

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462407

研究課題名(和文) 損傷を受けた神経細胞に対する麻酔・鎮静薬の毒性に関する検討

研究課題名(英文) The experiment to examine the effect of anesthetic agents on injured neurons

研究代表者

安藤 富男 (ANDOH, Tomio)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授

研究者番号：00193110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄神経障害モデルでは、術後約2～3週間以降に疼痛行動を発症する。そのメカニズムとして、成体動物では想定的に有意であるKCC2が減少し、NKCC1が増加することで、細胞内Cl⁻濃度が増加し、GABA刺激により細胞が過剰興奮することが提唱されている。SNLではKCC2の変化が誘導されなかったため、過去の報告を参考にCCIモデルに変更して実験を行った。CCIではモデル作成2週間後に脊髄後角でのpKCC2の低下を認めた。またweight distribution testでも、健足負荷の時間増加を認めた。しかしながらCCI動物にCLP290を投与しても、行動学的変化は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The neuropathic pain model rats exhibit pain behaviour in 2 to 3 weeks after surgery. The phenomenon that down regulation of KCC2 and relative up regulation of NKCC1 has been proposed as promising mechanism underlying pain behaviour. We examined two models, SNL and CCI. While SNL rats did not exhibit the down regulation of KCC2, CCI showed the down regulation of pKCC2 in spinal dorsal horn, which is consistent with pain behaviour examined with weight distribution test. However the administration of CLP290, KCC2 activator, did not rescue pain behaviour.

研究分野：麻酔科学

キーワード：神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

傷害を受けたニューロンでは、Catio-Chloride-Cotransporter 発現の変化により GABAA 受容体刺激が興奮作用をもたらす幼若化が起きることが知られており、この興奮作用が細胞の修復と同時に細胞死増強にも働くことが報告されている。本研究では、成体ラットを用いた神経損傷モデルにおいて、吸入麻酔薬ないしプロポフォール投与による GABAA 受容体刺激作用を介して、障害を受けたニューロンの神経細胞死を増強するかどうか、増強する場合はそのメカニズムと予防法を解明することを目的としている。すなわち、本研究の臨床的意義は、頭部外傷や脊髄損傷などの急性期において、人工呼吸等の集中治療管理のために鎮静薬として GABAA 受容体刺激薬を使用することが神経損傷に対して不利に働く危険性について検討することである。

2. 研究の目的

手術の合併症として、術中に末梢神経を損傷し術後に慢性痛（神経因性疼痛）が生じその治療に苦慮することがある。これまでの動物実験では、脊髄神経が障害されると障害側の脊髄後角において KCC2 (potassium-chloride co transporter 2) の発現量低下と NKCC1 (Na-K-Cl cotransporter 1) の発現量増加が生じ、これが神経細胞の興奮毒性をもたらして神経因性疼痛を引き起こす一因となると考えられている。今回、脊髄神経障害モデル (SNL モデル) に麻酔薬を投与することで興奮毒性が誘導される結果、疼痛が増悪するかどうかを検討する。もしその仮説が成立する場合、KCC2 活性化薬剤の投与で興奮毒性を抑制し、疼痛増悪の抑制を得られるかを検討する。

3. 研究の方法

脊髄神経障害モデルである SNL モデルを

作成し、3週間目以降より Von Frey test で疼痛の程度を定量する。神経障害動物では KCC2 の減少、NKCC1 の増加を生じ、また麻酔薬曝露が増加した NKCC1 の活性化を介して神経因性疼痛を増悪させるという仮説があり、脊髄神経障害モデルラットに対して麻酔薬を曝露させ、疼痛が増悪するかを行動学的に評価し、その脊髄での興奮性変化を組織染色により検討する。最終的には、KCC2 刺激薬を投与し、麻酔薬曝露によって増悪した疼痛が改善しているかを生化学的・行動学的に検討する。

4. 研究成果

(1) SNL ラットの疼痛過敏行動への吸入麻酔薬の影響

SNL ラットに対しモデル作成時に 1MAC のセボフルランを6時間曝露し、術後の疼痛過敏行動に対する吸入麻酔薬の影響を検討した。セボフルラン併用および非併用 SNL 群また sham 群を作成し、2週に1回の頻度で Von Frey テストを施行し、疼痛閾値の評価を行った。その結果、SNL ラットの2群では sham 群に比較してモデル作成2週間後より著しい疼痛過敏行動を呈した。またこの行動障害は術後15週間まで持続することが分かった。そうしたモデルラットにセボフルランを曝露する操作を追加したが、経時的評価の点数において、セボフルランの疼痛増悪効果を認めたと、総合的に疼痛行動を評価すると、セボフルランによる痛覚過敏の増悪は認められなかった(図1)。

そこで、過去に神経障害性疼痛モデル動物で変化が報告されている KCC2 ないしリン酸化 KCC2 (pKCC2) の低下を我々も再検討することとした。SNL モデルの術後4時間ないし14日後に麻酔下で脊髄を直視下に確認し、膨大部を中心とした領域を切除し、ウェスタンブロットを行った。しかしながら pKCC2 ないし KCC2 の低下は認められなかった(図2)。

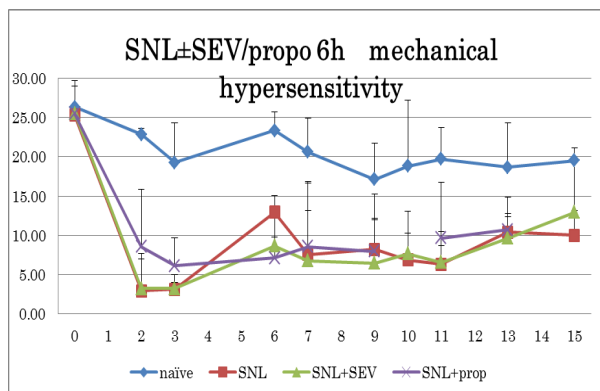


図1 . Von Frey test の経時的変化

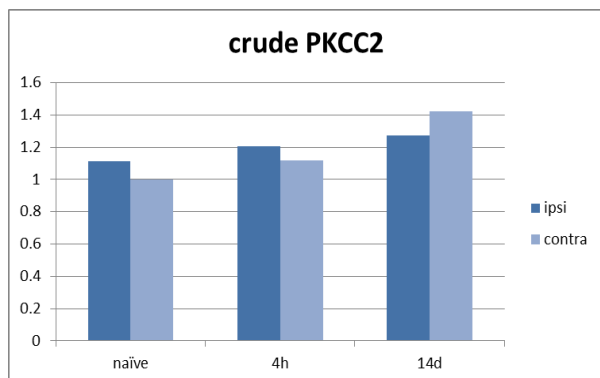


図2 . SNL ラットでの pKCC2 の経時的変化

この結果より、SNL モデルでは KCC2 の変化が軽微であるため、吸入麻酔薬併用に伴う疼痛行動の増悪が見られなかったものと判断した。したがって、SNL モデルではなく CCI モデルに変更し、再度同様の検討を行うこととした。

(2) CCI ラットにおける KCC2 の変化

CCI モデル作成 4 時間、7 日、14 日後に脊髄後角を採取し、ウェスタンブロット法により KCC2 ないし pKCC2 の定量を行った。その結果、モデル作成 7 日以降で pKCC2 の有意な低下を認めた (図3)。

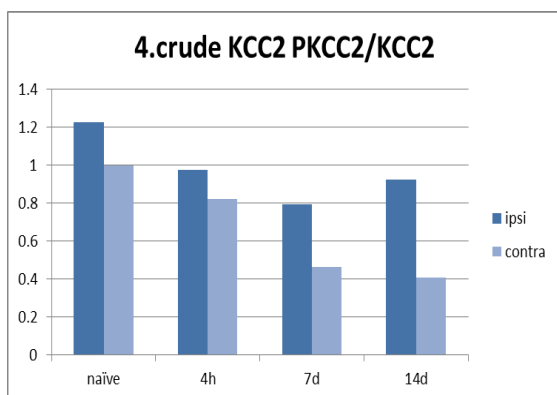


図3 . CCI ラットでの pKCC2 の経時的変化

(3) CCI ラットの疼痛過敏行動への KCC2 機能の影響

CCI モデルラットで、術後 7 日以降で pKCC2 の低下が生じることが分かったため、その時期に KCC2 を活性化することで以降の疼痛行動の改善が認められるかどうかを検討した。KCC2 活性化薬剤である CLP290 は共同研究者である Yves DeKoninck より MTA を交わし、譲渡を受けている。本薬剤を HPBCD に溶解し、100mg/kg の濃度で経口投与を行った。結果であるが、CCI 後 14 日目に CLP290 を経口投与した群では、溶媒である HPBCD と比較して疼痛行動に変化は認められなかった (図4)。

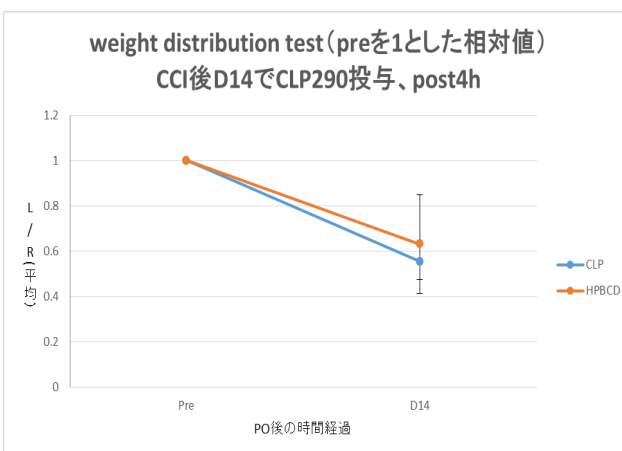


図4 . CCI ラットの疼痛行動に対する CLP290 の効果

つまり CCI 作成 14 日後に KCC2 を活性化することでは、疼痛行動の改善は認められないことが分かった。

(4) CCI ラットの疼痛過敏行動への吸入麻酔薬の影響

次に、pKCC2 の変化を認めたモデル作成 7 日以降のラットで疼痛過敏行動の検討を行った。 の実験と同様、CCI ラットに対し IMAC のセボフルランを 6 時間曝露し、疼痛過敏行動に対する吸入麻酔薬の効果を検討した。CCI モデル動物では von Frey テストの結果が大きくばらつくため、weight distribution テストを採用した。脊髄神経障害側の足には荷重をかけられないため、その分の荷重が健側にかかることを利用して、健側

に対する傷害側の荷重を定量する方法である。その結果、吸入麻酔薬曝露群では傷害側荷重が低下が増大したものの、統計的有意性は認められなかった（図5）。

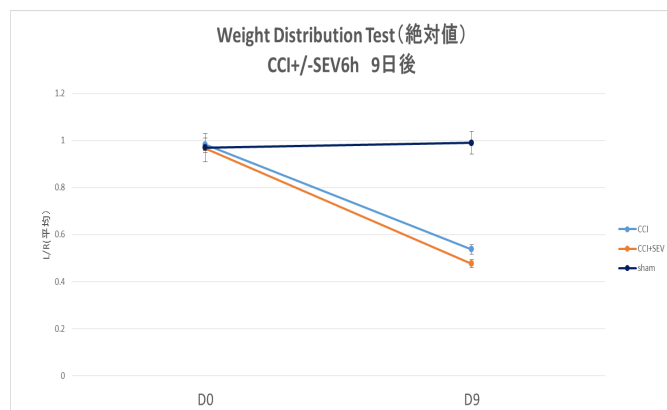


図5 .CCI ラットの疼痛行動に対するセボフルランの効果

【総括】

これまでの動物実験で、脊髄神経が障害されると障害側の脊髄後角において KCC2 (potassium-chloride co transporter 2) の発現量低下と NKCC1 (Na-K-Cl cotransporter 1) の発現量増加が生じ、これが神経細胞の興奮毒性をもたらして神経因性疼痛を引き起こす一因となると考えられてきた。今回、神経障害性疼痛モデルの SNL モデルでは上記変化を検出できなかったが、CCI モデルでは作成 7 日以降に pKCC2 の有意な減少を認めた。しかしながらこの pKCC2 の低下した動物に KCC2 活性化薬剤である CLP290 を投与しても疼痛行動の改善は認められなかった。また最初に立てた仮説である吸入麻酔薬が疼痛を増悪させるという実験も行った。しかしながらセボフルランを投与しても、細胞興奮およびそれに引き続く疼痛行動の増悪は認めなかった。今後ミダゾラムなどより GABAA 受容体に対する選択性が高い薬剤を使用して、疼痛行動の増悪が生じるかを検討していく。

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 0 件)

〔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〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 富男 (ANDOH, Tomio)

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：00193110

(2) 研究分担者

紙谷 義孝 (KAMIYA, Yoshinori)

新潟大学・医師学総合病院・教授

研究者番号：90381491

(3) 連携研究者

()

研究者番号：