

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670668

研究課題名(和文) タニケツトペインの機序解明と予防法の検討

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of tourniquet pain

研究代表者

河野 達郎 (Kohno, Tatsuro)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00313536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：手足の血流が滞ると血流再開後にしびれを生じる。その機序として血流再開後に末梢神経の興奮性が亢進するためとされているが明確な根拠はない。我々はフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて解析を行った。マウスの後肢を血流遮断した後、脊髄でのフラビン応答は増強していた。つまり、伝導遮断により脊髄での可塑性変化が起こり、この変化が遮断後のしびれなどの異常感覚を生じさせている可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Transient ischemia produces postischemic tingling sensation. Ischemia also produces nerve conduction block that may modulate spinal neural circuits. Neural activities were investigated using activity-dependent changes in endogenous fluorescence derived from mitochondrial flavoproteins. Ischemic treatment induced potentiation of the ipsilateral spinal responses to hindpaw stimulation. The present findings suggest that neural plasticity in the spinal cord shares the mechanisms, at least in part, with postischemic tingling sensation.

研究分野：麻酔科学

キーワード：タニケツトペイン しびれ フラビン蛍光蛋白

### 1. 研究開始当初の背景

整形外科の四肢の手術において、術中の出血を防止し、同時に術野の視野を良くするためにタニケット（駆血帯）が使用される。しかし、タニケットによる駆血時間が長くなると駆血部あるいはその遠位に痛みを生じ、全身麻酔中でも血圧の上昇がみられる。また、タニケット使用後にはしばらく末梢の異常感覚が観察され患者は不快感を生じる。これらの現象はこれまで末梢性機序が原因であると考えられてきたが、脊髄または脳の可塑性変化といった中枢性機序が関与している可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究ではフラビン蛋白蛍光イメージングを用いて、タニケット駆血中、駆血後の痛みが脊髄または脳の可塑性変化に関与しているかを明らかにし、その機序を解明するとともに、予防法を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 大脳体性感覚野のフラビン蛋白蛍光イメージング: 7-10 週齢の C57BL/6 マウスにウレタン 1.5 g/kg を腹腔内投与によって麻酔し、マウスの頭部皮膚を切除し、体性感覚野を明視下に置く (図 1)。頭蓋骨表面の乾燥を防いで透明性を維持するために流動パラフィン油を薄く塗布する。経頭蓋的に青色励起光 (450-490 nm) を脳表に照射し、脳表より放射される緑色自家蛍光 (500-550 nm) を冷却 CCD カメラにより撮影する (図 2)。体温は 36 ~ 37 °C に維持し、自発呼吸下に測定を行う。反応は大脳体性感覚野より 1 秒あたり 9 フレームの頻度で撮影する。50 秒毎に繰り返して得られた画像データを 24 回試行分加算平均した後、5×5 マトリックスフィルターで平滑化して画質を向上させる。刺激直前の 5 フレームの平均に対する各フレームの蛍光強度変化 ( $F/F_0$ ) を算出し、擬似カラー表示する。左足底を刺激し、右体性感覚野のフラビン蛋白応答を観察し、そのピーク値、経時変化、反応領域の面積を解析する。マウスの左大腿にタニケットを巻き 250 mmHg で虚血とする。虚血後 15 分おきに 3 時間後まで測定を行いフラビン蛋白応答の変化を観察する。虚血を解除した後、足底を刺激し、再灌流後のフラビン蛋白応答を観察する。

図 1: マウスの頭部と各感覚野の位置  
体性感覚野は頭頂部に位置する。

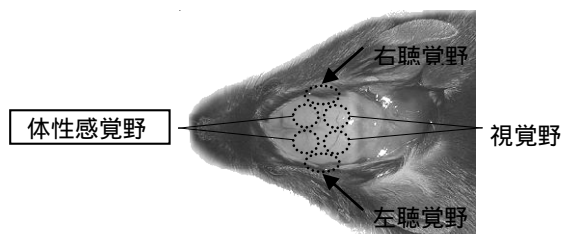
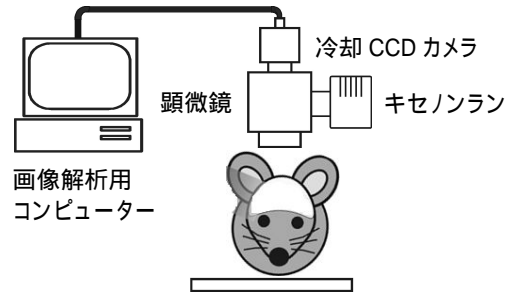


図 2: 蛍光イメージングの実験セット



(2) 脊髄後角のフラビン蛋白蛍光イメージング: 上記と同様の方法で、マウスをウレタンの腹腔内投与によって麻酔を行う。椎弓切除を施行し脊髄を露出する。青色励起光を脊髄に照射し、神経活動に伴って発せられる緑色自家蛍光を冷却 CCD カメラにより撮影する。ほか方法に関しては脳の蛍光イメージングと同じである。

### 4. 研究成果

ウレタン麻酔下のマウスの左後肢に振動刺激を与えると、L1,2 椎体レベル左側に応答を認めた。左後肢に 250 mmHg の圧力を 30 分間加え虚血状態としたところ応答は消失した。血流を再開すると速やかに回復し、虚血前と比較して増強した (図 3)。同様に、左後肢に振動刺激を与え、右体性感覚野フラビン応答の変化を観察した。脊髄と同じく、血流遮断中の応答は消失したが、血流を再開すると速やかに回復し、虚血前と比較して増強した (図 4)。von Frey 試験では血流再開後に虚血側の閾値の低下を認め、しびれが生じているものと考えられた (図 5)。

脊髄後角ニューロンには Type II 代謝型グルタミン酸レセプター (mGluR) が存在しており、A 線維の自発発火により賦活され後角ニューロンに対して抑制性に働いていることが知られている。したがって mGluR のアゴニストを投与することで虚血後のしびれは抑制される可能性がある。L1 椎弓を切除し、脊髄に直接 mGluR を投与し虚血としたところ、脊髄のフラビン応答の増強は阻害された。また、mGluR を髄腔投与した後に虚血としたところ von Frey 試験による閾値の低下は認められなかった。即ち、一過性虚血後のしびれには、虚血により末梢神経の自発発火が消失し、Type II mGluR が賦活されなくなることで生じるといった脊髄機序が関与している (図 6)。

血流遮断後のしびれには Type II mGluR を介した脊髄メカニズムがある。また、血流遮断後のしびれは振動刺激が侵害刺激として伝達したのと考えられる。

図 3 : 左振動刺激に対する脊髄フラビン応答の変化

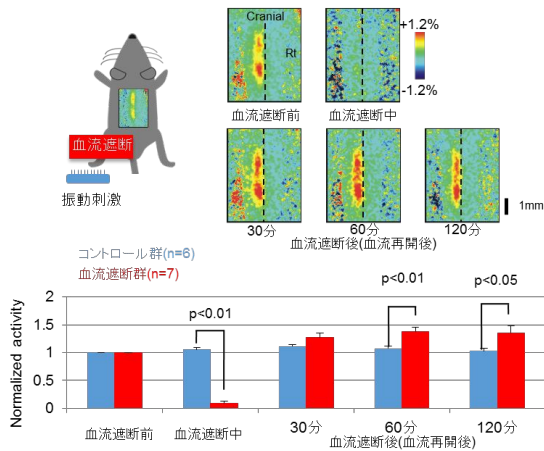


図 4 : 左振動刺激に対する右体性感覚野フラビン応答の変化

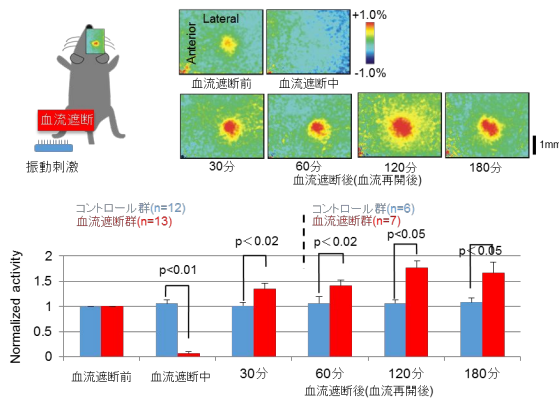


図 5 : von Frey test による行動実験 : 血流遮断後逃避閾値の低下を認めた。

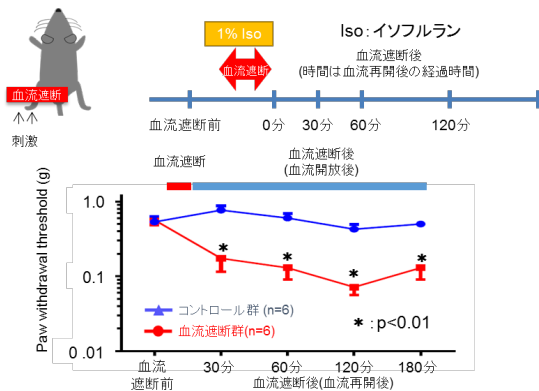
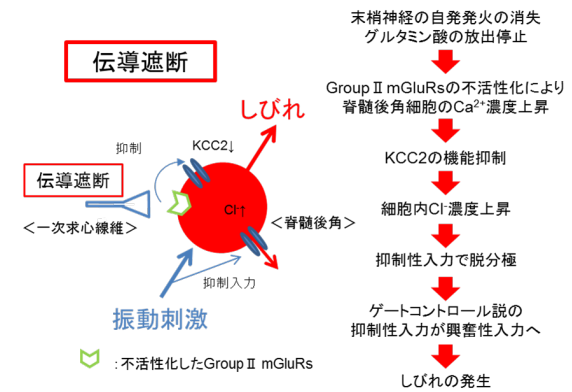


図 6 : 伝導遮断によるしびれ発生の脊髄メカニズム : 脊髄に投与した Group II mGluRs agonist が血流遮断後の逃避閾値の低下とフラビン応答の増強を抑制した しびれの発生には脊髄メカニズムがある。神経切断時同様の機序であることから血流遮断による伝導遮断が脊髄可塑性変化をきたしたと考えられる。



## 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1件)

Tatsunori Watanabe, Mika Sasaki, Seiji Komagata, Hiroaki Tsukano, Ryuichi Hishida, Tatsuro Kohno, Hiroshi Baba, Katsuei Shibuki, Spinal mechanisms underlying potentiation of hindpaw responses observed after transient hindpaw ischemia in mice, Scientific Reports、査読有、in-press、2015

〔学会発表〕(計2件)

渡部達範、佐々木美佳、駒形成司、塚野浩明、菱田竜一、河野達郎、馬場洋、澁木克栄 : 血流遮断後のしびれの脊髄メカニズム: フラビン蛋白蛍光応答の異常増強、日本麻酔科学会 第 61 回学術集会、2014 年 5 月 15 日~17 日、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

渡部達範、駒形成司、塚野浩明、菱田竜一、河野達郎、馬場洋、澁木克栄 : フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いた一過性虚血後のしびれの脊髄機構の解析 : 第 6 回日本運動器疼痛学会、2013 年 12 月 7 日~8 日、神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

河野 達郎 (KOHNO, Tatsuro)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号 : 00313536

(3)連携研究者

澁木 克栄 (SHIBUKI, Katsuei)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号： 40146163