

humans. Clinical Neurophysiology, 2013,
in press

2. 学会発表

- 1) Kakigi R: The painful brain. The 2nd
Joint Symposium of NIPS / Tübingen
University, Tübingen, Germany,
2012. 11. 29.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（慢性の痛み対策研究事業）
（総合）分担研究報告書

難治性疼痛の実態の解明と対応策の開発に関する研究
携帯端末を用いた総合運動支援システムの開発に関する研究

研究分担者 西尾 芳文 徳島大学ソシオテクノサイエンス研究部 教授
研究分担者 上田 哲史 徳島大学情報化推進センター 教授
研究協力者 青野 修一 愛知医科大学学際的痛みセンター

研究要旨

運動療法を習慣化させることを目的とした、携帯端末を用いた運動総合支援アラートシステムの開発を行う。その際に、慢性の痛みを持つ患者の行動・身体活動を客観的に評価できるシステムの構築を目指す。本報告では、携帯端末に内蔵されている加速度センサ・GPS 機能を用いて、日常行動の客観的評価のための基礎システムを構築する。また、健常者ボランティアを対象にシステムの有効性について検証する。

A. 研究目的

慢性痛の予防・治療には継続した運動療法が有効であることが知られている。本研究では、運動療法を習慣化させることを目的とした、携帯端末を用いた運動総合支援アラートシステムの開発を行う。慢性の痛みに対する情報、ストレッチ、体操などを配信し、認知行動学的な教育と運動療法を合わせて行う治療システム作りを目指す。その際に携帯端末に内蔵されている3次元加速度センサやGPSを用いて定量的に評価できるシステムの構築を行う。本報告では、治療効果の客観的評価法の開発に向けた基礎研究として、日常生活時のデータ収集アプリケーションの開発及び測定データの解析アルゴリズムの開発を行う。

B. 研究方法

日常活動の評価および治療システムの評価法確立のための基礎研究として、携帯端末に

内蔵されている3次元加速度センサやGPSを用いて、日常生活動作のデータを取得するアプリケーションの開発を行う。また、リハビリ体操の配信などが行えるようなシステム開発を行う。

取得データから日常生活動作の内容（立位・座位・臥位・歩行などの時間および回数）を分類するアルゴリズムの開発を行う。徳島大学工学部の学生ボランティア10名、愛知医科大学運動療育センターの職員ボランティア10名の計20名の健常者を対象とする。開発したアプリケーションを用いて、歩く・立つ・座る等の動作時のデータと、自由行動時のデータを取得する。データ解析には、機械学習アルゴリズムの1つである改良型k-最近傍法を用いる。各動作時のデータを教師信号としてアルゴリズムに学習させて、自由行動時のデータを各動作に分類し評価する。また、開発システムの有効性について検証を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、愛知医科大学倫理委員会の承認を受け実施している。

C. 研究結果

開発したデータ取得アプリケーションの測定時と設定画面を図1に示す。設定画面では周波数と測定時間の設定が可能である。取得データは構築したサーバに自動的に送信し、CSVファイルで保存される。自由行動における取得データの加速度例を図2に示す。



図1 データ取得アプリケーション

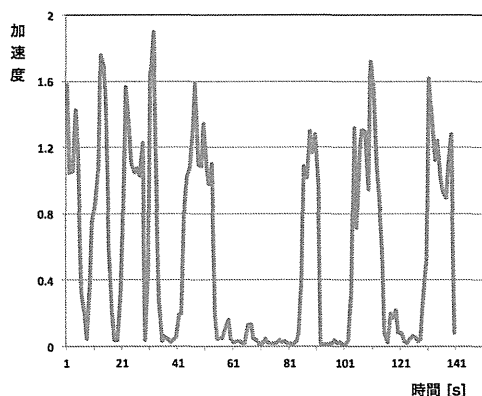


図2 自由行動時の加速度

健康者ボランティアの自由行動データを改良型k-最近傍法を用いて解析したところ、歩行時間・静止時間・立ち座りの回数がそれぞ

れ、85%、90%、58%の正答率で分類できることを確認した。

D. 考察

解析結果より、歩行時間、静止時間の正答率は高いが、立ち座り回数については誤差が大きい結果となっている。この理由として、検証データ数が少ないこと、データの特徴抽出が不十分である点などが考えられる。従って、行動分類アルゴリズムのさらなる改良・検証が必要であると考えられる。

E. 結論

本研究では、客観的な運動療法評価のための基礎研究として、携帯端末を用いた行動データ取得、日常生活動作分類システムを開発した。今後は、様々な体操を配信するシステム作りを行い、慢性痛患者での検証及び地域介入試験を実施し、さらなるシステムのブラッシュアップを行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoko UWATE and Yoshifumi NISHIO "Synchronization in Several Types of Coupled Polygonal Oscillatory Networks" □IEEE Transactions on Circuits and Systems I, vol. 59, no. 5, pp. 1042-1050, May 2012.
- 2) Sho SHIMOMURA, Haruna MATSUSHITA, Yoko UWATE and Yoshifumi NISHIO "Ant Colony Optimization Including Dull Ants Caused by Genetic Algorithm" □RISP Journal of Signal Processing, vol. 16, no. 4, pp. 303-306, Jul. 2012.
- 3) 松浦 健二, 上田 哲史, 佐野 雅彦 : 複数認証基盤に対応する複合SSO環境でのユーザエクスペリエンス, 学術情報処理

研究, Vol. 16, 138-145頁, 2012年

- 4) Tetsushi Ueta and Akihisa Tamura :
Bifurcation Analysis of a Simple 3D
Oscillator and Chaos Synchronization of its
Coupled Systems, Chaos, Solitons &
Fractals, Vol. 45, No.12, pp.1460-1468, 2012.
2. 学会発表
- 1) Chihiro IKUTA, Yoko UWATE and
Yoshifumi NISHIO "Investigation of
Multi-Layer Perceptron with Propagation of
Glial Pulse to Two Directions" Proceedings of
IEEE International Symposium on Circuits
and Systems (ISCAS'12), pp. 2099-2102, May
2012.
 - 2) 上田 哲史 : ポストカオス制御に向けた
取り組み, 回路とシステムワークショップ
論文集, 9-14項, 2012年
 - 3) 加藤 雄大, 上手 洋子, 西尾 芳文 "社会
性を考慮した結合を持つセルラニューラ
ルネットワーク" Proceedings of IEEE
Workshop on Nonlinear Signal Processing
(NSP'12), p. 1, Sep. 2012.
 - 4) Yudai SHIRASAKI, Yoko UWATE and
Yoshifumi NISHIO "Artificial Bee Colony
Algorithm with Two Kinds of Colonies"
平成24年度 電気関係学会 四国支部連合
大会 講演論文集, no. 1-15, p. 15, Sep. 2012.
 - 5) Naohiro SHIBUYA, Yuta YOKOYAMA,
Tomoya SHIMA, Chihiro IKUTA, Yoko
UWATE and Yoshifumi NISHIO "Copy
Weight Parameters for Back Propagation"
平成24年度 電気関係学会 四国支部連合
大会 講演論文集, no. 1-17, p. 17, Sep. 2012.
 - 6) 北野圭則, 上田哲史, 西尾芳文, 楊国安,
楊暘, "二値画像に対するフラクタル符号
化における輝度値変換パラメータの性質"
平成24年度 電気関係学会 四国支部連合
大会 講演論文集, no. 1-39, p. 39, Sep. 2012.
 - 7) Muhammad IZZAT bin Mohd Idrus,
Yoshihiro KATO, Yoko UWATE and
Yoshifumi NISHIO "Research on a New
Structure of Three-Layer Cellular Neural
Networks" Proceedings of IEEE Workshop on
Nonlinear Circuit Networks (NCN'12), pp.
109-110, Dec. 2012.
 - 8) Kazushige NATSUNO, Yoshihiro KATO,
Yoko UWATE and Yoshifumi NISHIO
"Investigation of Two-Layer Cellular Neural
Networks with Switching Only Coupling
Templates for Motion Picture Processing"
Proceedings of IEEE Workshop on Nonlinear
Circuit Networks (NCN'12), pp. 111-114, Dec.
2012.
 - 9) Yuta YOKOYAMA, Chihiro IKUTA, Yoko
UWATE and Yoshifumi NISHIO "Research
of Pattern Recognition by Multi-Layer
Perceptron with Neurogenesis" Proceedings of
IEEE Workshop on Nonlinear Circuit
Networks (NCN'12), pp. 115-116, Dec. 2012.
 - 10) Tomoya SHIMA, Yoko UWATE, Thomas
OTT and Yoshifumi NISHIO "Investigation
of Synchronization for Social Network with
Local Bridge via Coupled Rulkov Maps"
Proceedings of IEEE Asia Pacific Conference
on Circuits and Systems (APCCAS'12), pp.
499-502, Dec. 2012.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

難治性慢性疼痛の実態と病態の解明に関する研究

研究分担者 中塚 映政 関西医療大学 客員教授

研究要旨

難治性慢性疼痛の実態と病態を解明するために、脊髄後角における疼痛メカニズムに関してパッチクランプ法を用いて解析した。①活性酸素種（ROS）は、神経障害性疼痛や炎症性疼痛を含む慢性疼痛において脊髄レベルで関与していると考えられる。ROS ドナーである tert-butylhydroperoxide (t-BOOH) を脊髄に灌流投与すると自発性シナプス後電流 (sEPSC) の発火を認めた。さらなる解析結果から、ROS は脊髄後角細胞に入力する 1 次感覚神経中枢端に作用し、グルタミン酸の過剰放出を惹起することによって痛み情報伝達を増強することが明らかとなった。②慢性疼痛において、神経根性疼痛を訴える患者は多いが、傷害部位が異なる場合の疼痛発現の程度は不明である。本研究では傷害部位の異なる根性疼痛モデルを作成し、行動学、組織学、電気生理学的に疼痛発現程度を評価した。von Frey test、脊髄後角におけるミクログリアの増加数、脊髄後角第 II 層における自発性興奮性シナプス後電流のいずれに関しても、DRG > DRG より末梢 > DRG より中枢の順に増加を認めた。本結果から、根性疼痛の発現強度は末梢神経傷害部位により異なることが証明された。

A. 研究目的

① 活性酸素種の脊髄後角ニューロンに対する興奮性作用増強の解析

活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) は正常では細胞内でその強力な酸化作用により生体防御に利用されている。近年、ROS は慢性疼痛にも関与することが報告されているが、脊髄後角ニューロンに対する作用はいまだ不明である。本研究の目的は成熟ラットから作製した脊髄横断スライス標本の膠様質細胞にパッチクランプ法を適用し、ROS が脊髄後角感覚細胞の興奮性シナプス伝達にどのような作用を及ぼすかを検討することである。

② 神経根障害部位の差異による疼痛発現の違いの解析

神経根の炎症や変性により誘発される神経根性疼痛を訴える患者は多いが、傷害部位が異なると根性疼痛の発現強度が異なるか比較検討した報告は存在せず、詳細は不明である。本研究の目的は傷害部位の異なる根性疼痛モデルを作成し、行動学、組織学、電気生理学的観点から、根性疼痛の発現程度について評価を行なうことである。

B. 研究方法

① 活性酸素種の脊髄後角ニューロンに対する興奮性作用増強の解析

5~6 週齢の Sprague - Dawley 系成熟雄性ラットにウレタン（腹腔内投与：1.2~

1.5g/kg) で深麻酔後、神経根を切離しながら脊髄を摘出し、酸素負荷した 2~4℃ の人工脳脊髄液に浸した。摘出した脊髄を実体顕微鏡下に硬膜、前根、後根、クモ膜及び軟膜を除去し、溝を設けた寒天ブロックに設置した。マイクロスライサーを用いて厚さ約 650 μm の脊髄横断スライス標本作製した。腰膨大部の脊髄スライスを記録用チャンバーに移し、グリッドにて上方から軽く固定した後、酸素負荷した人工脳脊髄液で灌流した。マイクロマニピュレーターで電極を脊髄内に刺入し、5mV 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いわゆるブラインドパッチクランプ法によって記録を行った。薬液の灌流は人工脳脊髄液と同ラインを用いて行う。-70mv の電位固定における興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic currents; EPSC) を観察した。データは mean ± S.E.M. で表示した。検定には paired t-test, t-test を用いた。危険率 5% (P < 0.05) をもって有意と判断した

② 神経根障害部位の差異による疼痛発現の違いの解析

1) 動物モデル作成

5 週齢 Sprague-Dawley ラットを使用した。ペントバルビタール (50mg/kg) 腹腔内投与により麻酔を行い、腹臥位で傍脊柱筋群を腰椎から剥離した。椎間孔を開窓することで右 L5 神経根を露出した。DRG より中枢側 2mm を結

紮した群を C 群、DRG を結紮した群を D 群、DRG より末梢側 2mm を結紮した群を E 群とした。また非手術群を A 群、右 L5 神経根を露出のみ施行した群を B 群とした。結紮は 6-0 絹糸を使用した。処置後 7 日で、以下の 3 項目についてそれぞれ評価を行った。

2) 評価方法

a. von Frey Hair を用いた疼痛誘発試験

10g von Frey Hair を押しつけ、逃避反応を観察した。この操作を 10 回繰り返し、その逃避反応回数をカウントした。

b. L5 髄節の脊髄後角における活性化ミクログリアの発現数

モデルラットをイソフルラン麻酔下で右心室より 1%リン酸緩衝生理食塩水を用いて脱血し、その後 4%パラホルムアルデヒドで固定した。次に脊髄を取り出し、クリオスタットを用いて L5 髄節を厚さ 15 μ m の薄片で作成して、抗 Iba1 抗体を用いた蛍光抗体法で免疫染色を行った。L5 髄節の脊髄後角第 II 層における活性化ミクログリアを観察し、その発現数をカウントした。

c. in vivo - patch clamp 法による脊髄後角細胞の EPSC の記録

モデルラットをウレタン (1.2g/kg) 腹腔内投与麻酔下、脊椎専用固定器で固定した。辺縁皮膚を錘で引き上げることでプールを作成し、脊髄表面を約 36°C の酸素負荷した人工脳脊髄液で灌流した。次に顕微鏡下に硬膜を縦切開して切除し、後根を露出、腰傍大部で後根を内外側に分け、最後にクモ膜と軟膜を剥離することで電極刺入用の開窓を行う。右 L5 髄節の脊髄膠様質細胞において、-70mV に固定した電圧固定法による EPSC の頻度と振幅を記録した。データは mean \pm S. E. M. で表示した。

(倫理面への配慮)

本実験計画は関西医療大学動物実験委員会及び和歌山県立医科大学動物実験委員会での審査を受けて承認された。

モデル動物に関しては、自傷行為を行なうなどの耐え難い疼痛行動が見られた場合は安楽死処分とした。実験終了後は直ちに、頸髄・大動脈を切断処置し、動物を安楽死させた。

C. 研究結果

① 活性酸素種の脊髄後角ニューロンに対する作用の解析

膜電位固定下 (-70 mV) で記録を行った。活

性酸素種ドナーである tert-butylhydroperoxide (t-BOOH) を 5 分間灌流投与すると、記録した全ての膠様質細胞で、自発性の興奮性シナプス後電流 (spontaneous EPSC: sEPSC) の発生頻度ならびに振幅は増加した。t-BOOH による sEPSC の発生頻度ならびに振幅の平均増加率はそれぞれ $331.4 \pm 49.9\%$ 、 $176.7 \pm 11.9\%$ ($n = 20$) であった。またこの作用は反復投与により脱感作されなかった。さらに、電位依存性ナトリウムチャネル阻害薬である tetrodotoxin (TTX, 1 μ M) 存在下では興奮性増強作用は阻害されなかった。一方、グルタミン酸受容体の拮抗薬である 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione CNQX (20 μ M) 存在下では、t-BOOH による sEPSC の発生頻度ならびに振幅に対する増強作用は観察されなかった。さらに抗酸化剤である N-tert-Butyl- α -phenylnitron (PBN, 10 mM) 存在下では、t-BOOH による sEPSC の増強作用は有意に抑制された。このことから、ROS は一次求心性線維終末部に作用し、グルタミン酸を過剰に放出させる事により、脊髄後角ニューロンの興奮性を増強させる作用があることが判明した。

② 神経根障害部位の差異による疼痛増強の違いの解析

von Frey hair (各 $n=10$) を用いた逃避反応回数は、A 群 0.3 ± 0.2 回、B 群 1.1 ± 0.5 回、C 群 3.9 ± 0.5 回、D 群 7.9 ± 0.5 回、E 群 6.2 ± 0.3 回であった。A-B 群間で有意差はなく (Student' s t test, $P > 0.05$)、B 群と結紮群間 (C、D、E 群) で有意差を認めた (Student' s t test, $P < 0.001$)。結紮群間に有意差を認め、その程度は D 群、E 群、C 群の順であった (ANOVA、Tukey-Kramer 法、 $P < 0.001$)。

脊髄後角における活性化ミクログリア数 (各群 $n=5$) は、A 群 77.2 ± 2.5 、B 群 80.0 ± 2.1 、C 群 202 ± 8.0 、D 群 354 ± 8.1 、E 群 292 ± 6.6 であった。特に B 群に比べ D 群では 4 倍を超える活性化ミクログリアが散見された。特に結紮群では肥大化し、アメーバ様突起が出現した活性化ミクログリアが散見された。A-B 群間で有意差はなく (Student' s t test, $P > 0.05$)、B 群と結紮群間 (C、D、E 群) で有意差を認めた (Student' s t test, $P < 0.001$)。結紮群間に有意差を認め、D、E、C 群の順に増加していた (ANOVA、Tukey-Kramer 法、 $P < 0.001$)。

脊髄後角における EPSC (各 $n=10$) の頻度は

A群 9.0±1.4Hz、B群 9.4±1.3Hz、C群 14.6±1.7Hz、D群 19.2±2.0Hz、E群 17.3±2.1Hzであった。A-B群間で有意差はなく(Student's t test、P>0.05)、B群と結紮群間(C、D、E群)で有意差を認めた(Student's t test、P<0.001)。結紮群間に有意差を認め(ANOVA、Tukey-Kramer法、C-E群間P<0.05、C-D群間およびD-E群間P<0.001)。また振幅はA群 12.3±0.6pA、B群 14.4±1.0pA、C群 19.8±1.6pA、D群 37.7±2.2 pA、E群 28.3±2.4pAであった。A-B群間に有意差はなく(Student's t test、P>0.05)、B群と結紮群間(C、D、E群)で有意差を認めた(Student's t test、B-C群間P<0.05、B-D群間およびB-E群間P<0.001)。結紮群間に有意差を認め、D群、E群、C群の順に増加していた(ANOVA、Tukey-Kramer法、P<0.001)。

各項目でA-B群間で有意差はなく、B群と結紮群間(C、D、E群)で有意差を認めた。さらに興味深いことに本研究における各項目で結紮群間に有意差を認め、その程度はD群、E群、C群の順であった。

D. 考察

① 活性酸素種の脊髄後角ニューロンに対する作用の解析

本研究では、脊髄後角ニューロンにパッチクランプ法を適用して、単一細胞レベルでのt-BOOHの作用について検討を行った。活性酸素種ドナーであるt-BOOHを灌流投与するとsEPSCの振幅や発生頻度は有意に増加した。この作用はROSが脊髄後角ニューロンに投射する線維のシナプス前終末部に作用してグルタミン酸の過剰放出を惹起することが明らかとなった。近年、神経障害性疼痛にROSが関与しているとの報告が散見されるようになり、脊髄損傷後疼痛などの発生機序にROSが関与し、神経系の可塑的变化を惹起している可能性がある。今後、脊髄損傷後疼痛の発症メカニズムにROSが関与することが証明できれば、脊髄損傷後疼痛の予防や治療に光を当てることが可能になるかもしれない。

② 神経根障害部位の差異による疼痛増強の違いの解析

本研究では成熟ラットを用いて傷害部位の異なる根性疼痛モデルを作成し、行動学、組織学、電気生理学的観点から、根性疼痛について多角的に解析した。いずれの検討項目においてもDRG結紮群>DRGより末梢結紮群>DRGより近位結紮群の順に増強が強かった。このことは

臨床で経験する障害部位の違いによる疼痛発現の差異を裏付ける重要な知見であると考えている。

E. 結論

ROSは脊髄レベルにおける中枢性感作に関与している可能性が示された。また根性疼痛の発現程度は末梢神経傷害部位により異なることが証明された。これらの結果は、慢性疼痛のメカニズム解明の一助になると期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maenaka Y, Nishio N, Sugimura Y, Taniguchi W, Takiguchi N, Kiyoyuki Y, Matsukawa S, Miyazaki N, Nakatsuka T, Yoshida M: Patch-clamp analysis of reactive oxygen species actions on inhibitory synaptic transmission in spinal substantia gelatinosa neurons. *The Journal of Functional Diagnosis of the Spinal Cord.* (2013) 34, 46-51
- 2) Takiguchi N, Yoshida M, Taniguchi W, Hashizume H, Yamada H, Miyazaki N, Nishio N, Nakatsuka T. Distinct degree of radiculopathy at different levels of peripheral nerve injury. *Mol Pain.* (2012) 8, 31
- 3) Kaito Y, Nishio N, Taniguchi W, Takiguchi N, Miyazaki N, Maenaka Y, Nakatsuka T, Yoshida M. In vivo patch-clamp analysis of reactive oxygen species actions on excitatory synaptic transmission in spinal substantia gelatinosa neurons. *The Journal of Functional Diagnosis of the Spinal Cord.* (2012) 33, 18-23
- 4) Nishio N, Taniguchi W, Sugiura Y, Takiguchi N, Kiyoyuki Y, Matsukawa S, Sakurai Y, Kawasaki Y, Nakatsuka T. Reactive oxygen species actions on excitatory synaptic transmission in spinal substantia gelatinosa neurons. *Pain Reserch.* (2012) 27(3), 143-152
- 5) 谷口亘、吉田宗人、中塚映政. 慢性疼痛の基礎的研究 脊髄メカニズム. *Bone Joint Nerve.* (2012) 2(2), 217-222
- 6) 中塚映政. 脊髄内疼痛伝達機構の可塑的变化と神経障害性疼痛. *整形外科.* (2012) 63, 344

- 7) 中塚映政. 【坐骨神経痛と鍼灸治療】 腰部脊柱管狭窄症の診断と治療 西洋医学の立場から. 医道の日本. (2012) 71, 24-49
- 8) 中塚映政: 痛みの受容機構と鎮痛機構. 脊椎脊髄ジャーナル 24, 333-339(2011)
- 9) 谷口亘, 吉田宗人, 中塚映政: 鎮痛薬の作用機序ーオピオイドー. 整形・災害外科 (2011) 54, 1477-1483

2. 学会発表

- 1) Takiguchi N, Yoshida M, Taniguchi W, Hashizume H, Miyazaki N, Nishio N, Nakatsuka T: Distinct degree of radiculopathy at different levels of peripheral nerve injury. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, 2012. 10
- 2) 谷口亘, 西尾尚子, 櫻井悠加, 瀧口登, 峰巨, 阿部唯一, 宮崎展行, 吉田宗人, 中塚映政: 活性酸素種(ROS)は TRPA1 チャネルを介して脊髄後角ニューロンを興奮させる. 第1回和歌山ニューロカンファレンス, 和歌山, 2012. 12月
- 3) 瀧口登, 谷口亘, 橋爪洋, 峰巨, 阿部唯一, 宮崎展行, 西尾尚子, 山田宏, 中塚映政, 吉田宗人: 腰神経傷害部位の違いによる根性疼痛発現強度の検討. 第5回日本運動器疼痛学会 東京, 2012. 11月
- 4) 瀧口登, 谷口亘, 山田宏, 橋爪洋, 宮崎展行, 峰巨, 中塚映政, 吉田宗人: 腰神経の傷害部位の違いは神経障害性疼痛の発現にいかなる影響を与えるか. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 2012. 10月
- 5) 瀧口登, 吉田宗人, 谷口亘, 杉村弥恵, 西尾尚子, 中塚映政: 末梢神経傷害部位の違いから生じる根性疼痛の発現について. 第34回日本疼痛学会, 熊本, 2012. 7月
- 6) 瀧口登(和歌山県立医科大学 整形外科), 谷口亘, 山田宏, 橋爪洋, 宮崎展行, 峰巨, 中塚映政, 吉田宗人. 傷害部位の違いで腰神経根性疼痛の発現強度に差は生じるのか 動物モデルを用いた行動学、組織学、電気生理学的解析. 第41回日本脊椎脊髄病学会, 久留米, 2012. 4月
- 7) 前中悠加, 谷口亘, 瀧口登, 杉村弥恵,

宮崎展行, 吉田宗人, 西尾尚子, 清行康邦, 松川澄, 中塚映政: 脊髄膠様質細胞における抑制性シナプス伝達に対する活性酸素の作用. 第34回脊髄機能診断研究会, 東京, 2012. 2月

- 8) 西尾尚子, 谷口亘, 海戸弥恵, 瀧口登, 川崎康彦, 中塚映政: 脊髄膠様質ニューロンの興奮性シナプス伝達に対する活性酸素の作用. 第33回日本疼痛学会, 松山, 2011. 7月
- 9) 西尾尚子, 谷口亘, 瀧口登, 吉田宗人, 中塚映政: 脊髄後角痛覚ニューロンの興奮性シナプス伝達に対する活性酸素の作用. 第9回整形外科痛みを語る会, 松山, 2011. 5月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（慢性の痛み対策研究事業）
（総合）分担研究報告書

難治性疼痛の実態の解明と対応策の開発に関する研究
脊髄後角ニューロンにおける鎮痛機序に関する研究

研究分担者 河野 達郎 新潟大学大学院医歯学総合研究科麻酔科学分野 准教授

研究要旨

脊髄スライス標本を用いて、脊髄後角ニューロンに及ぼすザルトプロフェンおよび D-serine の効果を電気生理学的手法を用いて検討した。ザルトプロフェンは NSAIDs として臨床で使用されてきたが、ブラジキニンの拮抗作用も持っていることが明らかになった。D-serine は NMDA 受容体活性を増強するとともにグリシン受容体も活性化することがわかった。

A. 研究目的

脊髄後角は痛みが最初に伝達する中枢神経として重要な役割を果たしている。

ザルトプロフェンはプロピオン酸系の非ステロイド性消炎鎮痛薬（NSAIDs）である。NSAIDs の主作用は、プロスタグランジン（PG）の合成酵素のひとつであるシクロオキシゲナーゼ（COX）の活性阻害によって、PG 産生を抑制することにより、炎症や痛みを和らげる。それに加え、ザルトプロフェンはブラジキニンによる痛み反応を他の NSAIDs より強く抑えるという報告がある。

D-serine は脊髄損傷などの病的状態でアストロサイトから放出される伝達物質のひとつで NMDA 受容体の共作動物質として脳や脊髄レベルにおいて広範囲に存在している。

今回、ラット脊髄後角ニューロンにおけるザルトプロフェンのブラジキニンに対する作用機序および D-serine の脊髄後角ニューロンに及ぼす効果を検討した。

B. 研究方法

Wistar 系成熟雄ラットから、ウレタン麻醉下に腰仙部脊髄を摘出し、マイクロスライサーを用い、脊髄スライス標本を作成した。脊髄後角ニューロンより、ガラス電極を用い、ホールセル・パッチクランプ記録を行った。得られた電流は、パッチクランプ用増幅器により増幅し、データ解析用ソフトウェアを用いて解析した。データは平均±標準誤差で表し、統計処理は ANOVA 検定を用いた。P 値が 0.05 未満を有意とした。本研究は新潟大学動物実験指針に準拠し、動物愛護の精神を持って実験を行った。

（倫理面への配慮）

問題なし

C. 研究結果

AMPA の灌流投与によって、内向き電流が観察されたが、AMPA 投与前にブラジキニンをあらかじめ投与しておくこと、この電流の振幅は増大した ($P < 0.05$)。それに対し、ザルトプロフェンはこのブラジキニンの AMPA 電流増大

作用を抑制した ($P < 0.05$)。さらに、非選択的 COX 阻害薬のイブプロフェンと PG E2 を用いて、ザルトプロフェンの作用機序はザルトプロフェンの作用機序は COX-1 活性阻害によるものではないことがわかった。加えて、ザルトプロフェンの作用点はホスホリパーゼ C より下流であることが明らかになった。

NMDA 電流の振幅を D-serine 存在下と非存在下において比較した。D-serine により NMDA 電流の振幅は有意に増加した ($P < 0.05$)。このことより、D-serine がラット脊髄後角シナプス後ニューロンに存在する NMDA 受容体の活性化を増強することが示唆された。

膜電位を変化させ D-serine を投与すると、一過性の外向き電流を生じた。膜電位を変化させて D-serine による電流変化を調べたところ、その逆転電位は -70 mV 付近であった。さらに、グリシン受容体の拮抗薬存在下において D-serine 誘起の外向き電流は阻害されたことから、D-serine 誘起電流はグリシン受容体を介していることが示唆された。

D. 考察

ザルトプロフェンの作用はどのような機序が関与しているのでしょうか。我々は以前の研究でブラジキニンの AMPA 電流増大作用の機序を以下のように仮定した。ブラジキニンが B2 受容体に作用し、経路①: アラキドン酸から COX-1 を介して PGE2 の産生を促し、それが EP 受容体に作用し、アデニルシクラーゼを活性化し、間接的に A キナーゼ活性化を引き起こすと同時に、経路②: ホスホリパーゼ C を活性化し、直接的に C キナーゼ活性化を引き起こす。A キナーゼと C キナーゼの同時活性化により、さらに ERK が活性化され、AMPA 電流を増強する。本研究において、ザルトプロフェンの作用は、C キナーゼ活性薬で消失

した一方、ホスホリパーゼ C 活性薬では消失しなかった。この結果はザルトプロフェンの作用機序はホスホリパーゼ C より下流にあり、C キナーゼ活性阻害によるものであることを示している。

-50 mV の電位固定下に D-serine を単独で投与しても内向き電流の発生は観察されなかった。すなわち、脊髄後角において D-serine 自体は非選択的陽イオンチャネルの開閉に直接は作用しないが、NMDA 受容体のグリシン結合部位に作用し、チャネルの活性化に作用することが示唆された。一方、 0 mV に電位固定下に D-serine を投与すると外向き電流を発生した。D-serine による外向き電流はグリシン受容体阻害薬により阻害されことから、グリシン受容体の Cl⁻チャネルを介したものであることが示唆された。このように、脊髄後角ニューロンにおいて、グリア由来伝達物質として知られている D-serine が NMDA 受容体活性化を増強するだけでなく、グリシン受容体誘起の外向き電流を誘起することが明らかとなった。

E. 結論

ザルトプロフェンは COX を阻害する NSAIDs として臨床で使用されてきたが、ブラジキニンの興奮性増大作用をブロックすることで、COX 阻害以外の作用を持っていることが明らかになった。さらに、D-serine は脊髄後角ニューロンの NMDA 受容体活性を増強するとともにグリシン受容体を活性化することも明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furutani K, Ikoma M, Ishii H, Baba H, Kohno T. Bupivacaine inhibits

- glutamatergic transmission in spinal dorsal horn neurons. *Anesthesiology* 2010;112:138-143.
- 2) Georgiev SK, Baba H, Kohno T. Nitrous oxide and the inhibitory synaptic transmission in rat dorsal horn neurons. *European Journal of Pain* 2010;14:17-22.
 - 3) Georgiev SK, Furue H, Baba H, Kohno T. Xenon inhibits excitatory but not inhibitory transmission in rat spinal cord dorsal horn neurons. *Molecular Pain* 2010;6:25.
 - 4) Kohno T. Neuropathic pain and neuron-glia interactions in the spinal cord. *Journal of Anesthesia* 2010;24:325-327.
 - 5) Petrenko AB, Yamakura T, Kohno T, Sakimura K, Baba H. Reduced immobilizing properties of isoflurane and nitrous oxide in mutant mice lacking the N-methyl-D-aspartate receptor GluR(epsilon)1 subunit are caused by the secondary effects of gene knockout. *Anesth Analg* 2010;110:461-465.
 - 6) Honda H, Kawasaki Y, Baba H, Kohno T. The mu opioid receptor modulates neurotransmission in the rat spinal ventral horn. *Anesth Analg* 2012;115:703-712.
 - 7) Kohno T, Kimura M, Sasaki M, Obata H, Amaya F, Saito S. Milnacipran inhibits glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptor activity in spinal dorsal horn neurons. *Mol Pain* 2012;8:45.
 - 8) Yamamoto T, Honda H, Baba H, Kohno T. Effect of xenon on excitatory and inhibitory transmission in rat spinal ventral horn neurons. *Anesthesiology* 2012;116:1025-1034.
 - 9) Petrenko AB, Yamakura T, Kohno T, Sakimura K, Baba H. Increased brain monoaminergic tone after the NMDA receptor GluN2A subunit gene knockout is responsible for resistance to the hypnotic effect of nitrous oxide. *Eur J Pharmacol* 2013;698:200-205.
2. 学会発表
- 1) Kohno T: Role of bradykinin and antagonistic action of NSAID zaltoprofen on bradykinin-mediated enhancement of AMPA receptor activity in spinal dorsal horn neurons. Molecular targets for novel pain therapeutics, Italy, 2010
 - 2) Ikoma M, Kawakasi Y, Kohno T: Action of neurosteroids, dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosteron sulfate, on the substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. 13th World Congress on Pain, Montreal, Canada, 2010
 - 3) Kawakasi Y, Nakatsuka T, Amaya F, Sasaki M, Kohno T: Role of excitatory amino acid transporter inhibitor in the superficial dorsal horn neuron. 13th World Congress on Pain, Montreal, Canada, 2010
 - 4) Kohno T, Georgiev SK, Furue H: Xenon inhibits excitatory but not inhibitory transmission in rat spinal cord dorsal horn neurons. 40th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2010
 - 5) Furutani K, Ikoma M, Ishii H, Kohno T: The effects of bupivacaine on spontaneous postsynaptic currents in dorsal horn neurons. 40th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2010
 - 6) Honda H, Kawasaki Y, Baba H, Kohno T: Mu opioid receptor agonist modulates synaptic transmission to neonatal rat spinal ventral horn neurons but does not affect neuronal death induced by experimental ischemia. 40th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2010
 - 7) Kawakasi Y, Kohno T, Sasaki M, Amaya F, Nakatsuka T: Direct synaptic actions of glia-selective amino acid

transporter inhibitors in the spinal dorsal horn. 40th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2010

- 8) Yamamoto T, Kohno T: Effect of xenon on excitatory and inhibitory transmission in rat spinal ventral horn neurons. 41th Annual Meeting Society for Neuroscience, Chicago, USA, 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（慢性の痛み対策研究事業）
（総合）分担研究報告書

難治性疼痛の実態の解明と対応策の開発に関する研究

研究分担者 鈴木 重行 名古屋大学医学部保健学科 教授

研究要旨

難治性疼痛の中でも不動が関連する疼痛を想定し、モデルラットに対して疼痛の変化とともに運動の効果について検討した。その結果、ギプス固定により発生した疼痛は運動負荷により軽減できることが判明した。

A. 研究目的

ギプス固定による疼痛モデルラットに対してストレッチングを用いた運動介入を行い、痛み行動が運動によって改善するかを検証すること。

B. 研究方法

モデル動物はギプスを用いて足関節を最大底屈位にて2週間または4週間固定して作成した。ストレッチングは自作した他動運動装置を用いて40°の可動範囲で足関節最大背屈位まで行い、30分/日、6日/週、固定除去直後から実施した。疼痛の変化は腓腹筋への機械的刺激に対する逃避反応閾値を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は名古屋大学医学部保健学科動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

2週間または4週間のギプス固定により腓腹筋における逃避反応閾値は低下した。

そして、4週間の固定の後にストレッチングを行った群では逃避反応閾値の低下が抑制

されたが、2週間の固定の後にストレッチングを行った群では非運動群に比べて有意な差は認められなかった。

D. 考察

各群の逃避反応閾値の推移より、ギプス固定により痛み行動が生じるが、ストレッチングはその反応を抑制する効果があると推測された。また、2週間固定した群は4週間固定した群より早期に痛み行動が軽減したことから、疼痛の観点においてもギプス固定は早期に除去することが望ましいことが示唆された。

軟部組織由来の疼痛モデルを昨年度は酸性食塩水投与により、今年度はギプス固定により作成し、いずれも運動介入が疼痛を抑制すること示唆するデータが得られた。

E. 結論

酸性食塩水あるいはギプス固定したラットでは痛み行動が生じるが、ストレッチングによる運動介入はその反応を軽減する効果があると判明した。今後の展望について、軟部組織由来の慢性痛患者の運動介入効果について、検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 下 和弘, 鈴木重行, 牛田享宏. 熱流束、総熱量測定による痛覚評価の検討. PAIN RESEARCH, 27(1): 17-26, 2012

2. 学会発表

- 1) Hayashi K, Suzuki S, et al: Treadmill exercise reverses mechanical hyperalgesia in acid-injected rats. 14th World Congress on Pain (Milan, Italy) 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（慢性の痛み対策研究事業）
（総合）分担研究報告書

難治性疼痛の実態の解明と対応策の開発に関する研究
自律神経の関与に関する研究

研究分担者 佐藤 純 名古屋大学環境医学研究所 准教授

研究要旨

慢性痛患者は健康人に比べ寒冷環境に対して敏感で、寒い日や寒冷地で症状が悪化することが多い。これは慢性痛患者の低温に対するストレス応答性（自律神経反応性）が健康人と異なっている可能性を示唆しているが詳細は不明である。そこで分担研究者らは、坐骨神経損傷または脊髄神経損傷により作製した慢性痛モデルラットと気分障害（抑うつ）モデルラットを人工寒冷環境に曝露し、ストレス応答性を解析した。ストレス反応の指標として自由行動下ラットの頸静脈から繰り返し採血を行い、血中ノルアドレナリン濃度を高速液体クロマトグラフィ（HPLC）で定量し、安静時と寒冷曝露中のノルアドレナリン血中濃度の経時変化を健常対照群ラットと比較検討した。慢性痛モデルラットのストレス反応性は健常ラットと大きく異なることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、気象変化から疾患の症状発現や症状の消長を予報する健康天気予報（Biowater service: IDEA Consultants, Inc.）のインターネットサイトが開設されているように、天候や気象変化が身体または精神に与える影響についての社会的関心が高まっている。臨床医学的にも、慢性痛やうつ病などの患者の一部に天候や気象の変化によって症状が悪化するという知見（Jamison et al., 1995; Sato, 2003; Chand and Murthy, 2008）が数多くあり、これらの疾患群は「Meteoropathy: 気象病」として認識されるようになった（Balsamo et al., 1992）。慢性痛については、骨関節炎やリウマチ患者の症状と気温や湿度には相関がみられ、気温が低いかまたは湿度が高いときほど痛みが増強すること（Aikman, 1996）や、線維筋痛症患者では気象の変化により痛みを感じやすいこと（Fors and Sexton, 2002）などが報告されている。また、気分障害の1

つである双極性障害の患者を対象とした調査研究では、月ごとの平均気温または最高気温とうつ症状には負の相関があり、気温の低いときほど抑うつ症状が現れることが報告されている（Christensen et al., 2008）。これらのことから、気象変化が慢性痛や精神症状に与える調査研究に加え、気象病の病態悪化の機序解明や対策の立案に向けた発展的研究が求められるようになってきている。このような背景の中、当研究室では人工的に温度、湿度、気圧、照度などの気象要素を変化させることが可能な環境ストレスシミュレーション装置を用いて、環境変化が疾患モデル動物の疼痛行動や抑うつ行動、あるいは自律神経機能に及ぼす影響を調べてきた。これまで、日常体験する程度の気温低下や気圧低下が神経障害性疼痛モデルラット（Sato et al., 1999, 2000）や炎症性疼痛モデルラット（Sato et al., 2004）の疼痛行動を増強し、気圧低下はうつ病モデルラットの抑うつ症状を悪化させるこ

と (Mizoguchi et al., 2011) を明らかにし、気象病を疾患モデル動物で再現することに成功した。また、気圧低下による疼痛行動の増強が交感神経遮断術によって消失することから、メカニズムに交感神経が関与していることを明らかにした (Sato et al., 1999)。すなわち気象要素の変化が環境ストレスとして交感神経系の興奮を引き起こし、その結果として疼痛行動や抑うつ症状を悪化させている可能性を示した。

一方、当研究室の佐藤らは神経障害性疼痛や炎症性疼痛のメカニズムにおける交感神経の役割について多くの研究成果をあげてきた。特に、末梢神経障害後と慢性炎症病態では、末梢のC線維痛み受容器 (ポリモーダル受容器) が、健常では応答しなかった交感神経刺激とノルアドレナリン (noradrenaline: NA) の投与により興奮するようになることを発見し (Sato and Perl, 1991; Sato et al., 1993)、慢性痛が交感神経興奮が起こる状況 (ストレス) で悪化する現象の末梢メカニズムを明らかにした。また、神経障害性疼痛モデルラットの血圧、心拍数、血中 NA 濃度などの交感神経活動パラメータが、病態経過中に大きく変化することも明らかにした (Jin et al., 2008)。

これらの研究結果を総合すると、慢性痛や抑うつ病態時には交感神経系に何らかの変容が生まれ、それが重要なリスク要因となることで気象変化による未知のメカニズムが駆動し、気象病の症状発現や症状悪化を引き起こすものと考えられる。しかしながら、実際に気圧低下や気温低下に対する交感神経活動の反応性が病態時では変化しているのか、さらには、環境ストレス変化に対する交感神経活動と疾患との間に相関的因果関係は存在するのか、未だに不明な点が残されている。

そこで本研究では、慢性痛および抑うつモデル動物を低温曝露し、交感神経活動指標である血中 NA 濃度を経時的に測定することにより、環境ストレスに対する交感神経活動の興奮性が健常動物と異なっているかどうかを調べることにした。

B. 研究方法

1. 使用動物

実験には Sprague-Dawley (SD) 系の雄性ラット (260-380g, SLC Inc., Japan) を使用した。室温を $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に保った実験動物飼育室で、12 時間の明暗サイクル (L: 8:00-20:00, D: 20:00-8:00) のもと、エサと水は自由摂取できる自由行動下で飼育した。いずれの実験も、国際疼痛学会が定めた実験ガイドライン (Zimmermann, 1983) と名古屋大学における動物実験等に関する取扱規程 (平成 24 年 3 月 21 日規程第 89 号) を準拠し、名古屋大学動物実験委員会の承認のもとに行った。

2. 神経障害性疼痛モデル動物の作製方法

神経障害性疼痛モデルは、坐骨神経慢性絞扼 (Chronic constriction injury: CCI) モデルと脊髄神経結紮 (Segmental spinal nerve ligation: SNL) モデルの 2 種類を作製した。

2-1. CCI モデル

CCI モデルの作製は、Bennett and Xie (1988) の方法に準じて行った。イソフルラン吸入麻酔 (導入濃度: 4.0%, 維持濃度: 1.0-1.8%) の下、左側臥位にて右大腿部中間部を縦切開、筋層を剥離し坐骨神経を露出した。4/0 の腸線縫合糸 (Chromic gut) を使用し、坐骨神経を 1mm 間隔で 4 か所緩く結紮した。その後、筋層と皮膚をそれぞれ 4/0 の絹糸を用いて閉創した。

2-2. SNL モデル

SNL モデルの作製は、L5 脊髄神経のみを結紮するというを除いて Kim and Chung (1992) の方法に準じて行った。腹臥位にて脊柱に沿って切開し、第6腰椎横突起を露出した。第6腰椎横突起を骨切り鋏により切除し、L4、L5 脊髄神経を露出した。そして、L4 脊髄神経を傷つけないように、L5 脊髄神経のみ 5/0 の絹糸を使用してきつく縛った。最後に、筋層と皮膚をそれぞれ 4/0 の絹糸を使用し閉創した。

2-3. 慢性痛モデル動物の痛覚テスト

2-3-1. von Frey hair (VFH) test

機械刺激によるアロディニア（非侵害刺激による疼痛）や痛覚過敏（侵害刺激による強い疼痛）を評価するために VFH test を行った (Ta et al., 2000)。慢性痛モデル作製術の3日前から術後7日目まで毎日 VFH test を行い、術前3日間の平均値を pre 値とした。測定には3段階の強さ（弱：39.2mN，中：91.1mN，強：181.3mN）の自家製の VFH（直径 0.5mm）を用いた。まず、金網の上にラットを静置し、透明のプラスチックケージ（11×17×11cm）を上からかぶせた。探索行動が消失するまで 5-15 分待った後、金網越しにラットの後肢足底皮膚に VFH を先端が軽く曲がる程度までゆっくり垂直に押し当てた。非術側（左足）、術側（右足）の順に各々の VFH を 2-3 秒間隔で 10 回ずつ押し当て、肢を引っ込める回数（足挙上回数）を測定した。弱刺激は非侵害刺激レベル、中・強刺激は侵害刺激レベルと考えられるので、弱刺激による反応をアロディニア、中・強刺激による反応を痛覚過敏と定義した (Zhou et al., 1996; Sato et al., 2011)。

2-3-2. アセトンテスト

アセトンテストは、Choi (1994) らの方法に従い、VFH test 終了後に同様の環境下で行った。測定は慢性痛モデル作製術前の3日間と、作製後 1、3、5 および 7 日後に行い、術前3日間の平均を pre 値とした。1 ml シリンジ (TERUMO, Japan) を使用し、アセトン (SIGMA-ALDRICH, Japan) を先端に 1 滴出し、ラット後肢足底踵部に塗布した。塗布後 10 秒以内に後肢を挙上する、舐める、振るなどの行動をとれば「疼痛行動」と定義し、左右各 10 回ずつ刺激した時の疼痛行動回数を測定した。刺激は非術側（左足）、術側（右足）の順に行い、2分以上の間隔をあけて行った。

2-4. 抑うつモデル動物の作製方法

2-4-1. 連続強制水泳試験

強制水泳試験 (Forced swim test: FST) は先行研究の方法 (Mizoguchi et al., 2011) に準じ、連続で 6 日間、毎日 3 分ずつ行った。ラットが逃避できないサイズのビーカー（高さ 35cm×直径 24cm, 10 l）に 25±1℃の水を深さ 25cm まで満たし、ラットを浮かべ強制水泳させた。ラットが四肢を動かさずに浮いたままの状態を無動、前肢を使用し壁面を上に向かい登ろうとする行動を登はん行動、水中を水平方向へ移動する行動を遊泳と定義し (Cryan et al., 2002)、それぞれ無動時間、登はん行動時間及び遊泳時間を測定した。FST 終了後、キムタオルでラットの体の水を丁寧に拭き取ったのちホームケージへ戻した。

2-4-2. 高架式断崖試験

高架式断崖試験は緩和ストレスに対する動物の抵抗性や活動性・意欲について、動物の行動量を指標に評価する試験である (Mizoguchi et al., 2011)。そこで本研究で

は先行研究の方法に準じ、FST 開始の前日から7日間、毎日6分ずつ行った。透明なアクリル製のシリンダー（高さ 56.5cm×直径 14cm）を上下逆さまに置き、上面（オープンプラットホーム）にラットを乗せた。6分間でプラットホームの縁から下を覗き込む回数を計測した。覗き込んだとする基準は、ラットの頭と肩がプラットホームの縁を越えた時とした。

2-5. 血液採取方法

2-5-1. 頸静脈カテーテル留置

採血用カテーテル留置の方法は、Thrivkraman (2002) らの方法に準じて行った。清潔環境において生理食塩水で満たされたポリウレタンカテーテルを右外頸静脈から挿入し、カテーテルの先端が右心房手前にくるよう留置した。カテーテルのもう一端は、皮下を通し頸部背側から体外に露出した。なお、慢性痛モデル動物には術後7日-11日の間に、抑うつモデル動物は強制水泳試験終了後7日以内にカテーテル留置術を行った。

2-5-2. 環境ストレスシミュレータでの飼育環境

飼育にはブラインドケージ (BC-80, EICOM, Japan) を使用し、4面ある側面のうち1面を取り外し代わりに金網を取り付け、ケージ内の空気の循環を良くした。頸静脈カテーテルを自動血液サンプリング装置 (DR-II, EICOM, Japan) に連結後、カテーテル内の血液凝固を防ぐために、3時間ごとに1%ヘパリン加生理食塩水でカテーテル内の洗浄を行った。

2-5-3. 低温曝露

低温曝露実験は、当教室の先行研究 (Sato et al., 2000) を参考に、カテーテル留置 3

日後に行った。サーカディアンリズムを考慮し、実験の開始時間は 9:00-10:00 とした。まず、ラットを飼育環境と同じ室温 ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) に1時間留置した。その後、35分かけて温度を 10°C 低下させ $14 \pm 1^\circ\text{C}$ とし、3時間低温環境を維持した。その後30分間で $24 \pm 1^\circ\text{C}$ に戻し、この状態を維持した。プロトコルを図1に示した。

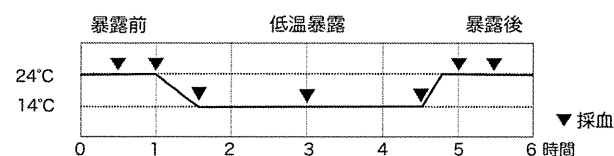


図1 低温曝露と採血プロトコル

2-5-4. 採血

採血には自動血液サンプリング装置を使用し、採血によるストレスの影響を極力除いた。採血は実験開始から30分 (曝露前1)、1時間 (曝露前2)、1時間30分 (低温1)、3時間 (低温2)、4時間30分 (低温3)、5時間15分 (曝露後1)、5時間45分 (曝露後2) 目に計7回行った (図1)。1回の血液採取量は $500 \mu\text{l}$ で、それぞれの採血操作は2回までとした。7回の採血がすべて成功した動物のみを解析対象とした。各採血終了後に採血量と同量 ($500 \mu\text{l}$) の1%ヘパリン加生理食塩水を血管内に戻した。採取した血液は 4°C に冷却したヘパリン入りのサンプリングチューブに集め、実験終了後に遠心分離 (4°C , 3000rpm, 5分)、抽出した血漿成分を -80°C で保存した。

2-5-5. 血中 NA 量の測定

$100 \mu\text{l}$ の血漿に内部標準物質として $0.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ の3, 4-Dihydroxybenzylamine (DHBA) を添加し、1.5 M Tris 塩酸緩衝液 (pH 8.6) によりカテコールアミン類をアルミナに吸着

させたのち 2% 酢酸で溶出させた (Ganhao et al., 1991)。溶出した溶液を高速液体クロマトグラフィ (HPLC-ECD, HTEC-300, EICOM, Japan) に注入し、ノルアドレナリンの分析・定量を行った。クロマトグラム曲線の保持時間が 5-6 分に現れるピークを NA とし、DHBA との面積比から NA 濃度を求めた (PowerChrom v. 2.2J, ADI, Japan)。HPLC の条件は以下の通りである。

カラム : EICOMPAK CA-50DS (2.1 ID × 150mm)

プレカラム : CA-ODS (3.01 ID × 4mm)

カラム温度 : 25°C

移動相 : 700 mg/l 1-オクタンスルホン酸ナトリウム及び 50 ml/l EDTA・2Na を含む 0.1 mol/l リン酸緩衝液 (pH5.7) -メタノール (88:12, v/v)

流速 : 230 µl/min

作用電極 : WE-3G (グラファイト)

印加電圧 : +450 mV vs. Ag/AgCl

ガasket : GS-25

2-6. 統計処理

結果は平均値±標準誤差で表した。VFH test、アセトンテスト、高架式断崖試験の結果については、基準値 (pre) または非術側、コントロールとの比較のため二元配置分散分析 (対応あり) を行ったのち、Fisher の最小有意差 (Least significant difference: LSD) 法により多重比較検定を行った。FST の無動時間、登はん行動時間、遊泳時間の基準値 (1 日目) との比較には一元配置分散分析 (対応あり) を行ったのち、Fisher の LSD 法により多重比較検定を行った。血中 NA 濃度の群内比較は一元配置分散分析 (対応あり) を行ったのち、Fisher の LSD 法により多重比較検定を行った。統計的有意水準は $p < 0.05$ とした。

統計処理には統計解析アドインソフト for windows Excel 統計 2010 を使用した。

(倫理面への配慮)

本実験は、名古屋大学動物実験委員会の承認のもと、実験動物福祉 3Rs ポリシーを遵守して行われた。

C. 研究結果

3-1. 慢性痛モデルラットの疼痛行動

3-1-1. 機械アロディニアと機械痛覚過敏 CCI 群 (n=9) の術側の足底面を 3 段階の VFH で刺激したところ、非術側と比較して、足挙上回数はいずれの刺激強度においても有意に増加した。CCI 群の術側の足挙上回数は、pre 値と比較して、術後 2 日から有意に増加し、その増加は術後 7 日においても認められた [39.2mN, CCI: $F_{(1,16)}=13.84$, day: $F_{(7,112)}=9.93$, CCI×day: $F_{(7,112)}=7.90$, $p < 0.001$ for all 図

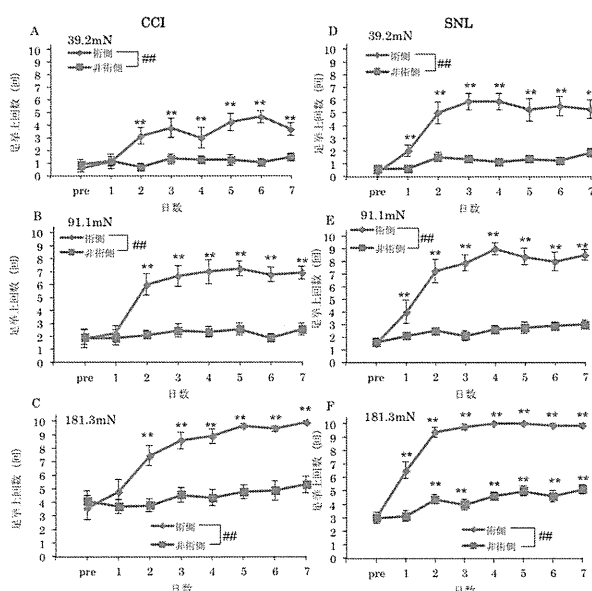


図 2. 2 種類の慢性痛モデルラットに機械刺激を与えた時の疼痛行動の経時変化。(A-C) CCI モデルラット (n=9)、(D-F) SNL モデルラット (n=8)。横軸は術後経過日数であり、縦軸は 39.2、91.1、181.3mN の VFH により刺激を与えたときの足挙上回数である (平均値

±標準誤差)。** $p < 0.01$ vs. pre 値。
 ## $p < 0.01$ vs. 非術側 (repeated measures two-way ANOVA followed by Fisher's LSD post hoc test)。

2A; 91.1mN, CCI: $F_{(1,16)}=27.37$, day: $F_{(7,112)}=19.50$, CCI × day: $F_{(7,112)}=13.42$, $p < 0.001$ for all 図 2B; 181.3mN, CCI: $F_{(1,16)}=30.75$, day: $F_{(7,112)}=22.12$, CCI × day: $F_{(7,112)}=10.76$, $p < 0.001$ for all 図 2C]。

一方、SNL 群 (n=8) の術側の足底面を VFH で刺激したところ、非術側と比較して、足挙上回数はいずれの刺激強度においても有意に増加した。SNL 群の術側の足挙上回数は、pre 値と比較して、術後 1 日から有意に増加し、その増加は術後 7 日においても認められた [39.2mN, SNL: $F_{(1,14)}=29.32$ day: $F_{(7,98)}=21.00$, SNL × day: $F_{(7,98)}=11.00$, $p < 0.001$ for all 図 2D; 91.1mN, SNL: $F_{(1,14)}=62.88$ day: $F_{(7,98)}=28.14$, SNL × day: $F_{(7,98)}=15.28$, $p < 0.001$ for all 図 2E; 181.3mN, SNL: $F_{(1,14)}=398.93$ day: $F_{(7,98)}=46.46$, SNL × day: $F_{(7,98)}=15.39$, $p < 0.001$ for all 図 2F]。

SNL 群は CCI 群に比べ全ての VFH の刺激に対する疼痛反応が 1 日早く有意に増強したことから、SNL 群は CCI 群よりも早期から機械刺激に対するアロディニアや痛覚過敏が形成されることが示された。

3-1-2. 冷アロディニア

CCI 群において、ラットの術側足底踵部にアセトン刺激を与えたところ、足挙上回数は非術側と比較して有意に増加した。CCI 群ラットの術側の足挙上回数は pre 値と比較して、術後 1 日から 7 日後にかけて有意に増加した [図 3A, CCI: $F_{(1,16)}=98.23$, day: $F_{(4,64)}=36.33$, CCI × day: $F_{(4,64)}=32.00$, $p < 0.001$ by repeated

measures two-way ANOVA]。また、非術側の足挙上回数の経時変化に有意な変化はみられなかった ($p > 0.05$)。

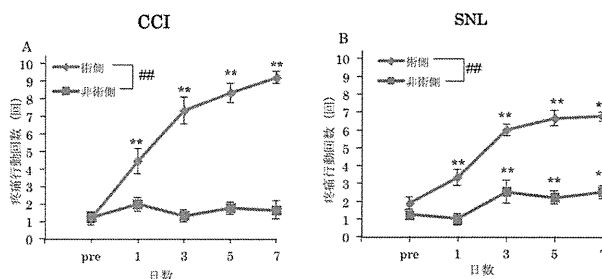


図 3. 2 種類の慢性痛モデルラットの足底皮膚に冷刺激を与えた時の疼痛行動の経時変化。(A) CCI モデルラット (n=9)、(B) SNL モデルラット (n=8)。横軸は術後経過日数であり、縦軸はアセトンを塗布した時の疼痛行動回数である (平均値 ± 標準誤差)。** $p < 0.01$ vs. pre. ## $p < 0.01$ vs. 非術側 (repeated measures two-way ANOVA followed by Fisher's LSD post hoc test)。

SNL 群において、ラットの術側足底踵部にアセトン刺激を与えたところ、足挙上回数は非術側と比較して有意に増加した。SNL 群ラットの術側の足挙上回数は pre 値と比較して、術後 1 日から 7 日にかけて有意に増加した [図 3B, SNL: $F_{(1,14)}=111.50$, day: $F_{(4,56)}=29.01$, SNL × day: $F_{(4,56)}=7.14$, $p < 0.001$ by repeated measures two-way ANOVA]。また、非術側の足挙上回数の経時変化に有意な上昇がみられ、pre 値と比較して術後 1 日から 7 日において有意に増加した ($p < 0.01$)。

CCI 群と SNL 群のいずれにおいても術側と非術側の pre 値に差はなかった ($p > 0.05$ by t test)。

本研究では、以上ふたつの疼痛行動テストにおいて pre 値と比較して 7 日目でも有意な