

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 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591743

研究課題名(和文) 難治性疼痛に対する脊髄刺激鎮痛法の作用点の解明 —中枢か脊髄か—

研究課題名(英文) Effect site of spinal cord stimulation for refractory pain -central or peripheral-

研究代表者

新堀 博展 (SHINBORI HIRONOBU)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：60404993

研究成果の概要(和文)：本研究では、脊髄における下行性抑制系の神経伝達物質であるセロトニンやノルアドレナリンを抑制することによって脊髄刺激の鎮痛作用が減弱することを明らかにした。また、脊髄刺激によって、背側縫線核のセロトニン作動性ニューロンの数が増加すること、神経障害性疼痛モデルラットで増加する障害側の青斑核のノルアドレナリン合成酵素に対する染色性が元に戻る事、脊髄広角のセロトニン、ノルアドレナリン合成酵素の発現量が脊髄刺激によって変化しない事を明らかにした。以上から、脊髄刺激法による鎮痛は下行性抑制系の活性化を介して生じているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the analgesic effect of spinal cord stimulation is attenuated by inhibiting noradrenaline and serotonin, a neurotransmitter of the descending inhibitory system in the spinal cord. In addition, by spinal cord stimulation, the number of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus was increased and the increased staining intensity against noradrenaline synthase at locus coeruleus of injured side in neuropathic pain model rats was returned to its original level. Moreover, we made it clear that the expression level of noradrenaline and serotonin synthetic enzyme of the dorsal horn does not change by spinal cord stimulation. These observations indicated that antinociceptive action of spinal cord stimulation might be mediated by the activation of the descending inhibitory system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔科学

キーワード：難治性疼痛、脊髄刺激鎮痛法、下降性抑制系

1. 研究開始当初の背景

脊髄刺激電極を含めた神経系への電気・磁気を用いた刺激法は神経因性疼痛、虚血痛といった難治性疼痛を中心に、世界中で広く用いられている治療法の一つである。硬膜外からの脊髄電氣的刺激により難治性の疼痛が自覚的・他覚的に改善したり、刺激された神経の支配領域での血行が改善する機序については、今のところゲートコントロール仮説が一般的に受け入れられているが、交感神経抑制作用による血流改善や、一旦刺激すると刺激を中止してもしばらくその効果が持続する場合など、ゲートコントロール仮説だけでは説明できない現象がしばしば観察される。これらを総合的に説明する機序の一つとして、上行性の刺激による下行性抑制系を含む脳幹部への賦活化が関与していると考えられているが、神経刺激によりシナプス終末での直接的な抑制性神経伝達物質の放出による興奮性神経伝達の抑制が関与している可能性もあり、詳しいメカニズムはわかっていない。

我々はすでに神経因性疼痛＋脊髄刺激電極埋込モデルラットに関して脊髄における5-HTの役割を薬理的に検討しているので、本研究では同モデルを用いてまず脊髄刺激時の青斑核(LC)、大縫線核(Raphe Nuclei Magnus; RNM)からの5-HT、NA放出を検討する。マイクロダイアリスのカラムは5-HT、NAを同時に測定できるCAXカラムを用いるため、一度にこれら2つの神経伝達物質が測定

脊髄刺激による効果はカロリンスカ研究所のLinderoth博士らが精力的に研究を行っているが、我々も2年前から脊髄刺激の鎮痛効果についての研究を開始し、比較的短期間のうちにモデル作成、神経因性疼痛における脊髄刺激による鎮痛効果[図1]は脊髄くも膜下腔の5-HTが関与する、というところまで明らかにしてきた。現在この分野においては国内で唯一の実験系を有しているといえる。

神経因性疼痛モデル動物における検討では脳幹部でのNA作動性ニューロンの起始核である青斑核(locus coeruleus; LC)における転写因子CREBのリン酸化が亢進しているといった報告や、吻側延髄腹側部(rostral ventromedial medulla; RVM)の電気刺激により脊髄後角ニューロンにおける抑制性シナプス電流の頻度が増加し、脳脊髄液中に5-HTやNAが放出されるといった報告がある一方、神経因性疼痛モデルラットにおいて脊髄刺激により得られた鎮痛は5-HTの拮抗薬を脊髄くも膜下腔にすることにより消失する。つまりその作用部位が下降性抑制系を中枢性

に賦活化しているのか、局所における下降性抑制系神経終末の直接刺激なのかについては未だ議論の余地があり、これを明らかにすることは脊髄刺激法の鎮痛効果発現メカニズムの解明に大きな意義を持つと考えた。

2. 研究の目的

本研究は脊髄刺激法による神経因性疼痛抑制作用メカニズムが、①電極による刺激が脊髄を上行し、脳幹部において脊髄下行性抑制系の中核と考えられている青斑核・大縫線核を賦活化することによって文字通り下降性抑制系を賦活化するためなのか、②刺激が脊髄後角局所に作用しセロトニン(5-HT)及びノルアドレナリン(NA)含有神経終末からの直接的な5-HT、NAの放出を生じるためなのかを明らかにするため、当研究室で作成した神経因性疼痛＋脊髄刺激電極埋込モデルラットを用いて、マイクロダイアリス法による脊髄および脳幹部での神経伝達物質を測定すると同時に、脊髄後角及び脳幹部での組織学的検討による裏づけを得ることにより上記疑問に答えようとするものである。

3. 研究の方法

実験はすべて約10週齢の雄性SDラット(350-400g)のラットを用いる。すべての実験期間を通じてラットは12時間の明暗サイクル(明期:7:00-19:00)、22℃の室温環境下で飼育される。

(1) 神経因性疼痛＋脊髄刺激電極埋込モデルラットの作成

はじめに左側L5腰神経結紮による疼痛モデルを作成しておく。エーテルによる予備麻酔の後、イソフルレン2%による麻酔下にラットを伏臥位にし上後腸骨棘を結ぶ線を中心に約2cmの正中縦切開をおく。椎体と左側の腸骨の間を剥離し、L5の棘突起を露出後丁寧に除去する。直下に見えるL4及びL5腰神経を確認後、L5のみを4-0絹糸を用いて結紮・切断し、消毒後皮膚縫合を行う。1週間後、auto von Frey装置(Ugo Basile社製Dynamic Plantar Anesthesiometer)を用いて機械的刺激に対する疼痛閾値を確認し、障害側にのみ痛覚過敏が生じているラットに対して脊髄刺激電極を留置する。

脊髄刺激電極の留置は基本的にKakinohanaらの方法[参考文献1]に準じ若干の改良を加えた方法で行う。エーテルによる予備麻酔の後、イソフルレン2%による麻酔

下に T10、11 の椎弓切除を行い、硬膜外腔を露出する。硬膜外腔に尾側にむけ脊髄刺激電極（銀線：直径 0.1mm を PE10 で絶縁したもの、自家製）の陰極を愛護的に 5mm 挿入する。次いで L5 レベルで椎弓切除を行い、陽極電極を尾側に 5mm 挿入する。電極の位置は閉創前にテスト刺激を行い、電気刺激によって左下腿を中心に収縮が見られる位置に微調整する。電極は棘間靭帯に縫合固定し、電極を皮下トンネルで頸部に導出し皮膚を縫合する。抗菌薬（CEZ 50mg）を電極挿入術の前後で皮下注射し、術後鎮痛としてインドメタシンを 5mg/kg で術後皮下注射する。手術後は単独で飼育する。

（2）脊髄刺激鎮痛法に關与する神経伝達物質の同定-くも膜下腔への各種拮抗薬投与の影響-

脊髄電気刺激を行い、脊髄刺激電極による疼痛閾値減弱効果が見られた後に、脊髄刺激を継続した状態で脊髄でのセロトニン受容体抑制、 α -アドレナリン受容体を抑制することにより脊髄刺激による鎮痛作用が抑制されるかの検討を行う。具体的にはセロトニン受容体拮抗薬として Methysergide (5-HT_{1/2} antagonist)、Ketanserin (5-HT_{2A/2C} antagonist)、Ondansetron (5-HT_{2A/2C} antagonist)、Yohimbine (α 2 adrenergic antagonist) 各々 30 μ g をくも膜下カテーテルより投与し、薬剤刺激前、投与後の疼痛閾値の変化を、薬剤を投与した群としない群とで比較する。

（3）脊髄刺激時の LC、RNM における 5-HT、NA のマイクロダイアリシス法による分泌測定

電極留置 3~5 日後に機械的刺激に対する脊髄刺激の効果を確認する。前述の auto von Frey 装置を用いて障害側に痛覚過敏が生じていることを確認した後に、下肢が収縮する 80% の強度の電流を、0.2ms \times 50Hz、1 時間にわたって通電し、図 1 の如くに鎮痛効果が得られていることを確認後、マイクロダイアリシスのガイドカニューレを大縫線核または青斑核に留置する。具体的にはペントバルビタール 50mg/kg 腹腔内投与により麻酔を行い、頭蓋骨を露出し矢状縫合とラムダ縫合を含んで 5mm \times 5mm 幅で頭蓋骨を除去する。脳定位固定装置を用いて大縫線核背側部 (A: -7.8mm from bregma, L: 0.2mm from midsagittal plane, V: -7.2mm from brain surface) または青斑核

(A: -9.8mm from bregma, L: 1.2mm from midsagittal plane, V: -7.1mm from brain surface) に透析用プローブ（外径：0.24mm、分子量カットオフ：20000、膜長：2mm）を挿入するためのガイドカニューレを挿入する。ガイドカニューレは歯科用セメントを用いて固定する。2~3 日の回復期間をおいた後に以下のプロトコルで刺激を行いつつ神経伝達物質をマイクロダイアリシス法により測定する。

（4）脳幹部及び脊髄後角での CREB に対する生化学的及び免疫組織学検討

2 の研究と同様に機械的刺激に対する脊髄刺激の効果を確認した後、直ちに動物をペントバルビタールの過量投与により安楽死させ、氷冷生理食塩水で還流後直ちに脳幹部及び脊髄腰膨大部を冷却しつつ摘出、トリミングの後液体窒素を用いて急速凍結保存する。検体が必要量集まったところでそれら検体のタンパクを可溶化し、CREB 及びリン酸化 CREB (p-CREB: 活性化 CREB) タンパクに対する Western blotting を行う。刺激前の動物、non-responder、完全な naïve Rat に対しても同様の実験を行い、CREB 及び p-CREB の発現量を比較する。また安楽死の後 4% パラホルムアルデヒド溶液にて還流固定して脳幹部及び脊髄腰膨大部を取り出し、LC、RNM 及び脊髄後角における p-CREB に対する免疫染色を行う。LC においては dopamine- β -hydroxylase に対する抗体、RNM においては tryptophan hydroxylase に対する抗体を用いた 2 重染色を行うことにより、それぞれ NA、5-HT 作動性ニューロンでの p-CREB の発現の程度を比較する。

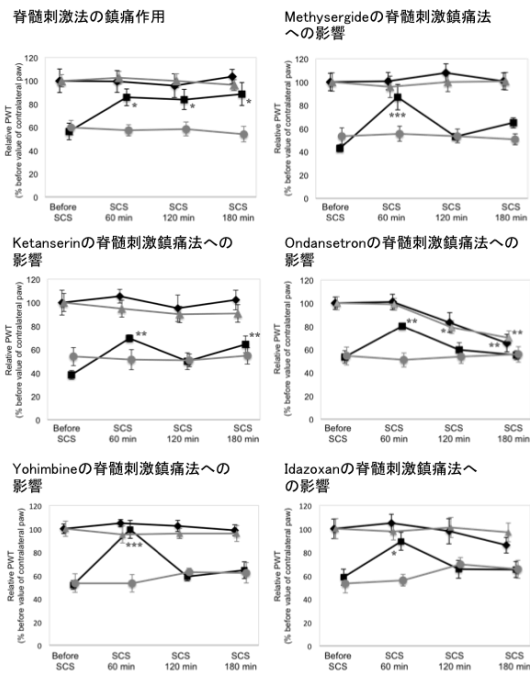
4. 研究成果

（1）神経障害性疼痛モデルラットに対する脊髄刺激法の効果と、髄腔内投与したセロトニン・ノルアドレナリン受容体拮抗薬の脊髄刺激鎮痛法に対する作用

セロトニン受容体に関しては、5-HT_{1,2} 受容体拮抗薬である Methysergide、5-HT_{2A/2C} 受容体拮抗薬である Ketanserin、5-HT₃ 受容体拮抗薬である Ondansetron (各 30 μ g) を脊髄刺激により疼痛が緩和している SNL ラットのくも膜下腔に予め留置しておいたカテーテルを通じて投与したところ、1 時間後には機械的刺激に対する閾値が脊髄刺激前のレベルに低下しており、これらセロトニン受容体のサブタイプが脊髄刺激による鎮痛作用に關与していることが示唆された。同様に α 2 アドレナリン受容体拮抗薬である Yohimbine、Idazoxan (各 30 μ g) のくも膜下投与でも鎮痛作用に拮抗することが出来、 α 2

アドレナリン受容体も脊髄刺激による鎮痛作用に関与していることが示唆された。

図1 くも膜下に投与したセロトニン受容体及び $\alpha 2$ アドレナリン受容体拮抗薬の脊髄刺激法に対する効果。黒線は脊髄刺激ラットでの疼痛閾値の変化、灰色線は刺激を加えないラットでの疼痛閾値の変化



(2) 脊髄刺激時の LC、RNM における 5-HT、NA のマイクロダイアリス法による分泌測定

本研究は依頼していた大学院生の本来の研究が難航したことと、使用予定であった高速液体クロマトグラフィーが故障しており、1年近く修理に取り組んだものの測定機器の状態が安定しなかったため、この手法に拘泥して時間を消費するよりもその他の実験を進めるほうが効率的であるという結論に達し、中止した。

(3) 脳幹部及び脊髄後角での CREB に対する生化学的及び免疫組織学検討

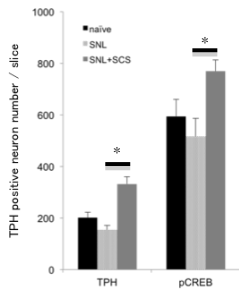
モデル動物において脊髄刺激を行い、機械的刺激に対する過敏性が減弱していることを確認の後、更に1.5~2時間脊髄刺激を加え、ペントバルビタール麻酔後還流固定し、脊髄及び脳幹部を摘出、後固定後薄切し組織学に用いた。コントロールとして神経障害のみを行

ったSNLラット、全く何もしていないnaiveラットも同様に薄切標本にした。ノルアドレナリン合成酵素 (Dopamine beta hydroxylase: D β H) , セロトニン合成酵素 (Tryptophan hydroxylase: TPH) , pCREBに対する免疫染色を行い、pCREBをRhodamine, D β H及びTPHをFITCで標識し、コンピュータによる画像取り込み後画像解析を行った。青斑核においてはD β H及びpCREBはSNL及び脊髄刺激によっても有意な変化は見られなかったが、縫線核においてはSNLではnaiveと比較して有意なTPH及びpCREBの変化は見られないものの、脊髄刺激により有意にTPH陽性ニューロン及びpCREB陽性の細胞核が増加していた。また、SNLラットの青斑核では、障害側でD β Hの染色性が反対側の約1.4倍増加していたのが、脊髄刺激により疼痛が抑制されたSNLラットではnaiveラットと同じレベルまで復していた。さらに脊髄におけるセロトニン、ノルアドレナリンそれぞれの合成酵素の発現量をウエスタンブロット法により定量した。脊髄刺激電極を留置したSNLモデルラットに対し、脊髄刺激を行い疼痛反応が減弱したラットに対し3時間の脊髄刺激を与え、ペントバルビタールによる深麻酔下に冷却生理食塩水で経心的に還流し、腰膨大部を摘出した後に脊髄後角を左右に分けて採取しウエスタンブロットのサンプルとした。対照群として、脊髄刺激を行わなかったSNLラットを用いた。神経障害性疼痛モデルラットにおいて、脊髄刺激を行った群とそうでない群では、脊髄後角におけるTPHおよびD β Hの発現量は脊髄刺激を行った群で減少していたため、脳幹部における免疫組織学的検討と合わせると、脊髄刺激法による脊髄での鎮痛作用には、セロトニン、ノルアドレナリンの双方が関与するが、これら神経伝達物質は脊髄で産生の増加が見られるのではなく、それぞれの中枢での産生が増加し、その結果脊髄での放出が増加しているということが示唆された。

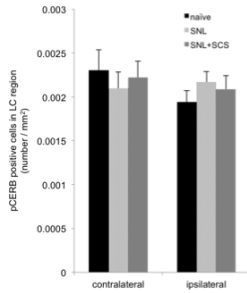
これら研究成果の一部は2013年10月にアメリカ合衆国サンフランシスコで行われるAnesthesiology 2013に発表予定であり、以上の研究成果はまとめて現在英文専門誌に投稿準備中である。

図2 脊髄刺激が下行性抑制系中枢核及び脊髄後角での神経細胞数及びタンパク発現に及ぼす影響の検討

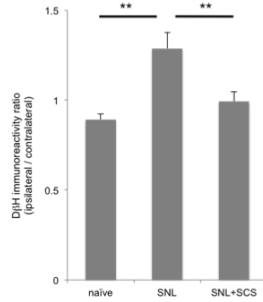
背側縫線核におけるセロトニンニューロン数の脊髄刺激による変化



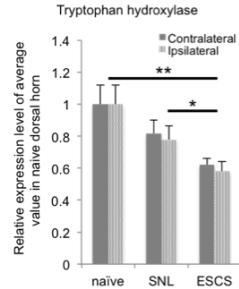
青斑核におけるpCREB陽性細胞数の脊髄刺激による変化



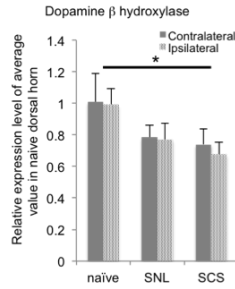
青斑核におけるDβHの蛍光強度の左右比の脊髄刺激による影響



脊髄後角におけるTPH発現量の脊髄刺激による影響



脊髄後角におけるDβH発現量の脊髄刺激による影響



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3件)

① Toshiharu Tazawa, Yoshinori Kamiya, Ayako Kobayashi, Kensuke Saeki, Hironobu Shinbori, Kengo Funakoshi, Takahisa Goto. SPINAL CORD STIMULATION ENHANCES PHOSPHORYLATION OF CREB PROTEIN AND NUMBER OF THE SEROTONERGIC NEURONS IN DORSAL RAPHE OF NEUROPATHIC ANIMALS. Annual Meeting of International Association of Study for Pain, 2012年8月31日, ミラノ(イタリア)

② Ayako Kobayashi, Yoshinori Kamiya, Toshiharu Tazawa, Takahiro Mihara, Yusuke Nakahashi, Hironobu Shinbori, Takahisa Goto, Pharmacological Analysis for the

5-HT Receptors in Electrical Spinal Cord Stimulation for Neuropathic Pain in Rat. Anesthesiology 2011, 2011年10月19日, シカゴ(アメリカ合衆国)

③ 小林綾子, 田澤利治, 中橋勇典, 紙谷義孝, 後藤隆久. 脊髄電気刺激の鎮痛効果は、5-HT、 $\alpha 2$ 受容体の活性化を介する. 日本麻酔科学会第58回学術集会. 2011年5月20日. 神戸国際会議場(兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新堀 博展 (SHINBORI HIRONOBU)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号: 60404993

(2) 研究分担者

小川 賢一 (OGAWA KENICHI)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号: 10233412

紙谷 義孝 (KAMIYA YOSHINORI)

横浜市立大学・医学研究科・客員講師

研究者番号: 90381491

菊地 龍明 (KIKUCHI TATSUAKI)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号: 70285138

(平成22年度で分担者としての期間終了)

田澤 利治 (TAZAWA TOSHIHARU)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号: 40405006

(平成22年度で分担者としての期間終了)

(3) 連携研究者

()

研究者番号: