

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460708

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛における責任領域の中枢移行時期の同定

研究課題名(英文) Transition period from peripheral nerve to CNS of the responsible area for abnormal behavior following sciatic nerve injury in rats

研究代表者

坪井 美行 (TSUBOI, Yoshiyuki)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：50246906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経が傷ついた時の痛みは、有効な治療薬および治療法がなく、慢性の痛みに移行する場合が多い。また、何かに触れた時の痛みと同様に自発的な痛みも臨床上問題となる。本研究では、神経障害性疼痛モデル動物の自発行動を経時的に測定した。中枢神経での神経活動を記録し、その後末梢神経からの入力を遮断することによって中枢神経の自発活動がどのくらい残るかを指標に痛みの責任部位の中枢への移行時期を調べた。自発行動は術後21日目以降で有意に多くなり、その時期から中枢神経の自発活動は末梢からの入力にあまり依存しないで活動していることが解かった。このことより痛みの主な責任部位が移行することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：When the peripheral nerve is damaged, the pain is caused. This pain has no effective therapeutic and treatment methods, and often shifts to chronic pain. Moreover, a spontaneous pain becomes a clinical problem as well as the pain when something is touched. In this study, it was measured the spontaneous behavior of the animal with the nerve injury disorder pain model. The transition time to the center of the responsibility part of the pain was examined by the index how much the voluntary activity of the central nerve remains by recording the nerve activity on the central nerve after blocking the input from the peripheral nerve. The frequency of the spontaneous behavior significantly increased and the spontaneous activity of neurons in the central nerve system was significantly frequent without dependence on the input from the peripheral nervous system after the postoperative 21st day. This suggests that the main areas of responsibility for pain are shifted to the central nervous system.

研究分野：神経科学

キーワード：疼痛 自発痛

### 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は末梢組織の損傷や外科手術による神経損傷により惹き起こされ、非ステロイド系抗炎症薬やモルヒネが奏功しないなど、有効な治療薬および治療法がなく (Sounvoravong et al 2004)、慢性疼痛に移行するケースが多い。Xieら (2005) は、動物実験において末梢神経損傷後から損傷 10 日に末梢神経ブロックを行った場合、神経障害性疼痛発症抑制に無効であったことを報告している。このことは、神経障害性疼痛の初期には障害された末梢神経自体が原因 (異常な活動電位の発生など) となり、中枢神経系の可塑的变化を惹き起こし、主たる責任部位が末梢の損傷部位から中枢神経系に移行したことを示唆している。しかし、末梢神経損傷による疼痛が慢性化する過程において、どの時期に、どの程度、中枢神経系が責任を負っているのかについては、全く不明であった。また、神経障害性疼痛の発症機構解明を目的とした動物を用いた基礎研究では、種々の刺激を与え、その反応 (仮性疼痛反応) を指標に行われている。しかし、臨床では、慢性痛などにみられる自発痛を visual analogue scale (VAS) 等の疼痛スコアを用いて、外的刺激の無い状態で評価する方法が一般的に用いられており、動物を用いた基礎研究と実際の臨床における疼痛評価には不一致があった。これらのことが神経障害性疼痛に有効な治療法の開発を遅らせている原因となっていると考えられていた。

### 2. 研究の目的

従来からの行動学的手法に加え、自発痛様行動に基づいた行動学的検索を行い、神経障害性疼痛の責任領域が中枢へシフトする時期を調べることを目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

坐骨神経の絞扼性神経損傷モデル (CCI: Chronic Constriction Injury model) 動物を使用した。7 週齢 Sprague Dawley 系雄性ラット (体重 180 ~ 220 g) を使用した。動物を術後の日数に従って 7、14、21、28、35 日目群、および sham 群に分けた。3% イソフルラン吸入麻酔下で、左側大腿皮膚を切開し、4.0 クロミックガットを用い坐骨神経 (sciatic nerve: SN) を 4 か所拘厄した。sham 群は神経露出のみで拘厄はしないものとした。切開部分を 6.0 絹糸で縫合した。

慢性疼痛の責任部位を調べるために、坐骨神経へ CCI を施した動物を用い、行動学的検索と電気生理学的検索を中心に研究を行った。

(1) 行動学的検索: 坐骨神経に施した末梢神経損傷による動物の行動を観察した。自発痛様行動 (神経損傷側に特有なリフティング動作、振り動作および舐め行動) や機械・熱刺激による逃避閾値を定量的に測定した。それにより、我々が用いるモデル動物が、慢

性疼痛モデルであることを経時的に確認した。自発痛様行動は、次のように測定した。動物を入れる測定箱は 7000 巻のコイルで囲まれており、磁石埋め込み肢の動作に依存した電磁誘導で生じるコイル内電圧をアンプで増幅し、かつ変換器でデジタル化した信号を PC に送り、電圧波形を記録解析できる MicroAct Scratching Test (ニューロサイエンス社) を用い測定した。同時に赤外線投光器搭載 CCD カメラ (ST-ACCD) を用いて行動を精査した。また、誘発痛の定量的機械刺激は足底へ Touch-Test™ Sensory Evaluator (North Coast Medical Inc., CA) を用いて行った。5 回ずつ刺激して 3 回以上逃避行動を示した刺激強度を逃避閾値とした。末梢神経障害後、7 日毎にそれぞれテストを行った。行動学検索は検索者と術者は分離し、ブラインドテストを行った。

(2) 電気生理学的検索: 後索核ニューロンの応答特性 (自発放電、刺激誘発反応など) が、伝導ブロックによる末梢神経からの入力遮断によりどのように変化するか (自発放電の頻度の変化) を調べた。ペントバルビタルナトリウム (ソムノペンチル: 共立製薬) 50 mg/kg、腹腔麻酔下で、人工呼吸を施し非動下 (ミオブロック、0.16mg/kg/h) した。足部に受容野を持つ侵害受容性ニューロンを記録し、ニューロンの応答特性 (自発放電、刺激誘発反応) を単一細胞外記録した。その後、神経節細胞の中核枝の伝導をブロックする目的で後索路 (胸髄 2-3 のレベル) ヘリドカイン (キシロカイン) を投与した。このことにより、末梢神経からの入力遮断を行った。末梢神経からの入力遮断の確認は、侵害刺激による応答が消失し、かつ、坐骨神経の神経障害部位から 1cm 近心部位に装着した双極電極による刺激 (刺激幅 2 msec、刺激強度 5 mA、0.5 Hz: サイレント C-fiber を刺激できるレンジ) に対する反応の消失とした。また、リドカインが記録しているニューロンへ作用していないことを証明するために、視床に挿入した双極電極を使用した刺激に対する逆行性反応は消失しないことをモニターした。これらの条件を満たしたときの自発放電量を記録 (2 分間) した。さらに、リドカインを除去した後の回復 (受容野の機械刺激に対する反応が記録される) 時の自発放電頻度を記録した。この自発放電頻度の減少率を経時的に測定した。これにより、末梢神経損傷により発症する異常痛覚発現の責任部位が中枢神経系に移行する時期と自発痛様行動との関連を調べた。

### 4. 研究成果

坐骨神経の絞扼性神経損傷モデル (CCI: Chronic Constriction Injury model) 動物を使用し、後索核より細胞外単一ニューロン活動記録を行い、視床に投射する後索核ニューロンの応答特性の解析後、脊髄 C3 レベルで後索路 (一次求心性ニューロンの中枢端

側)を麻酔で伝導ブロックし、自発放電の変化を調べ以下の結果を得た。

- (1) 視床に投射する後索核侵害受容性ニューロンは、Naive 群から記録した侵害受容ニューロンと比較して有意に自発放電が増加していた。
- (2) 14 日目での自発放電は、後索路の伝導ブロックにより約 65% 低下し、Naive のブロックによる自発放電低下率が有意に少なかった。21 日目から 35 日目では 50% 以下の低下率であった(自発放電が 50% 以上ブロック後も残った)。このことから疼痛の発現部位の責任が 14 日目以降中枢神経に移行していることが推察された。
- (3) 搔痒測定装置の原理を応用し、足の自発行動(flinching)を測定した。非損傷群と比較して損傷群では損傷側と同側の足の自発行動が損傷前と比較し、受傷後 21 日目より有意に増加していた。

これらの結果を併せると、疼痛発現の責任部位が受傷後 21 日目以降中枢神経に移行し、その中枢神経の自発放電が自発行動の有意な発現時期と相関が認められ、自発痛発現に後索核ニューロン 視床系が関与していることが示唆された。

#### 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 4 件)

1. ERK-GluR1 phosphorylation in trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons is involved in pain associated with dry tongue. Nakaya Y, Tsuboi Y, Okada-Ogawa A, Shinoda M, Kubo A, Chen JY, Noma N, Batbold D, Imamura Y, Sessle BJ, Iwata K. Mol Pain. (査読有), DOI: 10.1177/1744806916641680. 2016.
2. Distribution and Origin of VIP-, SP-, and Phospholipase C 2 -Immunoreactive Nerves in the Tongue of the Bullfrog, *Rana catesbeiana*. Tadokoro O, Ando H, Kawahara I, Asanuma N, Okumura M, Kitagawa J, Kondo E, Yagasaki H. Anat Rec (Hoboken). (査読有), 299:929-42, DOI: 10.1002/ar.23334, 2016.
3. Morphological and functional changes in regenerated primary afferent fibres following mental and inferior alveolar nerve transection. Tsuboi Y, Honda K, Bae YC, Shinoda M, Kondo M, Katagiri A, Echizenya S, Kamakura S, Lee J, Iwata K. Eur J Pain. (査読有), 19, 1258-1266, DOI: 10.1002/ejp.650, 2015.

4. Involvement of trigeminal transition zone and laminated subnucleus caudalis in masseter muscle hypersensitivity associated with tooth inflammation. Shimizu K, Matsumoto K, Noma N, Matsuura S, Ohara K, Komiya H, Watase T, Ogiso B, Tsuboi Y, Shinoda M, Hatori K, Nakaya Y, Iwata K. PLoS One. (査読有), 9, e109168, DOI: 10.1371/journal.pone.0109168, 2014.

[学会発表](計 8 件)

1. 青野悠里, 渡邊由梨子, 木口友里, 石川 学, 渋谷 鑛, 三枝 禎<sup>2</sup> 受容体を介したラットの側坐核のドパミン放出を GABA<sub>B</sub> 受容体刺激は抑制する. 2017 年 3 月 15-17 日, 第 90 回日本薬理学会年会, 長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール アストピア (長崎県長崎市)
2. 海津彰弘, 黒岩亮太, 江原秀和, 佐原敦義, 坪井美行 血流を阻害したラット下腿三頭筋の緊張. 2016 年 11 月 19 - 20 日, 第 25 回日本柔道整復接骨医学会学術大会, 仙台国際センター (宮城県仙台市)
3. Y. Nakaya, Y. Tsuboi, A. Okada-Ogawa, M. Shinoda, N. Noma, Y. Imamura, K. Iwata Involvement of ERK-GluR1 Phosphorylation in trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons in dry-tongue pain. 2016 年 9 月 26-30 日, 16th World Congress on Pain, Pacifico Yokohama (Kanagawa pref., Yokohama City)
4. Y. Tsuboi, K. Shimizu, H. Komiya, B. Ogiso, K. Iwata Involvement of tooth pulp inflammation in the enhancement of trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord neurons receiving Masseter muscle inputs. 2016 年 9 月 26-30 日, 16th World Congress on Pain, Pacifico Yokohama (Kanagawa pref., Yokohama City)
5. 坪井美行 神経障害モデル動物における異常感覚発現に關与する責任部

位の中枢神経系への移行時期について。  
2016年3月22-24日, 第93回日本生理学会大会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

6. 海津彰弘, 黒岩亮太, 江原秀和, 佐原敦義, 坪井美行 ラット下腿三頭筋の筋緊張検出方法の検討. 2015年11月7-8日, 第24回日本柔道整復接骨医学学会学術大会, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)
7. Y. Nakaya, A.Okada, Y.Tsuboi, M.Shinoda, Y.Imamura, K.Iwata The role of trigeminal spinal nucleus caudalis in dry-tongue pain. 2014年11月15-19日, Neuroscience 2014, Washington Convention Center (Washington DC, USA)
8. 中谷由香, 岡田明子, 坪井美行, 篠田雅路, 今村佳樹 口腔乾燥による舌痛に対する三叉神経脊髄路核尾側亜核のリン酸化 ERK. 2014年6月20-21日, 第36回日本疼痛学会, KKR ホテル(大阪府大阪市)

〔図書〕(計0件)

〔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  
日本大学歯学部生理学講座 坪井 美行の  
研究紹介ページ  
<https://sites.google.com/a/nihon-u.ac.jp/tsuboiyoshiyuki/>

6. 研究組織  
(1)研究代表者

坪井 美行(TSUBOI, Yoshiyuki)  
日本大学・歯学部・講師  
研究者番号: 50246906

(2)研究分担者

奥村 雅代(OKUMURA, Masayo)  
松本歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 10362849

三枝 禎(SAIGUSA, Tadashi)  
日本大学・松戸歯学部・教授  
研究者番号: 50277456

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )