

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11104

研究課題名(和文) 両側後根付き脊髄スライスを用いた高速画像解析法による神経障害性疼痛発生機序の解明

研究課題名(英文) The analysis of plastic change in spinal dorsal horn after peripheral nerve injury using spinal cord slice with attached both side of dorsal roots.

研究代表者

馬場 洋 (Hiroshi, Baba)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00262436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：「末梢神経損傷によって脊髄後角細胞の興奮性が増強している」という仮説を検証するために、L5レベルで左右両方の後根を付した脊髄スライスを作成し、両側の後根を同時に電気刺激して後角細胞に誘発される細胞内Ca<sup>2+</sup>変動を記録した。末梢神経損傷モデルはSpared Nerve Injuryモデルを用いた。正常側では後根刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇は変化率1.5～2.5%で記録することができた。しかし、正常側と比べて神経損傷側の反応はすべてのスライスで減少していることが判明した。「末梢神経損傷により脊髄後角細胞の興奮性が増強して神経障害性疼痛がおこる」という考え方が必ずしも正しくないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床で遭遇する神経障害性疼痛患者の痛みの原因は脊髄における可塑性変化の結果、末梢から伝わってきた感覚信号が脊髄で増幅されて上位中枢である脳に伝わるためと考えられてきた。しかし、今回の実験結果から、脊髄から脳に送られる信号はむしろ弱まることが示唆され、脳への信号が弱まっても、それを痛みとして感じるのは脳における何らかの可塑性変化のためと予想された。本研究の結果は、今後の神経障害性疼痛の発生機序の解明は脳の感覚野あるいは辺縁系(情動系)をターゲットとすべきことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Neuropathic pain after peripheral nerve injury is thought to be caused by the augmented activity of spinal cord dorsal horn (DH). However, whether peripheral nerve injury augments the activity of DH neurons evoked by peripheral tissue stimulation is controversial. To address this issue, we undertook intracellular Ca<sup>2+</sup> imaging studies using spinal cord slices with attached both side dorsal roots, and examined if the excitability of injured side of dorsal horn is more increased than normal side. The excitability of injured side is not increased, but actually decreased. It is unlikely that peripheral nerve injury augments the activity of DH neurons.

研究分野：麻酔科学

キーワード：脊髄スライス 末梢神経損傷 細胞内Ca 光学的測定 両側後根刺激 成熟ラット

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

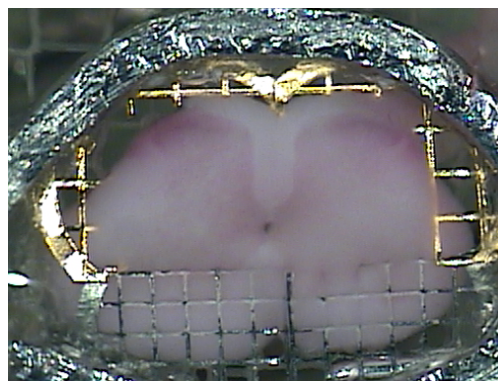
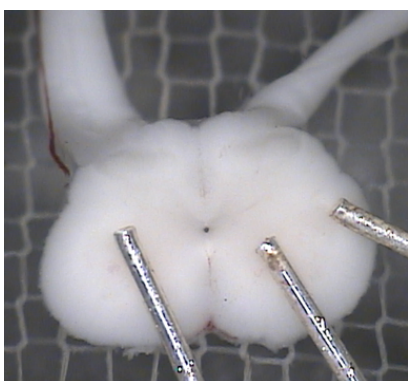
末梢神経が傷害されるといわゆる神経障害性疼痛と言う非常に難治性の痛みを発症することがあるが、その発症機序は現在でも明らかではない。ただし、一つの仮説として、「末梢神経を損傷すると脊髄後角に可塑性変化が生じ、上位中枢である脳に投射する脊髄後角細胞の興奮性が高まることによって痛みが発生する」という機序が1970年代頃から長い間信じられてきた。しかしながら、長年、帯状疱疹後神経痛（神経障害性疼痛の一種）で苦しんでいた患者の脊髄後角が非常に萎縮しているという事実や脊髄くも膜下麻酔時に腰部脊髄液中に局所麻酔薬を注入すると間違いなく脊髄後角細胞の興奮は減少しているはずなのに下肢を触ると神経障害性疼痛と類似した極めて不快なしびれ感が生じることから、必ずしも脊髄後角細胞の興奮性の増強が神経障害性疼痛の発症機序ではないのではないかという疑問が生じた。また、末梢神経を損傷すると脊髄後角細胞の興奮性が高まるという電気生理学的な報告が散見されるが、その細胞が末梢神経損傷前はどのような興奮特性だったのかは知ることができないため、理論的には末梢神経障害によって記録細胞の興奮性が高まったことを証明することはできないはずである。しかし、上記のような仮説が既に確定した真実のように信じられていた。

### 2. 研究の目的

本研究はまず成熟ラットの脊髄スライスを用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行うに当たって、最適な実験方法を確立することを目的とした。脊髄スライスを用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングはこれまで生後数日後の幼若動物にのみ可能であったので、神経障害性疼痛モデル動物には適応できない方法であった。本研究では、これまで不可能とされてきたものを可能にすることを第一の目的とした。次に末梢神経損傷後に本当に脊髄後角細胞の興奮性が増強しているかどうか細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを用いて、神経損傷側と健側を比較することによって検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では光学的に細胞の興奮を可視化できる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法を用い、脊髄後角の興奮性の全体像を可視化する方法を用いた。これまでの方法では、神経損傷の前後で脊髄後角細胞の興奮性の違いを調べることは不可能だったので、本研究では神経損傷側と非損傷側の脊髄後角細胞の興奮性を比較することによって、損傷側で本当に興奮性が増強しているかどうかを調べた。具体的には、末梢神経損傷の動物モデルである Spared Nerve Injury (SNI) モデルを用いた。この神経障害性疼痛モデルは坐骨神経の3分枝のうち、脛骨神経と腓骨神経を結紮切断し、腓腹神経のみを温存するというこのモデルで、神経損傷後、1週間以内に腓腹神経領域への触刺激による逃避閾値が大幅に低下する。この動物モデル (Wistar ラット) から腰髄 L5 レベルで左右両方の後根を付した脊髄スライス (下図右: 染色前、下図左: 染色後) を作成し、 $\text{Ca}^{2+}$  指示薬である Rhod-2 でスライスを染色し、神経細胞内に取り込ませた。このスライスの両側の後根を同時に電気刺激して後角細胞に誘発される細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  変動の大きさを光学的に測定し、神経損傷側が対側と比べて細胞の興奮がより大きくなっているか検証した。この方法を使えば、スライスの出来具合や染色の状況による変動を除外し、両側同じ条件で比較できるはずである。もし、長年信じられてきた仮説が正しいとすれば、健側と比べて損傷側の方が後根刺激によって誘発される  $\text{Ca}^{2+}$  変動が大きくなる (つまり細胞の興奮性が高まっている) はずである。逆に、損傷側の方が健側よりも  $\text{Ca}^{2+}$  変動が小さければ、長年信じられてきた神経損傷によって脊髄後角の興奮性が増強するという仮説は信じがたいものとなる。



### 4. 研究成果

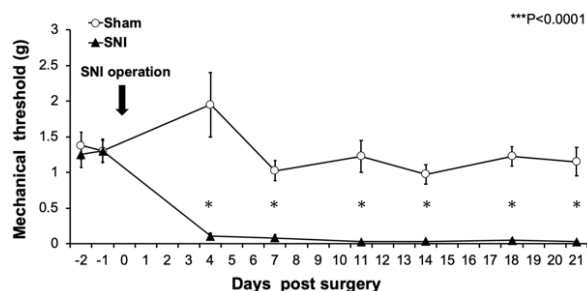
#### (1) Rhod-2 による脊髄スライス染色のための最適な染色条件

前半の約2年間で、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  変動 (活動電位の発生) を測定するための最適な条件を確立することができた。  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬である Rhod-2 は水に溶けず、DMSO に溶かしてスライス内に浸透させるが、脊髄 (あるいは延髄も) はミエリンが多く、Rhod-2 を脊髄内に浸透させるのは非常に困難であった。これを克服するために、Rhod-2 を溶かすことができる限界の濃度と脊髄に浸透させるために必要な時間を試行錯誤することによって決定した。

Rhod-2 を溶かすことのできる濃度は、0.33mg/4ml が最高であり、これ以上濃くすると Rhod-2 が溶けきれず析出することがわかった。しかし、この濃度を使っても脊髄に浸透させることは難しく、最低でも 90 分以上染色液内に置いておく必要があることがわかった。また、染色中は染色液内を 95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub> ガスでバブリングし、染色液の酸素分圧を 700mmHg 以上、二酸化炭素分圧を 40mmHg 前後に連続的に保つておく必要があることがわかった。このガス分圧を少量の染色液中で 90 分以上保つのは非常に困難であり、室温 (25℃前後) でバブリングした場合は酸素分圧を 700mmHg に保つのは不可能であり、多くの場合、酸素分圧を 400mmHg 程度に下がってしまうことがわかった。二酸化炭素分圧を正常に保つのはさらに難しく、20mmHg 以下に下がってしまうことがわかった。この状態では pH は 8 付近になり、神経細胞を生かしておくことは不可能である。これを克服するために、染色液の温度を 20℃以下に下げ、さらに外気圧を大気圧以上にして、気体の溶解度を上げることによって、染色液中の酸素分圧を 700mmHg 以上、二酸化炭素分圧を 40mmHg 前後に保ち、この条件下で染色することに成功した。

## (2) Spared Nerve Injury (SNI) モデルにおける逃避閾値の低下

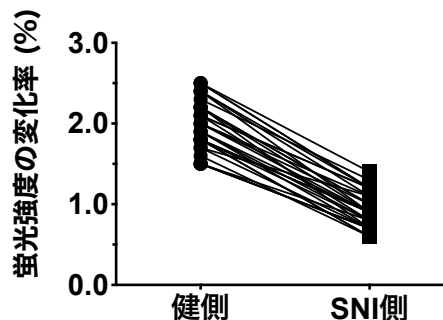
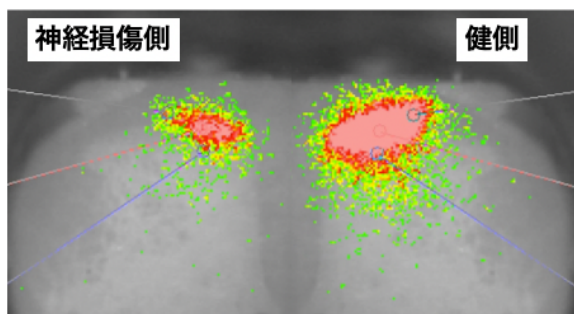
これまで多くの報告にあるように、このモデルでは後肢足底に機械的刺激を与え、逃避反応を示す刺激強度の閾値が低下する。本研究でも SNI 手術後 4 日目から明らかな逃避閾値の低下が認められた。ただし、光学的実験には逃避閾値が完全に安定する手術後 1 週間後以降のラットを用いた。



## (3)細胞内 Ca<sup>2+</sup>の反応 (損傷側と健側の比較)

最終年度は、「末梢神経損傷によって脊髄後角細胞の興奮性が増強しているはずである」という仮説を検証するために、腰髄 L5 レベルで左右両方の後根を付した脊髄スライスを作成し、両側の後根を同時に電気刺激して後角細胞に誘発される細胞内 Ca<sup>2+</sup>変動が、神経損傷側が対側と比べてより大きくなっているか検証した。この方法を使えば、スライスの出来具合や染色の状況による変動を除外し、両側 (神経損傷側と健側) を同じ条件で比較できるはずである。このモデルから、脊髄を摘出し、L5 神経根刺激による両側の脊髄後角細胞の細胞内 Ca<sup>2+</sup>上昇を比較した。正常側では、後根刺激 (1mA, 0.5ms) による細胞内 Ca<sup>2+</sup>上昇は蛍光強度変化率 1.5~2.5%で記録することができたが、スライスによって 1%程度の変動があることもわかった。しかし、同一スライスの正常側をコントロールとした場合、神経損傷側の反応はすべてのスライス (n=32) で減少していることが判明した (下図右)。健常側と比較した (100%とした) 場合、損傷側の反応は 33%~64% (46±7% of control) であり、どのスライスでも例外なく、神経損傷側の反応が低下していることがわかった。神経損傷側では細胞内 Ca<sup>2+</sup>変化の最大値 (下図: 赤サークル内の変化率) も興奮の広がり方 (下図左: 赤い部分の面積) も健側に比べて減少しており、脊髄後角の興奮性は神経損傷側で明らかに低下していることがわかった。

以上の結果から、「末梢神経損傷により脊髄後角細胞の興奮性が増強し、それによって神経障害性疼痛がおこる」というこれまでの考え方が必ずしも正しくないことが明らかになった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Yamamoto G, Kamiya Y, Sasaki M, Ikoma, M, Baba H  | 4. 巻<br>123             |
| 2. 論文標題<br>Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulphate enhances pain transmission in rat spinal cord dorsal horn                                   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>British Journal of Anaesthesia  | 6. 最初と最後の頁<br>e215-e225 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bja.2019.03.026  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Shoji H, Ohashi M, Hirano T, Watanabe K, Endo N, Baba H, Kohno T  | 4. 巻<br>408             |
| 2. 論文標題<br>Mechanisms of noradrenergic modulation of synaptic transmission and neuronal excitability in ventral horn neurons of the rat spinal cord | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Neuroscience  | 6. 最初と最後の頁<br>161-176   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.neuroscience.2019.03.026   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Onishi T, Watanabe T, Sasaki M, Kamiya Y, Hori M, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Takebayashi H, Baba H, Shibuki K                         | 4. 巻<br>597             |
| 2. 論文標題<br>Acute spatial spread of NO-mediated potentiation during hindpaw ischaemia in mice  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>J Physiol   | 6. 最初と最後の頁<br>3441-3455 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1113/JP277615   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Ohashi N, Ohashi M, Baba H  | 4. 巻<br>408             |
| 2. 論文標題<br>Action of Norepinephrine on Lamina X of the Spinal Cord  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Neuroscience  | 6. 最初と最後の頁<br>214-225   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.neuroscience.2019.04.004   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Seino Y, Ohashi N, Imai H, Baba H   | 4. 巻<br>33              |
| 2. 論文標題<br>Optimal Position of Inferior Vena Cava Cannula in Pediatric Cardiac Surgery: A Prospective, Randomized, Controlled, Double-Blind Study | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>J Neurosurg Anesthesiol   | 6. 最初と最後の頁<br>1253-1259 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1053/j.jvca.2018.10.023  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>馬場 洋  |
| 2. 発表標題<br>臨床濃度のメサドンは脊髄後角浅層部細胞の興奮性を強く抑制するが、NMDA受容体チャンネルには作用しない - 細胞内Ca <sup>2+</sup> 高速イメージング法とホールセルパッチクランプ法を用いた検討 - |
| 3. 学会等名<br>第66回日本麻酔科学会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

| 6. 研究組織 | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
|         |                           |                       |    |