

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592355

研究課題名(和文) 抗うつ薬、抗痙攣薬による神経障害性疼痛の予防 - インビボパッチクランプ法による検討

研究課題名(英文) Prevention of neuropathic pain by antidepressants and anticonvulsants: in vivo patch-clamp analysis

研究代表者

森 隆 (Mori, Takashi)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00336786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経障害性疼痛のメカニズム解明と薬剤による予防効果の検討を目的とした。しかし脊髄後角in vivoパッチクランプ法では、ラット神経障害性疼痛モデルにおいて特有のシナプス活動変化を明らかにできなかった。行動実験では、トラマドール、デクスメデトミジン、プラバスタチン、ケタミンの腹腔内持続投与に予防効果はなく、ロピバカインの神経結紮部への局所持続投与で軽度の予防効果を認め、今後の検討を要する。In vivoパッチクランプ法により、鎮痛薬トラマドールの全身投与が、膠様質神経細胞のシナプス活動を修飾し、これが主に代謝物であるM1による作用であることを示し、鎮痛機序の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present research was to investigate the mechanisms of neuropathic pain and preventive effects of drugs by using in vivo patch-clamp technique in rat spinal dorsal horn and behavioral experiments. However, contrary to expectations, the synaptic property of substantia gelatinosa neurons in neuropathic pain model rat have not been clarified by the electrophysiological technique. In behavioral study, continuous intraperitoneal infusion of tramadol, dexmedetomidine, pravastatin and ketamine before the nerve injury had no preventive effect on neuropathic pain. Some preventive effects were observed by ropivacaine administered locally on ligated nerve. Further study will be needed to confirm this preventive effects. Our in vivo patch-clamp experiments revealed that systemic tramadol modulated the synaptic activities of substantia gelatinosa neurons in the spinal cord and indicated that metabolite M1 may play a key role in the antinociceptive mechanisms of tramadol.

研究分野：麻酔学

キーワード：インビボパッチクランプ法 トラマドール 神経障害性疼痛 予防法

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は一旦発症すると治療に難渋することが多いので、発症の予防という観点で研究を計画した。疼痛緩和の第一選択として用いられる抗うつ薬、抗痙攣薬についても予防効果は明らかではなく、今のところ明確な予防法はない。

発症を予防するためには、神経障害性疼痛の発症機序を理解する必要がある。近年、その1つとして、脊髄ミクログリア P2X₄ 受容体活性化の関与が示されており、治療・予防の重要なターゲットとして注目されている。脊髄ミクログリア P2X₄ 受容体活性化による機序では、その刺激が一連の反応を誘導した結果、脊髄後角第一層の痛覚 2 次ニューロンにおける K⁺-Cl⁻ コトランスポーター 2 (KCC2) の発現低下、それによるニューロン内の Cl⁻ 濃度上昇が起こり (Cl⁻ 平衡電位の脱分極側シフト: Cl⁻ シフト) のため Cl⁻ 透過性で抑制性神経伝達を担う GABA_A 受容体や glycine 受容体の活動が興奮性の活動に変化する。これは脊髄スライス標本で確かめられており、アロディニア発症機序と考えられている。今回、より生理的な条件で発症機序を検討するため、我々が当研究室に立ち上げてきた脊髄後角 in vivo パッチクランプ法を活用する。神経障害性疼痛により生じる脊髄後角膠様質ニューロンのシナプス活動の変化や Cl⁻ シフトを明らかにすることを目標とした。またその結果は神経障害性疼痛発症の評価として有用と考えた。

一般的に、神経傷害性疼痛の予防には、原因となる急性痛や発症機序を先制して抑えることが重要とされる。抗うつ薬、抗痙攣薬の中には P2X₄ 受容体を抑制するものも示されており、このような薬剤を神経障害性疼痛の発症よりも先行して投与することにより、予防に有効である可能性がある。本研究は、脊髄後角 in vivo パッチクランプ法と行動実験を用いて、神経障害性疼痛の機序と予防について検討する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経障害性疼痛の機序と薬剤による予防について検討することである。そのため、ラット神経障害性疼痛モデルを用いて、in vivo パッチクランプ法と行動実験を行い検討する。

- 1) 脊髄後角 In vivo パッチクランプ法: 神経障害性疼痛モデルラットを用い、麻酔下に、膠様質ニューロンの電気生理学的特徴、特にシナプス活動の変化を明らかにする。脊髄スライス標本で確認された Cl⁻ シフト、GABA_A、glycine 受容体の活動が興奮性へ転じることなどを検証する。
- 2) 行動実験: 神経障害性疼痛モデルラットに、薬剤を先制投与し、行動実験により予防効果を調べる。また脊髄後角 in vivo パッチクランプ法を用いてシナプ

スレベルでの機序を検討する。

3. 研究の方法

脊髄後角 in vivo パッチクランプ法

神経障害性疼痛モデルラット (Chung モデル) を作成し、ウレタン麻酔下に、脊髄後角 in vivo パッチクランプ法 (穿孔パッチクランプ法併用) を行う。脊髄後角膠様質ニューロンの電気生理学的特徴を評価し、GABA_A 受容体、glycine 受容体機能の興奮性活動への転化、Cl⁻ シフトの検証を行う。

1) 神経障害性疼痛モデルの作製

実験には 4 - 7 週齢の Sprague-Dawley ラットを用いる。ラットをコントロール群と神経障害性疼痛群の 2 群に分ける。神経障害性疼痛群ではラットをセボフルランで麻酔し、第 5 腰神経を 5-0 絹糸で結紮する (Chung モデル)。手術の 1 - 2 週後に von Frey フィラメントを用いて機械的触刺激に対する逃避閾値を測定し、機械的アロディニア状態の発生を確認する。コントロール群 (神経無傷ラット群) では、全身麻酔下に sham 手術を行い、1 - 2 週後にアロディニアが発生していないことを確認する。

2) In vivo 標本の作製

手術後 1 週目、または 2 週目のラットを用いる。ラットを腹腔内にウレタン (1.2 - 1.5 mg/kg) を投与して麻酔する。椎弓切除 (第 12 胸椎 - 第 2 腰椎) を行なって第 3 - 5 腰椎レベルの脊髄を露出し、ラットを固定装置にセットする。露出した脊髄表面のくも膜、軟膜に約 2mm の電極刺入用の窓を開ける。脊髄表面を、95% O₂ - 5% CO₂ でバブリングした 37 °C の Krebs 液で灌流する。

3) In vivo パッチクランプ記録法

脊髄後角第一層の神経細胞を目標に in vivo パッチクランプ法を行なう。細胞内環境および細胞内陰イオンを保持した状態での記録を行うため、gramicidin D (25 μg/ml) を用いて穿孔パッチクランプを行う。マイクロマンピュレーターを用いてガラス電極を脊髄内へ刺入し、5 mV ステップに対する応答電流の変化を指標にギガシールを形成する。ギガシール形成後、穿孔パッチクランプの状態を待つ。Voltage-クランプ法で興奮性シナプス電流 (EPSCs) と抑制性シナプス電流 (IPSCs) の記録を行う。第 5 腰神経領域の機械的刺激時の EPSCs, IPSCs, 活動電位を記録する。以上の記録を解析し、神経障害性疼痛モデルラット群とコントロール群の 2 群での比較検討を行う。

薬剤先制投与による神経傷害性疼痛予防

Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile 社) を用いて、ラットの足底に機械的触刺激を与え、逃避閾値の測定し、機械的アロディニアの程度を評価する。

薬剤持続投与には、ミニ浸透圧ポンプ ALZET® カプセルを用いる。神経障害性疼痛ラットモデル作成手術の 1 週間前より、薬剤の

先制投与を開始し、基本的には2週間、持続投与する。

第5週齢のラットを用いて開始する。薬液注入ポンプを留置する前に、逃避閾値を測定する。2週間タイプのALZET®カプセルに薬液を注入し、それを第5週齢のラットの腹腔内にセボフルラン麻酔下で留置する。コントロールでは生理食塩水を持続投与する。

薬剤投与開始1週間後(第6週齢目)、逃避閾値の測定を終えたあとに、セボフルラン麻酔下に神経障害性疼痛モデル(Chung model)を作製する。

第7週齢目と第8週齢目にも、逃避反応の閾値の測定を行い、機械的アロディニアを評価し、薬剤の予防効果を検討する。

脊髄後角 *In vivo* パッチクランプ法は、第7週齢目または第8週齢目に行い、脊髄レベルでの機序を検討する。

4. 研究成果

神経障害性疼痛モデルラットにおける脊髄内での痛覚伝導系神経活動の変化を調べるため、脊髄後角 *in vivo* パッチクランプ法により膠様質神経細胞シナプス活動を解析することから開始した。まずホールセル記録による興奮性シナプス電流(EPSCs)と抑制性シナプス電流(IPSCs)、機械的刺激によるEPSCsとIPSCsの反応を、神経結紮をしない sham 手術を行ったラット(コントロール群)と比較した。機械的刺激に対するEPSCsの反応および活動電位の発生頻度に、統計学的有意差は認められなかった。当初は、機械的刺激に対する興奮性シナプス電流(EPSCs)の反応および活動電位の発生頻度に関して、コントロール群と神経障害性疼痛モデル群の間での差を予想したが、実験個体数を増やしたが明確な差を見いだすことができなかった。これが実験手技や個体や細胞レベルの不安定性によるものなのか不明であった。本研究をすすめるために重要な意義を持つ神経障害性疼痛モデルでのシナプス活動の変化を明確にすることができなかった。

次に、神経障害性疼痛の機序としてスライス標本で示されている、脊髄後角膠様質神経細胞Cl⁻平衡電位の脱分極側シフトおよびGABA_A、glycine受容体の興奮性活動への変化について検討を進めた。そのためグラミシジンDを用いた *in vivo* 穿孔パッチクランプ記録を試みた。グラミシジンDによるperforated形成は、文献によると約30分以上を要するため、長時間の安定した記録が必須である。実際にも、穿孔パッチクランプ形成に時間が要し、我々の技術的に *in vivo* での安定した長時間記録が難しく、予想以上に記録が困難であることがわかった。現時点で成功は1記録のみで、その記録では、IPSCsの逆転電位は-40 mV付であったが、これが脱分極側へのシフトと見なすことができるか明確ではない。今後も記録改善をすすめて検討を要する。

行動実験では、トラマドール、デクスメデ

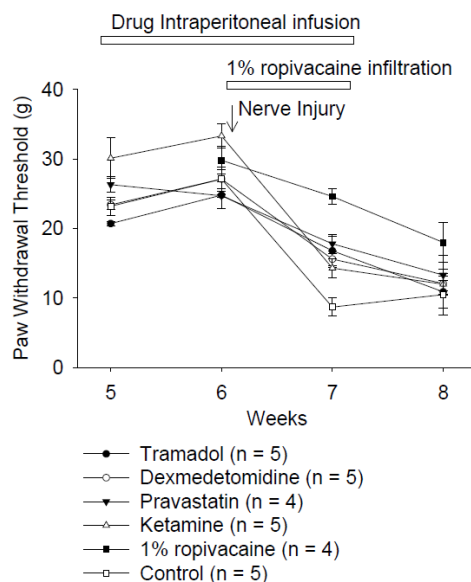
トミジン、スタチン(プラバスタチン)、ケタミンの腹腔内投与、ロピバカインの神経結紮部への局所投与の予防効果を検討した。トラマドール、ケタミンはそれぞれ異なる効果による先制鎮痛を期待した。デクスメドミジン、スタチンは予防効果を示す報告があったため実験に採用した。第5週齢のラットを用い、デクスメドミジン 40 μg/kg/day、トラマドール 5 mg/kg/day、プラバスタチン 10 mg/kg/day、ケタミン 1 mg/kg/dayを神経結紮の1週間前から1週間後までの2週間持続投与して機械的触刺激に対する逃避閾値を測定した。ロピバカインは第6週齢の神経結紮時よりその部位に持続投与を開始し、1週間投与した。

トラマドール、デクスメドミジン、スタチン(プラバスタチン)、ケタミンは、第7週齢の時点(神経結紮1週間後、薬剤持続投与開始2週間)で、コントロールに比べ、逃避閾値の上昇を認めた(下図)。これは薬剤投与中の鎮痛効果と考えられた。さらに第8週齢の時点(神経結紮2週間後、薬剤投与終了1週間後)では、逃避閾値にコントロールと差がなかった(下図)。この結果から、これらの薬剤には明らかな予防効果は認められなかった。いずれの群においても実験期間中に明らかな鎮静作用は認められなかった。

ロピバカインの神経結紮部への持続投与では、第7週齢(神経結紮1週間後、ロピバカイン投与開始1週間)、第8週齢(神経結紮1週間後、ロピバカイン投与終了1週間後)ともに逃避閾値の上昇を認めた(下図)。このことはロピバカイン局所投与の鎮痛効果を示すだけでなく、神経障害性疼痛予防効果を示唆するものと考えられた。これに関しては、さらなる検討の必要がある。

今後、薬剤(他の局所麻酔薬、抗鬱薬、抗痙攣薬等)、投与量を変えて検討する余地がある。

図) 神経障害性疼痛予防効果の検討



本研究を進める途中で、in vivo パッチクランプ法により、鎮静薬として臨床でも有効なデクスメトミジン、鎮痛薬として広く使われているトラマドールなどの薬剤に脊髄後角膠様質神経細胞シナプス活動に対する作用が認められた。デクスメトミジンに関しては、臨床投与量で IPSCs の増強を認め、トラマドールにおいても、興奮性シナプス電流の抑制と抑制性シナプス電流の増強という修飾作用を認めた。デクスメトミジンによる IPSCs の増強は、下行性抑制系機序であることがわかった（発表論文）。トラマドールの全身投与によるシナプス活動の修飾は、主に代謝物である M1 の作用であることを示し、鎮痛機序の一端を解明した（発表論文）。また全身麻酔薬セボフルランの脊髄後角膠様質神経細胞シナプス活動への影響についても検討中である。

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 3 件)

1. Hiroyuki Yamasaki, Yusuke Funai, Tomoharu Funao, Takashi Mori, Kiyonobu Nishikawa. Effects of tramadol on substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord: an in vivo patch-clamp analysis. PLOS ONE 査読有 2015 DOI:10.1371/journal.pone.0125147.
2. Yusuke funai, Anthony E. Pickering, Daisuke Uta, Kiyonobu Nishikawa, Takashi Mori, Akira Asada, Keiji Imoto, Hidemasa Furue. Systemic dexmedetomidine augments inhibitory synaptic transmission in the superficial dorsal horn through activation of descending noradrenergic control: an in vivo patch-clamp analysis of analgesic mechanisms. 査読有 Pain 2014;155:617-628 DOI: 10.1016/j.pain.2013.12.018
3. Megumi Hasaka, Takashi Mori, Tadashi Matsuura, Toshio Narahashi, Miyuki Kuno, Akira Asada, Kiyonobu Nishikawa. Effects of general anesthetics on P2X4 receptors in a mouse microglial cell line. 査読有 NeuroReport 2012; 23:601-605 DOI: 10.1097/WNR.0b013e32835509db.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Yusuke Funai, Takashi Mori, Hiroyuki Yamasaki, Kiyonobu Nishikawa. In vivo electrophysiological analyses of antinociceptive action of sevoflurane

in the rat substantia gelatinosa neurons. International Anesthesia Research Society 2015 Annual Meeting 2015年03月21日～2015年03月24日 Honolulu, Hawaii, USA

2. Hiroyuki Yamasaki, Takashi Mori, Yusuke Funai, Taku Hamada, Tokuhiko Yamada, Kiyonobu Nishikawa. Antinociceptive actions of tramadol revealed by in vivo patch-clamp recordings in the spinal cord dorsal horn. Euroanaesthesia2013 2013年06月02日 Barcelona, Spain
3. 山崎広之, 森 隆, 舟井優介, 濱田拓, 山田徳洪, 西川精宣. 脊髄後角 in vivo パッチクランプ法によるトラマドールの鎮痛機序の検討. 日本麻酔科学会第60回学術集会 2013年05月24日 札幌

〔その他〕

ホームページ等

<http://ocu-anesth.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 隆 (MORI, Takashi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00336786