

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19603012
 研究課題名（和文） 神経因性疼痛モデルの発症，維持におけるコリン作動性神経の関与
 研究課題名（英文） The role of cholinergic neurons on the manifestation and retention of experimental neuropathic pain model in mice
 研究代表者
 阿部 賢志（ABE KENJI）
 奥羽大学・薬学部・講師
 研究者番号：60405991

研究成果の概要：マウスの坐骨神経結紮による神経因性疼痛モデルの探索において，腓腹神経のみの単独結紮により明らかな疼痛閾値の低下が生じることを明らかにした。また，本モデルにおけるホルマリン誘発疼痛に対して，コリン作動薬の側脳室内投与は有意な鎮痛作用を発現した。この鎮痛作用は，ムスカリンM₁およびM₃受容体拮抗薬の前投与により一部抑制されたが，ホルマリン疼痛反応第Ⅱ相に対する鎮痛作用には明らかな変化は生じなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：神経因性疼痛，アセチルコリン，坐骨神経結紮モデル，マウス

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は帯状疱疹後神経痛，糖尿病性ニューロパチー，四肢の外傷・切断時等にみられる神経障害性の疼痛であり，その強力かつ持続的な痛みは患者のQOLを顕著に低下させる。しかし，この痛みの発症機序の全容は依然として明らかとなっていない。これまでに，動物を用いた多くの神経因性疼痛モデルが報告されており，特に大腿部の坐骨神経を外科的に侵襲することで神経因性疼痛を誘発

する動物モデルは，その簡便さおよび評価のし易さから広く用いられ，分子薬理学的な発症機序の解明に貢献している。しかし，本モデルについても改良の余地があり，未だヒトの神経因性疼痛の病態を完全に反映しているとは言えないのが現状である。

2. 研究の目的

神経因性疼痛は、オピオイド系鎮痛薬に対して抵抗性を示すため、その発症機序を明らかにすることは、この疼痛に対する治療薬の開発にとって非常に重要である。オピオイド系鎮痛薬の代表である morphine の作用が減弱する理由としては、神経因性疼痛の状態下では末梢におけるオピオイド受容体の減少や神経線維の機能低下が報告されている。さらに中枢では、morphine の作用部位のひとつである大縫線核(NRM)におけるセロトニンや、薬物報酬経路を構成する側坐核におけるドパミン含量の減少、腹側被蓋野における μ 受容体の減少等があげられている。しかし、これらの因子がどの程度の割合で morphine の鎮痛作用の減弱化に寄与しているのかは不明である。

申請者は既に、コリン作動薬が脳内投与により鎮痛作用を発現すること、morphine の鎮痛作用にアセチルコリン(ACh)受容体が強く関与すること等を報告し、鎮痛作用と脳内 ACh には密接な関連があることを明らかにしている。本研究では、坐骨神経を結紮した神経因性疼痛モデル動物を用い、その病態に対するコリン作動性神経の関与について検討した。

3. 研究の方法

(1) 神経因性疼痛モデルにおける疼痛閾値の変化に関する検討

坐骨神経結紮モデルとして、Decosterd と Woolf により報告された Spared Nerve Injury モデル (SNI モデル) を改変し、結紮する坐骨神経の組み合わせを変化させたモデル動物を作製した。すなわち、SNI モデル (総腓骨神経と脛骨神経を結紮) と、腓腹神経のみを単独で結紮した群を設定し、これらのモデルにおける疼痛反応について、侵害刺激として化学物質刺激 (0.1% および 1% ホルマリン)、von Frey filaments (vFF, 機械的刺激) および熱刺激を用い、それぞれ licking の持続時間および逃避反応を疼痛の指標として検討した。さらに、神経線維の活性化について、抗 c-Fos 抗体を用いた免疫染色法により脊髄 c-Fos 陽性細胞数の変化を評価した。

(2) 腓腹神経単独結紮モデルのホルマリン誘発疼痛に対するコリン作動薬の作用

腓腹神経単独結紮モデルマウスに対し、コリン作動薬としてカルバコール (0.1 あるいは 0.3 μ g/site) を側脳室内投与し、

1%ホルマリンによる疼痛反応に対する鎮痛作用について検討した。

(3) コリン作動薬の鎮痛作用に対するムスカリン受容体拮抗薬の作用

ムスカリン受容体拮抗薬として atropine を、また受容体の各種サブタイプに対する拮抗薬 (M_1 : pirenzepine, M_2 : methoctramine, M_3 : 4-DAMP) を腓腹神経単独結紮モデルマウスに対して側脳室内投与した。5 分後にカルバコールを側脳室内投与後、ただちに動物の足底部に 1% ホルマリンを皮下投与し、誘発される licking の持続時間を測定した。

4. 研究成果

(1) 神経因性疼痛モデルにおける疼痛閾値の変化に関する検討

総腓骨神経 (CPN) と脛骨神経 (TN) の同時結紮により、低用量 (0.1%) ホルマリン誘発による疼痛反応 (licking time) は有意に短縮された。一方、腓腹神経 (SN) 単独結紮群における licking time は有意に延長した。従って、CPN と TN の同時結紮により hyposensitivity が、SN の単独結紮により hypersensitivity が惹起されたと考えられた (Fig. 1)。

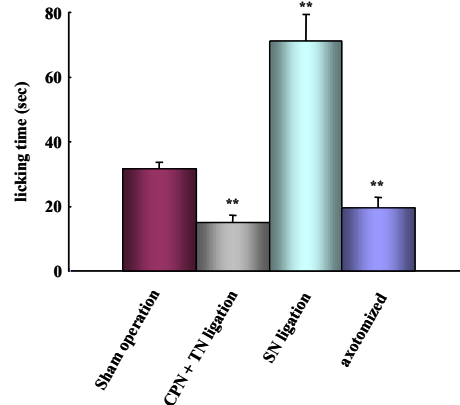


Fig. 1 0.1% ホルマリン誘発による足底部 licking time の変化

さらに、vFF 刺激および熱刺激に対する疼痛反応でも同様の結果が得られた。vFF 刺激に対して、CPN + TN 結紮群では手術後 5 日目をピークとする反応閾値の上昇がみられたが、SN 単独結紮群では経日的な反応閾値の低下が認められた (Fig. 2)。熱刺激に対しても同様に、CPN + TN 結紮群では反応潜時の延長、SN 単独結紮群ではその持続的な短縮が認められた (Fig. 3)。

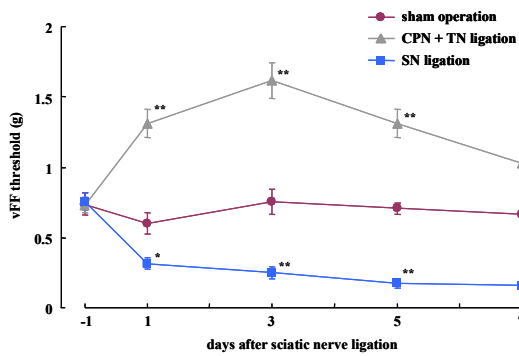


Fig. 2 機械刺激に対する反応性の経時変化

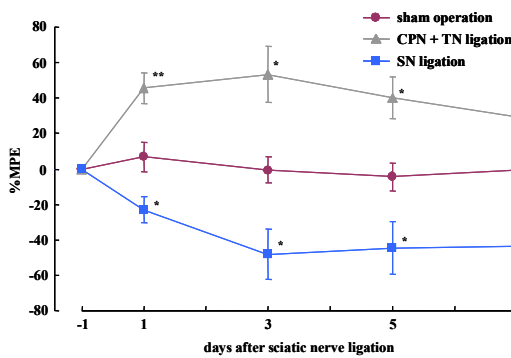


Fig. 3 熱刺激に対する反応性の経時変化

また、対照群およびCPN + TN 結紮群における脊髄 c-Fos 陽性細胞の発現数はほぼ同程度であったが、SN 単独結紮群では顕著な増加が認められた (Fig. 4)。以上の結果から、神経因性疼痛モデルとしてマウス坐骨神経を用いる場合、SN の単独結紮により顕著な疼痛反応が惹起されることが明らかとなった。

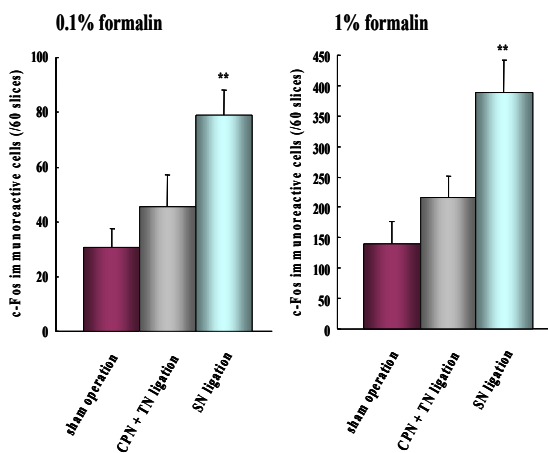


Fig. 4 ホルマリン刺激時における脊髄 c-Fos 陽性細胞数の変化

(2) 腓腹神経単独結紮モデルのホルマリン誘発疼痛に対するコリン作動薬の作用

腓腹神経単独結紮モデルへの 1% ホルマリン投与により惹起した疼痛反応に対して、コリン作動薬であるカルバコールの脳室内投与は、低用量 (0.1 $\mu\text{g}/\text{site}$) では明確な鎮痛作用を示さなかった。しかし、高用量 (3 $\mu\text{g}/\text{site}$) の投与により統計学的に有意な鎮痛作用が発現した (Fig. 5)。

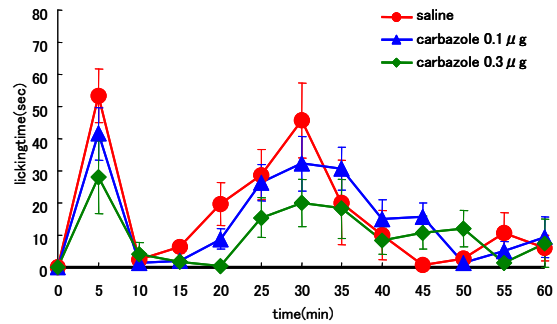


Fig. 5 腓腹神経単独結紮モデルにおけるホルマリン誘発疼痛に対するコリン作動薬の作用

(3) コリン作動薬の鎮痛作用に対するムスカリン受容体拮抗薬の作用

カルバコールにより発現した鎮痛作用に関与する ACh 受容体のサブタイプを特定するため、各種ムスカリン受容体拮抗薬の前投与による鎮痛作用の変化について検討した。その結果、 M_1 あるいは M_3 受容体拮抗薬の前投与により、カルバコールにより減弱したホルマリン誘発疼痛の第 I 相が強く発現した。しかし、第 II 相における鎮痛作用には変化はみられなかった。現在、第 II 相の疼痛反応と ACh の関連性について精査中である。

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)

[学会発表] (計 1 件)

①阿部賢志, 佐藤留美, 東海林徹, 野島浩史, マウスの spared nerve injury model における化学刺激による痛覚過敏の評価, 第 80 回日本薬理学会年会, 2007.03, 愛知

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 賢志 (ABE KENJI)
奥羽大学・薬学部・講師
研究者番号：60405991

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

野島 浩史 (NOJIMA HIROSHI)
奥羽大学・薬学部・教授
研究者番号：50208344

米原 典史 (YONEHARA NORIHUMI)
奥羽大学・薬学部・教授
研究者番号：70124534