

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591823

研究課題名（和文）神経障害性疼痛時の鎮痛薬の薬理学的可塑性—脊髄モノアミンの変動を指標にして—

研究課題名（英文）Pharmacologic plasticity of analgesic drugs in neuropathic pain states—measurement with monoamines in the spinal cord—

研究代表者

小幡 英章 (OBATA HIDEAKI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：20302482

研究成果の概要（和文）：抗うつ薬やガバペンチンのような神経障害性疼痛に用いられる薬剤の鎮痛機序を、ラットの疼痛モデルを用いて検討した。また薬剤投与後の脊髄のノルアドレナリンとセロトニンの変化をマイクロダイアライシス法で検討した。研究結果から、神経障害性疼痛に有効な薬剤は、脊髄でノルアドレナリンを増加させ、この増加が神経障害性疼痛抑制作用に強く関与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We examined mechanisms of antinociceptive effects of drugs such as antidepressant and gabapentin for neuropathic pain using rat pain models. We also measured spinal noradrenalin and serotonin level after the drug injection using microdialysis. We demonstrated that these drugs increased noradrenalin level in the spinal cord and the noradrenalin increase strongly contributed to the inhibitory effect for neuropathic pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ノルアドレナリン、セロトニン、マイクロダイアライシス

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛に代表される慢性疼痛の機序解明と、治療法の開発は医療・医学の緊急課題のひとつである。末梢神経を損傷すると、損傷した神経のみならず、脊髄後角から中枢神経系全体に解剖学的・機能的な変化が起こる。神経可塑性によって、異常な疼痛伝

達の回路が新たに構築されることが、慢性疼痛の原因のひとつであると考えられている。一方、慢性疼痛の治療における問題点は薬理学的可塑性による鎮痛薬の効力の変化である。例えば非ステロイド性抗炎症薬は、急性痛や手術後痛には鎮痛作用を発揮するが、神経障害性疼痛には無効な場合が多い。これに

対して、抗うつ薬や抗てんかん薬は、本来鎮痛薬ではないが、神経障害性疼痛に対して有効である (Finnerup et al., 2005)。なぜこのような薬理学的可塑性が生じるのか、その理由は明らかでないが、ひとつの可能性として、慢性疼痛時には神経可塑性によって下行性抑制系が変化していることが考えられる。動物実験のデータからは、神経障害性疼痛時には下行性抑制系の機能が減弱したり、逆に疼痛を増強したりすることが示唆されている (Porreca et al., 2002)。脳幹から脊髄後角に投射する下行性抑制系の代表的な経路は、ノルアドレナリン (NA) 作動性ニューロンとセロトニン (5-HT) 作動性ニューロンである。脊髄後角に放出された NA は、特に神経障害性疼痛には $\alpha 2$ 受容体を介して強力な鎮痛作用を発揮する。5-HT はやはり脊髄後角において鎮痛物質として働くが、神経障害性疼痛時には、痛みを増強する性質があることも示唆されている (Porreca et al., 2002)。神経障害性疼痛に用いられるオピオイド、抗うつ薬、さらに抗てんかん薬のひとつであるガバペンチンの鎮痛作用は、下行性抑制系と密接に関連していると考えられている (Xu et al., 1997; Sindup et al., 2005; Hayashida et al., 2007)。オピオイドの中でもモルヒネは急性痛には強い鎮痛作用があるが、神経障害性疼痛には有効でない場合がある。抗うつ薬 serotonin noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI) のひとつであるトレドミンや、ガバペンチンは急性痛にはほとんど鎮痛作用を示さないが、神経障害性疼痛には効果を発揮する。このような薬理学的可塑性は、NA/5-HT 作動性下行性抑制系への作用を検討することによって解明できる可能性がある。脊髄において、NA と 5-HT の放出を促進する薬剤、再取り込みを抑制する薬剤は、痛みを何らかの形で修飾するため、脊髄での

NA/5-HT 量の変化を測定することができれば、それらの薬剤の鎮痛効果を知る上で極めて重要な指標となる。申請者は、マイクロダイアリシス法を用いて、ラットの脊髄後角から NA と 5-HT を同時に測定する方法を確立した。今回の研究では、薬剤投与後の脊髄後角のモノアミン量の変化から、鎮痛薬の効力が変化する機序を解明することができるのではないかと考え、実験計画を立てた。

2. 研究の目的

前述のように、臨床での急性痛と神経障害性疼痛の治療において、鎮痛効力の変化 (薬理学的可塑性) が認められる。予備実験で SNRI トレドミンを正常ラットに腹腔内投与 (30 mg/kg) したところ、ほとんど鎮痛作用は得られなかった。ところが SNL ラットに同量を投与すると、閾値を大きく上昇させその効果は 3 時間以上持続した。このような現象がほかの薬剤でも起こるかどうかが、その原因は下行性抑制系の変化にあるのかどうかを検討した。研究手法としてはラットの疼痛モデルを用いた行動実験、マイクロダイアリシス法による脊髄 NA/5-HT の測定を行った。

3. 研究の方法

1) モデル動物

神経障害性疼痛の実験動物は 180~200 g の雄性 SD ラットを用いた。Kim と Chung (1992) によって開発された spinal nerve ligation; SNL モデルの変法である L5 脊髄神経切断モデルを作成した。すなわち麻酔下に腰部を正中切開し、右側 L6 腰椎横突起を切除する。それによって直下に見える右側 L5 脊髄神経を 5.0 絹糸で強く結紮し切断した。この手術後 1 ないし 2 日目から痛覚過敏を呈する。術後痛モデルの実験動物は 250~270g の雄 SD ラットを用いた。Brennan (1996) らの方法によって術後痛モデルを作成した。す

なわちイソフルラン麻酔下に左後肢足底の踵の部位に約1cmの皮膚切開を入れる。皮下の筋肉も切開し、骨部から剥離挙上し伸展する。止血後6.0ナイロン糸で2箇所縫合する。このラットは切開後約1時間より切開部周囲に感覚過敏を呈する。髄腔内投与のためのカテーテル留置は、Yakshらの方法によって行った。すなわちイソフルラン麻酔下にカテーテル(32Gポリウレタン製)を後頭部から、その先端が腰膨大部にくるように7.5cm挿入し留置する。髄腔内カテーテルの留置は、術後痛モデル作成の5日前に行った

II) 行動実験

機械的痛覚過敏はpaw-pressureテストによって定量化した。この方法では機械的侵害刺激を動物の後肢に与え、逃避した時の圧を逃避閾値として算出する。正常ラットの逃避閾値は200g程度であるが、SNLラットでは100g前後まで低下する。正常ラットに薬剤を投与し、逃避閾値を測定したときには急性痛に対する鎮痛作用を判定することができる。一方、SNLラットに対して薬剤を投与したときには、神経障害性疼痛の際に認められる機械的痛覚過敏に対する効果を判定することになる。機械的アロディニアはvon Frey filamentsを用いたup-down methodによって定量化した。

III) マイクロダイアリシス法による脊髄 NA/5-HT の測定

正常ラットまたは術後2WのSNLラットを用いた。ウレタンの腹腔内投与(1.5g/kg)で麻酔導入し、イソフルラン0.5%で維持する。直腸温をモニターし、温熱ブランケットによって36.5度前後に維持した。そけい部から動・静脈にPE20チューブを挿入し、動脈圧モニターと薬物投与に用いた。背部を正中切開し筋肉を取り除き、第13胸椎を椎弓切除し脊髄腰膨大部(L5)を露出した。右側(L5

神経切断側)の硬膜を30-Gの針でわずかに除去し、膜長1mmの針型マイクロダイアリシスプローブを水平面から20度の角度で1mm挿入した。その後、リンゲル液をマイクロシリンジポンプを用いて2 μ l/分速度で灌流し、15分間隔で灌流液を採取した。およそ120分灌流した後、30分間のbaseline値を測定した。その後、薬剤を静注し90分間サンプルを採取した。採取された15分毎のサンプルは、オートインジェクタでHTEC-500 analyzing system[®](Eicom Co.)に打ち込まれ、high-performance liquid chromatography (HPLC)法によってNA/5-HTの濃度を測定する。Eicom社製のHPLC用カラムEICOMPAK CAX[®]を用いることによって、NAと5-HTをリアルタイムで同時に測定することが可能となった。薬剤を静注し、正常ラットとSNLラットでNA/5-HTの放出の違いを検討した。

4. 研究成果

1. 抗うつ薬であるトレドミンの鎮痛作用を検討した。トレドミンをラット術後痛モデルに髄腔内投与すると、投与量依存性(1-30 μ g)に痛覚過敏を抑制した。この作用は髄腔内に α 2受容体拮抗薬idazoxan(30 μ g)をあらかじめ投与しておくことで抑制されたため、脊髄におけるNAの作用が重要であることが示唆された。マイクロダイアリシス法による脊髄NA/5-HTの測定では、トレドミンの全身投与によってNAは前値の5倍ほど増加し、長時間継続した。5-HTも増加したが一時的であった。この成果は以下の論文にまとめた。Obata H, Kimura M, Nakajima K, Tobe M, Nishikawa K, Saito S. Monoamine-dependent, opioid-independent antihypersensitivity effects of intrathecally administered milnacipran, a serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, in a postoperative

pain model in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;334:1059-65.

2. ラット神経障害性疼痛モデル (SNL) に対するトレドミンの効果を検討した。まずトレドミンを全身投与 (腹腔内) すると、SNL ラットに対しては投与量依存性 (1-30 mg/kg) に痛覚過敏を抑制したが、正常動物に対しては鎮痛効果が認められなかった。SNL ラットに対する作用は $\alpha 2$ 受容体拮抗薬 idazoxan の髄腔内投与 (30 μ g) によって減弱したため、この作用は脊髄の NA が関与していることが示唆された。一方、マイクロダイアリシス法による脊髄 NA/5-HT の測定では、cumulative-dose response を検討した。NA はトレドミンの投与量依存性に増加し (1-30 mg/kg)、この増加は正常ラットより SNL ラットの方が大きいことが明らかとなった。一方 5-HT はこのような現象は認められなかった。よってトレドミンは脊髄で NA を SNL ラットでより大きく増加させることによって SNL の痛覚過敏を抑制していると考えられた。この成果は国際学会 (Nakajima K, Obata H, Ito N, Saito S. Antinociceptive mechanism of serotonin noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI) in a rat model of neuropathic pain. Society for Neuroscience Annual Meeting 2008, Washington DC, November 17, 2008) で発表し、現在学術誌に投稿中である。

3. ترامadolの鎮痛作用について、ラット術後痛モデルを用いて検討した。 ترامadolは弱オピオイドに属する鎮痛薬である。 ترامadolを腹腔内 (10, 20, 40 mg/kg) または髄腔内 (25, 50, 100 μ g) 投与すると、いずれの投与方法においても投与量依存性に鎮痛効果を認めた。その作用は $\alpha 2$ 受容体

容体拮抗薬 idazoxan (30 μ g) または 5-HT 受容体拮抗薬 methysergide (30 μ g) で減弱された。マイクロダイアリシス法による脊髄 NA/5-HT の測定ではどちらも前値の 2.5 倍程度増加した。この結果から ترامadol の鎮痛作用には脊髄における NA/5-HT の増加が関与していることが明らかとなった。この成果は国際学会 (Kimura M, Obata H, Saito S. Antihypersensitivity effects of tramadol hydrochloride in a rat model of postoperative pain. Society for Neuroscience Annual Meeting 2010, San Diego, November 14, 2010) で発表し、現在学術誌に投稿中である。

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)

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Thakor D, Teng YD, Obata H, Nagane K, Saito S, Tabata Y. Nontoxic genetic engineering of mesenchymal stem cells using serum-compatible pullulan-spermine/DNA anioplexes. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17:131-44. (査読あり)
2. Tobe M, Obata H, Suto T, Yokoo H, Nakazato Y, Tabata Y, Saito S. Long-term effect of sciatic nerve block with slow-release lidocaine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology.* 2010;112:1473-81. (査読あり)
3. Peters CM, Hayashida K, Ewan EE, Nakajima K, Obata H, Xu Q, Yaksh TL, Eisenach JC. Lack of analgesic efficacy of spinal ondansetron on thermal and mechanical hypersensitivity following spinal

- nerve ligation in the rat. Brain Res. 2010;1352:83-93. (査読あり)
4. Obata H, Sakurazawa S, Kimura M, Saito S. Activation of astrocytes in the spinal cord contributes to the development of bilateral allodynia after peripheral nerve injury in rats. Brain Res. 2010;1363:72-80. (査読あり)
 5. Obata H, Kimura M, Nakajima K, Tobe M, Nishikawa K, Saito S. Monoamine-dependent, opioid-independent antihypersensitivity effects of intrathecally administered milnacipran, a serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, in a postoperative pain model in rats. J Pharmacol Exp Ther. 2010;334:1059-65. (査読あり)
 6. 小幡英章, 荻野祐一. 慢性痛の分子化学的機序と臨床薬理学. 麻酔 2010; 59; S54-61. (査読なし)
 7. Koizuka S, Saito S, Tobe M, Sekimoto K, Obata H, Koyama Y. Technical communication: percutaneous radiofrequency mandibular nerve rhizotomy guided by high-speed real-time computed tomography fluoroscopy. Anesth Analg. 2010;111:763-7. (査読あり)
 8. Nakajima K, Obata H, Ito N, Goto F, Saito S. The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. Eur J Pain. 2009;13:441-7. (査読あり)
 9. Koizuka S, Saito S, Sekimoto K, Tobe M, Obata H, Koyama Y. Percutaneous radio-frequency thermocoagulation of the Gasserian ganglion guided by high-speed real-time CT fluoroscopy. Neuroradiology. 2009;51:563-6. (査読あり)
 10. Ito N, Obata H, Saito S. Spinal microglial expression and mechanical hypersensitivity in a postoperative pain model: comparison with a neuropathic pain model. Anesthesiology. 2009;111:640-8. (査読あり)
 11. 小幡英章, 林田健一郎, 中島邦枝, 齋藤繁. $\alpha 2$ 受容体をターゲットにした慢性疼痛の治療. ペインクリニック 2009; 30: S233-242. (査読なし).
 12. 小幡英章, 林田健一郎. CRPS の薬物療法: ガバペンチンと抗うつ薬. ペインクリニック 2009; 30: S381-388. (査読なし)
 13. Hayashida K, Obata H, Nakajima K, Eisenach JC. Gabapentin acts within the locus coeruleus to alleviate neuropathic pain. Anesthesiology. 2008;109:1077-84. (査読あり)
 14. 小幡英章, 林田健一郎, 中島邦枝, 齋藤繁. $\alpha 2$ 受容体をターゲットにした慢性疼痛の治療. ペインクリニック 2008; 29: 239-249. (査読なし)
 15. 小幡英章, 疼痛治療に用いる薬物 -Update- : 抗うつ薬 (TCA, SNRI, SSRI) . ペインクリニック 2008; 29: 625-632. (査読なし)
 16. 小幡英章, 林田健一郎. CRPS の薬物療法: ガバペンチンと抗うつ薬. ペイン

クリニック 2008; 29: 1189-1197. (査読なし)

17. 小幡英章. 慢性疼痛におけるセロトニンの役割. 麻酔 2008; 57: S59-65. (査読なし)

[学会発表] (計 10 件)

1. Kimura M, Obata H, Saito S. Antihypersensitivity effects of tramadol hydrochloride in a rat model of postoperative pain. Society for Neuroscience Annual Meeting 2010, San Diego Convention Center, San Diego, USA, November 14, 2010.
2. Obata H, Ito N, Saito S. Spinal microglial expression and mechanical hypersensitivity in a postoperative pain model -comparison with a neuropathic pain model-. 13th world congress on pain, Montreal Convention Centre, Montreal, Canada, August 31, 2010.
3. Suto T, Tobe H, Obata H, Saito S, Goto F. Long-term effect of slow releasing lidocaine sheet and particle in a rat model of postoperative pain. 13th world congress on pain, Montreal Convention Centre, Montreal, Canada, August 31, 2010.
4. Obata H, Ito N, Saito S. Spinal microglial expression and mechanical hypersensitivity in a postoperative pain model. Society for Neuroscience Annual Meeting 2009, Tinley Park-Convention Center, Chicago, USA, October 18, 2009.
5. 小幡 英章, 林田健一郎, 中島邦枝, 齋藤繁, Eisenach JC. ガバペンチンは下行性ノルアドレナリン作動性神経を活性化

して神経障害性疼痛を抑制する。日本麻酔科学会第56回学術集会、ポートピアホテル、神戸市、H21年8月16日

6. Nakajima K, Obata H, Ito N, Saito S. Antinociceptive mechanism of serotonin noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI) in a rat model of neuropathic pain. Society for Neuroscience Annual Meeting 2008, Washington DC Convention Center, Washington DC, USA, November 17, 2008.
7. Obata H, Nakajima K, Saito S, Goto F. Serotonin and noradrenaline reuptake inhibition by milnacipran reduces mechanical hypersensitivity after paw incision in rats. 12th world congress on pain, Convention Center, Glasgow, UK, October 3, 2008.
8. 中島邦枝, 小幡英章, 齋藤繁. Serotonin noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI)の鎮痛メカニズム。日本ペインクリニック学会第 42 回大会、福岡国際会議場、福岡市、H20 年 7 月 20 日
9. 小幡英章, 中島邦枝, 伊藤奈穂美, 齋藤繁. SNRI(ミルナシプラン)の鎮痛作用 -ラット術後痛モデルでの検討-。日本麻酔科学会第 55 回学術集会、パシフィコ横浜、横浜市、H20 年 6 月 14 日
10. 中島邦枝, 小幡英章, 齋藤繁. マイクロダイアリシス法を用いた脊髄後角における NA・5-HT の同時測定。日本麻酔科学会第 55 回学術集会、パシフィコ横浜、横浜市、H20 年 6 月 13 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小幡 英章 (OBATA HIDEAKI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：20302482