

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月26日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592020

研究課題名（和文） 神経障害性疼痛モデルにおける神経分泌能解析
～痛覚過敏への末梢神経機能の関与研究課題名（英文） Evaluation of neuroendocrine in primary afferent neuron
of neuropathic pain

研究代表者

杉浦 健之（SUGIURA TAKESHI）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20295611

研究成果の概要（和文）：神経絞扼性モデル動物では、温冷水を用いた行動実験では、水への接触の影響が出た。マウス足底皮下への DiI 注入後数週間で脊髄後根神経節細胞まで DiI は輸送された。足底に分布する培養神経細胞では、カプサイシンへの反応性から TRPV1 を発現した細胞の頻度は比較的少なかった。皮膚と内臓へ分布する神経では、TRPV1 の関与と酸に反応するイオンチャネルも異なることが示唆された。最近 TRPA1 阻害が神経原性炎症を抑制することが報告され、TRPA1 の神経分泌能への関与が示唆される。

研究成果の概要（英文）：Behavior tests, which study on hypersensitivity to thermal stimulation, have indicated the effect of water in CCI model. Primary afferent neurons innervated to mouse hind-paw were labeled and discriminated by using DiI. Capsaicin sensitivity of hind-paw neurons suggested that TRPV1 might have relatively little contribution for nociception and neurogenic inflammation. Recently, TRPA1 inhibition was reported to reduce neurogenic inflammation, which suggests that TRPA1 might be involved in neuroendocrine in primary afferents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：パッチクランプ、後根神経節、侵害受容器、サーモグラフィー

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛モデルにおける痛覚過敏については数多くの報告がなされ、痛覚過敏における末梢侵害受容器の感作の関与は明らかとされている。そこで、侵害受容神経が感作された場合、神経伝達物質の分泌能も亢進することが考えられる。しかし、神経障害性疼痛モデルはもとより、ほかの疼痛モデル

においても、神経伝達物質の分泌能を指標とした、侵害受容神経の機能解析における研究は、まだ進められていなかった。

応募者はこれまで、炎症性物質が、侵害受容器を感作することを明らかにした。つまり、ブラジキニン（J Neurophysiol 2002）や、セロトニン（J Neurosci 2004）が、侵害受容器にあるカプサイシン受容体の感受性を

増し、温熱痛覚過敏・自発痛（体温で興奮）を引き起こす機序になりうることを示唆している。末梢神経の過敏性が、炎症性痛覚過敏の病態となっていることは明らかであるが、神経障害性疼痛に関しても、検討していきたいと考えていた。

そのようななか、応募者は外来診療中に、神経障害性疼痛の代表的疾患のひとつである三叉神経痛の患者において、処置時に激しい痛みを伴う顔面のフラッシュ（血管拡張）を観察した。侵害受容神経は、痛覚を伝えるだけでなく、神経伝達物質を放出し、神経原性炎症を引き起こす機能も持ち合わせることを考えると、フラッシュのメカニズムの一つに末梢神経分泌能の亢進が関与することが疑われる。すなわち、三叉神経痛（神経障害性疼痛）では、末梢神経機能（神経伝達物質分泌）亢進をきたしているのではないかと推察した。

2. 研究の目的

本研究では、侵害受容神経の神経伝達物質分泌能に着目し、培養一次感覚神経細胞と病態モデル動物を用いた基礎研究により神経障害性疼痛のメカニズムを解明することを目的とする。神経障害性疼痛のモデル動物には、坐骨神経を結紮する CCI（chronic constriction injury）モデルを使用する。すなわち、侵害受容に関わる受容体・イオンチャンネルが感作されることにより神経興奮性が増大すると同時に、神経分泌能も亢進しているのではないかと考え、この仮説の検証を行う。

3. 研究の方法

足底皮膚・筋に分布する神経の同定

麻酔下において、実験動物の足底部分に、DMSO で溶解した dicarbocyanine dye DiI を 27G 針を用いて $2\mu\text{l}$ 注入する。DiI が脊髄後根神経節細胞まで逆向性輸送されるまで、1週間程度待つ。1週間以降に脊髄後根神経節（L4-6）を取り出し、コラゲナーゼ、トリプシン処理後、神経細胞を単離培養し、細胞体に逆向性軸索移動した DiI を特殊フィルターを用いた顕微鏡下で観察し、足底部分に分布する一次求心神経を同定する。電気生理学的実験はラベルされた神経からのみ行う。応募者はすでに特定の臓器（消化管）に分布する感覚神経の同定方法を用いた実験系は確立しており（Sugiura et al., J Neurosci 2004, 24(43):9521-30, J Neurosci 2005, 9:25(10):2617-27）、これを応用する。

パッチクランプ記録

皮膚侵害受容器における痛覚受容に関わる受容体・イオンチャンネルの性質、神経の興奮性を明らかにする。応募者は、侵害受容に

関わるイオンチャンネルの中でも、カプサイシン受容体（Sugiura et al., J Neurophysi 2002, 88(1):544-8, J Neurosci 2004, 24(43):9521-30）と酸感受性イオンチャンネル（Sugiura et al., Neurosci Lett 2003, 23:350(2):109-12, J Neurosci 2005, 9:25(10):2617-27）に興味を持っているため、神経障害が加わった後の皮膚一次求心神経におけるそれらのイオンチャンネルの薬理的性質を調べる。応募者の所属する麻酔・危機管理学講座には、すでに独自のパッチクランプ記録のセットアップを保有しており、電気生理学実験は現在稼動中である。可能であれば、記録後、細胞をホルマリン固定し、侵害受容に関わる蛋白質の発現を免疫染色法で行い、記録した神経細胞のキャラクターを調べる。イオンチャンネルの検討には電位固定法を用い、神経興奮性の実験には電流固定法を用いる。

SP, CGRP の発現様式の検討

神経障害性疼痛モデル動物の神経興奮性の増大が電気生理学的実験で検証できたのち、神経伝達物質分泌能の亢進を検証する。SP や CGRP の神経伝達物質の発現量変化を調査する。侵害刺激を行った後の変化や、神経障害性疼痛モデルにおける反応性の増大を捉える。

疼痛行動学的検討と足底温度検査

今回購入予定のサーモグラフィーを用いて、足底の温度変化を調べる。同時に、疼痛閾値などの行動学変化も捉える。次に、神経障害性疼痛モデル動物において、熱・機械・化学刺激に対する閾値がどのように変化するか調べ、さらにサーモグラフィーを用いて、刺激に対する足底の温度変化を捉え、コントロールと比較検討する。

(1) 機械刺激； VFH フィラメントで閾値を測定

(2) 温熱刺激； 温水・冷水を用いる

(3) 化学刺激； カプサイシンを投与

4. 研究成果

神経損傷の機序は様々考えられるが、今回の研究では神経絞扼モデルを採用した。ラット大腿中央部あたりで坐骨神経をクロム処理された糸で緩く絞扼すると、神経障害性疼痛が観察される。行動学実験において、CCI ラットは、安静時の自発痛や熱痛覚過敏が観察された。温度覚には TRP ファミリーの受容体が関与していることが考えられ、その中でも TRPV1 が熱痛痛覚過敏に関与する可能性がある。温度の行動実験では温水、冷水に足を付ける方法で実験を行ったが、温度に反応しているのではなく水に付けることで反応していることも考えられ、ホットプレートや、

ペルチエ素子を用いた冷温板の開発も必要と考えられた。

電気生理学的手法を用いて、神経の興奮性すなわち、皮膚侵害受容器における痛覚受容に関わる受容体・イオンチャネルの性質を明らかにすることを目的に実験を進めてきた。パッチクランプ記録法を用いて、イオンチャネルの開口変化の検討には電位固定で、神経興奮性の実験には電流固定でおこなった。これまで侵害受容に関わるイオンチャネルの中でも、カプサイシン受容体と酸感受性イオンチャネルの薬理学的性質を調べており、さまざまな代謝型の受容体を介して興奮性を増すことがこれまでに分かってきた。

逆向性染色法を用いた特異的な感覚神経の同定では、実験動物の足底に DiI を注入後、数週間間の移動の時間を設けて、脊髄後根神経細胞を取り出し、イオンチャネルの反応性を検討した。足底の神経支配を考え、第4、5腰椎神経を選択した。顕微鏡下で、DiI を含んだ培養神経細胞が確認され、これまで腸管・内臓神経で行った手法が、皮下への注入でも可能であることが確認できた。電気生理学の実験では、足底を神経支配していると考えられる培養神経細胞において、侵害刺激である酸とカプサイシンへの反応を調べた。これまで研究していた消化管を支配している一次感覚神経細胞と反応性が異なり、カプサイシンに対して反応する一次感覚神経細胞が少なかった。カプサイシン $1 \mu\text{M}$ への反応性から、TRPV1 の分布は相対的に少ない可能性が考えられる。pH3-6.5 の酸への反応性も、電流の反応パターンからは異なるイオンチャネルが関与していると考えられたが、イオンチャネルの同定にはできていない。

TRPV1 の反応性について評価していたが、研究期間中に他の研究室から一次感覚神経に分布する TRPA1 を阻害することで、皮膚の神経原性炎症を抑制し、脊髄での神経情報伝達の調節に関与する可能性が報告された。TRPA1 は TRP ファミリーに属する受容体で、TRPV1 が侵害熱・カプサイシンに対して反応する一方、冷受容器の他、マスタードオイル、シナモンなどの化学物質に対して反応する受容体として考えられている。したがって冷温の研究を行うべきであった。

SP と CGRP が同一神経の神経終末および細胞体にあることは、すでに免疫染色法で示されており、さらにそれらの神経は血管に分布していることも報告されている。Acta Physiologica Scandinavica Volume 130, Issue 1, pages 33-40, 1987 そこで新たな研究手段として、組織中の微少濃度を測定する微小透析法を用いて、組織中の CGRP や SP の濃度を定量的に測定することを試みた。しかしながら、微小環流の段階で、検体サンプリングが確立できなかつた。侵害受容神経の神

経伝達物質分泌能を直接測定でき、動的にも定量できる方法であったが、技術的な限界と考える。

神経分泌能の指標の一つに血管拡張を考えている。ドップラー血流計・サーモグラフィーを用いた侵害受容神経の興奮性の検討では、侵害受容神経の神経伝達物質分泌機能の評価を、血管拡張を指標として行った。カプサイシン刺激によりドップラー血流計でとらえられる血流量増加を確認できているが、プローブのサイズが実験動物には大きすぎるため、また変化量が少ないため、サーモグラフィーでの測定方法での検討を行った。サーモグラフィーは、今回購入した遠赤外線カメラ (ARTCAM-320) を使用して検討した。サーモグラフィー解像度は十分と考えられるが、実験動物の小ささと固定が問題となった。

●研究成果のまとめ

(1) 神経絞扼性神経障害性モデル動物では、温冷水を用いた温熱痛覚過敏の検討では、水への接触の影響が出る

(2) 足底皮膚へ分布する神経細胞の同定方法として、DiI を用いた逆行性染色法が確立された。マウス足底皮下への注入後数週間後脊髄後根神経節細胞まで DiI は輸送される。顕微鏡下で、特殊フィルターを用いて容易に同定できる。

(3) 足底に分布する神経細胞を急性培養して行った電気生理学の実験では、カプサイシンへの反応性から、TRPV1 を発現した細胞の頻度は比較的少ない。皮膚と内臓へ分布する神経では、TRPV1 の関与が異なることが示唆される。

(4) 足底に分布する神経細胞を急性培養して行った電位固定パッチクランプ実験では、酸を投与した場合に観察された電流反応パターンから、内臓神経とは異なるイオンチャネルの関与が示唆される。

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9件)

- ① Takayanagi T, Sasaki H, Kawashima A, Mizuochi Y, Hirate H, Sugiura T, Azami T, Asai K, Sobue K. A new enteral diet, MHN-02, which contains abundant antioxidants and whey peptide, protects against carbon tetrachloride-induced hepatitis. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 査読有, 35(4):516-22. 2011
- ② 杉浦健之、徐 民恵、幸村英文、平手博之、藤田義人、薊 隆文、伊藤彰師、笹野 寛、

- 祖父江和哉 プラミペキソールが有効であった有痛性下肢運動障害疾患の 1 症例 日本ペインクリニック学会誌, 査読有 18(4), 384-387, 2011
- ③ 杉浦健之、秋吉瑠美子、加藤利奈、笹野 寛、祖父江和哉 巨大ブラを有する患者に対する自発呼吸下腕神経叢ブロック併用全身麻酔の経験 麻酔 60(9), 1101-1103, 査読有, 2011
- ④ 祖父江和哉, 高柳猛彦, 平手博之, 杉浦健之, 藤田義人, 浅井清文 水チャネル<アクアポリン>の中樞神経における多様な機能と関連疾患 日本歯科麻酔学会雑誌, 査読有, 38(2), 145-150, 2010
- ⑤ Morita M, Sasano H, Azami T, Sasano N, Fujita Y, Ito S, Sugiura T, Sobue K A novel skin-traction method is effective for real-time ultrasound-guided internal jugular vein catheterization in infants and neonates weighing less than 5 kilograms. Anesth Analg. 査読有, 109:754-9. 2009
- ⑥ Sasano N, Morita M, Sugiura T, Sasano H, Tsuda T, Katsuya H. Time progression from the patient's operating room entrance to incision: factors affecting anesthetic setup and surgical preparation times. J Anesth. 査読有, 23(2):230-4. 2009
- ⑦ Sasano H, Sasano N, Ito S, Fujita Y, Sugiura T, Morita M, Sobue K. Continuous positive airway pressure applied through a bronchial blocker as a treatment for hypoxemia due to stenosis of the left main bronchus. Anesthesiology. 査読有, 110:1199-200. 2009
- ⑧ Mizumura K, Sugiura T, Katanosaka K, Banik RK, Kozaki Y. Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? Exp Brain Res. 査読有, 196(1):53-65. 2009
- ⑨ Fujita Y, Takeuchi A, Sugiura T, Hattori T, Sasano N, Mizuochi Y, Sobue K. Before-after study of a restricted fluid infusion strategy for management of donor hepatectomy for living-donor liver transplantation. J Anesth. 査読有, 23:67-74. 2009
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 徐民恵、杉浦健之、薊隆文、伊藤彰師、笹野寛、笹野信子、大堀、春原啓一、津田喬子、祖父江和哉 脊髄鎮痛で疼痛管理している仙骨脊索腫による難治性下肢痛の 1 症例 日本ペインクリニック学会第 44 回大会(2010.07.1-3, 京都)
- ② 幸村英文、Miksa Michael、Wang Ping、伊藤彰師、杉浦健之、祖父江和哉 Sepsis は LPS-CD14 経路を介して MFG-E8 を抑制しマクロファージのアポトーシス細胞貪食能を抑制する—新しい貪食作用の検出方法を用いた検討— 日本麻酔科学会第 57 回学術集会(2010.06.3-5, 福岡)
- ③ 伊藤彰師、杉浦健之、鈴木悦子、幸村英文、草間宣好、水落雄一朗、薊隆文、大堀久、春原啓一、祖父江和哉 腰部交感神経節ブロックを施行した肢端紅痛症の 1 例—ブロック後の経過を含めて— 第 21 回日本ペインクリニック学会 東海地方会(2010.05.08, 名古屋)
- ④ 杉浦健之、木村卓二、島田靖子、徐民恵、平手博之、藤田義人、笹野信子、笹野 寛、津田喬子、祖父江和哉: 多発性硬化症に伴う前胸部・下肢痛に対して脊髄刺激療法を施行した 1 例 第 21 回日本ペインクリニック学会 東海地方会(2010.05.08, 名古屋)
- ⑤ 杉浦健之、森田正人、平手博之、笹野寛、春原啓一、津田喬子、祖父江和哉 頸・背部の筋れん縮に伴う疼痛に対する A 型ボツリヌス毒素製剤の治療効果 日本ペインクリニック学会 第 43 回大会(2009.07.16-18, 名古屋)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
杉浦 健之 (SUGIURA TAKESHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 20295611
- (2) 研究分担者
祖父江 和哉 (SOBUE KAZUYA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 90264738
- (3) 連携研究者
該当者なし