

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 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791431

研究課題名（和文）脊髄マイクログリアの活性化が術後痛に果たす役割 —神経障害性疼痛との比較検討—

研究課題名（英文）The role of spinal microglial activation on postoperative pain - comparison with neuropathic pain -

研究代表者

三枝 里江 (MIEDA RIE)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号：10400772

研究成果の概要（和文）：術後痛や神経障害性疼痛のさらなる解明を目指し、本研究を開始した。ラット術後痛モデルを作成し、脊髄マイクログリア抑制薬を用いることで、脊髄マイクログリアの活性化と感覚過敏との関係を検討した。また、ラット神経障害性疼痛モデルでは、脊髄マイクログリアが感覚過敏を惹起する時期を確定するために、モデル作成後の異なった時期よりマイクログリア抑制薬を投与し、感覚過敏を抑制できるか検討している。現在までに予定していた実験の約7割程度が終了したが、完遂できていないため、今後も実験を重ねてゆきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate role of spinal microglia for hypersensitivity in postoperative pain and neuropathic pain. For postoperative pain, using rat model of postoperative pain, microglial inhibitors were injected into rats with paw incision to examine the role of spinal microglia in postoperative hypersensitivity. In neuropathic pain model, rats were received microglial inhibitors immediately, 2 weeks and 2 months after L5 spinal nerve transection to determine when microglia have a most important role in the development and maintenance of neuropathic pain. I finished 70% of this study right now. Therefore, I will do my best to continue and complete this study.

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 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：疼痛

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：脊髄グリア細胞、術後痛、神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

手術後の痛み（術後痛）の抑制は、医療にとって重要な課題のひとつである。日々、多くの手術が行われているため、術後鎮痛の需要はきわめて大きい。これまでに様々な鎮痛法が検討されてきたが、十分な術後鎮痛法が確立されているとは言いがたく、二人に一人の患者は、術後に強い痛みを経験しているとされている。術後鎮痛が不十分であると神経障害性疼痛のような慢性痛に移行する場合がある。神経損傷後に発症する神経障害性疼痛は、持続する痛みや感覚過敏に苦しむばかりでなく、quality of life に重大な影響を及ぼす。神経障害性疼痛の機序と治療法に関しては、過去に多くの研究が行われてきたが、いまだ未解決の部分も多い。

これまでの疼痛研究のほとんどはニューロンをターゲットにしたものであったが、近年、脊髄グリア細胞（マイクログリアとアストロサイト）が単なるニューロンのための支持的な役割をしているだけではなく、侵害刺激によって活性化（肥大と増殖）し、疼痛を増強することが明らかになってきた。これまでの研究報告によると、侵害刺激後早期に、まずマイクログリアが活性化し、引き続いてアストロサイトも活性化する。活性化した脊髄グリア細胞から放出される炎症性サイトカインなどがニューロンを感作し、アロディニアや痛覚過敏の原因となる（Wieseler-Frank et al., *Neurochem Int* 2004）。今後、活性化型グリアに関する研究が、新たな疼痛治療薬の開発につながる可能性がある。

Brennan ら（Pain 1996）によって発表されたラット術後痛モデルは、手術後患者と酷似した時間経過で感覚過敏を呈する。この動物モデルの開発によって、術後痛の機序が徐々

に解明されており、術後痛は神経障害性疼痛や炎症性疼痛とは全く異なった独特の痛みであることが示唆されている。本研究代表者のグループは、脊髄グリアの活性化が術後痛に関与することを見出してきたが、マイクログリアとアストロサイトのそれぞれの役割については不明である。マイクログリアについては、神経障害性疼痛や炎症性疼痛に大きく関与することが報告されているが、術後痛の場合はどうなのか、詳細に解析することは術後痛の機序の解明に大きく貢献する。また、minocycline のように臨床に使用できるマイクログリア抑制薬が存在するため、治療にも役立つ可能性がある。

2. 研究の目的

活性化型脊髄グリアは、神経障害性疼痛（特に早期において）と術後痛に強く関与していることが示されている。しかし、マイクログリアとアストロサイトのそれぞれの役割は全く不明である。薬剤を用いてそれぞれの機能の違いを検討しようと考えたとき、マイクログリアを特異的に抑制する薬剤はあるが、アストロサイトに関してはこれまでのところ知られていない。そこで、今回の研究では、特にマイクログリアの術後痛および神経障害性疼痛に及ぼす役割について比較検討する。

マイクログリアの発現を選択的に阻害する薬剤として minocycline がある（Ledeboer et al., *Pain* 2005;115:71-83）。また、Mitogen-activated protein kinase (MAPK) のひとつである p38MAPK は脊髄後角ではマイクログリアだけに発現しているため、p38MAPK 阻害剤 SB203580 を用いても、マイクログリアの活性化を選択的に抑制することができる（Jin et al., *J Neurosci*

2003:23;4017-4022)。すなわちこれらの薬剤を用いることで、マイクログリアの役割を明確にすることが可能である。研究を開始した時点で、術後痛に関してはマイクログリアの役割を検討した報告はない。神経障害性疼痛に関しては、マイクログリアが発症と維持に重要な役割を果たしていることがすでに報告されている (Tsuda et al., Nature 2003:424;778-783) が、神経損傷後のいつの時点で、神経障害性疼痛の形成に重要な役割を果たしているのか不明である。そこで、

1. ラット術後痛モデルで脊髄マイクログリアの活性化と感覚過敏との関係を検討する。
2. ラット神経障害性疼痛モデルでマイクログリアが感覚過敏を惹起する時期を確定する。

以上の2点について研究を進める。マイクログリア活性化の抑制が、術後痛を抑制することができるのかについて検討し、治療に役立てることを目指す。神経障害性疼痛モデルを用いた実験では、モデル作成後の異なった時期 (作成直後、2週間後、2ヵ月後) に minocycline および SB203580 を投与し、感覚過敏を抑制できるか検討する。そうすることで、マイクログリアがその発症にかかわっているのか、あるいは維持にもかかわっているのかが明らかになり、臨床における新たな神経障害性疼痛の治療法の開発にもつながる可能性がある。

3. 研究の方法

<術後痛モデルでの検討>

a. モデルラットの作成

術後痛モデルの実験動物は250~270gの雄SDラットを用いる。Brennanらの方法によって術後痛モデルを作成する (Pain 1996:64:493-501)。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。

b. 薬剤とその投与

マイクログリア抑制薬 minocycline と選択的 p38MAPK 阻害剤 SB203580 を、それぞれまず手術前に投与する。その後は1日2回(朝夕)、術後3日目まで連日投与する。

c. 行動薬理的検討

感覚過敏は von Frey filaments を用いた up-down method によって、連日逃避閾値を測定することで判定する。用量-反応曲線を作成し、神経因性疼痛モデルに投与した場合の効果と比較する。

d. 免疫組織学的検討

脊髄でのマイクログリアとアストロサイトの発現の変化、および、リン酸化 p38MAPK の発現とその共発現を、免疫染色によって検討する。

<神経障害性疼痛モデルでの検討>

a. モデルラットの作成

神経障害性疼痛モデルの実験動物は、180~200gの雄SDラットを用いる。KimとChungによって開発された Spinal nerve ligation; SNL モデル (Pain 1992:50:355-63) の変法である L5 脊髄神経切断モデルを作成する。この手術後1ないし2日目から感覚過敏を発症する。

b. 薬剤とその投与

マイクログリア抑制薬 minocycline と選択的 p38MAPK 阻害剤 SB203580 は、以下の3つの時点から投与し、感覚過敏に対する効果を判定する。投与終了後免疫組織化学を行う。

1. L5 脊髄神経節断直後
2. L5 脊髄神経切断後2週間
3. L5 脊髄神経切断後2ヶ月

c. 行動薬理的検討

連日 von Frey filaments を用いて逃避閾値を測定する。用量-反応曲線を作成し、術後痛モデルに投与した場合の効果と比較す

る。

d. 免疫組織学的検討

脊髄でのマイクログリアとアストロサイトの発現の変化、および、リン酸化 p38MAPK の発現とその共発現を、免疫染色によって検討する。

4. 研究成果

上記研究計画に沿って、研究を進めてきた。現在、予定されていた実験の約7割が終了しているが、まだ、学会や論文などで発表する段階には至っていない。この実験は、術後痛や神経障害性疼痛を解明する上で、非常に重要な実験であると考えている。今後も実験を重ねてゆき、成果を発表する予定でいる。

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)

[図書] (計1件)

1. 三枝里江, 小幡英章, 齋藤繁. 带状疱疹後神経痛. 慢性疼痛における薬剤選定と治療薬開発. 技術情報協会編: 2010年 96-100

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三枝 里江 (MIEDA RIE)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号: 10400772