

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16724

研究課題名(和文)フラビン蛋白蛍光イメージング法による神経ブロック後に生じる反跳痛の機序解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of rebound pain after nerve block using flavoprotein fluorescence imaging

研究代表者

渡部 達範 (Watanabe, Tatsunori)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：30748330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：伝達麻酔(以下、神経ブロック)の施行後に問題となる「反跳痛」の機序について、脊髄での可塑性変化が関連しているという仮説をたて解析を行った。0.375%ロピバカインを用いて坐骨神経ブロックを行った。行動学的実験で、ブロック効果が持続している時間では後肢逃避閾値の上昇が認められ、その後回復過程において一時的な閾値の低下を認めた。次に坐骨神経ブロック下に術後痛モデルマウスや骨折モデルを作成しShamマウスと後肢逃避閾値の変化の比較を行ったが、有意な差を得ることができなかった。そのほか、同様にCFAアジュバンドやカラゲニンを用いた炎症性疼痛モデルも作成したが、有意差を得ることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

反跳痛の機序が解明されれば、神経ブロック下に手術を行った際に、その予防が可能となり得る。しかし、本研究からは反跳痛の機序を解明するまでには至らず、引き続きの研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：We analysed the mechanism of "rebound pain" which was induced after performing nerve block based on the hypothesis that plasticity change in the spinal cord was related. Sciatic nerve block was performed with 0.375% ropivacaine in mice. Behavioural experiments showed that the hindlimb withdrawal threshold increased during the duration of the blocking effect and then temporarily decreased during the recovery process. Next, postoperative pain and fracture model mice were created under the sciatic nerve block, and changes in hindlimb withdrawal threshold were compared with Sham mice, but significant differences could not be obtained. In addition, although the inflammatory pain model using CFA adjuvant and carrageenin was similarly created, the significant difference was not able to be acquired.

研究分野：麻酔学

キーワード：反跳痛

1. 研究開始当初の背景

近年、超音波装置の小型化・性能の向上により、伝達麻酔(以下、神経ブロック)の施行頻度が増加している。神経ブロックは嘔気や体動時痛の発生が少なく良質な術後鎮痛を提供できるメリットがある反面、局所麻酔薬の効果が切れてくるところに、神経ブロックを行わなかった場合よりも痛みが強くなる「反跳痛」を引き起こす(Abdallah et al. *Anesth Analg.* 2015)ことが知られている。神経ブロック後の反跳痛は、臨床レベルはよく知られている現象であるがその発生機序はわかっていない。

我々は、これまでに神経切断や虚血による伝導遮断が脊髄での可塑性変化を誘発し、異常感覚を生じることを報告してきた。これらの報告では Group 代謝型グルタミン酸レセプター (Komagata et al. *J Neurosci.* 2011, Watanabe et al. *Sci Rep.* 2015) や一酸化窒素 (NO) (Ohnishi et al. *J Physiol.* 2019) がその発症に関与していることを示した。神経ブロックは局所麻酔薬を用いて伝導遮断を起こすことでその効果を発揮することから、我々は「神経ブロック後の反跳痛も伝導遮断により誘導される mGluR や NO に依存した脊髄可塑性変化により引き起こされる」という仮説を立てた。

反跳痛を含む痛みの研究は、in vitro, in vivo のいずれでも行われているが in vivo では神経ネットワークが温存されているため生理的な条件で行える利点がある。申請者はこれまで Shibuki らが開発したフラビン蛋白蛍光イメージング法 (Shibuki et al. *J Physiol.* 2003) を用いて in vivo でのマウス体性感覚野および脊髄の応答を測定し上記の研究を行ってきた。同法はミトコンドリア内の電子伝達系に存在するフラビン蛋白の光学的な性質を利用し神経活動を測定する方法であり、in vivo でも簡便に神経活動が測定できる。マウスの後肢に振動刺激を与えると、体性感覚野および脊髄に応答が現れる。特にマウス脊髄での測定は申請者が開発し世界で初めて報告した方法であり (Watanabe et al. *Sci Rep.* 2015)、これらを用いて反跳痛の解析を行った。

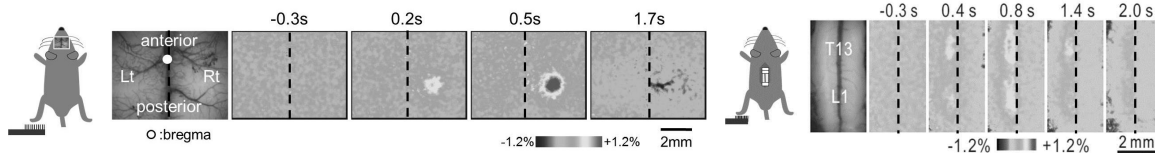


図 1: 左後肢に振動刺激を与えた時の大脳皮質一次体性感覚野の応答刺激と反対側の体性感覚野に応答がみられる

図 2: 左後肢に振動刺激を与えた時の脊髄のフラビン応答刺激と同側の背面に応答がみられる

2. 研究の目的

本研究の目的はフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて体性感覚野や脊髄の活動を測定し、神経ブロック後の反跳痛の発生メカニズムを検討することである。

3. 研究の方法

< 反跳痛モデルの作成 >

マウスの後肢足底に切開を加えて作成する術後痛モデル (Pogatzki et al. *Anesthesiology.* 2003) またはマウスの下腿の骨を骨折・骨接合して作成する骨折モデル (Minville et al. *Anesthesiology.* 2008) を作成した。この際、神経ブロックを併用した群と併用しない群を設ける。作成したモデルマウスに von Frey filament を用いた von Frey test を行い、逃避閾値を測定した。神経ブロックを施行後のマウスでは、ブロックの効果が切れる頃に閾値がより下がる、すなわち反跳痛モデルマウスが作成できることが予想された。

< 大脳皮質一次体性感覚野のフラビン蛋白蛍光イメージング >

7-10 週齢の C57BL/6 マウスにウレタン 1.65 g/kg を腹腔内投与によって麻酔し、気管切開により気道を確保し自発呼吸管理とする。マウスの頭部皮膚を切除し、頭頂部にある体性感覚野 (図 3) を暗視下に置いた。頭蓋骨表面の乾燥を防いで透明性を維持するために流動パラフィン を薄く塗布した。経頭蓋的に青色励起光 (450-490 nm) を脳表に照射し、脳表より放射される緑色自家蛍光 (500-550 nm) を冷却蛍光用カメラにより撮影した (図 4)。反応は大脳体性感覚野より 1 秒あたり 10 フレームの頻度で撮影する。50 秒毎に繰り返して得られた画像データを 30 回試行分加算平均した後、5×5 マトリックスフィルターで平滑化して画質を向上させた。刺激直前の 5 フレームの平均に対する各フレームの蛍光強度変化 (F/F) を算出し、擬似カラー表示した。左足底を刺激し、右体性感覚野のフラビン蛋白応答を観察し、そのピーク値、経時変化、反応領域の面積を解析した。反跳痛モデルマウスの行動実験で得られた閾値低下のパターンを参考に計測を行った。

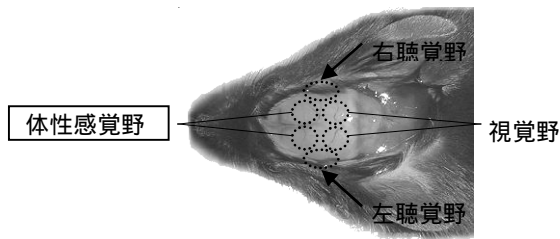


図3： マウスの頭部と各感覚野の位置、
体性感覚野は頭頂部に位置する。

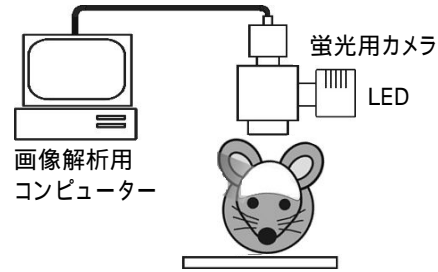


図4： 蛍光イメージングの実験セット（体性感覚野）

< 脊髄後角のフラビン蛋白蛍光イメージング >

体性感覚野と同様の方法で、マウスをウレタンの腹腔内投与によって麻酔し、気管切開により気道を確保し自発呼吸管理とする。T13, L1の椎弓を切除(図5)し脊髄背面を露出する。硬膜は正常のままとし脊髄固定具(STS-A; Narishige)を用いて椎体を固定した。脊髄表面には2%アガロースを塗布し、呼吸性の変動を抑制する。青色励起光を脊髄に照射し、神経活動に伴って発せられる緑色自家蛍光を冷却蛍光用カメラにより撮影した(図6)。体性感覚野と同様に、反跳痛モデルマウスの行動実験で得られた閾値低下のパターンを参考に計測を行った。

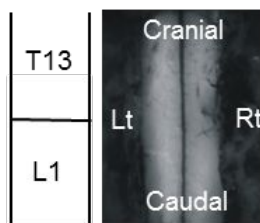


図5： T13・L1の椎弓切除を行ったところ

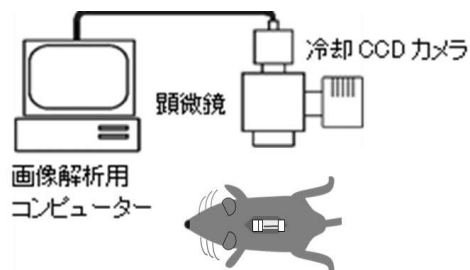


図6： 蛍光イメージングの実験セット(脊髄)

4．研究成果

坐骨神経を露出し、0.375%ロピバカインを用いることで坐骨神経ブロックを行った。行動学実験で、ブロック効果が持続している時間では後肢逃避閾値の上昇が認められ、その後一時的な閾値の低下を認めた。次に上記に示したような術後痛モデルマウスや骨折モデルを作成し Sham マウスと比較したが、行動学的実験で有意な差を得ることができなかった。そのほか、CFA アジュバンドやカラゲニンを用いた炎症性疼痛モデルも作成したが、同様に有意差を得ることができなかった。体性感覚野及び脊髄でのフラビン蛋白蛍光イメージングでは坐骨神経のブロック効果が持続している期間ではその応答は得られず、その後一時的な応答の増強を認めた。しかし、行動実験同様にモデルでは有意差を得ることができなかった。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕特に無し

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：馬場 洋
ローマ字氏名：Hiroshi Baba

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

