

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791578

研究課題名(和文) 脊髄マイクログリアにおいて術後痛の程度を反映する分子生物学的マーカーの同定

研究課題名(英文) The identification of a molecular biological marker for spinal microglia reflecting postoperative pain

研究代表者

三枝 里江 (MIEDA, RIE)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10400772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：手術後の痛み(術後痛)の抑制は、医療にとって重要な課題のひとつである。脊髄後角のマイクログリアの活性化は、術後痛に強く関与している可能性があるものの、術後痛を反映する特異的な脊髄マイクログリアのマーカーは判明していない。マイクログリアの活性化を反映する分子生物学的マーカーは複数存在するため、その中より動物モデルを用いて、術後痛の強さを正確に反映するマーカーを同定することを目標に実験を行っている。現在までに予定していた実験の約8割程度が終了したが、完遂できていないため、今後も実験を重ねてゆきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：To suppress the postoperative pain is one of the most important medical issues. Although upregulation of microglia in the spinal cord contributes to mechanical hypersensitivity after paw incision in rats, a specific molecular biological marker for spinal microglia reflecting postoperative pain is not identified. There are several molecular biological markers that reflects the activation of spinal microglia. Using postoperative pain rat model, the purpose of this study is to evaluate a correlation between those markers and postoperative pain.

I finished 80% of this study right now. Therefore, I will do my best to continue and complete this study.

研究分野：疼痛

キーワード：術後痛 脊髄マイクログリア

1. 研究開始当初の背景

手術後の痛み（術後痛）の抑制は医療にとって重要な課題のひとつである。術後痛は術後の回復の遅延や合併症の発生を増加させ、ひいては医療費の増大を招くためその制御は重要である。さらに、術後痛を適切にコントロールできない場合、そのまま慢性痛へ移行することもよく知られており、以降の生活の質や人生そのものにも影響を及ぼす。麻酔科領域において術後痛に対する認識は徐々に高まりつつあるがいまだ十分な鎮痛が行われているとはいえない。その背景には術後痛に関する基礎的研究がきわめて少ないことが関与していると思われる。

術後痛の基礎的研究には Brennanら(Pain 1996)によって開発されたラット術後痛モデルを用いて行われることが多い。この動物モデルは手術後患者と酷似した時間経過で感覚過敏を呈する。この動物モデルの開発によって、術後痛の機序が徐々に解明されており、術後痛は神経障害性疼痛や炎症性疼痛とは全く異なった独特の痛みであることが示唆されている。術後痛は急性痛に分類され、メスなどによる切開、電気メスによる熱損傷、止血目的の血管や組織の糸による結紮・切離、組織の圧排や切除、臓器傷害などの組織傷害を含む。実際の術後痛は、こうした様々な種類の組織の傷害や、その結果生じる反応を含んだ痛みである。

本研究代表者の所属する研究グループでは、術後痛のメカニズム解明のため脊髄のグリアに着目して研究を進めてきた。脊髄に存在するマイクログリアとアストロサイトは、侵害刺激によって活性化し痛みを増強することが明らかになっている。脊髄後角のマイクログリアとアストロサイトは術後3日目をピークに活性化し、グリア抑制薬の髄腔内投与で術後痛は抑制された (Obata et al., J Pain 2006;7:816-22)。神経障害性疼痛においても、脊髄グリアの活性化がきわめて重要な役割を果たしていることは多くの研究から明らかである。

ところが術後痛と脊髄グリアとの関連については依然として不明なことも多い。OX42は神経障害性疼痛モデルでは痛みを反映するマーカーであることが知られているものの、術後痛モデルでは脊髄OX42の発現増加と痛覚過敏は密に相関していないことが示唆されている (Ito et al., Anesthesiology 2009;111:640-8)。すなわち、疼痛モデルが異なると痛みの強さを鋭敏に反映する活性化型マイクログリアのマーカーが異なる可能性があり、術後痛の強さを特異的に反映するマイクログリア関連マーカーを同定する。そ

れにより新たな疼痛治療薬の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

現在、マイクログリアの活性化を反映する分子生物学的マーカーは複数存在する。その中より、動物術後痛モデルを用いて、術後痛の強さを正確に反映する脊髄マイクログリアの特異的マーカーを同定する。同定されたマーカーの有用性を、痛みを抑制した条件下でも検討し、新たな術後鎮痛法の評価指標となることを目指す。

術後痛の基礎的研究は、特に本邦においてはほとんど行われていない。ラット術後痛モデルは、手術後患者と酷似した時間経過で行動学的感覚過敏が観察されるが、前述のように行動学的変化を反映する指標が存在しない。先行実験によってこの動物モデルでは脊髄マイクログリアの活性化が痛覚過敏の発症や維持に深く関わりをもつことが予想されている。術後痛と脊髄マイクログリアに着目して研究しているグループは国外でもわずかである。術後痛の行動学的変化を裏付けるために有用なマーカー同定し術後痛の病態が明らかになれば、今後の術後痛研究を発展させ、臨床において新たな術後鎮痛法の開発に大きく貢献できる可能性がある。

3. 研究の方法

ラット術後痛モデルを用い、疼痛を反映しうる脊髄マイクログリア関連マーカーを同定するため免疫染色を行い、行動実験での逃避閾値の経過と比較する。

a. モデルラットの作成

術後痛モデルの実験動物は250~270gの雄SDラットを用いる。ソフルラン麻酔下に左後肢足底の踵の部位に約1cmの皮膚切開を入れる。皮下の筋肉も切開し、骨部から剥離挙上し伸展する。止血後6.0ナイロン糸で2箇所縫合する。このラットは切開後約1時間より切開部周囲に感覚過敏を呈する。

b. 行動薬理的検討

感覚過敏は von Frey filaments を用いた up-down method によって、連日逃避閾値を測定することで判定する。用量-反応曲線を作成し、naïve rat における効果と比較する。

c. 免疫組織学的検討

マイクログリアのマーカの発現量の変化と行動実験で得られた逃避閾値の変化との相関を、散布図を作成後に相関係数、回帰直線を算出して検討する。

ラット術後痛モデルに徐放型局所麻酔剤を使用した条件下で、先に検討したマーカの有用性を証明する。

a. モデルラットの作成

実験動物は 250～270g の雄 SD ラットを用いる。Brennan らの方法によって術後痛モデルを作成する。

b. 薬剤とその投与

約 7 日間でリドカインをほぼ均等に徐放するシート状の薬剤を作成する。このシートを坐骨神経周囲に投与すると、術後痛モデル作成後、7 日間にわたって逃避閾値を有意に上昇させることが判明している。リドカイン徐放シートを坐骨神経周囲に投与し、持続鎮痛処置を行った術後痛モデルを作成し、脊髄マイクログリア関連マーカの発現を、コントロール群と比較する。薬剤の投与は以下の通り行う。すなわちイソフルラン麻酔下に坐骨神経を露出、剥離する。遊離した坐骨神経周囲に、リドカインを含む徐放シートを粉碎して投与する。コントロール群はリドカインを含まないシートを粉碎して投与する。この処置の後、術後痛モデルを作成し麻酔から覚醒させる。

c. 行動薬理的検討

徐放型リドカインシートを投与した群とコントロール群で連日 von Frey filaments を用いて逃避閾値を測定する。

d. 免疫組織学的検討

i). 脊髄でのマイクログリアマーカの発現の変化

徐放型リドカインシート投与群とコントロール群で術後 1、3、5、7 日目に還流固定によって脊髄 L4～5 を取り出し、免疫染色でマイクログリアの活性化を検討する。

ii). 術後痛モデルの指標の決定

免疫染色と行動実験の結果を統計学的に検討し、疼痛行動をより反映する脊髄マイクログリアのマーカを検討する。

ラット神経障害性疼痛モデルでの検討

さらに、ラット術後痛モデルと同様の研究を、ラット神経障害性疼痛モデルを用いて行う。

a. モデルラットの作成

神経障害性疼痛モデルの実験動物は、180～

200g の雄 SD ラットを用いる。Kim と Chung によって開発された Spinal nerve ligation; SNL モデル (Pain 1992;50:355-63) の変法である L5 脊髄神経切断モデルを作成する。すなわちイソフルラン麻酔下に腰部を正中切開し、左側 L6 腰椎横突起を切除する。それによって直下に見える左側 L5 脊髄神経を 5.0 絹糸で強く結紮し切断する。

b. 行動薬理的検討

感覚過敏は von Frey filaments を用いた up-down method によって逃避閾値を測定することで判定する。用量-反応曲線を作成し、naïve rat における効果と比較する。

c. 免疫組織学的検討

SNL モデルを作成後 1、3、5、7 日目に還流固定して脊髄 L4～5 を取り出し、マイクログリアマーカで免疫染色を行う。逃避閾値とマイクログリアマーカ発現量の変化を術後痛モデルと比較する。

4. 研究成果

上記研究計画に沿って、研究を進めてきたが、免疫染色などに予定していた以上に時間がかかってしまっている。

現在、予定されていた実験の約 8 割が終了しているが、まだ、学会や論文などで発表する段階には至っていない。当初 3 年で実験を終了する予定であったが、もう少し時間が必要である。しかし、この実験は、術後痛を解明する上で、非常に重要な実験であると考えており、実験の中止は予定していない。今後も実験を重ねてゆき、成果を発表する予定である。そして、新たな術後鎮痛の開発や、より良い鎮痛法の工夫などに繋げ、少しでも術後痛に苦しむ人が減るように、努力してゆきたいと考えている。

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)

〔図書〕(計 1 件)

1. 三枝里江, 齋藤繁. 侵害受容性疼痛. メカニズムから読み解く痛みの臨床テキスト. 南江堂. 編集小川節郎: 11 - 15

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三枝 里江 (MIEDA RIE)

群馬大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10400772