

	おがわ まゆみ
氏名	小川 真有美
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第1197号
学位授与の日付	平成19年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Iteration of high-frequency stimulation enhances long-lasting excitatory responses in the spinal dorsal horn of rats: Characterization by optical imaging of signal propagation (ラット脊髄後角における高頻度刺激の反復による持続性興奮応答の増強—シグナル伝搬の光学画像による解析—)
論文審査委員	主査 教授 澁木 克栄 副査 教授 馬場 洋 副査 教授 遠藤 裕

博士論文の要旨

<はじめに>

慢性疼痛患者におけるアロディニアや痛覚異常の発生機序の一つとして脊髄神経機能の可塑的变化が注目されており、末梢からの過度の入力が脊髄後角におけるシナプス伝達効率を変化させ、それが異常痛覚伝達を誘発している可能性が示唆されている。過剰な神経興奮による痛覚伝達の異常がシナプス伝達効率の変化を伴うとすれば、興奮伝達の強度や広がりに変化が起これると予想される。本研究では、成熟ラット脊髄スライス標本に膜電位感受性色素を用いた神経興奮の画像解析法を適用し、過剰な刺激の繰り返しが後角の局所興奮伝搬にどのような影響を及ぼすかを検索した。また、脊髄での痛覚伝達に関与していると言われているグルタミン酸受容体やNK1受容体の役割についても検討した。

<方法>

週齢6-8週の雄性成熟ラットからウレタン麻酔下 (2000mg/kg、腹腔内投与) にて脊髄腰仙部を切り出し、厚さ650 μ mの後根付き脊髄横断スライス標本を作製し、膜電位感受性色素RH-414にて5分間染色した。スライス標本をチャンバー内に固定し、混合ガス (95% O₂-5% CO₂) で酸素化したクレブス液で灌流した。後根の電気刺激によって生じたスライスの蛍光強度変化を高速カメラで記録して、これをフジフィルム社製差分画像イメージプロセッサ (HR Deltaron 1700) を用い解析することによって、脊髄後角細胞の膜電位画像を得た。刺激条件は、シングルパルス刺激 (刺激電流 2.5 mA、刺激時間 0.5 ms)、高頻度刺激 (刺激電流 2.0 mA、刺激時間 0.1 ms、100 Hzで30パルス) とし、高頻度刺激は、10分間隔で3回繰り返した。スライスへの薬物の投与は、AMPA受容体拮抗薬CNQX (10 μ mol/L)、NMDA受容体拮抗薬CPP (10 μ mol/L) やNK1受容体拮抗薬L-703,606 (5 μ mol/L) のいずれかを灌流液に添加することによって行い、1回目の刺激の5分前から3回目の刺激に対する応答の観察が終了するまで投与を続けた。

<結果>

脊髄後根にシングルパルス刺激を与えると、まず、後角第Ⅱ-Ⅲ層の局所に興奮が誘発され、数msで第Ⅱ層全体やより深層に広がったのち、数十msで消失した。この反応はCNQXにより抑制されたが、CPPやL-703,606によっては抑制されなかった。高頻度刺激を行うと、後角第Ⅱ層を中心に数秒間持続する脱分極応答が得られた。10分後に再度同じ刺激を繰り返すと、興奮応答は増強し、第Ⅱ層のみならず、第Ⅰ層や深層へと広がるのが観察された。さらに、10分後に3回目の高頻度刺激を行うと、興奮応答はさらに増強し興奮の伝搬する領域も拡大した。これら高頻度刺激の繰り返しによる興奮応答の増強と領域の拡大はCNQXの存在下でもみられたが、CPPおよびL-703,606存在下では観察されず、とくにL-703,606存在下では興奮領域の減少が認められた。

<考察>

シングルパルス刺激による後角第Ⅱ-Ⅲ層の局所の初期興奮応答は、脊髄内A線維及びその終末の活動電位で、その後の第Ⅱ層全体とより深層に広がった興奮はA-、C線維からの入力によるシナプス後電位応答を表すと考えられ、従来からの応答潜時等の観察に一致する。

高頻度刺激では神経終末からの興奮性神経伝達物質が多量に放出され、持続性応答を誘起すると考えられる。とくに、C線維終末から放出されるサブスタンスPは数百msから数分という持続性の膜脱分極を誘起することが知られており、サブスタンスPが高頻度刺激による広範囲の興奮伝搬に重要な役割を果たしている可能性がある。一方、高頻度刺激の繰り返しにより持続性興奮が増強・拡大する現象の詳細な機序は不明であるが、この可塑的応答変化に対する拮抗薬の作用から、増強・拡大には通常興奮性シナプス伝達に関わるAMPA受容体は関与せず、NMDA受容体とNK1受容体の両者の活性化が協同的に関与していることが示唆された。現段階ではこの現象の臨床的意味は明確ではないが、強い疼痛刺激の後に痛みの感受性が高まり、疼痛領域が拡大するという痛みの感作現象に関与する可能性が高いと思われる。

(論文審査の要旨)

慢性疼痛におけるアロディニアや痛覚異常の機序として、過度の末梢入力
が脊髄後角におけるシナプス伝達効率を変化させ、異常痛覚を誘発する可
能性がある。本論文では、ラット脊髄スライス標本に膜電位感受性色素を用
いた神経興奮の光学的解析を適用し、過剰な刺激の繰り返しが脊髄後角の局
所興奮伝搬に及ぼす影響を解析した。脊髄後根に単発刺激を与えると、ま
ず、後角第Ⅱ・Ⅲ層の局所に興奮が誘発され、数ミリ秒で第Ⅱ層全体やより
深層に広がった後、数十ミリ秒で消失した。この応答は non NMDA グル
タミン酸受容体阻害剤の CNQX により抑制されたが、NMDA 受容体阻
害剤の CPP やサブスタンス P 受容体阻害剤の L-703.606 では抑制され
なかった。高頻度刺激を行うと、後角第Ⅱ層を中心に数秒間持続する光
学的応答が得られた。10分後に再度同じ刺激を繰り返すと、応答は増
強し、第Ⅱ層のみならず、第Ⅰ層や深層へと広がるのが観察された。さ
らに、10分後に3回目の高頻度刺激を行うと、応答はさらに増強した。
これら高頻度刺激の繰り返しによる応答の増強は CNQX の存在下でもみ
られたが、CPP および L-703.606 存在下では観察されなかった。この
脊髄後角応答の増強は、強い疼痛刺激の後に痛みが感作される現象に関
与する可能性があり、この点に学位論文としての価値を認める。