

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18613013

研究課題名（和文） ニューロパシクペインにおける交感神経遮断の分子生物学的意義

研究課題名（英文） The molecular biological significance of sympathetic nerve block in the neuropathic pain

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・准教授

研究者番号 20145791

研究成果の概要：

交感神経遮断のニューロパシクペインに対する効果の根拠を得るため、ラット脊髄神経結紮モデルを用いて後肢にニューロパシクペインを発生させ、交感神経遮断作用のあるクロニジンの脊髄も膜下投与や腰部交感神経節切除の抗アロディニア作用を行動実験で検証した。クロニジンは用量依存性に抗アロディニア作用を示したが、同じく用量依存性を示すガバペンチンと脊髄も膜下併用投与すると相乗作用を示した。ニューロパシクペインにおける脊髄 Rexid II 層での知覚ニューロンのシナプス伝達の変化、ならびに前述の薬剤や交感神経遮断の抗アロディニア作用との関連を *in vivo* パッチクランプ法で検討中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	450,000	3,850,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：ニューロパシクペイン、脊髄、交感神経遮断、*in vivo* パッチクランプ、ATP

## 1. 研究開始当初の背景

慢性痛の中でも、ニューロパシクペイン（神経因性疼痛）の原因、症状は多彩で、刺激によって誘発されるアロディニアと遷延する自発痛が特徴的であるが、決め手となる治療法が無く、その治療には難渋し、社会的な損失も大きい。1990年以降、ニューロパシクペインの発症メカニズムを説明する基礎的な研究結果が続々と報告され、特に2003年には脊髄ミクログリアにおけるプリン受容体のサブタイプ P2X4 受容体の発現が神経

損傷後のアロディニア発生に決定的な役割を演じていると報告された。

アロディニアの発生には神経損傷部に形成された交感神経線維から発生したバスケッが知覚神経を取り囲み、交感神経から放出されるノルアドレナリンが知覚神経に異所性に多数発現した  $\alpha_2$  受容体に結合して、機能的な異常短絡を形成することが関係しているという説があり、ニューロパシクペインに対する交感神経ブロックの有効例を経験するが、大規模な調査による臨床的エビデ

ンスも、有効性を証明する基礎的データにも欠く。

研究代表者は研究分担者ともにラットミクログリア細胞を用いて、イオンチャンネル型のP2X7受容体はパッチクランプ法で、G蛋白共役型のP2Y受容体は細胞内カルシウム濃度をFra-2で測定することにより、ニューロパシクペインの治療にも用いられるケタミンやリドカインについても検討した成果を発表段階であった。脊髄の *in vivo* patch clampについては経験がなかったが、先駆者が用いたと同型の脊髄・脳定位固定装置やマイクロマニピュレーター、1次元油圧式マイクロマニピュレーターなどを購入し、既存の設備を利用することで研究の遂行は可能と思われた。

## 2. 研究の目的

この研究の目的は、後肢にニューロパシクペインを発生させたラットで、腰部交感神経節切除や抗アロディニア作用が示唆される薬剤の脊髄くも膜下投与、あるいは P2X4 アンチセンス オリゴデオキシヌクレオチドの脊髄投与を行い行動実験で検証するとともに、*in vivo* パッチクランプ法で知覚ニューロンのシナプス伝導を検討して交感神経遮断のニューロパシクペインに対する効果の根拠を得ることであった。

## 3. 研究の方法

### (1) ニューロパシクペインモデルの作成とくも膜下薬剤投与の抗アロディニア効果の行動学的検討

7~15週齢のSD系雄性ラット(体重200~250g)を用い、交感神経の関与が大きいとされる Chung のニューロパシクペインモデルを作成した。1%セボフルレン/酸素で自発呼吸下に麻酔し、一側L5神経根を椎間孔出口で5-0絹糸を用い結紮した。同時にL3/4の椎間より Bahar らの方法で細径のポリエチレンカテーテルをくも膜下腔に留置固定した。手術翌日より、ラットの患肢に von Frey フィラメントで圧刺激、あるいはプロジェクション光源で熱刺激を加え、ラットが患肢の逃避動作をする閾値あるいは潜時を測定した。それぞれのカットオフ値は2.6g、2.0秒とし、反応の有無や潜時を健肢と患肢で比較した。機械アロディニアに対し熱アロディニアは顕著でなかったため、前者のみ検討した。手術後3~7日の回復期を置いた後、クロニジン 5,15,30,50,100  $\mu$ g, ガバペンチン 1,10,30,100,300  $\mu$ g をくも膜下に留置したカテーテルより投与し、15,30,45,60,90,120分後に抗アロディニア作用を検討した。また、得られた各々の薬剤の ED<sub>50</sub> の比率で2剤を混合し、濃度を変えて2剤同時投与時の抗アロディニア作用について検討した。

### (2) 腰部交感神経切除のニューロパシクペインに対する作用の行動学的検討

アロディニアが発現したラットに、全身麻酔下に背臥位に固定して開腹し、実体顕微鏡下に傍第1腰椎から第3腰椎の交感神経節、交感神経幹を確認し剪刀で切除する。創を閉鎖し、数日の回復時間を置いた後、機械的アロディニア、サーマルアロディニアの潜時を評価した。

### (3) 脊髄細胞外ATPの測定

細胞外ATPが神経系のシグナル伝達に関与している事がわかっている。また、ATP受容体のP2X4の刺激がニューロパシクペインの本態をなすと考えられており、脊髄細胞外のATPを測定する事には意義がある。近年、簡易に測定できるATPバイオセンサーがSarrisa社で開発された。脳脊髄固定装置にラットを固定し、Th12からL2まで椎弓切除し、加温・酸素化したKrebs液を還流しながらL1の後根近傍の脊髄にATPバイオセンサーおよびnullセンサーを刺入し、ニューロパシクペイン出現群とシャム群とで比較した。

### (4) *In vivo* patch clamp によるシナプス伝達の検討

ニューロパシクペインにおける脊髄知覚ニューロンのシナプス伝達の変化、ならび抗アロディニア作用をもたらす薬剤や交感神経遮断との関連を知るには *in vivo* patch clamp法が有用な手段である。

7~15週齢のラットに1.2~1.5g/kgのウレタンを腹腔内投与して麻酔し自発呼吸下で酸素投与し、体動が見られたときは初回投与量の1/2程度のウレタンを追加投与した。ラットを腹臥位として約3cmの背部皮膚切開を置き、傍脊椎の筋肉を剥離してTh12からL2までの椎弓切除を慎重に行った。硬膜まで露出できたところで、脳脊髄固定装置(ナリシゲSTS-7-S)にラットを固定した。視野の確保と加温したKrebs液を還流させるため、切開部の皮膚は数箇所牽引して薬液プールを作成した。実体顕微鏡下に硬膜を切開し、L1の後根を確認し、ガラスロッドで後根を軽く外側に圧排して脊髄記録ガラスピペット電極刺入のスペースを確保し、電極刺入部の軟膜をマイクロ手術用ピンセットで裂いた。Borosilicateガラスピペットでテーパーの細長い記録電極を作成し、抵抗が8M $\Omega$ 程度のものを用いた。(図1)



図1.

アンプから5mVのパルス電圧を発生させながら、マイクロマニピュレーターを用いて記録電極を脊髄膠様質（Rexid第Ⅱ層）に向けて電極を刺入してゆく際、脊髄表面に達した所から電極内に注射器で陽圧をかけて細胞をよけながらゆっくりと進めていった。

記録電極先端が細胞の正面で接触するとパルス電圧に対する応答電流が10~20%減少するので、その時点で陽圧を解除し-70mVの電圧をかけてギガオームシールが形成されたら、記録電極に陰圧をかけて細胞膜を破り、ホールセルパッチクランプを完成する。（図2）

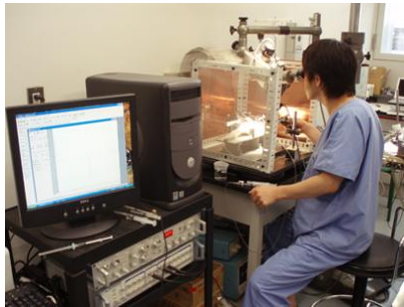


図2.

in vivo パッチクランプ法でピペット内液の組成と保持電圧を変える事により EPSC と IPSC を測定でき、足底刺激時の変化を検討することとした。また、波形解析により amplitude は postsynaptic、frequency は presynaptic の変化を表す。Ⅱ層へは脊髄表面に灌流させた薬剤も容易に浸透するのでその効果も検証することができる。

#### 4. 研究成果

(1) 脊髄神経結紮を行った患肢では6週間にわたって機械アロディニアを認めた。健側肢の閾値も患側ほどではないが低下した。クロニジン、ガバペンチン単独の脊髄くも膜下投与でともに用量依存性の抗アロディニア作用を認めた（図3）。

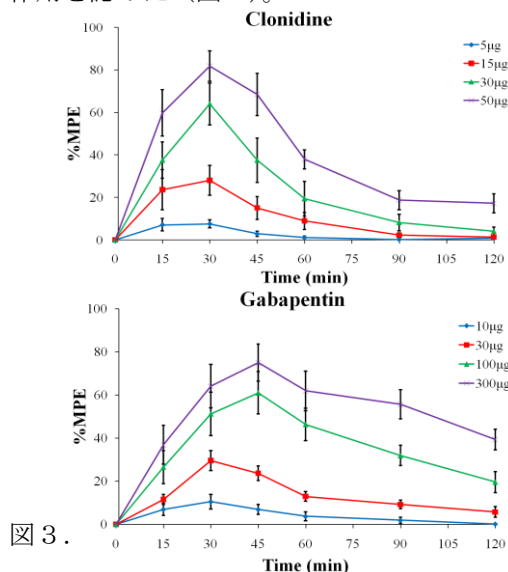


図3.

用量-反応曲線から求めたそれぞれの ED<sub>50</sub> はクロニジン 17.8±1.8µg、ガバペンチン 49.9±5.0µg であった（図4）。

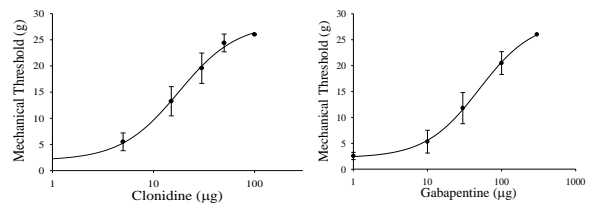


図4.

クロニジンとガバペンチン併用脊髄くも膜下投与時の ED<sub>50</sub> はクロニジン 3.5±0.6µg、ガバペンチン 9.8±1.5µg で、isobologram の additive line より下方にあり、2剤は synergistic に作用すると考えられた（図5）。

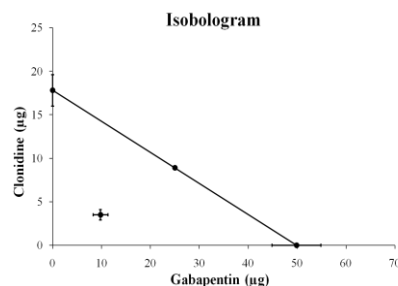


図5.

(2)~(4) 腰部交感神経節切除モデルの作成は数匹のラットでは成功したが、生存例が少なく、アロディニアの抑制に関しては一定の傾向が得られるまでのサンプル数が得られていない。

脊髄細胞外ATP濃度の測定は、2セット（10本）のATP biosensor電極を再利用しながら約20匹のラットで試行を行ったが、カフェインやニコチンの全身投与によっても細胞外ATP測定値の増加が確認できずbiosensorの信頼性が疑問視され、biosensorが高価であるためその後の実験を保留した。

In vivo patch clamp によるシナプス伝達の検討に関しては、設備が揃うとともに実験を開始した。研究期間内に約20匹のラットで試行したが未だ安定した記録は得られていない。これは、手技的な問題により動物および脊髄の状態が長時間良く保たれていない事に起因していると思われるので、より慎重な前処置により成功すると考えている。

#### 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 7 件）

1. Tadashi Matsuura, Yutaka Oda, Katsuaki Tanaka, Takashi Mori, Kiyonobu Nishikawa, Akira Asada. Advance of age decreases the minimum alveolar

- concentrations of isoflurane and sevoflurane for maintaining bispectral index below 50. *British Journal of Anaesthesia* 2009; 102: 331-335. 査読有り
2. 池永十健, 田中克明, 萩原千恵, 吉岡美和子, 西川精宣, 浅田章: ラリンジアルマスクを用いて全身麻酔下で経尿道的膀胱結石破碎術を施行した成人の Larsen 症候群症例: *臨床麻酔* 33: 41-44, 2009. 査読有り
  3. Kazutoshi Ikeshita, Kiyonobu Nishikawa, Sumiko Toriyama, Tomoyuki Yamashita, Yoshuyuki Tani, Tokuhiko Yamada, Akira Asada. Landiolol has a less potent negative inotropic effect than esmolol in isolated rabbit hearts. *Journal of Anesthesia* 2008; 22: 361-366. 査読有り
  4. 清水雅子, 舟尾友晴, 田中克明, 狩谷伸亨, 西川精宣, 浅田章: 術中輸液管理に苦慮した食道癌根治術症例—汎下垂体機能低下症の合併—: *臨床麻酔*, 32(5): 929-930, 2008. 査読有り
  5. 宮田妙子, 長谷一郎, 舟尾友晴, 中西美保, 飯室慎祐, 狩谷伸亨, 西川精宣, 浅田章: 薬剤性過敏症候群が疑われた 1 症例: *日本ペインクリニック学会誌*, 15(1): 14-17, 2008. 査読有り
  6. Tadashi Matsuura, Yutaka Oda, Kazutoshi Ikeshita, Kiyonobu Nishikawa, Kazuya Ito, Akira Asada. Differential electroencephalographic response to tracheal intubation between young and elderly during isoflurane - and sevoflurane - nitrous oxide anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia* 2007; 99: 858-863. 査読有り
  7. Mika Nakanishi, Takashi Mori, Kiyonobu Nishikawa, Makoto Sawada, Miyuki Kuno, Akira Asada. Effects of general anesthetics on P2X7 and P2Y receptors in a rat microglial cell line. *Anesthesia and Analgesia* 2007; 104: 1136-1144. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

1. 西川精宣: 教育講演: 脊髄鎮痛と交感神経: 日本臨床麻酔学会 第 28 回大会, 京都, 2008 年 11 月 22 日
2. Yoshihiro Yamama, Kiyonobu Nishikawa, Tomoharu Funao, Tadashi Matsuura, Takashi Mori, Akira Asada. Intrathecal gabapentin and clonidine synergistically inhibit allodynia in spinal nerve ligation rats. 2008 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists. Orlando, USA, 2008 年 10 月 20 日
3. 舟尾友晴, 長谷一郎, 高橋陵太, 宮田妙子, 義元徳祥, 西川精宣, 浅田章: 肺癌胸壁浸潤による胸背部痛に対し、肋間神経高周波熱凝固術が有効であった 2 症例: 第 42 回 日本ペインクリニック学

- 会, 福岡, 2008 年 7 月 20 日
4. 山間義弘, 西川精宣, 舟尾友晴, 森 隆, 浅田 章 Clonidin と Gabapentin のくも膜下併用投与は相乗的にアロディニアを抑制する: 第 55 回日本麻酔科学会学術集会, 横浜, 2008 年 6 月 12 日
  5. 宮田妙子, 長谷一郎, 舟尾友晴, 義元徳祥, 西川精宣, 浅田章: 難治性吐逆に対する治療経験: 第 41 回 日本ペインクリニック学会, 横浜, 2007 年 7 月 18 日
  6. 森 隆, 久野みゆき, 山間義弘, 仲西未佳, 西川精宣, 浅田章: リドカインのミクログリアプロトンチャンネルに及ぼす作用: 第 54 回 日本麻酔科学会学術集会, 札幌, 2007 年 5 月 31 日

[図書] (計 1 件)

1. 浅田章, 西川精宣 編. 局所麻酔薬中毒・アレルギー. 克誠堂出版 2008. 全 224 頁
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・准教授  
研究者番号: 20145791
  - (2) 研究分担者  
森 隆(MORI TAKASHI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 00336786
  - (3) 連携研究者  
なし