

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791577

研究課題名(和文) 妊娠と神経障害性疼痛

研究課題名(英文) Pregnancy suppresses mechanical allodynia by reducing c-fos in the spinal dorsal horn in the chronic constriction injury rat model

研究代表者

小野寺 美子 (Onodera, Yoshiko)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：50516953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 800,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠による疼痛閾値上昇のメカニズムを解明するために脊髄での下行性抑制系に焦点を当て研究を進めた。妊娠の成立を安定させ、引き続きBennettの神経障害性疼痛モデル作成を確立させ、von frey testにて妊娠ラットで分娩直前に疼痛閾値が上昇することを明確にした。機序の解明のために脊髄後角での神経細胞の興奮を示すc-fosに焦点を当てた。ウエスタンブロットを用いてc-fosの定量を行い、非妊娠ラットでは神経障害性痛モデルにて、病側のc-fos増加を認めたが、妊娠ラットではその傾向が弱まったことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Pregnancy has been reported to increase the pain threshold. We focused on neuron activation in the spinal cord, and used the chronic constriction injury (CCI) rat model to test the hypothesis that pregnancy reverses upregulated c-Fos in spinal cord cells. Pregnancy significantly reversed the lowered mechanical threshold induced by CCI neuropathic pain. Pain threshold is elevated just before delivery, and decreases after delivery. Furthermore, pregnancy reduced the upregulation of c-Fos in the spinal dorsal horn in the CCI model.

研究分野：神経障害性疼痛

キーワード：妊娠 神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国では約 1700 万人が慢性疼痛に苦しんでいる。急性痛は身体の障害としての警告の意味を持つが、慢性疼痛は患者の QOL を著しく損なうだけであり除痛が重要である。慢性疼痛は、リウマチ性関節痛などに代表される侵害受容性疼痛、帯状疱疹後神経痛や複合性局所疼痛症候群 (CRPS) に代表される神経障害性疼痛、心因性疼痛に分類される。その中でも難治性である神経障害性疼痛への有効な治療法は確立されておらず、その治療薬の開発は急務である。

(2) 妊娠による疼痛閾値の上昇の機序についてはエンドルフィンなどの内因性鎮痛物質が関与していることを 1980 年に Gintzler が発表しており¹⁾、1989 年には Howaed²⁾らがダイノルフィンの脊髄への作用について報告している。われわれも先行研究で妊娠に伴い、内因性鎮痛機序は分娩直前に活性化されることを体性および内臓性侵害刺激を用いて確認してきた³⁾。

我々は妊娠による疼痛閾値の上昇が、内因性オピオイドなどで賦活された下行性疼痛抑制系に起因するものであると仮定し、痛いという信号が一次求心性線維にて伝達されるのを防いでいると考えている。c-fos は immediate early gene (IEG) と呼ばれる遺伝子群の 1 つからつくられる蛋白⁴⁾であり、転写調節因子として遺伝子の発現を調節し、侵害刺激や神経切断によって、受容野と一致する部分の二次ニューロンや痛みの上行路に沿って現れる。よって脊髄での c-fos 陽性細胞の数の変化が末梢性疼痛の指標となる。本研究では脊髄での c-fos の発現が減少しているはずである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、妊娠によって疼痛閾値が上昇する機序を解明し、難治性疼痛である神経障害性疼痛の治療法を新たに確立することである。

本研究の特色は妊娠ラットを使用する部分である。

妊娠という生理学的に非常に大きな変化を起こすライフサイクル上のイベントにおいて、これまでの研究で痛み閾値が上昇することがわかっている。これはヒトを含めた生物の進化の過程において獲得してきたものと考えられるが、そこに今世界で千数百万人が苦しんでいる神経障害性痛の治療法を見出そうとしている。

妊娠によって下行性疼痛抑制系が賦活され痛みが減弱されると考えられている。脊髄への痛いという信号の入力が阻害されていると考えているので、脊髄での C-FOS 発現量が、非妊娠神経障害性疼痛ラットと比較し、妊娠神経障害性疼痛ラットで低下するという結果が予測されている。

またその結果、脊髄において痛み刺激に対する反応が減弱するはずなので、痛み刺激を受けて、活性化するミクログリアも活性化しないという結果が予測される。以上の結果を踏まえて、神経障害性痛を減弱させるためには、一次求心性線維からの入力を減らす必要がある。

その鍵が妊娠状態にあると考えられるので、今後妊娠による生理的变化の中に疼痛を減弱させる因子があることが解明し、その中から因子を見つけ出すことが目標となる。

3. 研究の方法

(1) 妊娠ラットの作成

ラット計 40 匹を使用する。S.D 系雌ラット 20 匹を対象とし、臆粘液スメアを参考に適切な時期に雄ラットと交尾させ、妊娠ラットを作成する。ケージ内の Plug の存在により妊娠を確認する。対照群として、非妊娠ラット 20 匹を使用する。

(2)

① 神経障害性疼痛モデルの作成

妊娠 3-5 日ラットをペントバルビタール麻酔下に坐骨神経を 4 か所で結紮することにより Neuropathic pain model を作成する⁵⁾。Hot plate test (50W projector)、Von Fry filament を用い Hyperalgesia であることを確認する。

② 妊娠 14 日、妊娠 21 日 (分娩直前) および分娩 7 日後にラットを生理食塩水、4% パラホルムアルデヒドで灌流固定する。その後脊髄をとりだし、4% パラホルムアルデヒドに 1 時間、次に 0.1M のフォスフェイトバッファーに溶解した 10% サッカロースに 1 時間、その後 30% サッカロースに一晩浸す。取り出した脊髄を滑走型マイクロトームを用い、40 μ m の凍結切片にし、スライドグラスにのせる。内因性ペルオキシダーゼ活性の抑制のため、切片を 0.1% 過酸化水素に 10 分浸す。その後、PBS で 2~3 回洗浄する。1 次抗体が細胞内や核内に浸透しやすくするため、0.5% TritonX-100 の PBS 溶液中に 30 秒程度切片を浸す。その後 PBS

Sで洗浄する。ブロック抗体である10%ヤギ血清を滴下し、室温で20分間浸透台の上で反応させる。ブロック抗体を取り除き、一次抗体としてPC38 Anti-c-Fos (Ab-5) (4-17) Rabbit pAbを用い、滴下する。4℃で一晩おいた後、スライドをPBSで洗浄し、2次抗体を使用する。室温で30分反応させた後PBSで洗浄する。その後ストレプトアビジン-HRPを結合させる。これにDABを添加し発色させる。その後PBSで2~3回洗浄する。その後アルコールとキシレンで脱水と固定を行う。できあがったスライドを光学顕微鏡で観察し、スライド上での脊髄後角のc-fos蛋白出現数を測定し、妊娠ラット、非妊娠ラット、神経障害性疼痛の有無によって比較する。

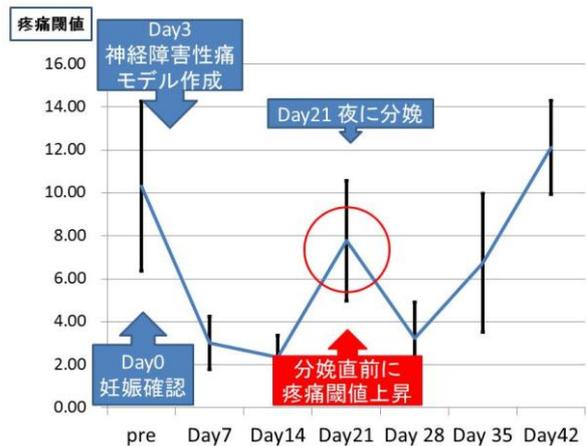
③ウエスタンブロット法

妊娠21日(分娩直前)にラットをペントバルビタールで麻酔下に坐骨神経から逆行性に部位を同定し、L4-6部分を検体として摘出する。すぐに粉末にしたドライアイスにて凍結し、-80℃で保存して検体とする。

これらの組織を、蛋白溶解バッファーを使用して均質化し、その蛋白溶解バッファーはプロテアーゼ阻害薬とフォスファターゼ阻害薬を含むものとする。ホモジネートを18000g, 摂氏4度で20分間遠心分離し、その上澄みを収集し、蛋白定量を行う。30ugずつ蛋白を分注し、Laemmli bufferを加え、次に95度で5分間、蛋白変性させる。蛋白を、10-12%のgelを用いて電気泳動により展開した後、PVDFメンブレンに転写する。メンブレンはスキムミルクを用いてブロッキングし、そののち一次抗体を含んだ溶液中に摂氏4度で1晩、振盪させる。一次抗体は、Anti-c-Fos Rabbitを用い、ハウスキーピングとしてmouse anti-β-actinを使用する。メンブレンを2次抗体に浸し、次にchemiluminescence solutionを用いて検出する。得られたバンドはImageJを用いて解析した。

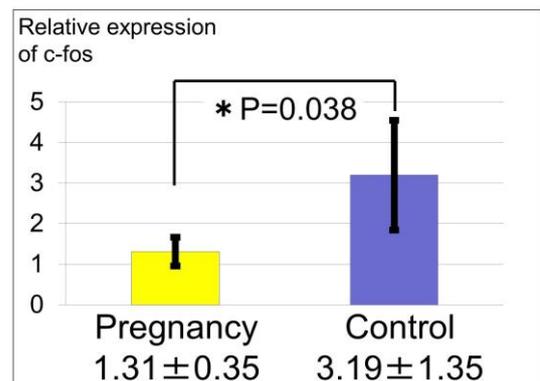
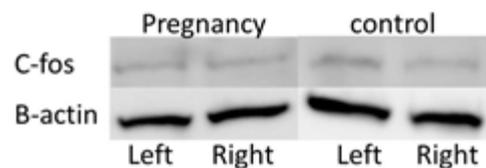
4. 研究成果

(1) Von frey test から妊娠ラットでは、分娩直前のDay21に疼痛閾値の上昇が認められた。またその効果は分娩直後に消失した。



(2) 免疫染色ではC-fosの定量は困難であった。

(3) 免疫染色での定量が困難であったためウエスタンブロット法を用いてc-fosの定量を行った。



分娩直前である妊娠21日において非妊娠群と比較して、妊娠群では有意にC-fosの発現が抑制されていた。

このことより、分娩直前に生じる疼痛閾値上昇には、脊髄後角への末梢神経からの痛み刺激の入力が抑制されていることがわかった。この機序には先行研究で説明されているダイノルフィンなどの内因性のオピオイドが関与していると考えられ、神経障害性疼痛に

においても妊娠による疼痛閾値の上昇を認めることがわかった。

今後はホルモン偽妊娠状態としたラットでも同様のことが起こるかどうかが、近年神経障害性疼痛の成立・維持に重要と考えられているミクログリアやアストロサイトなどの妊娠による動向などを検討する。

ことにより、さらなる Pregnancy induced analgesia の検討を進め、神経障害性疼痛の治療法を模索していきたい。

<引用文献>

- ① Gintzler .Science 1980;210:193-195
- ② Haward W et al.Eur J pharmacol 1989;159:205-209
- ③ Iwasaki H et al. Anesthesiology 1991;74:927-933
- ④ S P HUNT, A Pini, G EvanNature 1987;328:632-634
- ⑤ Bennett G.J et al. Pain 1988;33:87-107

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1件)

- ① Yoshiko Onodera, M.D., Tomoki Sasakawa, M.D., Keiko Mamiya, M.D.Ph.D., Takafumi Iida, M.D., Daisuke Kawata, M.D., Takayuki Kunisawa, M.D. Ph.D., Osamu Takahata, M.D.Ph.D, Hiroshi Iwasaki, M.D.Ph.D.、Pregnancy reduces c-fos expression in chronic constriction injury model in rats、2014年10月12日、New orleans

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野寺 美子 (ONODERA, Yoshiko)

旭川医科大学・医学部・助教