

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460701

研究課題名(和文) 糖尿病性神経障害における脊髄刺激療法による脊髄モノアミン動態の検討

研究課題名(英文) Elucidation of the spinal monoamine dynamics in the diabetic neuropathy by spinal cord stimulation

研究代表者

舟尾 友晴 (FUNAO, TOMOHARU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70433307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は脊髄刺激療法による糖尿病性神経障害ラットの脊髄後角におけるモノアミン・神経アミノ酸動態について調べた。脊髄後角でのモノアミン・神経アミノ酸は脊髄刺激では変化はなく、脳内線条体でのモノアミン・神経アミノ酸も変化はなかった。脳内線条体でのモノアミン・神経アミノ酸動態は自由行動下での糖尿病性神経障害ラットにおいても同様の結果であった。本研究では、脊髄刺激療法の鎮痛機序にモノアミンや神経アミノ酸が関与することを証明することができなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the movement of monoamine and amino acid in the spinal dorsal horn in rats with diabetic mellitus by spinal cord stimulation(SCS). The concentration of monoamine and amino acid in the spinal dorsal horn was not changed by SCS, also in the striatum was not changed. In free-moving diabetic neuropathy rats, the result was same. Our results cannot prove that the analgesic mechanism of SCS for diabetic neuropathy is involved with monoamine and amino acid in the spinal dorsal horn and the striatum.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病性神経障害 脊髄刺激療法 神経アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病性神経障害は網膜症、腎症とともに糖尿病の三大合併症のひとつに挙げられる。初期の症状では両手指や両足趾のしびれのみであるが、進行すると両膝関節以下のしびれに電撃痛が伴うことがしばしばみられる。日常診療において最も難治性の神経障害性疼痛で、アロディニア（通常では痛みと感ぜない程度の刺激を痛みと認識する現象）や電撃痛を伴うことが特徴である。本疾患に対しては有効な治療法が未だに確立されておらず、鎮痛薬の内服や神経ブロック等種々の治療に対して抵抗性を示すことが多い。従って本疾患を有する患者は長期間の闘病生活を強いられる場合が多く、これは患者本人の精神的・経済的負担に留まらず、医療費の増大・生産性の低下等、国家レベルでも多大な損失を生ずる。それ故糖尿病性神経障害による疼痛の有効な治療法の確立は緊急を要する重要な課題である。

(2) 糖尿病性神経障害では末梢神経の脱髄などの不可逆的変化を伴うことが多く、末梢神経の異常興奮を抑制する抗けいれん薬だけでは疼痛の軽減は得られにくいことが多い。そのため中枢神経系における神経伝達物質に対する影響が鎮痛の鍵になるものと考え、我々は下行性疼痛抑制系の賦活化に関するノルアドレナリンやセロトニンを増加させる薬物の研究を行ってきた。しかしこれらの薬物は臨床的に眠気や気分不良といった副作用を伴うことが多い。そこでこのような副作用がない脊髄刺激療法が慢性の神経障害性疼痛患者に施行されることがある。脊髄刺激療法は四肢血流の改善を促すことはわかっているが、その鎮痛機序は明確ではない。脊髄後角でのコリン作動性神経の関与を示唆する動物実験の報告があり、この部位での

コリン作動性ニューロンや GABA 作動性ニューロンは下行性疼痛抑制系で重要な役割を果たすノルアドレナリンの影響を受けると考えられている。従って脊髄後角でのモノアミンや GABA の動態を調べることが脊髄刺激療法の鎮痛機序解明につながると考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 日本を含めた先進国では、糖尿病患者の数は増加の一途をたどり、自国の生産性の低下や医療費の増大といった深刻な問題となっている。糖尿病の合併症のひとつである神経障害は、進行すると下肢のしびれ・疼痛のために自立歩行が不能となり、車椅子生活を余儀なくされる場合も多い。糖尿病性神経障害は細胞内でのソルビトール増加による末梢神経の脱髄変性が原因となる代謝障害と、毛細血管基底膜肥厚による微小循環障害が原因となる血流障害が考えられている。現在、糖尿病性神経障害による下肢の疼痛は難治性であり、様々な鎮痛薬や神経ブロックに抵抗を示すが、脊髄刺激療法が効果を示す場合がある。脊髄刺激療法は四肢血流障害に対し治療成績が良く、鎮痛機序のひとつに自律神経を介した血流改善が考えられている。しかし脊髄後角でのコリン作動性ニューロンの関与も示唆されていることから、モノアミンや GABA の関与する鎮痛機序も十分考えられることからこれらの脊髄後角での動態を明らかにする。

(2) 本研究では糖尿病性神経障害モデルラットの Th11 レベルでの脊髄刺激を行い、Th13 レベルの脊髄後角にマイクロダイアライシスプローブを留置し、モノアミン・GABA・グルタミン酸などのアミノ酸を測定する。これにより脊髄刺激療法の下行性疼痛抑制系への関与について分析することで、その作用

機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糖尿病性神経障害モデルの作成

体重180-230gのSD系雌性ラットにストレプトゾシン60mg/kgを生理食塩水で希釈、1.5mMのクエン酸でpH4.5に調整したものを尾静脈から投与する。投与後、22℃で12時間毎の昼夜サイクルで飼育し、食餌と水分は自由に与える。これにより血糖値は400mg/dlより高値を示すようになり、ストレプトゾシン投与2週間後には約98%のマウスが糖尿病モデルラットとなる。機械刺激に対する痛覚過敏はストレプトゾシン投与2週間後から2ヶ月にわたり、観察される。この疼痛の評価は自動式von Frey test が可能な Anesthesiometer 37450(Ugo Basile社)を用いて行い、得られたスコアに基づいてアロディニアや痛覚過敏の診断を行う。同週齢のラットをコントロール群として用いる。

#### (2) 脊髄マイクロダイアライシス法による濃度測定

ウレタン1.5g/kgによる全身麻酔下でTh11-L1レベルの椎弓切除を行い、ラット用脊髄固定装置STS-B(Narishige)で脊髄を固定する。Th11レベルに特殊なMicrostimulatorを硬膜表面に留置し、Th13レベルにMicromanipulatorを用いて直埋型透析プローブ(D-I-4-01,Eicom)を矢状面に対し15度傾け、脊髄表面から1mmの深さまで留置する。シリンジポンプ(ESP-64, Eicom)を用いて、透析プローブを乳酸リンゲル液で灌流(2 $\mu$ l/min)し、プローブを通して得られた灌流液を、フラクションコレクターに収集、冷却貯留する。

#### (3) モノアミン・神経アミノ酸の定量

20分間で得られた灌流液40 $\mu$ lのうち20 $\mu$ lを高

速液体クロマトグラフ(high performance liquid chromatography: HPLC)に注入し、ノルアドレナリン・ドパミン・セロトニンを測定する。HPLCの移動相は10%アセトニトリルを含む75mM磷酸緩衝液(pH 3.0)、流速は0.3ml/minとし、分離用カラムはODS系(EICOMPAK SC-5 ODS, Eicom)を用いる。作用電極に純黒鉛、参照電極に塩化銀を装着した電気化学検出装置(HTEC-500, Eicom)を用い、550mVの荷電時に得られたピーク面積から外部標準直線を用いて定量を行った。

残りの20 $\mu$ lは自動誘導体化機能付オートサンプルインジェクターを用いて高速液体クロマトグラフ(high performance liquid chromatography: HPLC)に注入する。HPLCの移動相は0.1Mリン酸塩緩衝液(pH6.0)-メタノール(8:3,v/v)、流速は0.23ml/minとし、分離用カラムはODS系(EICOMPAK SC-50DS, Eicom)を用いる。作用電極に純黒鉛、参照電極に塩化銀を装着した電気化学検出装置(HTEC-500, Eicom)を用い、600mVの荷電時に得られたピーク面積から外部標準直線を用いて定量を行う。これによりアスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、タウリン、アラニン、GABAの測定を行った。

### 4. 研究成果

(1) ストレプトゾシンの尾静脈からの投与により1週間後には全例血糖値は400mg/dlを超え、2週間からvon Frey testによる痛覚閾値の低下を認めた。ストレプトゾシン投与4週間後には著明な痛覚過敏の状態を呈していた。

(2) ウレタン麻酔下のラット脊髄後角から採取した灌流液中のモノアミン(ノルアドレナリン、ドパミン、セロトニン)と7種の神経アミノ酸(アスパラギン酸、グルタミン、

グルタミン酸、グリシン、タウリン、アラニン、GABA)を前述に記した方法で測定したが、脊髄刺激による変化はみられなかった。刺激方法を定電流や定電圧、パルス幅や出力を様々に変化させたが、脊髄後角モノアミン・神経アミノ酸の濃度に変化はなかった。

なし  
(3)連携研究者  
なし

(3) 脊髄後角での変化はなくとも、脳内の神経アミノ酸、特に GABA 動態の関与を考え、線条体に透析プローブを留置し灌流液を採取した。しかし脊髄刺激による線条体での GABA の変化は認めなかった。モノアミンや他の神経アミノ酸についても同様の結果であった。

(4) 麻酔による脳内 GABA への影響を考慮し、検体である線条体での灌流液採取の数日前にセボフルレン麻酔下に椎弓切除・硬膜表面への電極留置と線条体へのガイドカニューレ留置を行った。麻酔の影響がない自由行動下での脊髄刺激による線条体 GABA 動態を調査したが、刺激による変化は認めなかった。今回の研究では脊髄刺激療法の鎮痛機序としてモノアミンや神経アミノ酸動態の変化が関与していることを明確にできなかった。

#### 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)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

舟尾 友晴 (FUNAO TOMOHARU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70433307

##### (2) 研究分担者