

---



---

原 著

---



---

In vivo フラビン蛋白自家蛍光イメージング法を用いた  
末梢神経損傷後のマウスにおける大脳皮質一次体性感覚野と  
脊髄後角の経時的な神経活動の違い

番 場 景 子

新潟大学医歯学総合研究科 生体機能調節医学専攻器官制御医学大講座  
麻酔科学分野専攻  
(主任：馬場 洋教授)

Differences in Neural Activity Over time between the Primary Somatosensory  
Cortex and the Spinal Cord Dorsal Horn in Mice after Peripheral Nerve Injury using  
In Vivo Flavoprotein Autofluorescence Imaging

Keiko BAMBА

*Division of Anesthesiology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences  
(Director: Prof. Hiroshi BABA)*

要 旨

慢性疼痛の一つである末梢神経損傷に伴う神経障害性疼痛は難治性であり、この発症には脊髄後角および脳の神経可塑性が重要な役割を果たしていることが報告されている。脊髄後角や大脳皮質一次体性感覚野 (S1) の神経細胞は末梢組織に対する侵害刺激により興奮し、その興奮性は高まる。神経障害性疼痛においても脊髄後角細胞と S1 領域の神経興奮性が高まると考えられている。これらの研究は脊髄後角細胞や S1 領域の神経細胞の興奮性増強が神経障害性疼痛の発症機序であることを示唆しているが、しかし一方でこれらの研究は神経障害性疼痛が完成した後に観察したものであり、脊髄後角細胞や S1 領域の神経細胞の興奮性増強が神経障害性疼痛の機序である証拠にはならない。

今回、我々は坐骨神経部分結紮マウスである SNI (Spared Nerve Injury) モデルマウスを作成し、生きたまま神経活動の二次元的な計測が可能な in vivo フラビン蛋白自家蛍光イメージング法 (flavoprotein autofluorescence imaging; FAI) を用いて、同側脊髄後角と対側の一次感覚大脳皮質 (S1) 領域の蛍光強度と空間分布を測定し、SNI 術後の後肢刺激に対する動物の逃避閾値の変化、同側の脊髄後角細胞や S1 領域の神経細胞の興奮性の経時変化を比較した。

Reprint requests to: Keiko BAMBА  
Division of Anesthesiology, Niigata University  
Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,  
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科  
麻酔科学分野

番 場 景 子

後肢刺激への擦過刺激に対する逃避閾値を von Frey filament を用いて計測したところ、逃避閾値が神経損傷後4日目から低下し、長期間にわたって安定して低下していたのに対し、FAIでは擦過刺激に反応するS1領域の活動は術後4日から漸増する傾向があるものの、統計学的に有意な増加は認めず、21日後に初めて有意な増加を示した。一方、脊髄後角の神経活動は、SNI術後に増加することはなく、低下傾向さえ示した。

これらの結果から、痛みの知覚の第一中継点である脊髄後角の神経活動は、痛みの知覚の高次中枢であるS1領域の神経可塑性とは一致しないことが明らかになった。また、S1領域の興奮性変化と機械的刺激に対する逃避閾値の変化の時間的経過も一致しないことが明らかになった。本研究より、従来考えられてきた末梢神経損傷によって脊髄後角における神経興奮に可塑性変化が生じ、さらにS1領域の興奮性の可塑性変化を伴って神経障害性痛を来すというこれまでの仮説とは異なった新しいメカニズムの存在が示唆された。

キーワード：神経障害性疼痛，フラビンタンパク質自家蛍光イメージング，in vivo イメージング，一次体性感覚野，脊髄後角

## はじめに

末梢神経損傷に伴う神経障害性疼痛は非常に難治性で、患者の生活に重度の社会的障害をもたらすことが知られ、有効な治療法は確立されていない。この神経障害性疼痛の発症や慢性化する病態生理学的メカニズムは未だ明らかではないが、脊髄後角と脳の神経可塑性変化が神経障害性疼痛の発症に重要な役割を果たしていることが示唆されている<sup>1)-3)</sup>。大脳皮質一次体性感覚野(S1)は感覚受容の高次中枢であり、侵害刺激によりS1領域は興奮する<sup>4)5)</sup>。神経障害性疼痛状態ではS1領域の興奮性は増強し、興奮性シナプスの機能的かつ形態的な可塑性変化を来すことがわかっている<sup>6)7)</sup>。一方、脊髄後角におけるin vitro スライスでのパッチクランプ実験では、細胞の種類によっては自発性シナプス後電流の発生頻度が増加すること、及び受動的な膜興奮性が神経障害性疼痛モデルラットでは増強することが示され<sup>8)</sup>、脊髄後角のin vivo パッチクランプ実験においても末梢神経損傷モデルラットでは自発性シナプス後電流の発生頻度が増加することが報告されている<sup>9)</sup>。これらのことから、脊髄後角の神経興奮性もS1と同様に神経障害性疼痛状態では亢進すると考えられている<sup>1)10)</sup>。

神経障害性疼痛の動物モデルとして、坐骨神経を機械的に部分損傷したSpinal Nerve Ligation

(SNL)モデル<sup>11)12)</sup>、Chronic Constriction Injury (CCI)モデル<sup>13)</sup>や本研究で採用したSpared Nerve Injury (SNI)モデル<sup>14)15)</sup>等がある。いずれも、後肢足底の機械的刺激による逃避閾値が神経損傷後に低下し、これが痛みによるものと考えられ、人間の神経障害性疼痛に相当するものと考えられてきた。先に述べたように、末梢神経損傷後には脊髄後角やS1に可塑性変化が起こり、その興奮性が増強し、その結果として機械的刺激による逃避閾値の低下が生じると信じられてきた。しかし、それらの因果関係には確固たる証拠もないのが現状である。

これまで神経細胞の興奮を評価する方法として細胞内記録やパッチクランプなどの電気生理学的手法が用いられてきた。しかしながら、これらの電気生理学的手法では、非常に限られた領域(単一シナプスまたは単一細胞)での神経興奮性を評価しており、神経興奮性の空間的分布に関する情報はほとんど得られない。一方、近年、光学的手法を用いて細胞内Ca<sup>2+</sup>や神経細胞の代謝変動を測定し、in vivoで神経活動を記録する方法が普及してきている<sup>6)16)</sup>。特に、フラビン蛋白自家蛍光イメージング(flavoprotein autofluorescence imaging: FAI)は、他のin vivoイメージング方法と比較して、高い時間的・空間的分解能で神経組織の表層領域における代謝活動のモニタリングを可能にする簡便で低侵襲なイメージング方法であ

る<sup>17)-20)</sup>。このイメージング方法には、多くの利点がある。第一に、外因性蛍光色素の負荷またはトランスジェニックまたは遺伝子送達法を用いたカルシウム感受性蛍光タンパク質 (GCaMP など) の導入を必要とせず、退色に強い<sup>21)</sup>。第二に、二光子レーザー顕微鏡を用いた in vivo イメージングでは、単一のニューロンや特定の性質を持つニューロン群の神経興奮性を観察することができるが、FAI ではニューロンの興奮性の二次元的な空間変化を観察し、神経活動を定量的に測定することができる<sup>22) 23)</sup>。

本研究は FAI を用いて、マウスの坐骨神経損傷後の脊髄後角細胞や大脳皮質一次体性感覚野 (S1) の神経興奮性を経時的に調べ、後肢足底に対する機械的刺激に対する逃避閾値の変化と比較することにより、神経障害性疼痛の発症に対する脊髄後角や大脳皮質一次体性感覚野の可塑性変化の役割を検討した。

## 材料と方法

### 1. 動物

すべての実験は、新潟大学動物実験倫理委員会 (承認番号: 189-4, SA00491) の承認を得て、National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No.80-23, 1996 年改訂版) に準拠して実施した。Charles River Japan (横浜市, 日本) から購入した 6 週齢の雄の C57BL/6 マウスを、一定温度 ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) で 12 時間の明暗サイクルで飼育し、餌と水を自由に摂取させた。使用動物数と苦痛は最小限に止めた。

### 2. Spared Nerve Injury (SNI) モデルマウス

イソフルラン (1-3%) の全身麻酔下に、左大腿中間部に切開を加え坐骨神経を露出・剥離し、左坐骨神経の分枝である左腓腹神経を温存しつつ、左総腓骨神経、左脛骨神経を 6-0 絹糸で結紮し、遠位部を切断、筋層と皮膚を 2 層で閉創した。sham 群として、神経の結紮及び切断を行わずに剥離だけを行い、同様の手順を行った<sup>24) 14)</sup>。

### 3. 後肢逃避反応の機械的閾値の評価

機械的アロディニアを評価するために、von Frey filament を用いて、後肢逃避反応の機械的閾値を測定した<sup>25)</sup>。von Frey filament によって発生する力は 0.008 から 2g の間であった。マウスは試験の 2 日前から試験環境に慣れさせた。マウスは Sham 群 (n=8) と SNI 群 (n=8) に無作為に割り付けた。von Frey 試験は、SNI 手術の 2 日前から術後 3 週間まで施行した。マウスをメッシュ床のある透明なプラスチック製の箱に個別に入れ、30 分間順応させた後、後肢足底の外側 (腓腹神経領域) を刺激した。逃避閾値は、10 回の試行のうち少なくとも 2 回の後肢逃避反応を誘発する最小の力として定義した。

### 4. 大脳皮質一次体性感覚野 (S1) 及び脊髄のフラビン蛋白自家蛍光イメージング

マウスをウレタン (蒸留水中 240mg/mL, 1.65g/kg, 腹腔内投与; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で麻酔し、気管切開を行った。必要に応じてウレタン (0.1~0.2 g/kg, 皮下投与) の追加投与を行った。体温は直腸プローブを用いてモニターし、シリコンゴムヒーターを用いて  $38^\circ\text{C}$  に維持した。S1 における測定では、マウスの頭部に対しリドカイン (アスペンジャパン, 東京, 日本) の皮下注射後、皮膚を切除し、頭蓋骨を露出した。歯科用アクリル樹脂 (スーパーボンド; サンメディカル, 滋賀県, 日本) でマニピュレーターに頭蓋骨を固定後、頭蓋骨表面の乾燥を防いで透明性を維持するために流動パラフィンを薄く塗布した。マウスを暗視下に置き、経頭蓋的に青色励起光 (450-490nm) (pE-100; coolLED, Andover, 英国) を脳表に照射し、ブラシ振動刺激装置 (YOMS530; 新潟県吉野市, 日本) を用いて後肢足底第 5 趾に非侵害刺激 (振幅 0.2 mm, 50Hz, 500ms) を加えた際の脳表より放射される緑色自家蛍光 (500-550nm) を冷却 CCD カメラ (ORCA-Flash 4.0V2, C11440-22CU; 浜松ホトニクス) により撮影した。反応は対側の S1 (図 1A-B) より 1 秒当たり 10 フレームの頻度で撮影した (128×128 ピクセル)。記録は、MetaMorph ソ

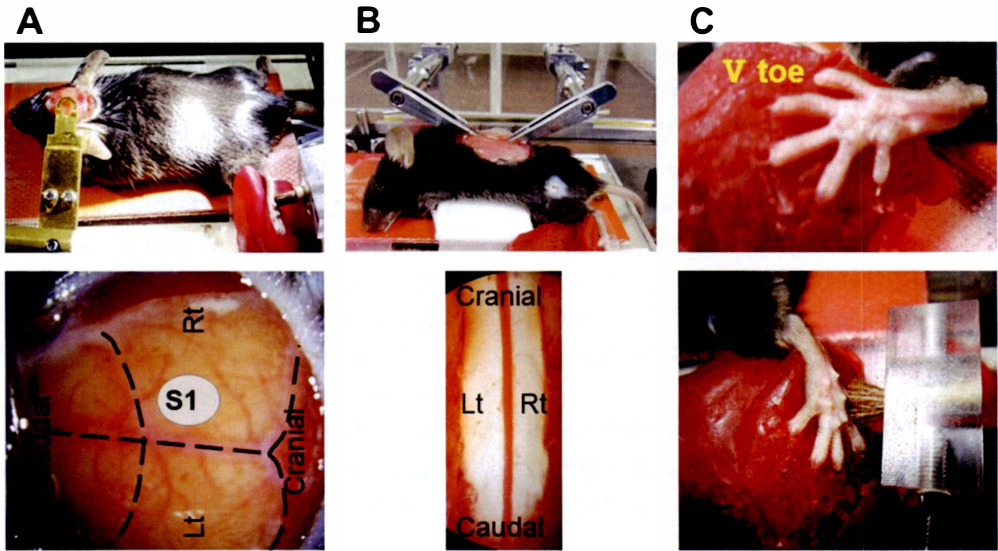


図1

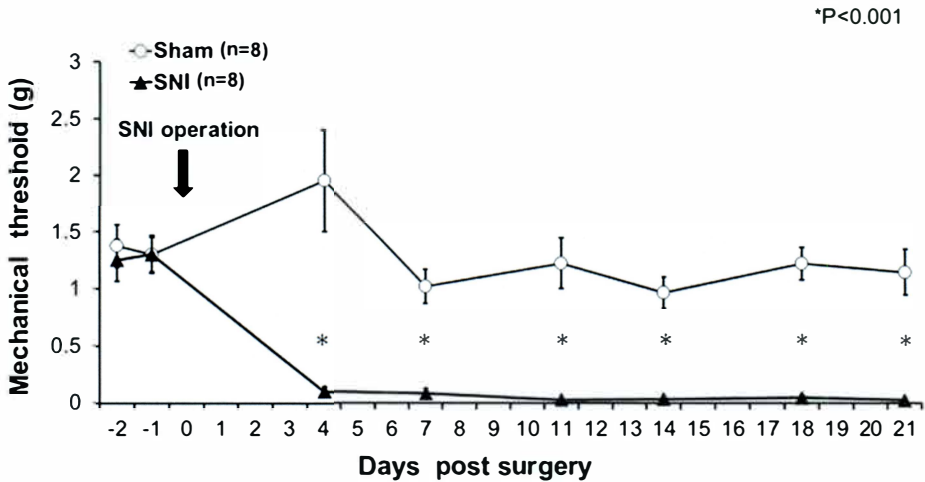


図2

フトウェア (Molecular Devices, San Jose, CA) を用いて 50 秒毎に繰り返して得られた画像データを 30 回施行分加算平均した後、5×5 マトリックス フィルターで平滑化して画質を向上させた。刺激直前の 5 フレームの平均を基準値 ( $F_0$ ) とし、蛍光強度変化率 ( $\Delta F/F_0$ ) を算出し、疑似カラーを表示した。応答振幅は、刺激発生後 0.6~1.0 秒における  $\Delta F/F_0$  の平均値として評価した。 $\Delta F/F_0$  が 0.563 以上の値を示す領域、すなわち局所的な神

経活動の領域を応答領域 (Response Area) と定義し、ピクセル単位で決定した (図3B, 4B 左)。我々の実験環境では、機械的な足底刺激のないマウスでは、自発呼吸時の呼吸運動により  $\Delta F/F_0$  値が  $0.25 \pm 0.03$  程度変動していたため、この変動の 2 倍の値を検出閾値とした。応答領域の信号強度変化率の平均値 (Ave.  $\Delta F/F_0$  in response area) を記録し (図3B, 4B 中央)、平均  $\Delta F/F_0$  変化率と応答領域の大きさの積を面積

強度 (Area Intensity = 応答領域  $\times 10^{-3} \times \Delta F/F_0$  の平均値) と定義した (図 3B, 4B 右). FAI は SNI 手術の 4 日後, 7 日後, 14 日後, 21 日後に実施し, sham 群と比較した. 記録終了後のマウスはイソフルラン過量投与により安楽死させた.

## 5. 統計情報

すべての統計解析は, R のグラフィカルユーザーインターフェースである EZR を用いた (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)<sup>26</sup>). sham 群と SNI 群のマウスからの対応のないデータは Wilcoxon 順位和検定を用いて比較した. 経時変化を比較するために, 行動実験には Friedman の検定を使用し, FAI の応答の評価には Steel の多重比較検定を使用した. von Frey 検定の機械的閾値は離散データであり, 中央値 (四分位間範囲) として表示した. 連続データは平均値  $\pm$  標準偏差として表記した. 統計学的有意差は  $P < 0.05$  と定義した.

## 結 果

### 1. SNI 手術後の後肢逃避反応の機械的閾値の低下

後肢逃避反応の機械的閾値を測定するために, von Frey filament を用いて後肢足底外側 (腓腹神経領域) を刺激した<sup>15) 27)</sup>. 術前の SNI 群の逃避

閾値は 1.0g (1.0-1.55g,  $n=8$ ) であったが, 術後 4 日目に 0.07g (0.035-0.0925 g) まで低下した. 機械的刺激に対する痛覚過敏は, その後の 3 週間を通して安定して持続した (逃避閾値: 術後 (POD) 7, 0.02g [0.008-0.07g]; POD14, 0.02g [0.02-0.0475g]; POD 21, 0.02 g [0.008-0.04 g]).) Sham 群の逃避閾値は, 実験期間を通して変化しなかった (逃避閾値: 研究期間を通して 1.0-1.5g,  $n=8$ ). Friedman の検定により, 機械的逃避閾値の低下は SNI 群では統計的に有意であったが, sham 群では有意ではなかった (sham  $P=0.468$ , SNI  $P < 0.0001$ ; 図 2).

### 2. SNI モデルマウスの S1 領域において神経活動は亢進した

本研究では, SNI 手術後の第 5 趾の非侵害機械的刺激によって誘発される同側 S1 反応の経時的变化を調べた. SNI 側左第 5 趾刺激後, 右 S1 領域の応答領域, 応答領域の信号強度変化率の平均値, 面積強度は術後 4 日目から増加傾向を示したが (図 3A), 統計学的には有意な変化ではなく, 術後 21 日目に初めて有意な増強となった (図 3B). (応答面積 [ $10^3$  pixels]: sham  $0.32 \pm 0.24$ ; POD 4,  $1.21 \pm 0.81$  ( $P=0.95$ ); POD 7,  $2.22 \pm 1.78$  ( $P=0.60$ ); POD 14,  $4.41 \pm 2.25$  ( $P=0.064$ ); POD 21,  $6.26 \pm 5.16$  ( $P=0.0049$ ); 応答面積内の

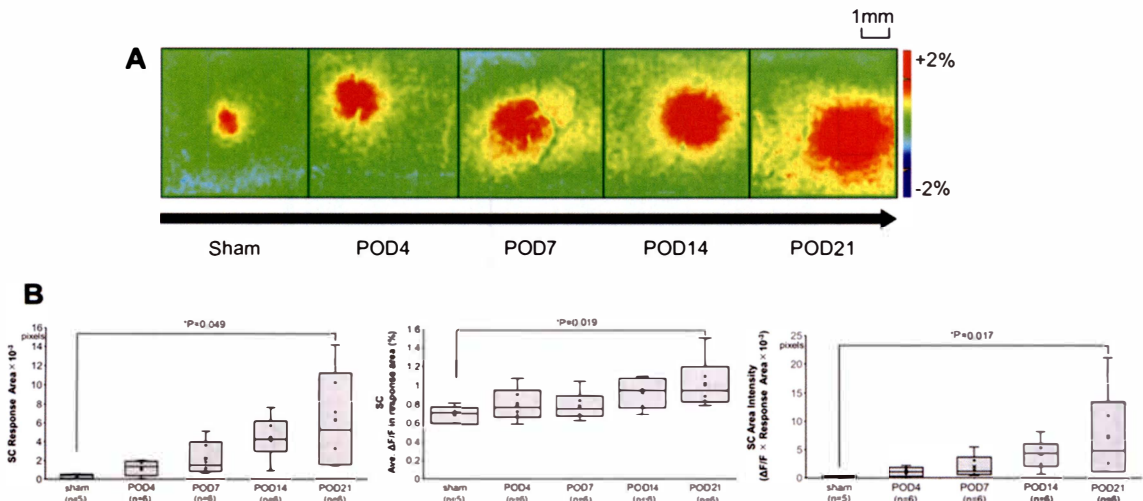


図 3

平均変化率: sham  $0.69 \pm 0.09$ ; POD 4,  $0.80 \pm 0.17$  ( $P=0.70$ ); POD 7,  $0.79 \pm 0.15$  ( $P=0.75$ ); POD 14,  $0.93 \pm 0.16$  ( $P=0.011$ ); POD 21,  $1.02 \pm 0.26$  ( $P=0.019$ ), Area Intensity= 応答面積  $\times \Delta F/F_0$ : sham  $0.23 \pm 0.18$ ; POD 4,  $1.06 \pm 0.83$  ( $P=0.99$ ); POD 7,  $1.95 \pm 1.92$  ( $P=0.86$ ); POD 14,  $4.27 \pm 2.55$  ( $P=0.27$ ); POD 21,  $7.44 \pm 7.78$  ( $P=0.017$ ); ここでのP値はすべてSteelの検定によるShamとの比較; 各群  $n=5-6$ ).

**3. SNI 術後の背側脊髄において神経活動の増加は認められない**

S1領域での測定と同様に, SNI手術後4日目, 7日目, 14日目, 21日目のマウスの脊髄の蛍光強度値を測定し, Shamマウスと比較した. 我々の予想に反して, S1での測定結果とは異なり, 神経損傷後の後肢刺激に应答する脊髄後角の神経活動の面積および強度は, いずれも経時的な増強変化は認めず, 統計学的な有意差はないものの, むしろ減少傾向を示した(図4A). (応答面積[ $10^3$  pixels]: sham  $0.59 \pm 0.31$ ; POD 4,  $0.32 \pm 0.20$  ( $P=0.16$ ); POD 7,  $0.33 \pm 0.11$  ( $P=0.21$ ), POD 14,  $0.33 \pm 0.27$  ( $P=0.21$ ); POD 21,  $0.26 \pm 0.13$  ( $P=0.062$ ); 応答面積内の平均変化率: sham  $0.89 \pm 0.06$ ; POD 4,  $0.83 \pm 0.11$  ( $P=0.73$ ); POD 7,  $0.81 \pm 0.06$  ( $P=0.59$ ); POD 14,  $0.83 \pm$

$0.15$  ( $P=0.75$ ); POD 21,  $0.77 \pm 0.08$  ( $P=0.15$ ); 面積強度 = 応答面積  $\times \Delta F/F_0$ : sham  $0.53 \pm 0.30$ ; POD 4,  $0.28 \pm 0.20$  ( $P=0.17$ ); POD 7,  $0.28 \pm 0.11$  ( $P=0.19$ ); POD 14,  $0.31 \pm 0.28$  ( $P=0.28$ ); POD 21,  $0.20 \pm 0.11$  ( $P=0.054$ ) (図4B); P値は, Steelの検定によるShamとの比較; 各群の  $n=5-6$ )

**考 察**

本研究の結果ら, SNI手術後4日目の早期から後肢への機械的刺激に対する逃避閾値が明らかに低下し, 少なくとも21日までは安定して低下することが明らかになった. 一方, S1領域の興奮性は術後4日目から急激に増強することではなく, 術後21日目に初めて統計学的に有意な増強を示した. 脊髄後角の興奮性は術後, 少なくとも21日までは有意な変化を示さず, むしろ若干の減弱傾向を認めるのみであった.

**1. 末梢神経損傷後, S1領域の神経活動は経時的に漸増する**

我々は, 痛みによる行動とS1領域の神経興奮は並行していると考えていた. しかし, 本研究では, SNI手術後4日目から機械的逃避閾値の低下が一定に維持されていたにも関わらず, 対側の

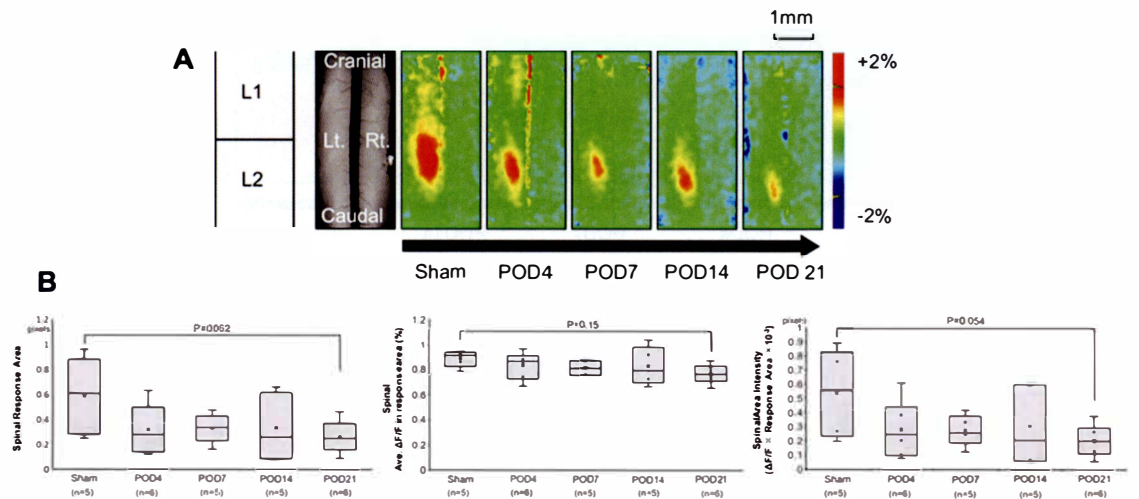


図4

S1 領域の神経活動は 21 日目まで経時的に増強することが明らかになった。今までのところ、神経障害性疼痛は S1 領域を含む感覚神経系の可塑性が関係していると考えられている。末梢神経損傷により S1 領域においてシナプスが形態学的な変化を起こすことが報告されている<sup>7)28)</sup>。また、一過性の脊髄虚血によって誘導された神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、術後 14 日までの間、S1 ニューロンの自然発火が時間経過とともに増加しており<sup>29)</sup>、機能的な変化も起きていると考えられる。今回の研究では、神経細胞の興奮性だけでなく、応答領域の面積も増加していることが明らかとなった。この現象は、いくつかの神経障害性疼痛モデルにおける受容野の拡大に寄与している可能性がある。我々の研究では、神経損傷後の神経細胞の興奮性 ( $\Delta F/F_0$ ) の経時変化は、応答面積の大きさの変化よりも小さかった。臨床現場においても、複雑性局所疼痛症候群 2 型 (CRPS-type2) を含む末梢神経障害性疼痛患者では神経損傷後に末梢の痛覚過敏領域あるいはアロディニア領域が拡大することがある。今回、神経損傷後の S1 領域の反応野が拡大していることが見いだされたことから、神経障害性疼痛の患者ではこの現象を反映している可能性があると考えられる。しかし一方で、本研究の結果は、後肢への機械的刺激に対する逃避閾値の低下と S1 領域の興奮性の変化の経時的変化は明らかに異なることを示している。機械的刺激に対する逃避閾値の低下を痛みの増強と考えて良いと仮定するならば、S1 における興奮性の増強は必ずしも痛みの増強を反映していないことになる。痛みは、感覚と言う側面だけではなく、感情・情動の変化を伴って、初めて痛みという感覚になる。大脳皮質感覚野の興奮性の増強を持って痛みの増強と考えるのは危険である。S1 領域の興奮性の増強だけでは必ずしも痛みの増強を説明できるメカニズムでないとと言える。本研究では、動物の疼痛行動と S1 領域の興奮性の変化は同様の経時的変化を示さないことを明らかにした。このことから、S1 領域の興奮性の増強だけでは痛みの増強を判断できないといえる。

## 2. 末梢神経損傷後、脊髄後角の神経活動は時間経過とともに増強せず、むしろ減弱する

脊髄後角における神経障害性疼痛モデルの神経可塑性を調査した先行研究では、神経損傷後に自発的なシナプス後電流の発生頻度が増加すること<sup>8)9)</sup>や細胞の種類によっては発火特性が変化することが報告されている<sup>8)9)</sup>。また、抑制性シナプス伝達の減弱も報告されている<sup>30)</sup>。しかし、これらの報告は末梢神経損傷後に、末梢組織の刺激による後角細胞の反応が増強していることを直接的に示したものではない。我々の研究では、刺激にตอบสนองして神経細胞の興奮性を示す FAI の応答領域の大きさは末梢神経損傷後の脊髄では変化せず、むしろ時間の経過とともに減少する傾向にあった。

本研究の結果である SNI 術後の後肢刺激に対する脊髄背側の神経活動が変化していない、あるいは減少しているという現象の一つの説明として、FAI が抑制性ニューロンの活動性を反映している可能性が考えられる。末梢神経損傷後の脊髄後角の抑制性介在ニューロンの数が減少し、GABA による興奮性の抑制が減弱するという報告がある<sup>31)</sup>。対照的に、いくつかの研究では、GABA 作動性ニューロンを含む神経細胞の喪失は末梢神経損傷後には起こらないことを証明している<sup>32)–34)</sup>。両者を考慮すれば、末梢神経損傷後の抑制性介在ニューロンの喪失は全く起こらないか、あるいは起こったとしてもごくわずかと考えるのが妥当である。本研究における FAI で見ている脊髄後角浅層部の大多数 (約 70%) は興奮性介在ニューロンであり<sup>35)36)</sup>、抑制性ニューロンの喪失の影響は例えあったとしても、FAI に対する影響はほとんどないと考えられる。従って、FAI が脊髄では変化せず、むしろ時間の経過とともに減少する傾向にあると考えるべきである。

## 3. 動物の疼痛行動と S1 及び脊髄後角細胞の興奮性について

手術後の痛みのような侵害受容性疼痛は末梢の侵害受容器で活動電位が発生し、それが脊髄後角の侵害受容ニューロンを興奮させ、それが上位中

枢である脳のS1や辺縁系(情動系)を賦活することにより、痛みとして認知される。局所麻酔薬による末梢神経ブロックや脊髄へのオピオイド等の投与により、脊髄後角の侵害ニューロンの興奮を抑制すれば、その上位中枢である大脳感覚野や辺縁系の反応が消失し、痛み感覚も消失する。すなわち、脊髄後角の侵害受容ニューロンの興奮が侵害受容性疼痛の原因になっている。一方、神経障害性疼痛では、末梢の侵害受容器の興奮もなく、脊髄後角細胞の興奮性増加を伴わずに、疼痛行動が発生する。しかも、その疼痛行動の経時的変化はS1領域の興奮性とも時間経過が一致しない。

これまで、長い間、多くの研究者が直接的な証拠がないにもかかわらず、神経障害性疼痛は脊髄後角細胞の興奮性の増加とS1領域の興奮性の増加が神経障害性疼痛を発生させるメカニズムと考えてきた。本研究はその考え方に異論を唱えるものである。

## 結 語

本研究では、末梢神経損傷モデルマウスにおいて、脊髄後角の興奮性は変化していないか、あるいは低下傾向であるにも関わらず、S1領域の興奮性が徐々に増加していることを示した。さらに、S1領域の興奮性の増加と動物の痛み行動が一致しないことからS1領域の興奮性の増加が動物の痛み行動の原因ではない可能性が考えられる。本研究はこれまで信じられていた脊髄後角細胞やS1領域の興奮性増強が必ずしも神経障害性疼痛を直接反映するものではなく、他の機序が存在することを示唆するものである。

## 謝 辞

本研究に際しご指導を賜りました新潟大学医歯学総合研究科麻酔科学分野の馬場洋教授、紙谷義孝准教授、佐々木美佳先生、魚沼基幹病院の渡部達範先生に厚く御礼申し上げます。

## 参 考 文 献

- 1) Ji RR, Kohno T, Moore KA and Woolf CJ: Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms?. *Trends Neurosci* 26: 696-705, 2003.
- 2) Woolf CJ and Salter MW: Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288: 1765-1769, 2000.
- 3) Zhuo M: Neuronal mechanism for neuropathic pain. *Mol Pain* 3: 14, 2007.
- 4) Hjernevik T, Jacobsen LM, Qu H, Bjaalie JG, Gjerstad J and Willoch F: Metabolic plasticity in the supraspinal pain modulating circuitry after noxious stimulus-induced spinal cord LTP. *Pain* 140: 456-464, 2008.
- 5) Wang Z, Bradesi S, Maarek JM, Lee K, Winchester WJ, Mayer EA and Holschneider DP: Regional brain activation in conscious, unrestrained rats in response to noxious visceral stimulation. *Pain* 138: 233-243, 2008.
- 6) Eto K, Wake H, Watanabe M, Ishibashi H, Noda M, Yanagawa Y and Nabekura J: Inter-regional contribution of enhanced activity of the primary somatosensory cortex to the anterior cingulate cortex accelerates chronic pain behavior. *J Neurosci* 31: 7631-7636, 2011.
- 7) Kim SK, Kato G, Ishikawa T and Nabekura J: Phase-specific plasticity of synaptic structures in the somatosensory cortex of living mice during neuropathic pain. *Mol Pain* 7: 87, 2011.
- 8) Balasubramanyan S, Stemkowski PL, Stebbing MJ and Smith PA: Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol* 96: 579-590, 2006.
- 9) Uta D, Kato G, Doi A, Andoh T, Kume T, Yoshimura M and Koga K: Animal models of chronic pain increase spontaneous glutamatergic transmission in adult rat spinal dorsal horn in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 512: 352-359, 2019.
- 10) Xing GG, Liu FY, Qu XX, Han JS and Wan Y:



- Long-term synaptic plasticity in the spinal dorsal horn and its modulation by electroacupuncture in rats with neuropathic pain. *Exp Neurol* 208: 323-332, 2007.
- 11) Kim SH and Chung JM: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-363, 1992.
  - 12) Chung JM, Choi Y, Yoon YW and Na HS: Effects of age on behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *Neurosci Lett* 183: 54-57, 1995.
  - 13) Bennett GJ and Xie YK: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87-107, 1988.
  - 14) Decosterd I and Woolf CJ: Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87: 149-158, 2000.
  - 15) Shields SD, Eckert WA and 3rd, Basbaum AI: Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *J Pain* 4: 465-470, 2003.
  - 16) Scott Benjamin B, Thiberge Stephan Y, Guo Caiying, Tervo D Gowanlock R, Brody Carlos D, Karpova Alla Y and Tank David W: Imaging Cortical Dynamics in GCaMP Transgenic Rats with a Head-Mounted Widefield Microscope. *Neuron* 100: 1045-1058. e1045, 2018.
  - 17) Jongen JL, Pederzani T, Koekkoek SK, Shapiro J, van der Burg J, De Zeeuw CI, Huygen FJ and Holstege JC: Autofluorescent flavoprotein imaging of spinal nociceptive activity. *J Neurosci* 30: 4081-4087, 2010.
  - 18) Onishi T, Watanabe T, Sasaki M, Kamiya Y, Horie M, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Takebayashi H, Baba H and Shibuki K: Acute spatial spread of NO-mediated potentiation during hindpaw ischaemia in mice. *J Physiol* 597: 3441-3455, 2019.
  - 19) Shibuki K, Hishida R, Murakami H, Kudoh M, Kawaguchi T, Watanabe M, Watanabe S, Kouuchi T and Tanaka R: Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J Physiol* 549: 919-927, 2003.
  - 20) Watanabe T, Sasaki M, Komagata S, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Baba H and Shibuki K: Spinal mechanisms underlying potentiation of hindpaw responses observed after transient hindpaw ischemia in mice. *Sci Rep* 5: 11191, 2015.
  - 21) Kubota Y, Kamatani D, Tsukano H, Ohshima S, Takahashi K, Hishida R, Kudoh M, Takahashi S and Shibuki K: Transcranial photo-inactivation of neural activities in the mouse auditory cortex. *Neurosci Res* 60: 422-430, 2008.
  - 22) Tohmi M, Kitaura H, Komagata S, Kudoh M and Shibuki K: Enduring critical period plasticity visualized by transcranial flavoprotein imaging in mouse primary visual cortex. *J Neurosci* 26: 11775-11785, 2006.
  - 23) Llano DA, Theyel BB, Mallik AK, Sherman SM and Issa NP: Rapid and sensitive mapping of long-range connections in vitro using flavoprotein autofluorescence imaging combined with laser photostimulation. *J Neurophysiol* 101: 3325-3340, 2009.
  - 24) Bourquin AF, Suveges M, Pertin M, Gilliard N, Sardy S, Davison AC, Spahn DR and Decosterd I: Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain* 122: 14 e11-14, 2006.
  - 25) Amaya F, Samad TA, Barrett L, Broom DC and Woolf CJ: Periganglionic inflammation elicits a distally radiating pain hypersensitivity by promoting COX-2 induction in the dorsal root ganglion. *Pain* 142: 59-67, 2009.
  - 26) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48: 452-458, 2013.
  - 27) Smith AK, O'Hara CL and Stucky CL: Mechanical sensitization of cutaneous sensory fibers in the spared nerve injury mouse model. *Mol Pain* 9: 61, 2013.
  - 28) Kim SK and Nabekura J: Rapid synaptic

- remodeling in the adult somatosensory cortex following peripheral nerve injury and its association with neuropathic pain. *J Neurosci* 31: 5477-5482, 2011.
- 29) Xiong W, Ping X, Ripsch MS, Chavez GSC, Hannon HE, Jiang K, Bao C, Jadhav V, Chen L, Chai Z, Ma C, Wu H, Feng J, Blesch A, White FA and Jin X: Enhancing excitatory activity of somatosensory cortex alleviates neuropathic pain through regulating homeostatic plasticity. *Sci Rep* 7: 12743, 2017.
- 30) Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H and Woolf CJ: Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 22: 6724-6731, 2002.
- 31) Inquimbert P, Moll M, Latremoliere A, Tong CK, Whang J, Sheehan GF, Smith BM, Korb E, Athie MCP, Babaniyi O, Ghasemlou N, Yanagawa Y, Allis CD, Hof PR and Scholz J: NMDA Receptor Activation Underlies the Loss of Spinal Dorsal Horn Neurons and the Transition to Persistent Pain after Peripheral Nerve Injury. *Cell Rep* 23: 2678-2689, 2018.
- 32) Polgár E, Gray S, Riddell JS and Todd AJ: Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain* 111: 144-150, 2004.
- 33) Polgar E, Hughes DI, Arham AZ and Todd AJ: Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci* 25: 6658-6666, 2005.
- 34) Polgar E and Todd AJ: Tactile allodynia can occur in the spared nerve injury model in the rat without selective loss of GABA or GABA (A) receptors from synapses in laminae I-II of the ipsilateral spinal dorsal horn. *Neuroscience* 156: 193-202, 2008.
- 35) Todd AJ and Sullivan AC: Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 296: 496-505, 1990.
- 36) Todd Andrew J: Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11: 823-836, 2010.

(令和2年6月4日受付)

---