

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462378

研究課題名(和文) 高速画像解析法による末梢神経損傷後の脊髄後角可塑性変化の解析

研究課題名(英文) The analysis of plastic change in spinal dorsal after the peripheral nerve injury by the high-speed image analytical method

研究代表者

馬場 洋 (BABA, Hiroshi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00262436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：後根付き脊髄スライスを用いて、脊髄後角細胞の細胞内Ca²⁺の変動を可視化し、痛み刺激に対する後角細胞の興奮の強さと広がりを可視化することに成功した。痛み刺激の代用として後根を電気刺激することにより、まず、後角浅層部(第2層)内瘦軀の細胞が最も早く強く興奮し、その後、第2層中央部や第3層に興奮が広がることわかった。

次に、糖尿病性神経障害性疼痛モデルを作成し、神経障害性疼痛治療薬であるプレガバリンの後角細胞の興奮に対する作用を検討した。その結果、臨床濃度のプレガバリンは糖尿病性神経障害性疼痛モデルの脊髄において興奮の強さや広がりに有意に影響にないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Pregabalin is thought to exert its therapeutic effect in neuropathic pain by inhibiting the activity of spinal dorsal horn(DH) neurons. However, whether a clinical concentration of pregabalin can cause acute inhibition of DH neurons in the spinal cord is controversial. To address this issue, we undertook intracellular Ca²⁺ imaging studies using spinal cord slices, and examined if pregabalin acutely inhibits the primary afferent stimulation-evoked excitation of DH neurons in normal rats and in rats with painful diabetic neuropathy. Clinically relevant (10 μM) and a very high concentration of pregabalin (100 μM) did not affect dorsal roots stimulation-evoked Ca²⁺ signals in normal and diabetic neuropathic rats. These results suggest that the activity of DH neurons in the spinal cord is not inhibited acutely by clinical doses of pregabalin. It is very unlikely that an acute inhibitory action in the DH is the main analgesic mechanism of pregabalin in neuropathic pain states.

研究分野：麻酔科学

キーワード：脊髄後角 糖尿病性神経障害性疼痛 細胞内Caイメージング 可塑性変化 脊髄スライス プレガバリン 後根刺激 ラット

1. 研究開始当初の背景

プレガバリンやガバペンチン等のガバペンチノイドは国際疼痛学会が神経障害性疼痛に対する第一選択薬と位置づけている薬剤であり、一次求心性線維終末の電位依存性 Ca^{2+} チャネルの 2 サブユニットに選択的に結合し、神経伝達物質の放出を急性に抑制することによって脊髄後角細胞の興奮を抑制し、鎮痛作用を發揮すると推定されていた。一方、人を対象とした臨床データでは、プレガバリンは内服後、約1時間で最高血中濃度に達し、脳脊髄液中の濃度も約8時間で最高濃度に達するにもかかわらず、鎮痛効果発現までには数日～数週間かかり、プレガバリンの急性作用が鎮痛作用機序であることが疑問視されている。これまで基礎研究で報告されていた急性作用は臨床濃度の100倍以上濃度のプレガバリンを用いて観察されたものであり、臨床濃度(約1-2 μ M/L)でも同様の急性作用があるのかどうか明らかではなく、臨床濃度で脊髄後角細胞の興奮を抑制するかどうか明らかにする必要があった。また、一方で、正常ラットではプレガバリンは作用しないが糖尿病性神経障害性疼痛モデルラットでは有意に一次求心性線維終末からの神経伝達物質の放出を急性に抑制するようになるという報告もあり、より信頼できる方法で再検する必要もあった。

2. 研究の目的

本研究では、ガバペンチノイドの一種であるプレガバリンが脊髄後角一次求心性線維から入力される痛覚情報によって誘発される脊髄後角細胞の興奮を臨床濃度で急性に抑制する作用があるかどうか、正常動物と神経障害性疼痛モデル動物の両方で検証することを目的とする。それにより、脊髄レベルでの急性の抑制効果がプレガバリンの主たる鎮痛機序であるかどうかを検証することを目的とする。

3. 研究の方法

もしプレガバリンが本当に一次求心性線維からの興奮性伝達物質(グルタミン酸)の放出を急性に抑制するとしたら、その結果として脊髄後角細胞の興奮は急性に減弱するはずである。細胞内 Ca^{2+} は神経の興奮(活動電位の発生)とほぼ同様の変

動を示すことから、本研究では脊髄後角細胞の興奮の指標として細胞内 Ca^{2+} を用い、脊髄スライスから光学的に細胞内 Ca^{2+} の高速イメージングを行った。実験動物は週齢10週以上の Wistar 系完全成熟雄性ラットを用いた。臨床において、これらのガバペンチノイドは糖尿病性神経障害性痛患者によく用いられるため、神経障害性疼痛モデル動物としては糖尿病性神経障害性痛モデルを用いた。

(1) 後根付き脊髄スライスの作成

ウレタンの腹腔内投与によりラットを麻酔し、下部胸椎から下部腰椎まで椎弓切除を行った。腰仙部脊髄を摘出し、約4に冷却した人工脳脊髄液(クレブス液)中で L5レベルの後根付き脊髄横断スライス標本を、マイクロスライサーを用いて作成した。このスライスを Ca^{2+} 指示薬(Rhod-2)で染色する前に室温下で約1時間、95% O_2 , 5% CO_2 ガスで酸素化したクレブス液で灌流した。

(2) Ca^{2+} 指示薬によるスライスの染色

約1時間の灌流後、このスライス標本を Rhod-2(Ca^{2+} 指示薬)0.33mg を含んだクレブス液(4ml)の中で攪拌しながら約90分染色した。その後、染色したスライスを記録用チェンバーに移し、95% O_2 , 5% CO_2 ガスで酸素化したクレブス液(37)で灌流した。

(3) 糖尿病性神経障害性痛モデルの作成

糖尿病の作成は膵臓のベータ細胞を破壊するストレプトゾトシン(60mg/kg 体重)の腹腔内投与によって行った。血糖値の明らかな持続的上昇を確認後、1週間ごとに後肢足底への機械的刺激に対する逃避閾値が経時的に低下していくことを確認した。また、逃避閾値が低下するだけでなく、刺激した後肢をなめる・振り回すなどの異常な逃避行動が認められるようになった。糖尿病作成から4週間後に腰部脊髄を取り出して脊髄スライスを作成した。

(4) 細胞内 Ca^{2+} イメージング

脊髄スライスからの細胞内 Ca^{2+} イメージングシステムは最短で0.6ミリ秒間隔で測定できる高速画像解析装置(MICAM02)を用いた。後根刺激は吸引電極によって行い、20秒間隔で32回刺激して加算平均を行った。薬物投与は刺激の10分前から灌流投与によって行い、刺激中も薬物投与を続けた。プレガバリンの濃度は0, 10, 100, 300 μ M/Lを用いた。臨床濃度は10 μ M/L 以下であるの

で、この濃度で脊髄後角細胞に抑制作用があるかどうか特に注目した。

4. 研究成果

平成26年度は主に Rhod-2による脊髄スライス染色法に関する至適条件の検索を行った。その結果、上記の様に Rhod-2の濃度は0.33mg/4ml、染色時間は90分以上であることがわかった。

平成27,28年度は後根刺激で後角細胞に誘発される興奮反応の特徴を調べ、正常ラットと糖尿病ラットから摘出した脊髄スライスを比較した。後根を A および C 線維が刺激される刺激強度で電気刺激すると脊髄後角浅層部（特に後角第2層の内側部）に一致して変化率2.0~2.5%程度の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められた。しかし、脊髄後角の興奮性は正常ラットと糖尿病ラットで有意な差はなかった。

次に、正常および神経障害性痛モデルの脊髄後角細胞の興奮性に対するプレガバリン 10, 100, 300 μ M/L の作用を Ca^{2+} イメージング法を用いて検索した。正常および神経障害性痛モデルの両方の脊髄において、臨床濃度の 10 μ M/L においてプレガバリンは有意な抑制作用を示さなかった。また、臨床濃度の100倍程度の濃度である100 μ M/L でも有意な抑制作用を示さなかった。さらに、プレガバリンの濃度を300 μ M/L にしたところ、正常および神経障害性痛モデルの両方において、若干の抑制作用（20%程度）が観察された。しかし抑制の程度には正常および神経障害性痛モデル間で有意な差はなかった。

以上の結果から、臨床濃度（10 μ M/L）や臨床濃度以上の濃度（100 μ M/L）でもプレガバリンには脊髄後角細胞の興奮性を急性に抑制効果はないことがわかった。また、糖尿病性神経障害性痛モデル動物の脊髄でも同様に抑制効果を示さなかったことから、神経障害性痛の状態でのみ、これらの薬剤が鎮痛効果を発揮するという仮説も否定的となった。300 μ M/L の非常に高濃度のプレガバリンでは若干の抑制作用が見られたが、この濃度は臨床的には達し得ない濃度であるため、臨床的意義はないと考えられた。

本研究ではプレガバリンの正確な作用機序を解明するには至らなかったが、少なくともこの薬剤の主たる鎮痛作用機序は一次求心性線維終末の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルに対する急性抑制作用ではなく、おそらくタンパ

クの発現やその輸送過程等、ある程度時間のかかる過程に作用して鎮痛作用を発揮する可能性が高いことが強く示唆された。

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8件)

Baba H, Petrenko AB, Fujiwara N, Clinically relevant concentration of pregabalin has no acute inhibitory effect on excitation of dorsal horn neurons under normal or neuropathic pain conditions: An intracellular calcium-imaging study in spinal cord slices from adult rats, Brain Res, 査読有、1648、2016、445-458

doi: 10.1016/j.brainres.2016.08.018.

Ohashi N, Denda S, Furutani K, Yoshida T, Kamiya Y, Komura R, Nishimaki H, Inuma Y, Hirayama Y, Naito S, Nitta K, Baba H., Ultrasound-guided ilioinguinal/ iliohypogastric block did not reduce emergence delirium after ambulatory pediatric inguinal hernia repair: a prospective randomized double-blind study, Surg Today, 査読有、46、2016、963-969

doi: 10.1007/s00595-015-1280-6.

Ohashi M, Hirano T, Watanabe K, Shoji H, Ohashi N, Baba H, Endo N, Kohno T., Hydrogen peroxide modulates neuronal excitability and membrane properties in ventral horn neurons of the rat spinal cord, Neuroscience, 査読有、331、2016、206-220

doi:10.1016/j.neuroscience.2016.06.033.

Ohashi M, Hirano T, Watanabe K, Katsumi K, Ohashi N, Baba H, Endo N, Kohno T., Hydrogen peroxide modulates synaptic transmission in ventral horn neurons of the rat spinal cord, J Physiol, 査読有、594、2016、115-134

doi: 10.1113/JP271449.

Yoshida T, Onishi T, Furutani K, Baba H; A new ultrasound-guided pubic approach for proximal obturator nerve block: clinical study and cadaver evaluation, *Anaesthesia*, 査読有、594、2016、115-134

doi: 10.1111/anae.13336.

Watanabe T, Yanabashi K, Moriya K, Maki Y, Tsubokawa N, Baba H; Ultra-sound-guided supraclavicular brachial plexus block in a patient with a cervical rib, *Can J Anaesth* (査読有) 62、2015、671-673

doi: 10.1007/s12630-015-0331-1.

Watanabe T, Sasaki M, Komagata S, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Baba H, Shibuki K, Spinal mechanisms underlying potentiation of hindpaw responses observed after transient hindpaw ischemia in mice, *Sci Rep*, 査読有、5、2015:11191

doi: 10.1038/srep11191.

Ohashi N, Sasaki M, Ohashi M, Kamiya Y, Baba H, Kohno T, Tranexamic acid evokes pain by modulating neuronal excitability in the spinal dorsal horn, *Sci Rep*, 査読有、5、2015、13458

doi: 10.1038/srep13458.

〔学会発表〕(計 10 件)

馬場洋、脊髄スライスを使った痛みの研究、日本麻酔科学会北海道・東北支部 第 6 回学術集会、2016.9.3、北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)

大西毅、渡部達範、河野達郎、菱田竜一、馬場洋、渋木克栄、末梢の血流遮断によるフラビントパク蛍光応答の増強と一酸化窒素の関連性、日本麻酔科学会第 63 回学術集会、2016.5.27、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

大橋宣子、佐々木美佳、馬場洋、河野達郎、アセトアミノフェンの脊髄後角ニューロンにおける鎮痛機序、日本麻酔科学会第 63 回学術集会、2016.5.27、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

渡部達範、平岡治彦、荒木拓也、永野大輔、山本康次郎、馬場洋、褐色細胞腫麻酔では手術進行に伴いプロポフォル濃度は著名に低下する、日本麻酔科学会第 63 回学術集会、2016.5.27、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

古谷健太、渡部達範、松田敬一郎、馬場洋、SUZY 鉗子と McGRATH MAC の併用は経鼻胃管挿入を容易にする、日本麻酔科学会第 63 回学術集会、2016.5.27、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

馬場洋、細胞内 Ca²⁺ 高速イメージング法による脊髄後角内の神経興奮伝搬の解析 -興奮伝搬様式と鎮痛薬の作用について-、日本麻酔科学会第 62 回学術集会、

2015.5.28、神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

大橋宣子、佐々木美佳、紙谷義孝、馬場洋、河野達郎、トラネキサム酸の脊髄後角ニューロンにおける作用機序、日本麻酔科学会第 62 回学術集会、2015.5.28、神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

山本豪、生駒美穂、佐々木美佳、紙谷義孝、馬場洋、河野達郎、神経ステロイド DHEAS はラットラット脊髄後角においてシグマ 1 受容体 NMDA 受容体を介して痛覚増強作用を発揮する、日本麻酔科学会第 62 回学術集会、2015.5.29、神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

古谷健太、飛田俊幸、石井秀明、馬場洋、中位胸椎レベルで硬膜外投与されたロピバカインの運動誘発電位及び体性感覚誘発電位に与える影響、日本麻酔科学会第 62 回学術集会、2015.5.29、神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

今井英一、吉田敬之、大橋宣子、種岡美紀、馬場洋、胸部大動脈瘤ステントグラフト内挿術中の瘤内もやもやエコー残存検索は持続性エンドリーク検出に有用である、日本麻酔科学会第 62 回学術集会、2015.5.28、神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

〔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

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/ane/>

6．研究組織

(1)研究代表者

馬場 洋 (BABA, Hiroshi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：00262436

(2)研究分担者

藤原 直士 (FUJIWARA, Naoshi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：70181419
平成 28 年 3 月 17 日、定年退職のため削除

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：