

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462448

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛モデルラットにおける下降性抑制系賦活機構の検討

研究課題名(英文) Study on activation of the descending pain inhibitory systems in a neuropathic pain rat model

研究代表者

西川 精宣 (Nishikawa, Kiyonobu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20145791

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)：ラット脊髄神経結紮モデル(Chung model)で、行動学的実験とともに脊髄in vivo patch clamp法を用いたシナプス応答を解析し下行性抑制系の役割を検討した。トラマドールは自発性興奮性シナプス後電流(sEPSC)減少と抑制性シナプス後電流(sIPSC)を増加させたが、頸髄半切断により脊髄下行性抑制経路の離断実験で主要代謝物M1が脊髄よりも上位で作用していることがわかった。ChungモデルでDSP-4により青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロンを破壊しても、アロディニアの左右逆転現象はみられず、抑制性ニューロンの興奮が逆に痛みを増強する機序は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of the descending pain inhibitory system in a rat spinal nerve ligation model (Chung model) by analyzing behavioral experiments together with synaptic responses using spinal cord in vivo patch clamp method. Tramadol decreased spontaneous excitatory synaptic currents (sEPSC) and increased spontaneous inhibitory synaptic currents (sIPSC), but preparation of semi-resection of cervical cord for resection of spinal descending inhibitory pathway revealed that M1, the major metabolite of tramadol, acts at supraspinal site. Destruction of the noradrenaline neurons at the locus coeruleus did not bring about a reverse phenomenon of allodynia at the left and the right side, therefore we were unable to confirm a mechanism that excitation of the inhibitory neurons inversely potentiated pain.

研究分野：麻酔科学、疼痛学

キーワード：下行性抑制系 in vivo patch clamp 脊髄 ترامドール DSP-4

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経障害性疼痛の原因、症状は多彩であるため、共通して有効な薬剤を見出すのは難しい。ラット脊髄神経結紮モデル (Chung モデル) は、部分神経損傷にもとづく慢性神経障害性疼痛モデルのひとつであり、CRPS タイプ2に類似したものである。われわれは Chung の脊髄神経結紮モデルで腰部交感神経節切除を行ったり、脊髄くも膜下にクロニジンならびにガバペンチンを投与して神経障害性疼痛に対する効果を検討したが、急性痛に伴うアロディニアで検討した過去の研究結果と比べても抗アロディニア作用の ED₅₀ や持続時間に大差なく、神経障害性疼痛の主因にかかわる評価にはより詳細な研究が必要であることが示唆された¹⁾。生理的な状態では青斑核由来のノルアドレナリン線維と、大縫線核由来のセロトニン線維が脊髄後角に投射して痛みを抑制する脊髄下行性抑制系の役割が重要と考えられ、これらの経路の賦活による鎮痛作用を期待して慢性疼痛患者にセロトニンやノルアドレナリンの再取り込み阻害薬がしばしば投与される。硬膜外やくも膜下に投与される $\alpha 2$ アドレナリン受容体アゴニストの効果も、ノルアドレナリン線維の作用を模していると考えられる。デクスメドミジンはクロニジンよりもはるかにアドレナリン $\alpha 2$ 受容体選択性が強く、脊髄スライス標本の *in vivo patch clamp* 法で高濃度では脊髄膠様質細胞の抑制性後シナプス電流を増加させる²⁾ が、われわれは、正常ラットにおいて、デクスメドミジンの低用量の静脈内投与は下行性抑制経路を賦活化して鎮痛作用をもたらしていることを、生理学研究所との共同研究で脊髄 *in vivo patch clamp* 法を用いて明らかにした³⁾。炎症性慢性疼痛動物モデルならびに神経障害性疼痛モデルで、脊髄後角のノルアドレナリンやセロトニンの含有量が増加しており、下行性抑制系が活性化されている事を示唆するが、一方で神経障害性疼痛モデルでは逆に行性の痛覚増強性線維の活動が優勢となることも報告されており、神経障害性疼痛の発症時には下行性抑制系は正常とは異なった作動をすると推測される。

(2) *In vivo patch clamp* 法においては、刺激の定量性、再現性が得られた結果の解釈に重要となるので、刺激される神経線維を分別した定量刺激を受容野に加えてその反応を観察することが重要である⁴⁾。下行性抑制系の破壊⁵⁾の有無により、アロディニア発現時ならびに薬剤介入を加えたときに下降性抑制系がどのように寄与しているかを検討する。

(3) 神経障害性疼痛モデル動物の解析に脊髄 *in vivo patch-clamp* を応用し脊髄鎮痛薬の下行性抑制系への効果について検討した報告は見当たらず、より正確に神経障害性疼痛 (参考文献)

1. Yamama Y, Nishikawa K, et al. Intrathecal gabapentin and clonidine synergistically inhibit allodynia in spinal nerve-ligated rats. *Life Sciences* 2010;87:565-571.
2. Ishii H, Kohno T, Yet al. Action of dexmedetomidine on the substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 2008;27:3182-90.
3. Funai Y, Pickering AE, et al. Systemic dexmedetomidine augments inhibitory synaptic transmission in the superficial dorsal horn through activation of descending noradrenergic control: an *in vivo* patch-clamp analysis of analgesic mechanisms. *PAIN* 2015;155: 617-628.
4. Koga K, Furue H, et al. Selective activation of primary afferent fibers evaluated by sine-wave electrical stimulation. *Mol Pain* 2005;1-11.
5. Kudo T, Kushikata T, et al. A central neuropathic pain model by DSP-4 induced lesion of noradrenergic neurons: Preliminary report. *Neurosci Lett* 2010;481:102-104

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経障害性疼痛の病態を模したラット脊髄神経結紮モデルで、行動学的実験とともに脊髄 *in vivo patch clamp* 法を用いたシナプス応答の解析により、鎮痛薬投与がもたらす効果と下行性抑制系の役割を明らかにすることである。神経障害性疼痛のなかでも CRPS タイプ2の病態を模した Chung のラット脊髄神経結紮モデルを用いて、行動学的実験とともに脊髄 *in vivo patch clamp* 法を用いたシナプス応答を解析し、下行性抑制系を温存したラットおよび破壊したラットで $\alpha 2$ アゴニストやトラマドールをはじめとした薬剤投与の効果を検討して下行性抑制系の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

Dynamic plantar aesthesiometer を用いた機械刺激での逃避行動閾値での検討と、その後、選択的定量的刺激を再現するために、先の鋭なピンセットに圧センサーを装着したピンチメータープローブとその圧力を電気信号に変換するピンチメーター、そして侵害熱刺激を定量的に再現する痛覚計と熱を発する特注プローブを開発した。

まず、先行実験として、正常ラットでトラマドールの鎮痛作用を検討した。同様の実験

を Chung モデルで行なって検討するにあたって、覚醒下で求めたピンチ刺激、熱プローブ刺激による逃避反応閾値より大きい一定の刺激を全身麻酔下にて与えて誘発 EPSC、誘発 IPSC の変化を検討することとした。

Chung モデルを作成し、選択的定量的侵害刺激を再現するために、定量的侵害機械刺激を加えるピンチメーターと定量的侵害熱刺激を加える痛覚計でラットの足底あるいは下腿を刺激し、トラマドールを全身投与して検討した。この脊髄 *in vivo* patch clamp study では、覚醒下で求めたピンチ刺激、熱刺激による逃避反応閾値より大きい一定の刺激を与えて誘発 EPSC、誘発 IPSC の変化とトラマドールの影響を検討した。

Chung モデルで、青斑核のノルアドレナリン作動性下行性疼痛抑制系ニューロンを特異的に破壊する毒素である DSP-4 を 50mg/kg 腹腔内投与し、その 10~14 日後に aesthesiometer で逃避閾値を再測定した。

選択的侵害刺激を再現可能なピンチ刺激、熱刺激デバイスを用いて、誘発 EPSC、誘発 IPSC の変化を検討した。

4. 研究成果

まず、先行実験では、正常ラットでトラマドールの鎮痛作用を脊髄膠様質細胞での *in vivo* patch clamp で検証した。 -70 mV 電位固定での自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC)、および内液組成を変え膜電位を 0 mV に固定して自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) を検討したところ、 5 mg/kg 以上の静注で sEPSC は減少し sIPSC は増加したが、脊髄表面灌流では非常に高濃度のトラマドールでのみ sEPSC の減少、外向き電流発生と sIPSC の増強を認めたので、代謝産物 M1 が非直接的に脊髄に作用していることが確認された。その中で、M1 の全身投与による sIPSC の増加は頸髄同側半離断すると認められず、下行性疼痛抑制系の関与が考えられた。(図 1、雑誌論文 2)

独自に開発したピンチメーター足底刺激による全身麻酔中の EPSC, IPSC は再現性の良い反応を得られることが確認できた。(図 2、学会発表 6)

次に、神経障害性疼痛では抑制性ニューロンの KCC2 トランスポーターの抑制により細胞内 Cl^- イオン濃度が上昇し、GABA あるいはグリシン受容体刺激による Cl^- チャネルの開口で逆に脱分極側に電位が移行して痛みが発生しており、下行性疼痛抑制系ニューロンの破壊でむしろ allodynia が緩和される可能性も考えられたが、Chung モデルで DSP-4 を腹腔内投与し、その 10~14 日後に aesthesiometer で逃避閾値を再測定した結果では、非結紮側の allodynia は出現したが、患側の allodynia 緩和や疼痛の左右逆転現象はみられず、神経障害性疼痛の発生に下行性疼痛抑制系の関与は少ないと考えられた。(図 3)

Chung モデルにおける誘発 EPSC、誘発 IPSC の検討では、n 数が少ないがトラマドール投与で誘発 EPSC は減少、誘発 IPSC はあまり変化しない結果が得られている。今後、さらに *in vivo* patch clamp での観察を重ねての検討が必要である。

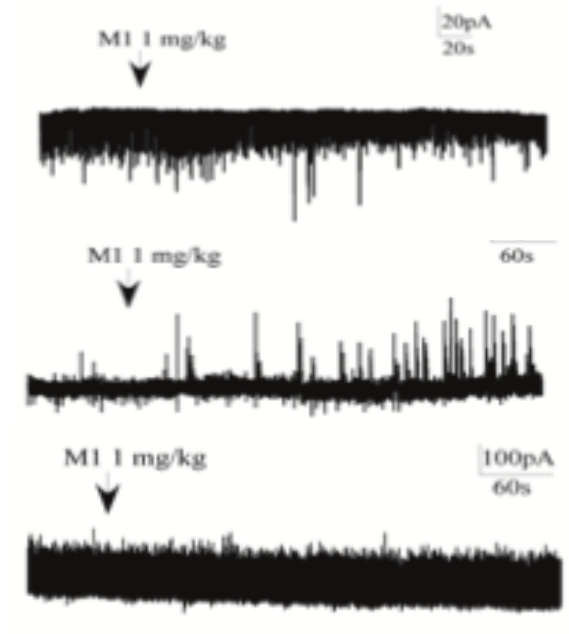
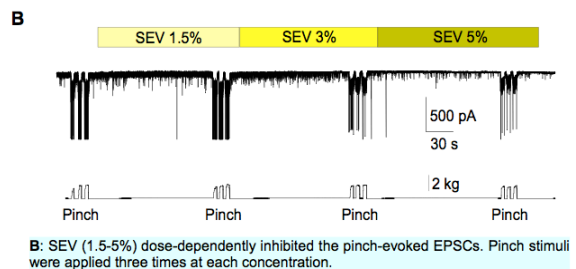


図 1. トラマドールの代謝産物 M1 の全身投与により、最上段より sEPSC の減少、sIPSC の増加。最下段は頸髄同側半離断を行うと M1 投与によって sIPSC の増加は認めなかった。



B: SEV (1.5-5%) dose-dependently inhibited the pinch-evoked EPSCs. Pinch stimuli were applied three times at each concentration.

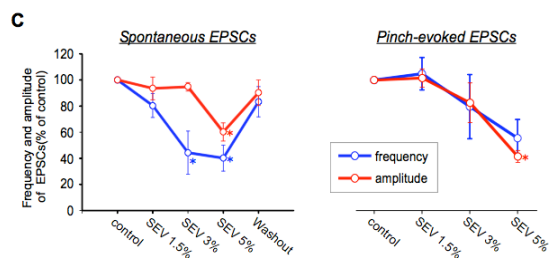


図 2. 全身麻酔中のピンチメーターによる足底刺激と EPSC の反応

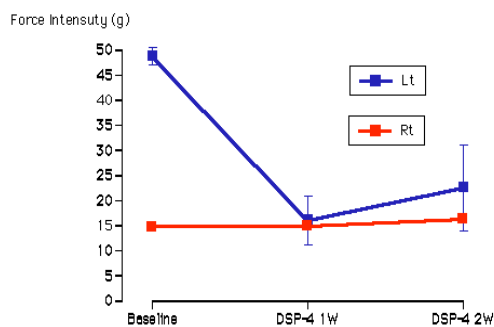


図3. Chung モデルにおける DSP-4 腹腔内投与後の Aesthesiometer による逃避閾値の推移。Rt が脊髄神経結紮を行なった右側。

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 9 件)

1. Taku Hamada, Masahiko Tsuchiya, Koh Mizutani, Ryota Takahashi, Kazuya Muguruma, Kiyoshi Maeda, Wasa Ueda, Kiyonobu Nishikawa. Levobupivacaine – dextran mixture for transversus abdominis plane block and rectus sheath block in patients undergoing laparoscopic colectomy: a randomised controlled trial: *Anaesthesia* 2016;71: 411-416. 査読有り
2. Hiroyuki Yamasaki, Yusuke Funai, Tomoharu Funao, Takashi Mori, Kiyonobu Nishikawa. Effects of tramadol on substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord: an in vivo patch-clamp analysis. *PLoS One* 2015;10(5): e0125147. 査読有り
3. Yusuke Funai, Anthony E. Pickering, Daisuke Uta, Kiyonobu Nishikawa, Takashi Mori, Akira Asada, Keiji Imoto, Hidemasa Furue. Systemic dexmedetomidine augments inhibitory synaptic transmission in the superficial dorsal horn through activation of descending noradrenergic control: an in vivo patch-clamp analysis of analgesic mechanisms. *PAIN* 2015;155: 617-628. 査読有り
4. Suehiro Koichi, Takahashi Ryota, Mori Takashi, Nishikawa Kiyonobu. Brain serotonin content regulates the manifestation of tramadol-induced seizures in rats: Disparity between tramadol seizure and serotonin syndrome. *Anesthesiology* 2015;122:178-189. 査読有り

5. Hori Kotaro, Kuno Miyuki, Nishikawa Kiyonobu. Lipid emulsion increases the fast Na⁺ current and reverses the bupivacaine-induced block. A new aspect of lipid resuscitation? *Anesthesiology* 2014;121:903-904. 査読有り
6. Fijimoto Yohei, Funao Tomoharu, Suehiro Koichi, Tanaka Katsuaki, Matsuura Tadashi, Funao Tomoharu, Yamada Tokuhiko, Mori Takashi, Tsuchiya Masaaki, Nishikawa Kiyonobu. Preoperative hydroperoxidase concentrations are associated with a risk of postoperative complications after cardiac surgery. *Anesthesia and Intensive Care* 2014;43:487-494. 査読有り
7. Yusuke Funai, Kiyonobu Nishikawa, Takashi Mori, Akira Asada, Keiji Imoto, Hidemasa Furue. Systemic α 2 agonist administration facilitates inhibitory synaptic transmission in the rat spinal dorsal horn mediated through α 1 adrenoceptors. *PAIN RESEARCH* 2013;28: 145-153. 査読有り
8. Kotaro Hori, Tadashi Matsuura, Takashi Mori, Miyuki Kuno, Makoto Sawada, Kiyonobu Nishikawa. The effect of lipid emulsion on intracellular bupivacaine as a mechanism of lipid resuscitation: an electrophysiological study using voltage-gated proton channels. *Anesthesia and Analgesia* 2013; 117:1293-1301. 査読有り
9. Koichi Suehiro, Tomoharu Funao, Yohei Fujimoto, Tokuhiko Yamada, Takashi Mori, Kiyonobu Nishikawa. Relationship between noradrenaline release in the locus coeruleus and antiallodynic efficacy of analgesics in rats with painful diabetic neuropathy. *Life Science* 2013; 92: 1138-1144. 査読有り

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 河合茂明, 山崎広之, 萩原千恵, 山田徳洪, 西川精宣. 神経障害性疼痛は交感神経 β 2 受容体を介して酸化ストレスに心筋保護的に作用する: 日本麻酔科学会第 63 回学術集会, 福岡. 2016 年 5 月 27 日
2. 辻川翔吾, 松浦正, 堀耕太郎, 森隆, 久野みゆき, 西川精宣. アミトリプチリン中毒に対する脂肪乳剤の有効性—アルカリ化療法との比較—: 日本麻酔科学会第 63 回学術集会, 福岡. 2016 年 5 月 27 日

3. Shigeaki Kawai, Hiroyuki Yamasaki, Tokuhiko Yamada, Kiyonobu Nishikawa. Neuropathic Pain Diminishes Cellular Damages at Ischemia-reperfusion Injury in Cardiac Myocytes. 2015 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists. San Diego, USA. 2015年10月27日
 4. 堀耕太郎, 松浦正, 辻川翔吾, 森隆, 久野みゆき, 西川精宣:ブピバカインのリピッドレスキューにおける電気生理学的効果の検討: 日本麻酔科学会第62回学術集会,神戸, 2015年5月28日
 5. 辻川翔吾, 堀耕太郎, 舟井優介, 松浦正, 森隆, 西川精宣. 全身麻酔手術における胸部硬膜外麻酔の術直後心室再分極への影響: 無作為化比較試験による検討: 日本麻酔科学会第62回学術集会,神戸, 2015年5月28日
 6. Funai Yusuke, Mori Takashi, Yamasaki Hiroyuki, Nishikawa Kiyonobu. In vivo analyses of antinociceptive action of sevoflurane in the rat substantia gelatinosa neurons. IARS 2015 Annual Meeting. Honolulu,Hawaii(USA). 2015年3月23日.
 7. 藤本陽平, 末廣浩一, 高橋陵太, 舟尾友晴, 西川精宣. ترامadol誘発性痙攣閾値に対する脳内セロトニン濃度の影響について. 日本麻酔科学会第61回学術集会. 横浜, 2014年5月15日
 8. Yohei Fujimoto, Tomoharu Funao, Koichi Suehiro, Ryota Takahashi, Katsuaki Tanaka, Kiyonobu Nishikawa. Brain serotonin content regulates manifestation of tramadol-induced seizure in rats. 2013 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists. San Francisco, California, USA. 2013年10月15日
 9. Hiroyuki Yamasaki, Takashi Mori, Yusuke Funai, Taku Hamada, Tokuhiko Yamada, Kiyonobu Nishikawa. Antinociceptive actions of tramadol revealed by in vivo patch-clamp recordings in the spinal cord dorsal horn. Euroanaesthesia 2013, Barcelona, Spain, 2013年6月2日
 10. Kotaro Hori, Tadashi Matsuura, Megumi Hasaka, Takashi Mori, Miyuki Kuno, Kiyonobu Nishikawa. The recovery speed of lipid emulsion therapy largely depends on "lipid sink": An electrophysiological study using voltage-gated proton channels. Euroanaesthesia 2013, Barcelona, Spain, 2013年6月2日
 11. 藤本陽平, 舟尾友晴, 末廣浩一, 高橋陵太, 西川精宣. ジアゼパムはリドカイン・ ترامadol誘発性痙攣とともに抑制する: 日本麻酔科学会第60回学術集会,札幌, 2013年5月24日
 12. 堀耕太郎, 松浦正, 羽阪めぐみ, 森隆, 久野みゆき, 西川精宣. lipid rescueにおける"lipid sink"の効果発現時間について ~電位依存性プロトンチャネルによる検討~. 日本麻酔科学会第60回学術集会, 2013年5月23日
 13. 山崎広之, 森隆, 舟井優介, 濱田拓, 山田徳洪, 西川精宣. 脊髄後角 in vivo パッチクランプ法による ترامadolの鎮痛機序の検討: 日本麻酔科学会第60回学術集会,札幌,2013年5月23日
- 〔図書〕(計 1件)
1. 西川精宣, 専門編集:川真田樹人, 監修: 森田 潔. 麻酔科医のための周術期の疼痛管理:新戦略に基づく麻酔・周術期医学 6章 周術期疼痛に治療法 6-3 術後痛に有効なその他の薬物. Pp195-202 (総ページ数 320) 2014 中山書店(東京)
- 〔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
西川 精宣 (NISHIKAWA, Kiyonobu)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 20145791
 - (2)研究協力者
舟井 優介 (FANAI, Yusuke)
大阪市立大学・大学院医学研究科・大学院生(現 講師)
研究者番号: 60722486
 - 山崎 広之 (YAMASAKI, Hiroyuki)
大阪市立大学・大学院医学研究科・大学院生(現 病院講師)
研究者番号: 70759000