した。

### ③青斑核ノルアドレナリン細胞の刺激に対する応答の解析

上記の青斑核ノルアドレナリン細胞の基本的電気生理学的な性質を解析したのちに、機械刺激（触、ピンプリック、ピンチ）や熱刺激（温、冷）に対する反応を解析する。青斑核ノルアドレナリン神経に *in vivo* でパッチクランプを行っている状態で、刺激を加え、その刺激に対する応答を解析した。具体的には、それぞれの刺激に対して、まずは電流固定下での活動電位の発火頻度の解析や興奮性シナプス後電位の解析を行い比較した。続いて電位固定下の状態でそれぞれの指摘に対して、興奮性シナプス後電流と抑制性シナプス後電流の頻度や振幅の解析を行って比較を行った。

### (2)免疫組織学的検討

*In vivo* パッチクランプ法にて記録した細胞が青斑核ノルアドレナリン神経細胞であることの確認は、記録後に灌流固定を施行し脳幹部を摘出。記録の際には電極内液内にバイオサイチンを注入しておき、チロシンヒドロキシラーゼとバイオサイチンの蛍光2重染色を行うことによった。

### (3)脳幹他部位への応用

脳幹は麻酔薬の作用部位としても大きな役割を果たしている部位であり、意識の変化に

伴う電気生理学的変化や、麻酔薬使用前使用後での、脳幹の核部位の電気生理学的変化を *in vivo* パッチクランプ記録を試みた。

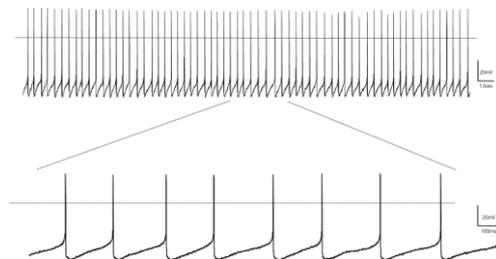
### 3. 研究成果

#### <ラット青斑核ノルアドレナリン細胞からの *in vivo*パッチクランプ記録の確立>

本研究では、ラットを用いて青斑核神経細胞から *in vivo*パッチクランプ法を用いてシナプス応答を解析することにより、ノルアドレナリンによる下行性疼痛抑制系のメカニズムを解明することが目的であった。脳幹青斑核からの *in vivo*パッチクランプ記録の方法確立をめざし実験を行った。その結果ラット脳幹青斑核神経細胞からの *in vivo* whole-cell 記録に成功した（図1）。

図1

ラット脳幹の青斑核神経細胞から *in vivo* whole cell patch-clamp 記録した活動電位



これまでに青斑核神経細胞からの *in vivo* whole cell記録の報告はなく、閾値下のシナプス応答は不明な点が多かったが、今回成功した方法を用いることにより、下行性疼痛抑制系におけるノルアドレナリン起始核である脳幹青斑核神経細胞のシナプス応答を詳細に検討し、下行性抑制系のメカニズムを解明することが可能となった。

#### <*in vivo*パッチクランプ記録を用いて、青斑核ノルアドレナリン細胞の電気生理学的性質を解析>

脳幹青斑核からのin vivoパッチクランプ記録法を使用して、青斑核ノルアドレナリン細胞の電気生理学的特性を解析する実験を行った。これまでは細胞外記録などにより、活動電位の頻度からしか青斑核細胞の性質を解析できなかったが、今回の方法により閾値下の興奮性シナプス後電流や抑制性シナプス後電流を記録できた。

#### <免疫組織学的検討>

記録の際に電極内液内にバイオサイチンを注入しておき、チロシンヒドロキシラーゼとバイオサイチンの蛍光2重染色を行うことにより、*In vivo*パッチクランプ法にて記録した細胞が青斑核ノルアドレナリン神経細胞であることを示すことができた(図2)。

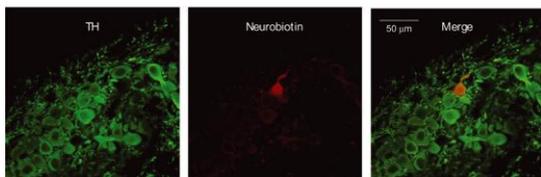


図2：記録細胞の免疫組織学的検討

今回の結果により、これまで報告のなかったラットの脳幹青斑核細胞からのin vivoパッチクランプ記録を新たに開発できた。本手法を応用することにより、これまで研究することが難しかった、シナプスが保たれた状態でのwholeの生体標本を用いて、脊髄などに比してより上位中枢である脳幹からの電気生理学的検討を活動電位閾値下のレベルで行うことができるようになる。

今後、本研究をさらに発展させることにより、麻酔科領域での痛み抑制系の解明、意識研究の発展、ノルアドレナリンによる循環動態への影響に関する研究など応用は広がると考える。

#### 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 2件)

①古江秀昌、井本 敬二、杉山 大介、川真田 樹人、舟井 優介、西川 精宣、下行性ノルアドレナリン痛覚抑制機構とその活動制御、麻酔、査読有、61 巻増刊、2012、pp.s30-s40

②Sugiyama D、Hur SW、Pickering AE、Kase D、Kim SJ、Kawamata M、Imoto K、Furue H. *In vivo* patch-clamp recording from locus coeruleus neurones in the rat brainstem. *J Physiol*、査読有、1:590(Pt 10)、2012、pp2225-31

DOI : 10.1113/jphysiol.2011.226407

[学会発表] (計 2件)

①杉山大介、井本敬二、川真田樹人、古江秀昌、ラット脳幹青斑核からのin vivoパッチクランプ記録、第89回日本生理学会大会、2012.3.29-31、松本

② Daisuke Sugiyama, Keiji Imoto, A.E. Pickering, Mikito Kawamata, Hidemasa Furue, *In vivo* whole-cell patch-clamp analysis of synaptic responses evoked in locus coeruleus neurons in the rat brainstem, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2011.11. 12-16, Washinton DC, USA

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

杉山 大介 (SUGIYAMA DAISUKE)  
信州大学・医学部附属病院・特任研究員  
研究者番号：40467189