

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460711

研究課題名(和文) In vivo パッチクランプ法による鍼灸鎮痛メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of acupuncture analgesia using in vivo patch-clamp technique

研究代表者

西尾 尚子(Nishio, Naoko)

和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：40648359

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)：鍼治療は慢性疼痛に対して有効な治療の一つであるが、その鎮痛メカニズムは未だ明らかではない。本研究では鍼刺激が脊髄後角におけるシグナル伝達に及ぼす影響についてin vivo パッチクランプ法により解析を行った。鍼刺激は、神経障害性モデルラットにおいて興奮性シナプス後電流の発生頻度並びに振幅に影響を与えなかった。一方、抑制性シナプス後電流の発生頻度を有意に増加させ、振幅には影響を与えなかった。すなわち鍼刺激はシナプス前性に作用して抑制性神経伝達物質であるGABAやグリシンの放出を増強させることにより脊髄後角ニューロンの興奮性を抑制させることで鎮痛作用をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Acupuncture is a kind of the effective treatments for a chronic pain. However, mechanisms of acupuncture analgesia have been poorly understood. In this study, we investigated effects of acupuncture onto the synaptic transmission of dorsal horn neurons by in vivo patch-clamp technique. Acupuncture did not affect the frequency and amplitude of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) in the neuropathic pain model rat. On the other hand, acupuncture increased the frequency of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs), while the amplitude of sIPSCs was not affected by acupuncture. These data suggest that acupuncture analgesia consist of enhancement the release of inhibitory neurotransmitters such as GABA and glycine.

研究分野：疼痛分野

キーワード：patch-clamp 鍼刺激 in vivo パッチクランプ IPSC 脊髄後角

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は既存の非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs) やオピオイドなどの鎮痛薬に抵抗する 경우가多く、治療に難渋する。近年、新規の鎮痛薬・鎮痛補助薬が次々に開発され、慢性疼痛への対応は幅を広げつつある。しかし、未だ慢性疼痛により、QOLやADLが強く制限されている人が多いのも事実である。このような状況を打破するには現存する鎮痛法とは作用機序が全く異なった鎮痛法も必要であり、その手掛かりとなる基礎研究が必要である。そこで数多くの臨床報告や経験から慢性疼痛に有用であると認められている補完代替医療の1つである鍼治療に焦点をあてた。鍼治療の理論は東洋医学的な立場から説明されることが多い。しかしながら、2010年には、鍼刺激がアデノシン濃度を局所的に上昇させることにより鎮痛効果をもたらすという末梢レベルにおける鎮痛メカニズムの報告が発表され、注目をあびた。近年鍼治療の鎮痛メカニズムが西洋医学的な面から裏付けされるようになり、エビデンスが蓄積されるようになったものの、そのメカニズムは完全に解明されているわけではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、鍼刺激が脊髄後角の感覚ニューロンにどのように作用し、鎮痛効果を惹起しているのかを電気生理学的に解析することである。鍼治療が疼痛に有効であることは認められているが、鍼刺激による鎮痛メカニズムについては、様々な仮説が提唱されているものの完全に解明されてはいない。脊髄における鎮痛作用機序が鍼刺激による鎮痛作用において重要な位置を占めていると考えられている。In vivo パッチクランプ法は、ラットを生存させたまま、脊髄の単一ニューロンを記録できるため、生理的に近い状況で神経活動を記録できる手段である。末梢-脊髄-脳といった神経の投射経路を断裂させることなく、痛み情報の中継基地である脊髄後角ニューロンの電気活動をリアルタイムで評価できる。鍼治療を臨床で行うと同様の環境をラットで作ることが可能で鍼刺激のメカニズムを評価するには最適である。以前、当研究グループは、ノーマルラットを用いてラットの外果とアキレス腱の間に鍼を刺入し、鍼刺入前と刺入中に発生する自発性興奮性シナプス後電流(spontaneous excitatory postsynaptic current : sEPSC)と自発性抑制性シナプス後電流(spontaneous inhibitory postsynaptic current : sIPSC)にどのような影響があるか解析を行った。その結果、電位固定下でsEPSCの頻度・振幅における抑制傾向とsIPSCの頻度・振幅における増強傾向を認めた。そこでノーマルラットではなく実際の病的状態におけるモデルラットにおいて鍼刺激はその効果をより強める可能性があると考え、神経障害性モデルラ

ットを用いて検討を行った。

3. 研究の方法

《神経障害性疼痛モデル作成》

雄性 Sprague-Dawley ラットに5週齢の時点で末梢神経障害性疼痛(Spared nerve injury: SNI)モデルを作成した。SNIモデルは坐骨神経から分岐する3枝のうち、腓骨神経を残し、総腓骨神経・脛骨神経を結紮・切断することによって作成する。疼痛は von Frey test で評価し、術後7~10日の時点で下肢に allodynia 様の反応が出現するのを確認して電気生理学的実験に使用した。

《in vivo パッチクランプ法》

In vivo パッチクランプ法に関しては Taniguchi(Pain, 2011)による。ラットをウレタン(腹腔内投与: 1.2~1.5g/kg)で麻醉後、胸腰椎部に縦切開を行い、Th12 から L2 まで椎弓切除術を行う。次にラットを脊髄固定器で固定し、皮切部の辺縁を引き上げることでプールを作成し、脊髄表面を約 36 の酸素負荷した人工脳脊髄液で灌流する。実体顕微鏡下に硬膜を切除し、腰膨大部レベルで後根を内外側に分け、電極刺入スペースを作る。呼吸による脊髄の振動が抑制できていることを確認した上で、クモ膜と軟膜に微細ハサミ、鑷子を用いて電極刺入用の開窓を行い、記録の準備を終える。マイクロマニピュレーターで電極を脊髄内に刺入し、5mV ステップに対する応答電流の変化を指標にギガシールを形成するいわゆるブラインドホールセルパッチクランプ法によって記録を行う。記録細胞は第 1 層の膠様質を狙うが、記録電極を刺入する深さからある程度の同定は可能である。(脊髄表面から約 150 μm 以内)。

4. 研究成果

鍼刺激による脊髄レベルの鎮痛メカニズムを調べるために、神経障害性疼痛モデルラットに in vivo パッチクランプ法を適用し脊髄後角ニューロンのシナプス伝達の解析を行った。神経障害性疼痛モデルラットには SNI モデルを用いた。右側の脊髄膠様質ニューロンから EPSC と IPSC を観察し、右後肢の崑崙(BL)相当部位(外果とアキレス腱の間)に対し、鍼を垂直に刺入した。鍼は、皮内針(線径 0.12、鍼長 3mm)を使用した。

(1) 興奮性シナプス伝達に対する鍼刺激の影響

膜電位を -70mV に固定し、鍼刺激による前後の EPSC の発生頻度、振幅の変化をリアルタイムに観察した。その結果記録したニューロンの約 10%において発生頻度・振幅の減少が見られたが、その他の多くのニューロンにおいては有意な変化が見られなかった。EPSC の発生頻度の減少はシナプス前膜からの興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出減少を示し、振幅の減少は記録されたニューロンの感受性の変化を意味する。

(2) 抑制性シナプス伝達に対する鍼刺激の影響

膜電位を-0mVに固定し、鍼刺激による前後のIPSCの発生頻度、振幅の変化をリアルタイムに観察した。その結果記録したニューロンの約80%において発生頻度の有意な増加を認めた。一方、振幅には、有意な増加は認められなかった。IPSCの発生頻度の増加はシナプス前膜からの抑制性神経伝達物質であるgamma-aminobutyric acid(GABA)、グリシンの放出増強を示す。

以上の結果から、SNIモデルへの鍼刺激は主として興奮性シナプス伝達ではなく、抑制性シナプス伝達に作用すること及びその作用はシナプス後性でなく、シナプス前性に作用していることが示唆された。末梢における鍼刺激がどのような機序によって、抑制性伝達物質の放出を増強させるのかは不明であるが、下行性疼痛抑制系の賦活等が考えられる。今後の検討課題として抑制伝達物質に対する拮抗薬などを用いた薬理的な検討が必要と考える。

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 2件)

1. Taniguchi W, Nishio N, Yamanaka M, Kiyoyuki Y, Sonekatsu M, Yoshida M, Nakatsuka T. TRPV1 channels induce knee osteoarthritis pain -in vivo patch-clamp analysis- Pain Res 2014 29 171-179 査読有
2. Nishio N, Taniguchi W, Miyake Y, Kiyoyuki Y, Yamanaka M, Sonekatsu M, Abe T, Takiguchi N, Yoshida M, Nakatsuka T: A role of CGRP on excitatory synaptic transmission in spinal substantia gelatinosa neurons. The Journal of Functional Diagnosis of the Spinal Cord 35, 10-15, 2014 査読有

[学会発表](計 3件)

1. 西尾尚子, 谷口亘, 曾根勝真弓, 西秀人, 中塚映政, 吉田宗人: 神経障害性疼痛におけるCGRPによる脊髄内興奮性シナプス伝達抑制の可能性. 第9回日本運動器疼痛学会, 東京, 2016. 11. 26-27
2. Nishio N, Taniguchi W, Sonekatsu M, Yamanaka M, Tsutsui S, Nishi H, Yoshida M, Nakatsuka T. Patch-clamp analysis of reactive oxygen species actions on excitatory synaptic transmission in spinal substantia gelatinosa neurons. 16th World Congress on Pain (IASP), 2016.9.26-9.30 Yokohama
3. 西尾尚子, 谷口亘, 曾根勝真弓, 筒井俊二, 西秀人, 中塚映政, 吉田宗人: CGRP

は脊髄後角細胞のNMDA受容体の活動性を増強する. 第38回日本疼痛学会, 北海道, 2016. 6. 24-25

[図書](計 4件)

1. 谷口亘, 中塚映政: 痛みのClinical Neuroscience 8 脊髄機能変化と痛み: アロディニアなどのメカニズムを巡って. 最新医学 71(2): 112-115, 2016 最新医学社
2. 谷口亘, 中塚映政: 特集“痛みとかゆみ”【痛み・かゆみの科学】3. 痛みの神経伝達機序 JOHNS 32(5): 551-554, 2016 東京医学者
3. Wataru Taniguchi, Terumasa Nakatsuka. Chaptor31. Spinal synaptic plasticity in chronic pain. Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord. 2014; 387-398, Springer Japan, Tokyo
4. 谷口亘, 中塚映政. 基礎編 A. 基礎知識 12. 痛みの研究手法 パッチクランプ法 /C. 脊髄 1. 脊髄後角/D. 脳 2. 神経可塑性 /D. 3. 中枢性感作. 痛みの Science & Practice シリーズ6 「痛み診療キーポイント」2014; P.14,41,60,61 文光堂, 東京

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

西尾 尚子(Nishio Naoko)
和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員
研究者番号: 40648359

(2)研究分担者

谷口 亘 (Taniguchi Wataru)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号： 20453194

中塚 映政 (Nakatsuka Terumasa)
関西医療大学・保健医療学部・客員教授
研究番号： 30380752

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()