

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460733

研究課題名(和文) ボツリヌス毒素の脊髄後角における鎮痛作用機序の解明

研究課題名(英文) Antinociceptive mechanisms of botulinus toxin on chronic pain

研究代表者

吉村 恵 (Yoshimura, Megumu)

熊本保健科学大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：10140641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ボツリヌス毒素は世界最強の毒素であるが、臨床的に筋や関節の拘縮、痙性斜頸、脳性麻痺の治療などに効果を示す。最近、ボツリヌス毒素によって慢性疼痛が緩和される報告が多く見られる。しかし、その作用機序および作用部位は明らかではない。そこで本研究では慢性炎症疼痛モデルラットを用い、脊髄後角細胞からパッチクランプ記録を行い、毒素の鎮痛作用機序と作用部位を明らかにすること目的とした。慢性炎症モデルに毒素を投与したものと非投与群から脊髄スライスに後根を付した標本作製し、シナプス応答を比較検討した。その結果、ボツリヌス毒素投与群では痛みを脊髄に伝えるC線維の応答が選択的に抑制されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Botulinus toxin is a useful chemical for releasing contraction of muscles and joints, cerebral palsy and torticollis. Recently, there are numerous reports concerning the effectiveness of botulinus toxin on chronic pain. However, its mechanisms and sites of action have not been clarified yet. In the present study, we used slice preparations of the spinal cord which retained a dorsal root obtained from chronic pain rat models by injection of CFA in the hind limb plantar. Stimulation of the dorsal root elicited a A-delta and/or C afferent evoked EPSCs which carried nociceptive information monosynaptically to the spinal substantia gelatinosa. In rats which were injected with toxin, relatively small amplitude of C afferent evoked EPSCs than that of A-delta evoked one were observed, suggesting that the toxin might be taken up in the C afferent terminals and orthodromically transported to the central C afferent terminals to reduce transmitter release.

研究分野：神経科学

キーワード：伝達物質放出 ボツリヌス毒素 痛覚伝達 慢性疼痛 脊髄スライス標本 パッチクランプ記録 脊髄後角

1. 研究開始当初の背景

- (1) ボツリヌス毒素はボツリヌス菌が産生する毒素で、世界で最強と言われている。しかしその作用から筋肉の痙縮や関節の拘縮などの治療に、また、脳性麻痺や斜頸の治療などに広く用いられている。これらの作用は全て神経筋接合部におけるアセチルコリン分泌抑制によって誘起されるが、ボツリヌス毒素はそれ以外にも働き、シナプス伝達を阻害する可能性が示唆されてきた。その一つとして感覚神経終末からの伝達物質放出阻害作用である。その結果痛みの伝達にも何らかの作用がある事が示唆されてきた。
- (2) その考えに伴い最近、臨床的に慢性疼痛の治療に効果があることが多く報告され注目を集めているが、その作用機序および作用部位に関しては未だ不明である。

2. 研究の目的

- (1) ボツリヌス毒素によって慢性疼痛が抑制を受けるか否かを行動学的に明らかにするため、慢性炎症モデルを用いてその作用を調べた。
- (2) 次に、慢性疼痛モデルラットにおいてボツリヌス毒素の鎮痛作用機序を明らかにするため慢性炎症モデルラットの足底に投与したボツリヌス毒素の作用を、モデルラットから作製したスライス標本を用いてその作用機序を明らかにする。
- (3) スライス標本を用いてえられた実験結果から毒素が末梢感覚神経に作用して痛みを

抑制しているのか、それとも中枢側に働いて作用をしているかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 先ず、雄性SDラット足底にフロイドアジュバント(CFA)を皮下に投与して慢性炎症モデルを作製した。以前の実験からラット足底にCFAを投与したラットでは4週間以上の痛覚過敏が惹起される事を明らかにしてきた。ボツリヌス毒素の作用も正常ラットではその変化をとらえる事が困難であると考え、慢性炎症モデルを用いて鎮痛作用を示すかを調べた。CFAを後肢皮下に投与すると著名な浮腫が起こり、約10日後には消退して行った。しかし、von Frey hairで調べると明らかな痛覚過敏を長期に渡って呈した。CFA投与後3日目に同じ部位にボツリヌス毒素を1、3、10単位投与したラットを作製した。10単位投与したラットでは時に体重の減少が見られ、また運動機能も高度に障害された事から、本実験では1および3単位のボツリヌス毒素を用いて検討した。
- (2) 慢性疼痛モデルラットとそれに加えてボツリヌス毒素を投与したラットの行動学的な差違を調べるため、von Frey hairを用いて痛覚過敏に変化があるか否かを調べ、ボツリヌス毒素が明らかな慢性疼痛抑制作用を示すかをしらべた。また、CFAによって惹起された浮腫がボツリヌス毒素によって減弱されるかもあわせて調べた。それはボツリヌス毒素が末梢に働いてその作用をあらわしている可能性を否定するためである。
- (3) 効果が見られたラットの腹腔内にウレタンを投与し、深麻酔下にラミネクトミーを

行い、脊髄を取り出した。ボツリヌス毒素投与側と同側の L4~L5 の後根を一本残し、他の全ての後根と前根を切除した。一本残した後根の周囲をのぞいてクモ膜と軟膜を丁寧に除去した。寒天上に設けた溝に脊髄をおき、スライサーによって脊髄横断スライスに後根を付した標本作製し、記録用のチェンバーに設けたナイロンネットに置き、スライスの両面を酸素付加したクレブス液で持続的に灌流した。この状態では 10 時間以上に渡ってスライスを良い状態に保っておく事が可能であった。また、単一細胞から 4 時間に及び安定したパッチクランプ記録を行う事が出来た。後根は吸引電極を用いて刺激を行い、刺激を行っている線維の同定には刺激強度とその伝導速度から行った。末梢からの痛み情報が伝えられる後角膠様質細胞からパッチクランプ記録を行い、後根刺激によって誘起されたシナプス応答を比較検討した。シナプス応答が単シナプス応答であるか否かの同定には後根を 20 Hz で頻回刺激して、潜時が変化しない事、failure が見られない事をクライテリアとした。また、C 線維のケースでは 2 Hz で刺激しても failure が起こらない事を指標に行った。

4 . 研究成果

(1) 行動学的に痛覚過敏の程度を調べるためラット足底に von Frey hair を用いて刺激を加え、後肢を引っ込めるまでの時間を測定した。本実験では明らかにボツリヌス毒素を投与したラットにおいて、足を引っ込めるまでの時間が延長しており、痛覚過敏が軽減された事を示す所見と考えられた。この痛覚抑

制作用は濃度依存的であった。ボツリヌス毒素投与によって後肢に惹起された浮腫については何ら変化が見られなかった。この事はボツリヌス毒素が炎症そのものには何ら作用を示さない事を示唆した。

(2) 行動学的に痛覚過敏を示したラットとボツリヌス毒素によって痛覚過敏を示したラット膠様質細胞からパッチクランプ記録を行うと全ての細胞で興奮性と抑制性の自発性シナプス応答が記録された。それらはおのこのグルタミン酸と、抑制性では GABA または glycine が伝達物質であった。-70 mV で記録を行うと EPSC のみが観察され、IPSC は観察されない。これは-70 mV がクロライドの逆転電位であるためである。事実、この膜電位ではグルタミン酸による EPSC を CNQX でブロックすると如何なるシナプス応答も観察されなかった。次に後根を刺激して誘起されるシナプス応答を比較検討した慢性炎症ラット膠様質細胞では A-delta および C 線維の刺激によって EPSC が惹起されたがその振幅には大きな相違は見られず統計学的な解析においても有意差はなかった。ボツリヌス毒素を投与したラットでは濃度依存性に C 線維誘起のシナプス応答の振幅の減少がみられ、A-delta 誘起の EPSC の振幅と比較して有意に小さかった。測定に CFA を投与して脊髄後角における c-Fos の発現分布を見るとほぼ内側に位置しており、外側の膠様質には陽性細胞は非常に少なかった。これは足底からの感覚情報が膠様質内側に終末している事を意味している。そこで、記録を内側と外側から別々に行う炉内側の細胞では C 線維誘起の EPSC の振幅が減

少していたが、外側の細胞ではそのような変化は見られなかった。次いで、運動系の異常が見られるか否かを調べるためローターテストおよびトレッドミル実験も併せて行ったが、運動系に関しても一時的に有意な差がみられた。しかし、その作用は投与初期にのみ観察され、その後は明らかな変化は見られなくなった。

(3) 後肢に起こった浮腫に対しては何ら作用を示さなかった結果からボツリヌス毒素は末梢感覚神経にはあまり作用がなく、感覚神経に取り込まれ順行性に感覚神経脊髄側に運ばれ、終末からのグルタミン酸の放出を抑制している可能性が示唆された。しかしながら運動系に対してはある程度の作用を示す事から、痛覚過敏の抑制が運動機能の低下によっている可能性も否定できない。ただ、運動機能は回復しているにも拘らず痛覚過敏の程度は減少している事を考えると運動系が主ではなく感覚情報伝達に対して何らかの作用を示し、それによって痛覚過敏を抑制している事が示唆された。

5. 考察

痛みは A-delta 線維と無髄の C 線維によって運ばれるが、慢性の疼痛には主に C 線維が関与していると考えられており、今回ボツリヌス毒素によって C 線維による情報伝達が選択的に抑制されている実験結果は早い、限局性の痛みの伝達には関与せず、慢性の痛みに対して特異的に働く可能性が示唆されており、今後実験を進める事によって末期ガンの痛みや神経因性疼痛の治療などにも使用される可能性を秘めている。

5. 主な発表論文等

(学会発表)(計1回)

第13回整形外科痛みを語る会、特別講演

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 恵 (YOSHIMURA, Megumu)

熊本保健科学大学、大学院保健科学

研究科・教授

研究者番号：10140641

(3) 研究分担者

申 敏哲 (SHIN, Minchul)

熊本保健科学大学、リハビリテーショ

ン科・准教授

研究者番号：70596452