

## 【7】

氏 名	五月女 俊也 <small>きおとめ としや</small>
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第667号
学位授与の日付	平成28年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (麻酔・疼痛学)
学位論文題目	神経障害後の脊髄後角におけるシナプス伝達の変化：膜電位イメージング法を用いて
論文審査委員	(主査) 教授 平 田 幸 一 (副査) 教授 奥 田 泰 久 教授 下 田 和 孝

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

末梢神経が障害されると、アロディニアや痛覚過敏などの神経障害性疼痛に特徴的な症状を呈する。これらの症状は、第1次求心性線維が入力する脊髄後角表層における興奮性シナプス伝達の変化によって生じると考えられており、これらの変化の発症機序として、脊髄後角表層におけるN-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体や  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole proprionic acid (AMPA) 受容体などの興奮性シナプス成分の亢進が関与することが電気生理学的に明らかにされている。

さらに、脊髄後角において第1次求心性線維からの興奮性シナプス伝達に関与しているneurokinin 1 (NK1) 受容体やcalcitonin gene-related peptide (CGRP) 受容体の関与を示す研究や、 $\gamma$ アミノ酪酸 (GABA) やグリシンなどの抑制性シナプス成分の神経障害性疼痛への関与を示す研究も報告されているが、これらの機序の関連については未だ議論の余地があり、末梢神経障害による脊髄後角におけるシナプス変化は複雑で、かつ不明な部分が多い。

#### 【目 的】

本研究では、神経障害性疼痛の発症機序を電気生理学的に明らかにする目的で、Seltzer法による神経障害性疼痛モデルの脊髄スライス標本を膜電位感受性色素で染色し、脊髄後角表層の電気刺激で誘発された興奮性シナプス伝達の変化を高速イメージングシステムによって視覚的に観察した。

## 【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

### 1. 対象

生後4 - 6週の雄性ICRマウスを使用した(20-30g)。飼育室の明暗周期を12時間とし、すべての実験は明期に行った。また餌、水分は自由に摂取できるようにした。

### 2. 神経障害性疼痛モデルの作製

ケタミン100mg/kg、キシラジン10mg/kg麻酔下にSeltzer法による坐骨神経部分結紮を行い、神経障害性疼痛モデルを作製した(坐骨神経結紮群)。一方、対照群は全身麻酔下に坐骨神経の露出のみ(sham手術)を行った。

### 3. von Frey試験

結紮3日前から結紮後7日目まで、坐骨神経部分結紮後のマウスの機械的刺激に対する反応をvon Frey filament (No. 2.83, bending force 0.07g)を用いて評価した。Filamentによる機械的刺激を10回加え、それに対して逃避行動を示す回数を連日測定し、測定結果について対照群と坐骨神経結紮群で比較した。

### 4. 脊髄スライス標本の作製

ケタミン100mg/kg、キシラジン10mg/kg麻酔下にマウスの椎弓を切除して脊髄を摘出した。摘出した脊髄は直ちに95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>で飽和した4℃の氷冷クレブス液(組成: NaCl 113mM, KCl 3mM, NaHCO<sub>3</sub> 25mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, D-glucose 11mM, pH 7.4)に浸漬し、マイクロスライサー(Microslicer<sup>®</sup>, D.S.K., Japan)を用いて、厚さ450μmの脊髄スライス標本作製した。

### 5. 膜電位感受性色素による染色

5%CO<sub>2</sub>、/95%O<sub>2</sub>をバブリングした常温のクレブス液を浸漬した濾紙上に、脊髄スライスを留置した直径13mmのメンブランフィルターを並べ、30分間インキュベーションした後、膜電位感受性色素であるdi-4-ANEPPS (5mM) 40μLにクレブス液480μLとfetal bovine serum 480μLを加えたものを100μLずつ滴下し、15~20分間暗所にてインキュベーションした後に色素を洗浄した。

### 6. 高速蛍光測定による膜電位イメージング

スライス標本を記録用チャンバーに固定し、クレブス液灌流下にCCDカメラ(MiCAM2)を用いた高速蛍光測定法により行われた。対照群および坐骨神経結紮群の脊髄後根流入部位に刺激電極を用いて電気刺激(train 3, duration 1.0ms, interval 10ms)を加えることで得られた膜電位変化を記録した。さらにGABA<sub>A</sub>受容体拮抗薬であるbicucullineおよびグリシン受容体拮抗薬であるstrychnineを灌流させ、抑制性シナプス伝達の影響を遮断した。はじめに①クレブス液のみを灌流させ、膜電位変化(蛍光強度変化)を記録、その次に②bicuculline (10μM) + strychnine (1μM)を追加灌流させ、次に③非NMDA受容体拮抗薬(AMPA受容体阻害薬)である6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) (10μM)を、そして④NMDA受容体阻害薬であるDL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) (50μM)を追加灌流し、それぞれの薬剤を灌流させたときの膜電

位変化を経時的に観察、さらにこれらの変化を対照群と坐骨神経結紮群間で比較した。

## 7. 統計解析

全ての結果は平均値±標準誤差で示し、対照群と坐骨神経結紮群における左右の後角の蛍光強度変化の比較には二元配置分散分析法(two-way analysis of variance : two-way ANOVA)を用いた。

また事後の多重比較検定にはTukey法を用いた。統計処理は統計ソフトPrism<sup>®</sup>を使用し、統計的有意水準は $p < 0.05$ とした。

### 【結 果】

#### 1. von Frey試験

坐骨神経部分結紮前の機械的刺激に対する逃避行動を示す行動は、両群において差はみられなかった。しかし坐骨神経結紮群では結紮直後から7日目まで、filamentの機械的刺激に対する逃避行動の回数が増加しており、アロディニアが発症していることが確認された(対照群 :  $n=8$ , 坐骨神経結紮群 :  $n=8$ )。

#### 2. 高速蛍光測定による膜電位イメージング

bicucullineとstrychnineを灌流させたときの膜電位変化は増強し、CNQXの灌流によって減弱し、APVの灌流でさらに減弱したが完全には消失しなかった。

灌流前の膜電位変化は、対照群に比して結紮群で増強される傾向にあり、bicucullineとstrychnineを灌流させると、結紮群の膜電位変化は対照群に比して有意に増大した ( $p < 0.05$ )。その後、CNQXを灌流させると、両群ともに膜電位変化は減弱し、さらにAPVを灌流させた結果、bicucullineとstrychnineのみの灌流時に比して膜電位変化は有意に減弱した ( $p < 0.05$ )。また、bicucullineとstrychnine灌流下でのCNQXとAPVの灌流による膜電位変化は、対照群に比して坐骨神経結紮群で有意に増大していた ( $p < 0.05$ )。

### 【考 察】

本研究では、各シナプス成分が神経障害性疼痛の発症や持続にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、末梢神経障害性疼痛マウスの脊髄後角表層におけるシナプス伝達の変化について、膜電位イメージングによる視覚的手法を用いて評価した。そして、神経障害時に脊髄後角における興奮性シナプス伝達の亢進を捉えることが出来た。また、これまでの電気生理学的手法では得られなかったCNQXとAPVの両者の灌流後に残存する蛍光変化を見出し、このシステムが神経障害性疼痛の研究に有効であることを示した。

非NMDA受容体阻害薬 (AMPA受容体阻害薬) であるCNQXを灌流させると増強した膜電位変化は減弱し、次いでNMDA受容体阻害薬であるAPVを追加投与すると膜電位変化はさらに減弱した。坐骨神経結紮群についても同様の観察を行った結果、対照群と同じ変化が観察された。それぞれの成分について対照群と坐骨神経結紮群で比較したところ、CNQXおよびAPVを灌流させた場合、坐骨神経結紮群において有意に増大していた。このことから、NMDAとAMPAの2つの興奮性シナプス成分は、坐骨神経結紮によって増強していたことになる。

AMPA受容体阻害薬であるCNQXの灌流によって膜電位変化が減弱したが、この減弱は坐骨神経

結紮群ではさらに減弱することが明らかとなった。このことから、AMPA受容体は神経障害性疼痛において重要な役割を果たしている結論できる。

NMDA受容体阻害薬であるAPVの灌流により、電気刺激によって生じる膜電位変化は、対照群と比して結紮群で増強されていた。このことは、坐骨神経結紮によってNMDA受容体を介する興奮性シナプス成分は増強していたことを示し、過去の研究結果と矛盾しないものであった。一方、AMPA受容体とNMDA受容体の両者を阻害したにもかかわらず、他の興奮性シナプス成分の残余を示す膜電位変化を認め、この膜電位変化は結紮群では対照群と比して有意に増大していたことから、神経障害性疼痛にはAMPA、NMDA以外の興奮性シナプス成分が関与していると考えられた。

## 【結 論】

本研究において、高速蛍光測定によりNMDAとAMPA受容体を介する興奮性シナプス伝達が坐骨神経部分結紮により増強することを確認できた。CNQXとAPVの両者の灌流後に残存する蛍光変化の起源は現時点では不明だが、神経障害によってAMPA受容体とNMDA受容体以外の興奮性シナプス伝達が亢進している可能性が推測された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

### 【論文概要】

本研究では、シナプス成分が神経障害性疼痛の発症や持続にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、末梢神経障害性疼痛マウスの脊髄後角表層における興奮性シナプス伝達の変化について、高速イメージングシステム（膜電位イメージング法）による視覚的な評価を行った。

Seltzer法で坐骨神経の部分結紮を行ったマウスを神経障害性疼痛モデルとして用い、von Fray試験で神経障害性疼痛が発症していることを確認した後に高速イメージングシステムによる膜電位イメージングを行った。対照群にはsham手術を行った。

$\gamma$ -amino-butyric acid (GABA) やグリシンなどの抑制性シナプス成分の影響をビククリンとストリキニンを灌流することで除外して膜電位変化の増強を確認した後に、興奮性シナプス伝達に関与する *a*-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 受容体の阻害薬である6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) を灌流させた結果、抑制性シナプス成分の阻害によって増強していた膜電位変化が減弱した。次いで、同じく興奮性シナプス成分の重要な神経伝達経路である *n*-methyl-d-aspartate (NMDA) 受容体の阻害薬であるDL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) をCNQXに追加して投与した結果、膜電位変化はさらに減弱した。

この膜電位変化を坐骨神経結紮群と対照群の両群で観察し、対照群と坐骨神経結紮群の興奮性シナプス成分の膜電位蛍光強度変化率を統計学的に解析した結果、CNQXとAPVを灌流させた時の膜電位蛍光強度変化率は坐骨神経結紮群において有意に増大していたため、NMDAとAMPAの2つの興奮性シナプス成分は坐骨神経結紮によって増強していたことが示された。

次いで、AMPA受容体阻害薬であるCNQXの灌流によって膜電位蛍光強度が減弱したが、この減弱は坐骨神経結紮群ではさらに減弱させたため、AMPA受容体は神経障害性疼痛において重要な役

割を果たしていると結論した。さらに、NMDA受容体阻害薬であるAPVの灌流によって膜電位蛍光強度変化は対照群と比して結紮群で増強されていた。このことは、坐骨神経結紮によってNMDA受容体を介する興奮性シナプス成分は増強していたことを示し、過去の研究結果と矛盾しないものであった。

一方、AMPA受容体とNMDA受容体の両者を阻害したにもかかわらず、他の興奮性シナプス成分の残余を示す膜電位変化を認め、この膜電位変化は結紮群では対照群と比して有意に増大していたことから、神経障害性疼痛にはAMPA、NMDA以外の興奮性シナプス成分が関与していると考えた。残余する興奮性シナプス成分として、neurokinin 1 (NK1) 受容体やcalcitonin gene-related peptide (CGRP) 受容体などを挙げ、今後の研究でこれらの興奮性シナプス成分の関与を確認する予定とした。

#### **【研究方法の妥当性】**

今回、坐骨神経部分結紮モデルを神経障害性疼痛のモデルとして使用したが、このモデルはSeltzerらによって確立された手法であり、小動物を用いた神経障害性疼痛に関する研究で世界的に広く使用されており、本研究の実施にあたって妥当と判断した。

第1次求心性線維が入力する脊髄後角表層にはAMPA受容体やNMDA受容体といった興奮性シナプス成分が存在する。膜電位感受性色素により染色したマウス脊髄スライス標本における高速イメージングシステムを用いた膜電位記録は、これらの興奮性シナプス成分を阻害する薬剤を灌流させることによって減弱したことから、AMPA受容体およびNMDA受容体の影響を観察する方法として妥当であると考えられる。

#### **【研究結果の新奇性・独創性】**

これまで、神経障害性疼痛の機序を解明するための電気生理学的検討は、whole cell patch clamp記録が主流であったが、この研究法は単一神経細胞における膜電位の記録であった。しかし、今回行った、膜電位感受性色素によって染色したマウス脊髄スライス標本を高速イメージングシステムで観察して膜電位を記録する手法は、脊髄後角表層における変化を視覚的かつ多面的に評価できるという点で画期的な手法であり、末梢神経障害後のAMPA受容体とNMDA受容体を介する興奮性シナプス成分の変化を多面的に捉えたという結果は新奇性・独創性に富んでいると言える。

また、これらの興奮性シナプス成分を阻害した後に残存する膜電位記録を見出し、NK1受容体やCGRP受容体などの他の興奮性シナプス成分が関与しているのではないかという仮説を十分に説明できるものであった。

#### **【結論の妥当性】**

末梢神経障害後の神経障害性疼痛の発症は複雑であり、複数の機序が関与していることが定説となっている。脊髄後角のAMPA受容体およびNMDA受容体の神経障害性疼痛の発症や持続への関与が、これまでの電気生理学的手法によって示唆されてきた。それを高速イメージングシステムによって確認した本研究結果は、過去の研究と矛盾しないものである。さらに、AMPA受容体およびNMDA受容体の阻害後に残存する膜電位変化を認め、他の興奮性シナプス成分が関与している可能

性を見出した。これは神経障害性疼痛の発症に複数の機序が関与しているというこれまでの仮説に矛盾しないものであり、結論は妥当であると判断する。

#### **【当該分野における位置付け】**

高速イメージングシステムを用いて神経障害性疼痛における興奮性シナプス変化を観察する膜電位イメージング法で脊髄における膜電位変化を観察した例は過去にない。本研究法は、従来の単一ニューロンにおけるシナプス変化のみが観察可能であった電気生理学的手法とは異なり、脊髄後角全体におけるシナプス変化が観察可能となっている。今後、さらに詳細な神経障害性疼痛での興奮性シナプス伝達の変化について、このシステムを用いて検索することが可能となり、神経障害性疼痛の発症予防、発症後の治療が確立されていくものと考えられる。この観点から、本研究結果は今後の痛みを呈する疾患の発症機序解明に有用な報告になりえると考えられた。

#### **【申請者の研究能力】**

申請者は、麻酔科学を研鑽したうえで、神経障害性疼痛の診断、評価、治療などの臨床経験も体得し、神経障害性疼痛の機序を解明するために電気生理学的手法や分子生物学的手法等を用いた基礎研究に関与してきた。それらの経験を通して研究遂行に必要な知識や能力は十分に獲得していると判断する。

#### **【学位授与の可否】**

本申請論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該研究分野への貢献度も高いと評価できる。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Dokkyo Journal of Medical Sciences

43 : 51-58, 2016