

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592314

研究課題名(和文)末梢神経障害による下行性疼痛抑制系の変調と神経因性疼痛

研究課題名(英文)The abnormality of the descending inhibitory system in the brain stem by the peripheral axotomy and neuropathic pain

研究代表者

榎葉 均(Kashiba, Hitoshi)

関西医療大学・看護学部・教授

研究者番号：10185754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、末梢からの侵害情報は脊髄後角の表層を介して中枢に伝えられ、状況に応じて脳幹からのニューロンによって抑制的に修飾されると考えられてきた。しかしながら、今回の研究において、主に非侵害性の情報を司ると考えられてきた後角深層のニューロンの多くが侵害情報を処理していること、更にこれらのニューロンは部分的に脳幹より興奮性に制御されていることが分かってきた。現在のところ、これらの生理学的意義については不明であるが、下行性疼痛抑制システム概念については再考せねばならない問題であると考えている。

研究成果の概要(英文)：It is known that the noxious information in the peripheral tissues, the visceral organs, the skin and others, is carried by the primary sensory neurons with A delta and C fibers to the central nervous system via spinal dorsal horn. The information is thought to be also negatively regulated by the serotonergic and the noradrenergic neurons in the brain stem according to the situation. In our study, many neurons in the deep lamina of dorsal horn were excited by substance P, which is the neuromodulator in the nociceptors. This result means these neurons are involved in the transmission or modulation of pain sensation. Moreover, surprisingly, some of these are suggested to be excitatory, but not inhibitory, regulated by serotonergic and noradrenergic neurons. Although the physiological roles for the neural mechanism inferred from our present findings is unknown, the previous descending inhibitory system will have to be reconsidered.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔科学

キーワード：下行性抑制系 脊髄後角ニューロン パッチクランプ法 ラット

1. 研究開始当初の背景

近年になってこの侵害情報を抑制する内因性疼痛抑制機構という仕組みが脚光を浴びている。痛みの信号が痛みの信号を減弱させるというのである。最も代表的な仕組みの一つは、脳幹から脊髄後角に至る下行性の抑制ニューロンの存在である。この研究の起源は 1970 年代に遡る事になる[Basbaum 1978, 1979]。下行性抑制ニューロンは 5-HT 系と NA 系の二つに大別する事ができる[Howard 2005, Yoshimura 2006]。5-HT 作動性ニューロンは、延髄腹側の網様体に位置する大縫線核 (nucleus raphe magnus : NRM) 等より脊髄後角の表層へ投射している。このニューロン群を駆動させているのは中脳中心灰白質に局在する Glu 作動性ニューロンといわれている。通常、これらのニューロンは近傍に存在する GABA 作動性ニューロンにより興奮が抑制されている。一方、NA 作動性ニューロンは青斑核 (locus coeruleus : LC) およびその近傍から同じく脊髄後角表層へ投射し、侵害情報を修飾する事が知られている。しかしながら、これらの詳細な神経メカニズムについては明らかにされていない。

脊髄の中で後角表層部分は比較的研究が進んでいる[Grudt 2002, Yasaka 2010]。後角は大きく表層と深層に分類され、更に表層はⅠ層とⅡ層に、深層はⅢ層からⅤ層に分かれる[Rexed 1952]。表層は、一次求心性神経の A δ 求心性ニューロンと無髄 (C) 求心性ニューロンの入力を受け、深層はそれ以外の入力を受けるとされている。無髄の求心性ニューロンは SP やカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide: CGRP) 等の神経ペプチドと呼ばれる神経修飾物質を含むペプチド作動性ニューロンとこれらの神経ペプチドを含まない非ペプチド作動性ニューロンに分類され(これらのニューロン群の機能の違いについては様々な説が提唱さ

れている)前者はⅠ層とⅡ層の outer (lamina o) に、後者はこれに加えⅢ層の inner (lamina i) にも分布する[Kashiba 2001]。後角の投射ニューロンには、侵害刺激及び非侵害刺激に応答する広作動域ニューロン (Wide Dynamic Range (WDR) neuron) や侵害刺激のみに応答する特異的侵害受容 (nociceptive specific (NS) neuron) が存在し、前者は主にⅠ層に、後者は主にⅢ層に分布する。介在ニューロンとしてはⅢ層に分布する柄細胞 (stalked cell) や髒島細胞 (islet cell) が知られている[Gobel 1975]。よって、疼痛に関する研究は主に後角表層を中心に取り扱われてきた経緯がある。

2. 研究の目的

上述したように脊髄の中でも脊髄後角の深層ニューロンにおける神経科学的研究は、表層ニューロンにおけるそれと比較すると遅れていると言わざるを得ない。我々はパッチクランプ法を用いた研究[Kashiba 2012] から、侵害受容性の一次求心性ニューロンの多く含まれる SP の応答性を手がかりに脊髄後角深層において研究を進めた。後角深層において約 60-70% のニューロンが SP に対して興奮性のゆっくりした内向き膜電流 (slow inward current) を記録した。更にこれらのニューロンの多くはエンケファリン (Enk) により抑制性のゆっくりした外向き電流を示した。一方、SP 非感受性ニューロンは Enk には応答しなかった。

そこで今回の実験では、ラット脊髄新鮮スライスを用いながらパッチクランプ法により以前の実験結果を踏まえ、下行性抑制系において重要な役割であると考えられる 5-HT、NA に対する脊髄後角深層ニューロンの膜電流変化を記録・解析し、脊髄後角の疼痛処理システムについて検討した。

3. 研究の方法

新鮮脊髄スライス標本の作製

本実験には3~4週令のSprague-Dawley (SD)系雄性ラット (n=230) を使用した。新鮮脊髄スライス標本の作製、及びブラインドパッチクランプ法については中塚らの方法に準じた⁽²¹⁾。ウレタン(0.4~0.8 g/kg)をラットの腹腔内投与し、深麻酔後に背側の胸腰椎部に皮切を行った。エピネフリン添加0.5%キシロカイン液を棘突起の両側に局所注射後傍脊柱筋群を切離し脊椎を露出した。中位胸椎から下位腰痛まで椎弓切除を行った後、神経根を切離しながら脊髄を摘出した。摘出した脊髄は、酸素95%、二酸化炭素5%で飽和した高濃度スクロース人工脳脊髄液(in mM; 223 sucrose, 25 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 3.6 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.4 ascorbic acid, 2 pyruvate, 11 D-glucose, pH, 7.2)[Adam 2004]に浸した。摘出した脊髄を実体顕微鏡下に、硬膜、くも膜、軟膜、前根、後根を除去した。これらを除去した脊髄をV字型に溝を作った寒天ブロックに乗せマイクロスライサー(堂阪EMI社製DTK-1000)を用いて厚さ約650 μ mの脊髄新鮮横断スライス標本を作製した。作製したスライス標本を透明アクリル製の記録用チャンバーに移しプラチナ製のアンカーで固定し、人口脳脊髄液 (in mM; 117 NaCl, 3.6 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 11 glucose, pH, 7.2)を1分間に5ml~10mlの流速で還流させた。

ブラインド・パッチクランプ法

チャンバー内に固定されたスライスに下から透過光をあて実体顕微鏡で見ると背側の表層部に比較的明るい層が観察される。この層の下辺から腹側に向け、後索路の谷底レベルまでの後角深層部に記録電極を刺入し、モニターで電極抵抗を確認しながらマニピュレーターを用いてゆっくりと電極を進めた。電極抵抗が十分に上昇すると電極内の陽圧を解除し、電極先端部を細胞膜に吸着させ、ギガシールを完成させた。その後、さ

らに電極内圧を下げて細胞膜を破り、ホールセルレコーディングを開始した。記録電極は電気抵抗6~12M Ω の微小ガラス電極を使用し、電極内液の組成は(in mM; 135 potassium gluconate, 5 KCl, 0.5 CaCl₂, 2 MgCl₂, 2 MgCl₂, 5 EGTA, 5 HEPES, pH, 7.2)であった。

ニューロンの電気信号はパッチクランプ用アンプ(Axopatch 200B, Axon Instruments, USA)で取得した。これらのデータはA/Dコンバーター(Digidate 1200, Axo Instruments, USA)でデジタル変換され、pCLAMP 9 (pCLAMP acquisition program, version 9, Axon Instruments, USA)を用いながらPC (Net Vist, IBM, USA)に取り込み解析した。

サブスタンスP(SP):株式会社ペプチド研究所、5-HT:和光純薬工業株式会社、5-HT受容体アゴニスト(8-OH-DPAT、 α -methyl-5-HT、biguanide、5-carboxamidotryptamine (5-CT):シグマアルドリッチジャパン株式会社)、アドレナリン(Ad):和光純薬工業株式会社、及びカテコラミン受容体アゴニスト(phenylephrine、clonidine、isoproterenol:シグマアルドリッチジャパン株式会社)は、人工脳脊髄液に3 μ M (SPについては1 μ M)になるように準備し、いずれも1分間投与(bath application)した。

4. 研究成果

今回の実験では55個のニューロンからブラインド・パッチクランプ法により膜電流を記録する事が出来た。記録はスライス標本を作製してから8時間に渡って行う事が可能で、一つのニューロンから最長90分に渡る安定した記録を得る事が出来た。記録した深層ニューロンは-50~-70mVの静止電位を有していた。

5-HT,Ad及びSPの脊髄後角深層ニューロンに対する作用

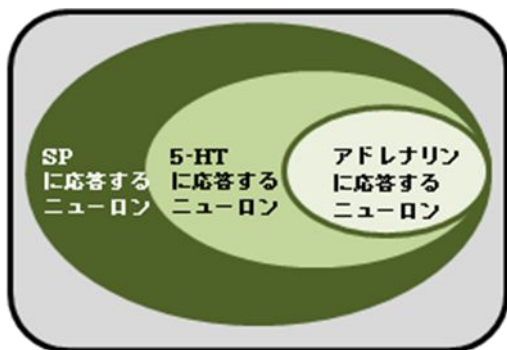


Fig.1 後角深層においてサブスタンスP (SP), 5-HT 及びアドレナリン (Ad) にそれぞれ応答するニューロン群の相関関係

後角深層ニューロンに対する 5-HT, Ad, SP の効果について検討した。記録した深層ニューロンのうち、5-HT (3 μ M for 1 min) を投与すると、37%のニューロン (13/35 cells) が slow inward current (平均 14.9 pA) を示したが、slow outward current を示したニューロンはわずか 1 cell であった (1/35 cells) (9.1 pA, n=1)。また、Ad (3 μ M for 1 min) を投与すると、20%のニューロン (7/35 cells) が slow inward current (13.5 pA) を示し、slow outward current (平均 9.1 pA) を示したニューロンは、2 cells であった (2/35 cells) (Fig. 1)。5-HT 及び Ad に応答するニューロンは、全て SP に対して 5 pA 以上の slow inward current を示した。

深層ニューロンにおける 5-HT 受容体、NA 受容体アゴニストの作用

5-HT 受容体アゴニスト及び NA 受容体アゴニストを用いて、5-HT 及び Ad に応答するニューロンに発現しているそれらの受容体について検討した。今回の実験に用いたアゴニストは、Table 1 に示した [Barnes 1999, Branchek 2000]。5-HT1 受容体については、現時点において 5-HT1A、5-HT1B、5-HT1D、5-HT1E、5-HT1F に分類されているが、今回の実験には 5-HT1A アゴニストのみを用いた。5-HT4 受容体と 5-HT5 受容体アゴニストは現時点において確立されていない。5-HT 受容体

のうち、イオンチャネル型の受容体は 5-HT3 受容体のみで、残りの受容体は G 蛋白結合型であるの、5-HT の G 蛋白結合型受容体のうち、抑制性の応答を示すのは 5-HT1 と 5-HT5A であり、残りは興奮性の G 蛋白と結合している。

-1 5-HT により slow inward current を誘導したニューロン

5-HT2 受容体は、さらに 3 種の受容体 (5-HT2A, 2B, 2C) に分類されるが、今回の実験では 3 種の受容体に共通のアゴニストである α -methyl-5-HT のみを用いた。5-HT により slow inward current を誘導した 8 個のニューロンに α -methyl-5-HT (3 μ M for 1 min) を投与すると、5 個のニューロンが slow inward current を示し、残りのニューロンは応答しなかった。 α -methyl-5-HT による slow inward current は比較的小さな膜電流応答であった。

5-HT により slow inward current を誘導した 8 個のニューロンに 5-HT3 受容体アゴニストとして biguanide (3 μ M for 1 min) を作用させたところ、興奮性に応答したのはわずかに 1 個のニューロンのみであった。残りのニューロンに対して、膜電流変化は見られなかった。

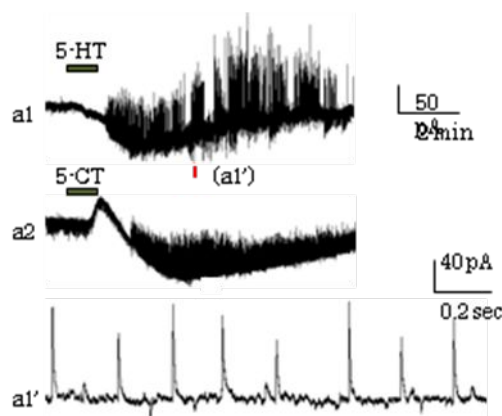


Fig.2 後角深層ニューロンにおける 5-HT 及び 5-HT アゴニスト (5-CT) の作用による膜電流変化

5-carboxamidotryptamine (5-CT) は 5-HT6 受

容体及び5-HT7受容体の共通アゴニストであり、現時点においてこれらの受容体を識別するリガンドは見つかっていない。また、5-CTは5-HT5受容体のサブタイプを認識するとの報告もある[Barnes 1999, Branchek 2000]。5HTにより slow inward current を誘導した8個のニューロンに、5-HT6/7 受容体アゴニスト 5-CT (3 μ M for 1 min)を作用させたところ、全てのニューロンにおいて slow inward current が観察された。その内2個のニューロンにおいては、このゆっくりした下向きの膜電流応答に加え抑制性の IPSCs の顕著な増加が見られた(Fig. 2-a1, a2, a1')。また、3個のニューロンにおいて 5-CT を作用させた時、膜電流変化が始まる最初の段階で、上向き(抑制性)の電流変化が見られた。Grudt らは[Grudt 1995]、以前に 5-CT を 5-HT1A 受容体アゴニストとして用い、後角ニューロンにおいて抑制性の膜電位変化を報告している。この応答は、抑制性の 5-HT5 受容体サブタイプを介した反応かもしれない。つまり、今回記録した3個のニューロンは 5-HT6/7 受容体と抑制性の 5-HT1A 受容体を共発現しているのかもしれない。しかしながら、今回の研究ではこれ以上の解析は行っていない。

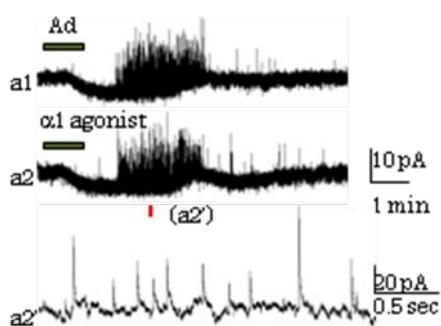


Fig.3 後角深層ニューロンにおけるアドレナリン (Ad) 及び α 1 アゴニスト (phenylephrine) の作用による膜電流変化

-2 5-HT により slow outward current を誘導したニューロン

5-HT により slow outward current を誘導し

た1個のニューロンに、5-HT1A アゴニスト 8-OH-DPAT を作用させた。しかしながら、膜電流変化は観察されなかった。

-3 Ad により slow inward current を誘導したニューロン

Ad により slow inward current を誘導した7個のニューロンに、 α 1 アゴニストである phenylephrine を作用させたところ、全てのニューロンにおいて slow inward current が観察された。この内、2個のニューロンにおいては、このゆっくりした下向きの膜電流応答に加え抑制性の IPSCs の顕著な増加が見られた(Fig. 3-a1, a2, a2')。Ad により slow inward current を誘導した5個のニューロンに、 α 2 アゴニストである clonidine を作用させたところ、1個のニューロンは同様の slow inward current を示したが、残りのニューロン(4 cells)はどんな膜電流変化も示さなかった。Ad により slow inward current を誘導した1個のニューロンに、 β アゴニストである isoproterenol を作用させた。しかしながら、膜電流変化は観察されなかった。

-4 Ad により slow outward current を誘導したニューロン

Ad により slow outward current を誘導した4個のニューロンに、 α 1 アゴニストである phenylephrine を作用させたところ、全てのニューロンにおいてどんな膜電位変化も示さなかった。Ad により slow outward current を誘導した6個のニューロンに、 α 2 アゴニストである clonidine を作用させたところ、二つのニューロンは同様に slow outward current を示したが、残りのニューロン(4 cells)はどんな膜電流変化も示さなかった。

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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

5-HTおよびアドレナリンはサブスタンスP
に反応する脊髄後角深層ニューロンを興奮
させる：パッチクランプ法による解析
和田達矢、清行康邦、榎葉均、他
第89回日本生理学会大会(松本 2012)

サブスタンスPとエンケファリンに反応する
脊髄後角ニューロン
榎葉均、清行康邦
第62回全日本鍼灸学会(福岡 2013)

〔図書〕(計 2件)

「鎮痛(第3章 pp62-74)」

榎葉均

日本伝統医学テキスト・鍼灸編(編集:「統
合医療を推進する為の日本伝統医学の標準
化」研究班)2012

鍼灸医学大事典(生理学領域用語執筆)

榎葉均

医歯薬出版(株)初版第1版第1刷発 2012

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎葉均 (Kashiba Hitoshi)
研究者番号：10185754

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

大島稔 (Ohshima Minoru)
研究者番号：20342230

内田靖之 (Uchida Yasuyuki)
研究者番号：80388678