

硬膜外脊髄電気刺激の除痛機序：末梢神経損傷モデルにおける脳脊髄液中の神経伝達物質におよぼす影響

蔵 昌 宏

近畿大学医学部麻酔科学教室

抄 録

硬膜外脊髄電気刺激療法 (SCS) は、神経因性疼痛をはじめとした慢性難治性疼痛に対する有効な治療方法の一つであるが、その除痛機序には不明な点が多い。そこで、SCS によって脳脊髄液中に放出されるアミン代謝物やアミノ酸からなる神経伝達物質を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて定量分析し、SCS の除痛機序について検討した。研究には、Sprague-Dawley 系雄性ラットを用い、はじめに無麻酔、無拘束下での坐骨神経部分結紮モデル (PSNL ラット) とシャムラット (対照ラット) における脳脊髄液中の神経伝達物質の相違について、ついで PSNL ラットを用いて、SCS 施行による神経伝達物質の変化を検討した。その結果、PSNL ラットでは対照ラットと比較して 5-hydroxytryptophan (5HTP), tyrosine (TYR) 濃度は有意に高く、norepinephrine (NE) 濃度と norepinephrine (NE)/dopamine (DA) 比は有意に低かった。SCS によって、NE, 5-hydroxyindole acetic acid (5HIAA) 濃度の有意な増加と NE/DA 比の有意な上昇を認めた。また、PSNL ラットは対照ラットと比較して、興奮性アミノ酸 (aspartate: ASP, glutamate: GLU) 濃度と抑制性アミノ酸 (glycine: GLY, γ -amino butiric acid: GABA) 濃度は有意に高かったが、SCS により GLU の濃度が減少した。以上の結果より、坐骨神経部分損傷によって NE 作動性下行性抑制系の障害が生じ、SCS の除痛機序には下行性抑制系の賦活作用と GLU 減少作用が関与すると考えられた。

Key words: Spinal cord stimulation, Neurotransmitters, Cerebrospinal fluid, Neuropathic pain, Seltzer model, HPLC

緒 言

末梢神経損傷は、自発痛、侵害刺激に対する閾値の低下による痛覚過敏反応、通常痛みを引き起こさない刺激によって惹起される激痛 (アロディニア) などの症状を来す神経因性疼痛の重要な発症原因のひとつである¹。また、末梢神経損傷に起因する神経因性疼痛は、病態が完成すると慢性に経過し、非常に難治性である。神経因性疼痛の原因として、末梢神経における病変のみならず、脊髄での NMDA 受容体を介した wind up 現象による侵害受容性ニューロンの感受性増大²、脊髄ニューロンにおける再構築³、遺伝子発現⁴ や神経ペプチドの変化⁵ などによる脊髄神経回路の可塑的な変化が関与していると考えられているが、これに対して決定的な治療法は確立されていないのが現状である。

硬膜外脊髄電気刺激療法 (spinal cord stimulation: SCS) は、近年、各種保存的治療に抵抗性を示す慢性難治性疼痛 (神経因性疼痛を含む) に対する治療に応用され^{6,7}、本邦においても、反射性交感神経性萎縮症、カウザルギー、幻肢痛などの神経因性疼痛での除痛効果が確認されている⁸⁻¹²。しかし、末梢神経損傷によってもたらされる神経因性疼痛患者に対する SCS の効果は必ずしも一定ではない。

これらの事実により、末梢神経損傷モデルにおける SCS の除痛機序に関する基礎的研究は、臨床上、重要な意義を持つと思われる。この SCS の除痛機序には、脊髄後角ニューロンの過剰興奮の抑制¹³ や下行性抑制系の賦活¹⁴、後索上行路刺激による上位中枢における干渉作用¹⁵ などが関与すると考えられており、最近では、脊髄における抑制系神経伝達物質が関与する^{16,17} と報告されている。しかし、ヒトの病

態に類似した無麻酔、無拘束下の末梢神経損傷モデルにおけるSCSの除痛機序に関する実験報告はほとんどない。

本研究では、無麻酔、無拘束の末梢神経損傷モデルラットの脳脊髄液(cerebrospinal fluid:CSF)を採取し、CSF中の多種の神経伝達物質を高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography:HPLC)により同時定量することで、末梢神経損傷モデルにおける神経伝達の変化を明らかにするとともに、SCSによる除痛機序を解明することを目的とした。

方 法

この実験は近畿大学医学部動物実験実施規定に準拠して行った。

実験動物

Sprague-Dawley系雄性ラット(SLC社,浜松:実験開始時9週齢,体重250-300g)を実験開始前に1週間予備飼育し、順調に発育したものを実験に供した。ラットは室温 $23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,湿度55%,明暗周期

12時間(照明環境:午前7時から午後7時)の一定の環境下で,1個体ずつ柔らかな木屑のケージで飼育し,食事,水は自由に摂取できるようにした。なお,飼料はラット飼育用固型飼料(CE-2,日本クレア社)を,給水は水道水を使用した。実験中何らかの原因でプロトコルから除外または実験を終了したラットは,直ちに大量のペントバルビタールの腹腔内投与により安楽死処置を施した。また,すべての外科的処置は吸入麻酔薬(イソフルラン1-1.5%)を用いたマスク麻酔で自発呼吸下に行った。

実験1(図1(A))

PSNLラットの作成

Seltzerら¹⁸の方法に従って,大腿二頭筋を分け坐骨神経を露出し,3分枝部より中枢側の大転子レベルで8-0絹糸を用いて,坐骨神経の背側1/2-1/3を強く1回結紮することで,坐骨神経部分結紮モデル(partial sciatic nerve ligation:PSNL)ラットを作成した。また,対照用として,右の坐骨神経を露出し,神経には侵襲を加えず閉創したシャム手術ラ

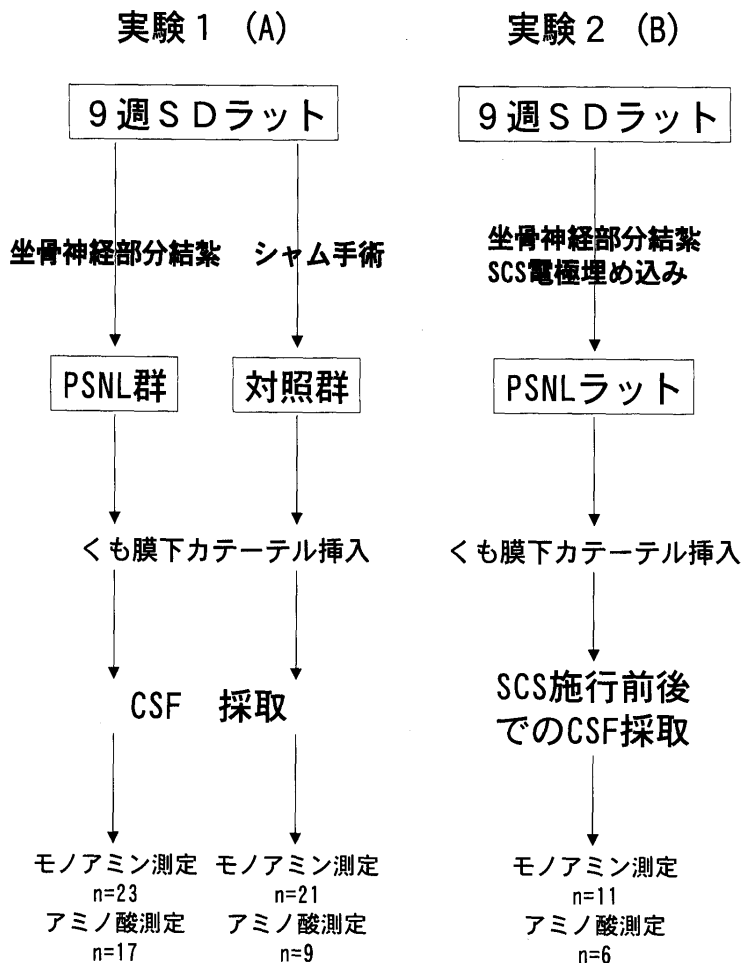


図1 実験1:PSNLラットとシャムラットのCSF中アミン関連物質およびアミノ酸測定
実験2:SCS施行前後におけるPSNLラットのCSF中アミン関連物質およびアミノ酸測定

ットを作成した。

くも膜下カテーテルの留置

神経結紮またはシャム手術7日後に、CSFを採取するためのくも膜下カテーテルの留置を行った。Yakshら¹⁹の方法に従い、ラットの環椎後頭骨間直上を皮切し、頭蓋骨に沿って筋肉を前後に分け、環椎後頭骨間硬膜を露出した。23G注射針を用いて、脊髄を損傷しないように注意深く硬膜を切開し、髄液の流出を確認後、25G針で作成した硬膜フックを用いて硬膜を持ち上げ、切開孔よりポリエチレンカテーテル(PE10: Cray-Adams, USA)をくも膜下腔に尾側に向かって3cm挿入し留置した。カテーテルを筋、筋膜に固定した後に、他端を後頸部皮膚より約3cm露出させ、マイクロシリンジを用いてカテーテルより髄液が吸引できることを確認した後、髄液の漏出を防ぐためのガイドカニューレを挿入した。

くも膜下カテーテル留置後、回復期間として5日間の観察期間を設け、実験に供した。観察期間中に、四肢麻痺、出血および感染などの合併症の発現をみたラットは除外した。

CSFの採取

CSFの採取は、カテーテル留置術後5日目の午前9時から正午にかけて行った。各ケージにおいて、ラットを無麻酔、無拘束の状態、くも膜下カテーテルにマイクロシリンジを接続し、Wadaら²⁰の手法に準じて、約5分かけてCSF40 μ lを吸引採取した。採取したCSFを蓋つきスピッツ管に移した後、液体窒素中で冷凍し、分析まで -80°C で保存した。なおCSF採取中、ラットが何らかの異常行動や疼痛行動を示すことはなかった。

CSF中の神経伝達物質およびその関連物質の分析

分析前に自然解凍したCSFに、限外濾過フィルター(10,000 NMWL, UFC3LGC00, MCメディカル, 東京)を用いて、3000 rpm (F-45-12-11), 10分間の遠心濾過処理を施した。分析にはクーロアレイ三次元電気化学検出器高速液体クロマトグラフィー(CoulArray analyzer, ESA, Chelmsford, MA, USA)による多項目同時分析を用い、得られたクロマトグラムをCoulArray analyzerに直結したコンピュータにより解析、定量を行った。Tohgiら²¹の手法に準じて測定したモノアミンおよびその関連物質は、tyrosine (TYR), L-dihydroxyphenylalanine (DOPA), dopamine (DA), norepinephrine (NE), 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), tryptophan (TRP), 5-hydroxytryptophan (5HTP), 5-hydroxytryptamine (5HT), 5-hydrox-

yindole-3-acetic acid (5HIAA) の計9種類で、検体30 μ lを逆相C₁₈MCMカラム(ϕ 4.6 \times 150 mm, MCメディカル, 東京)に注入し、8電極(荷電0-560 mV, 80 mV 間隔)を用いたグラジエント法により分析した。

また、アミノ酸は興奮性アミノ酸として aspartate (ASP), glutamate (GLU), 抑制性アミノ酸として glycine (GLY), γ -aminobutyric acid (GABA), その他のアミノ酸 asparagine (ASG), glutamine (GLN), arginine (ARG), threonine (THR), taurine (TAU), alanine (ALA) の計10種類で、検体30 μ lにOPA試薬20 μ lを混和した後、アイソクラテック法で、逆相C₁₈MCMカラムに注入し、4電極(荷電200-520 mV, 140 mV 間隔)を用いて分析した。

上記の方法によって、モノアミンおよびその関連物質、アミノ酸のCSF中の濃度を定量するとともに、PSNL群と対照群間で比較検討した。

なお、OPA試薬は、メタノール1 mlに溶解したオルトアルデヒド54 mgと10 μ lの2-メルカプトエタノールおよびpH 9.3に調整した0.1 M四ホウ酸緩衝液9 mlの混和溶液を使用した。移動層と標準液は、モノアミン測定にはMobil phase A, B (ESA, Chelmsford, MA, USA)とモノアミン用標準液(MCメディカル, 東京)を、アミノ酸測定にはアミノ酸用移動層(MCメディカル, 東京)とアミノ酸用標準液(MCメディカル, 東京)をそれぞれ使用した。

実験2 (図1B)

PSNLラットの作成とSCS用電極の埋め込み

実験1と同様に、生後9週齢にPSNLモデルの作成を行うと同時に、SCS用電極の埋め込みを行った。

ラットの第2腰椎椎体を中心に約2 cm皮切した後、第1~3腰椎上の筋膜および棘間靭帯を切開した。次に第2腰椎棘突起を部分切除し、椎間周囲に付着する筋肉を鈍的に剝離し、第1~2腰椎間の黄靭帯を露出して23G注射針で小孔を空け、SCS用電極(直径0.5 mm, 白金性2極電極: ユニークメディカル社, 大阪)を頭側に向かって約1.5 cm挿入し、先端が下位胸椎レベルに位置するように留置した。その際、通電によって坐骨神経結紮側の下肢全体の筋収縮が得られることを確認した。電極を筋、筋膜に固定し、背側皮下トンネルを通して他端を後頸部より露出した。

くも膜下カテーテルの留置

くも膜下カテーテルの埋め込みは、電極埋め込み手術7日後に、実験1と同様の手技で行った。

SCSの施行とその前後でのCSF採取

くも膜下カテーテル術後5日目の午前9-12時に、SCSを施行した。PSNLラットと刺激器 (Model3625, 日本Medtronic社, 東京)の間に50 cmの中継リード (ユニークメディカル社, 大阪)を介することで、無麻酔、無拘束の状態での通電を可能とした。

Cuiら²²の報告に準じて、SCSの刺激頻度は50 Hz, パルス幅は200 msecとし、刺激強度を筋収縮が生じる強さの1/2-1/3の電流量に設定して90分間の通電を行った。CSFの採取は、実験1と同様の方法によって、SCS施行前と通電90分時にそれぞれ各40 µl採取し、直ちに冷凍保存した。なお、SCS施行中にラットが疼痛行動を示したり異常行動を示すことはなかった。

CSF中の神経伝達物質の測定

HPLCを用いて実験1と同項目の測定を行い、各神経伝達物質濃度を定量するとともに濃度比を算出し、SCS施行前を対照として比較検討した。

統計処理

各数値は中央値 (25, 75パーセンタイル値) で示

し、統計学的検定は、対照群とPSNL群間の検定にはMann-Whitney-U-test, SCS施行前後の比較検定にはWilcoxon-t-testを用いた。なお、統計分析は、Statistica for MS Windows Ver. 5.05 J (StatSoft)を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

実験1

PSNLラットのCSF中のアミン代謝物およびアミノ酸濃度

NEとその前駆物質 (TYR, DOPA, DA) および代謝産物 (MHPG) のCSF中濃度と、各測定物質間の濃度比を表1 Aに示した。PSNL群では対照群に比較してTYRが増加し、NEは有意に減少していた。また、濃度比において、PSNL群のNE/DA比が対照群に比較して低値を示し、MHPG/NE比が高値を示した。DOPA, DA, MHPG濃度およびDOPA/TYR比, DA/DOPA比は2群間で有意な差を認めなかった。

5HTとその前駆物質 (TRP, 5HTP) および代謝産物 (5HIAA) のCSF中濃度、各濃度比を表1 Bに

表1 A 対照群とPSNL群間におけるCSF中のNE関連物質の比較

	対照群 (n=21)	PSNL群 (n=23)	p 値
TYR	1996 (1550-3036)	3073 (2133-4210)*	0.028
DOPA	1.06 (0.89-1.42)	1.12 (0.79-1.34)	0.91
DA	0.64 (0.49-0.78)	0.76 (0.56-1.01)	0.28
NE	1.24 (0.93-1.34)	0.85 (0.61-1.02)**	0.002
MHPG	22.9 (19.2-29.8)	24.5 (19.6-28.1)	0.99
(比)			
DOPA/TYR×10 ³	0.69 (0.29-0.81)	0.33 (0.27-0.60)	0.12
DA/DOPA	0.53 (0.45-0.70)	0.76 (0.49-1.00)	0.08
NE/DA	1.85 (1.34-2.28)	1.09 (0.81-1.48)**	0.003
MHPG/NE	19.5 (15.4-25.7)	25.0 (22.6-35.9)*	0.04

TYR: tyrosine, DOPA: L-dihydroxyphenylalanine, DA: dopamine, NE: norepinephrine, MHPG: 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$,

濃度はすべて ng/ml, 測定値は中央値 (25, 75パーセンタイル値) で表した。

表1 B 対照群とPSNL群間におけるCSF中の5HT関連物質の比較

	対照群 (n=21)	PSNL群 (n=23)	p 値
TRP	測定限界以下	測定限定以下	
5HTP	0.55 (0.37-0.79)	0.78 (0.55-1.03)*	0.042
5HT	0.54 (0.33-0.74)	0.72 (0.41-0.96)	0.34
5HIAA	186 (155-386)	172 (138-207)	0.10
(比)			
5HT/5HTP	1.00 (0.55-1.64)	0.80 (0.43-1.29)	0.66
5HIAA/5HT	361 (228-814)	309 (198-404)	0.11

TRP: tryptophan, 5HTP: 5-hydroxytryptophan, 5HT: 5-hydroxytryptamine, 5HIAA: 5-hydroxyindole acetic acid, *: $p < 0.05$,

濃度はすべて ng/ml, 測定値は中央値 (25, 75パーセンタイル値) で表した。

表1C 対照群とPSNL群間におけるCSF中のアミノ酸の比較

	対照群 (n=9)	PSNL群 (n=17)	p値
(興奮性アミノ酸)			
ASP	2.47 (2.14-3.88)	6.26 (3.79-12.5)*	0.042
GLU	35.1 (24.9-70.5)	99.8 (65.5-166)*	0.013
(抑制性アミノ酸)			
GLY	29.7 (24.3-34.7)	48.1 (36.4-72.9)*	0.015
GABA×10 ⁻³	5.50 (4.21-14.8)	23.4 (11.2-38.1)*	0.020
(その他)			
ASG	8.05 (6.38-12.6)	12.4 (8.41-20.0)	0.21
GLN	589 (240-623)	585 (437-703)	0.46
ARG	22.5 (18.0-36.6)	42.4 (27.9-51.7)	0.42
THR	68.2 (43.3-100)	130 (91.5-153)	0.06
TAU	28.0 (21.9-30.4)	52.9 (39.0-67.2)	0.14
ALA	46.8 (25.2-98.0)	81.1 (70.2-147)	0.08
(比)			
ASP/GLY×10 ⁻³	99.1 (83.6-160)	130 (103-145)	0.46
ASP/GABA	570 (250-1380)	364 (196-479)	0.17
GLU/GLY	1.33 (0.99-2.39)	2.28 (1.55-3.11)	0.16
GLU/GABA×10 ³	5.35 (4.13-11.3)	5.26 (2.52-12.8)	0.69
ASG/ASP	3.16 (1.56-3.68)	2.04 (1.31-2.71)	0.26
GLN/GLU	8.44 (8.12-10.6)	5.89 (3.21-9.28)	0.06
GLY/THR	0.44 (0.35-0.56)	0.49 (0.38-0.58)	0.65
GLY/ALA	0.82 (0.26-0.89)	0.57 (0.44-0.65)	0.36

ASP: aspartate, GLU: glutamate, ASP: asparagine, GLN: glutamine, ARG: arginine, GLY: glycine, THR: threonine, TAU: taurine, ALA: alanine, GABA: γ -amino butiric acid, *: $p < 0.05$, 濃度はすべて nmol/L, 測定値は中央値 (25, 75パーセンタイル値) で表した。

示した。5HT 関連物質のうち、TRP は検出することができなかった。PSNL 群と対照群間の比較では、PSNL 群で 5HTP が増加していたが、その他に有意な差を認めなかった。いずれの濃度比も 2 群間で有意な差を認めなかった。

アミノ酸10種のCSF中濃度、および興奮性アミノ酸であるASP、GLUと抑制性アミノ酸であるGLY、GABAの濃度比と関連物質の濃度比を表1C

に示した。PSNL 群では対照群に比べてASP、GLU、GLY、GABAの濃度が有意に増加していたが、その他のアミノ酸にはいずれも差を認めなかった。濃度比も有意な差を認めなかった。

実験2

SCSによるPSNLラットのCSF中のアミン代謝物およびアミノ酸濃度の変化

SCS前後での各神経伝達物質の濃度と濃度比を

表2A SCSによるPSNLラットにおけるCSF中のNE関連物質の変化 (n=11)

	SCS前	SCS後	p値
TYR	3025 (2201-4164)	2351 (1800-2866)	0.18
DOPA	1.33 (0.97-1.78)	1.12 (0.79-1.36)	0.22
DA	0.67 (0.45-0.87)	0.51 (0.42-0.83)	0.25
NE	0.58 (0.48-0.81)	0.85 (0.61-1.13)*	0.02
MHPG	19.4 (12.7-26.2)	24.2 (20.7-26.4)	0.07
(比)			
DOPA/TYR×10 ³	0.40 (0.33-0.59)	0.44 (0.30-0.67)	0.88
DA/DOPA	0.53 (0.47-0.77)	0.49 (0.42-0.74)	0.83
NE/DA	0.84 (0.59-1.42)	1.55 (1.24-1.92)**	0.009
MHPG/NE	27.1 (23.5-35.6)	25.4 (23.0-39.5)	0.30

TYR: tyrosine, DOPA: L-dihydroxyphenylalanine, DA: dopamine, NE: norepinephrine, MHPG: 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, 濃度はすべて ng/ml, 測定値は中央値 (25, 75パーセンタイル値) で表した。

表 2 B SCS による PSNL ラットにおける CSF 中の 5HT 関連物質の変化 (n=11)

	SCS 前	SCS 後	p 値
TRP	測定限界以下	測定限定以下	
5HTP	0.79 (0.55-1.02)	0.51 (0.38-0.85)	0.18
5HT	0.63 (0.31-0.92)	0.72 (0.27-0.98)	0.55
5HIAA	146 (131-172)	219 (196-259)*	0.004
(比)			
5HT/5HTP	0.68 (0.36-2.35)	0.63 (0.39-1.74)	0.88
5HIAA/5HT	255 (83-431)	437 (214-913)	0.14

TRP: tryptophan, 5HTP: 5-hydroxytryptophan, 5HT: 5-hydroxytryptamine, 5HIAA: 5-hydroxyindole acetic acid, *: p<0.05,

濃度はすべて ng/ml, 測定値は中央値 (25, 75パーセンタイル値) で表した。

表 2 C SCS による PSNL ラットにおける CSF 中のアミノ酸の変化 (n=6)

	SCS 前	SCS 後	p 値
(興奮性アミノ酸)			
ASP	4.33 (2.72-6.80)	2.82 (2.01-4.34)	0.063
GLU	68.1 (44.2-99.3)	23.4 (21.7-50.1)*	0.027
(抑制性アミノ酸)			
GLY	41.6 (30.2-48.1)	40.5 (29.6-50.8)	0.50
GABA×10 ⁻³	22.5 (16.7-25.9)	11.5 (6.12-29.7)	0.13
(その他)			
ASG	11.5 (9.66-18.2)	11.0 (6.34-13)	0.40
GLN	586 (444-686)	396 (358-525)	0.18
ARG	37.3 (24.3-42.4)	24.6 (19.3-34.7)	0.24
THR	105 (70.3-151)	61.9 (59.0-87.1)	0.18
TAU	52.1 (31.5-66.9)	43.6 (17.6-92.7)	0.74
ALA	79.9 (56.0-92.0)	67.0 (46.8-79.1)	0.24
(比)			
ASP/GLY×10 ⁻³	110 (88-138)	62.3 (59.0-88.2)*	0.028
ASP/GABA	199 (81.2-631)	166 (136-564)	1.00
GLU/GLY	1.34 (1.00-2.09)	0.86 (0.58-1.45)*	0.028
GLU/GABA×10 ³	2.46 (1.41-4.66)	1.82 (1.43-7.62)	0.61
ASG/ASP	2.63 (2.32-4.11)	3.90 (2.59-4.45)	0.61
GLN/GLU	10.2 (6.92-11.2)	12.1 (11.4-16.6)*	0.028
GLY/THR	0.48 (0.30-0.61)	0.63 (0.28-0.76)	0.06
GLY/ALA	0.59 (0.50-0.62)	0.55 (0.55-0.68)	0.13

ASP: aspartate, GLU: glutamate, ASP: asparagine, GLN: glutamine, ARG: arginine, GLY: glycine, THR: threonine, TAU: taurine, ALA: alanine, GABA: γ -amino butiric acid, *: p<0.05, 濃度はすべて nmol/L, 測定値は中央値 (25, 75パーセンタイル値) で表した。

表 2 A, 2 B, 2 C に示した. NE と関連物質の SCS 前後の比較では, SCS 後に NE 濃度の有意な増加と, NE/DA 比の有意な上昇を認めたが, その他の NE 関連物質には変化を認めなかった。

5HT と関連物質の SCS 前後の比較では, SCS 後に 5HIAA 濃度の有意な増加を認めたが, その他の 5HT 関連物質には変化を認めなかった。

アミノ酸の SCS 前後の比較では, SCS 後に GLU 濃度が有意に減少したが, 他のアミノ酸はいずれも変化を認めなかった. 濃度比では, ASP/GLY 比,

GLU/GLY 比の有意な低下と GLN/GLU 比の有意な上昇を認めたが, 他の濃度比はいずれも変化を認めなかった。

考 察

本研究では, PSNL ラットの CSF において, TYR 濃度の有意な増加と NE 濃度の有意な減少, NE/DA 比の有意な低下を認め, 興奮性アミノ酸 (ARG, GLU) と抑制性アミノ酸 (GLY, GABA) 両者が有意に増加することを認めた. また, SCS 施

行により、NE 濃度と 5HIAA 濃度が増加し、GLU 濃度が有意に減少することを確認した。

神経組織の損傷や機能異常などによって惹起される神経因性疼痛¹は、侵害刺激を引き起こす組織損傷がない状態でも自発痛、痛覚過敏、触覚アロディニアなどの症状が持続的あるいは突発性に生じることが特徴であり、臨床上、治療に難渋する。そこで、神経因性疼痛の実験モデルとして、Bennett ら²³が最初に神経因性疼痛モデルラットを作成して以来、さまざまなモデルが作成され、解析されるに至っている²⁴。本研究で用いた Seltzer による坐骨神経部分損傷モデルは、神経因性疼痛モデルとして捉えられ¹⁸、痛覚過敏とアロディニアが発現することが報告されている²⁵。また、Cui ら²²は、同モデルで SCS を施行し、痛覚過敏と触覚アロディニアが軽減すると報告している。従って、本研究で、坐骨神経部分損傷モデルを用いて SCS による CSF 中の神経伝達物質の変動を調べることは、その除痛機序の解明につながると考えた。

神経伝達物質の変化に関する従来の報告では、主にマイクロダイアリシスや凍結切片を用いた手法が用いられてきた。また、これまで報告された SCS の除痛機序に関する研究では、数10分から60分の通電時間が用いられてきた。本研究では測定試料を CSF とし、CSF 中に反映される神経伝達物質の変動を捉えることを目的としたため、通電時間を従来の報告より長い90分とした。

無麻酔、無拘束下における *in vivo* での実験報告は極めて少なかった。本研究では無麻酔、無拘束下での CSF を採取することで、より生理的な状態での SCS による変動を捉え得たと考える。また、多電極の電気化学検出器を備えた HPLC を用いることで、神経伝達物質、その前駆物質および代謝産物も併せて同時定量を行うことができ、今までには見られなかった代謝レベルの変化についても評価し得た。

坐骨神経部分損傷の下行性抑制系神経伝達物質への影響

脊髄や延髄には、多数の介在ニューロンが存在し、末梢から中枢へ伝達される情報はシナプスにおいて神経伝達物質により様々に修飾されている²⁶。なかでも NE と 5HT は下行性抑制系に関与する神経伝達物質であり、脊髄後角において侵害刺激を抑制する²⁷。神経終末の NE は主として TYR を前駆物質とし、生合成酵素による DOPA、DA への変換を経て、生成貯蔵され放出される。また放出された NE

は取り込みや種々の代謝をうけ、一部は MHPG へと代謝される。同様に、5HT は TRP を前駆物質とし、中間代謝物である 5HTP を経て生成され、一部は 5HIAA へと代謝される。

実験1では、PSNL ラットの CSF 中で、TYR 濃度の増加を認めるにも関わらず中間代謝産物である DOPA、DA 濃度は不変で、NE 濃度は低下したことから、TYR から DOPA、および DA から NE 生成への代謝が障害されている可能性が推察された。CSF 中の NE、MHPG、5HIAA 濃度は中枢神経系の活動を反映するとされている²⁸ものの、CSF 中の神経伝達物質の濃度はそれぞれの物質の合成、分泌、取り込み、代謝による影響を受けていることから、CSF 中の濃度のみでその変化を結論づけることは難しい。そこで、併せて代謝経路に沿った濃度比を算出したところ、PSNL ラットでは DOPA/TYR、DA/DOPA 比は不変であるのに対し、NE/DA 比の低下と MHPG/NE 比の上昇を認めた。つまり、PSNL ラットに生じた NE 濃度低下は、主として DA からの NE 生成低下および、NE から MHPG への代謝亢進により、シナプスにおける NE 濃度の低下をきたす、すなわち NE 作動性下行性抑制系の障害が生じていることを示唆するものであった。

一方、5HT 作動性下行性抑制系については、5HT 前駆物質である 5HTP の有意な増加を示したのみで、その他の関連物質に有意な変化を認めなかった。TRP の検出が不可能であった原因は不明であるが、いずれにせよ、PSNL ラットにおいては 5HT 作動性下行性抑制系の変化は少ないものと推察された。

Satoh²⁹らは、Bennett モデルにおける凍結ホモジネート脊髄後角中の NE、5HT 濃度が増加していたことから、神経因性疼痛の状況下では下行性抑制系が賦活されていると推察しているが、本研究ではこれに反した結果が得られた。この点に関しては、Yamamoto ら³⁰が、神経損傷モデルの種類によって反応性が異なることを指摘しているように、用いたモデルの相違あるいは測定した試料の相違によるものと考えられる。

坐骨神経部分損傷の興奮性アミノ酸と抑制性アミノ酸への影響

末梢の受傷部からの痛み刺激が繰り返しかつ長期間続くと、脊髄中の2次ニューロンが過剰に興奮し、弱い刺激に対しても痛み刺激と同様な反応を起こす wind up 現象が生じること²が知られている。興奮性アミノ酸である GLU、ASP は一次求心線維からの痛覚を伝達する神経伝達物質であり²⁶、この wind up 現象には GLU とその NMDA 受容体の活性化が関与し³¹、さらに NMDA-NO-cGMP 系が痛覚過

敏発症に重要な役割を演じていると報告³²されている。また、GLUは侵害情報を伝える伝達物質であるだけでなく、神経細胞死を誘発する原因物質として捉えられている^{33,34}。一方、抑制性アミノ酸であるGABA、GLYは痛み情報伝達の抑制、つまり鎮痛に関与し³⁵、脊髄後角におけるGABAやGLY抑制系の機能低下も神経因性疼痛の発症機序の一つと考えられている³⁶⁻³⁸。実験1では、PSNLラットにおいてCSF中のGLU、ASPならびにGLY、GABA濃度の有意な増加が認められた。これは病的持続性疼痛状態においては、興奮性アミノ酸の増加³⁹だけでなく内因性鎮痛機構の活性化（GLY、GABA）が生じているとするSatohら²⁹の報告を支持する結果であった。

また、神経因性疼痛を発症する中枢性機序として、脊髄後角内での興奮性アミノ酸と抑制性アミノ酸の不均衡が推察されていることから^{40,41}、興奮性アミノ酸と抑制性アミノ酸の比を算出したが、PSNLモデルの少なくともCSF中においては明らかな不均衡を見いだすことはできなかった。また、NOSを介するNOの産生に重要なARG濃度は、PSNL群と対照群間で差を認めなかったが、CSF中のGLU濃度の有意な増加は、NOの産生に直接または間接的に関与する可能性があると思われる。

SCSによるPSNLラットでの下行性抑制系神経伝達物質の変化

SCS施行によりPSNLラットCSF中のNE濃度の有意な増加、MHPGの増加傾向を認めた。また、NE/DA比は有意に上昇したものの、MHPG/NE比は不変であった。すなわち、SCSは主にDAからNEへの代謝を促進する作用があり、実験1の結果と考え併せると、PSNLラットに生じたNE作動性下行性抑制系の障害を改善することが示唆された。また、SCS施行によって5HTは不変であったが、5HTの代謝産物である5HIAA濃度が有意に増加したことから、SCSには5HT作動性下行性抑制系の賦活を促す可能性があると考えられた。

SCSによるPSNLラットでの興奮性および抑制性アミノ酸濃度の変化

Cuiら²²は、同様の坐骨神経部分損傷モデルを用いて、SCSがGABAの分泌を促し、GLU、ASPの放出を抑制するとしている。また、Stillerら⁴²は、SCSによる接触アロディニアの改善にはGABA分泌が関与すると報告している。さらに、Simpsonら⁴³は、SCSによりGLYの分泌が増加すると報告している。本実験では、SCSによってCSF中のGLU濃度が有意に低下したが、GLY、GABAおよびその他の物質には有意な変化を認めなかった。この結果と

上記報告の相違は、測定した試料の相違や、本研究が無拘束下に行ったのに対してCuiら²²はGABA作動性を持つハロセン麻酔⁴⁴下に行ったという実験環境の違いが関与したものと思われる。SCSによってASP/GLY比、GLU/GLY比が各々減少した。

SCSが興奮性アミノ酸（ASP、GLU）と抑制性アミノ酸であるGLYとのバランスを変化させることが、疼痛抑制機構にどのように影響するかは不明である。しかし、ラット中枢神経系のなかでGLY含量が最も豊富な組織は脊髄であるとの事実⁴⁵からは、SCSがGLYを介して鎮痛に何らかの影響を及ぼすことは想像に難しくない。また、GLN/GLU比はSCS施行により有意に上昇した。この結果はSCSがGLU放出抑制のみならず、GLU代謝に関与している可能性を示すものである。さらに本研究で認められたSCSによる下行性抑制系の賦活の結果、GLUの放出抑制が生じた可能性もあると考えられる。

本研究において、SCSによるGLUの減少作用を認めたことにより、SCSはGLUによる痛覚過敏形成や中枢神経における可塑的な変化を抑制あるいは予防できる可能性があると考えられた。つまり、神経因性疼痛の発症をみた場合、受傷後期間を経るにつれてSCSに抵抗性を示すとする森本ら¹²の報告を考慮すると、このSCSをより早期に施行することで、神経因性疼痛の増悪を抑制し、より効果的な疼痛の軽減を得られる可能性がある。

本研究では末梢神経損傷モデルを作成して神経伝達物質の変動を明らかにしたが、今後同モデルの疼痛発現を定量的に評価して、病態による変化と神経因性疼痛の治療に用いられているSCSの効果を明らかにする必要がある。

本研究から、坐骨神経部分損傷モデルラットにおいては、NE作動性下行性抑制系が障害され、CSF中の興奮性アミノ酸ならびに抑制性アミノ酸濃度が増加することが明らかとなった。また、SCSによる除痛機序には、下行性抑制系の賦活化と、興奮性アミノ酸であるGLUの減少作用が関与すると考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導ご高聞を賜りました近畿大学医学部麻酔科学教室古賀義久教授に深甚なる謝意を捧げます。また直接ご指導いただきました森本昌宏講師をはじめ、本研究にご協力いただきました奥田隆彦助教授、高杉嘉弘講師、土屋典生助手、坂口雅彦助手、教室員各位ならびにライフサイエンス動物舎各位に心から感謝いたします。

文 献

1. Merskey H, Bogduk N (1994) Classification of chronic pain (2nd ed.) descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Seattle, JASP Press, pp 1-213
- 2.Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R (1993) Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 52: 259-285
3. Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355: 75-78
4. Boucher TJ, Okuse K, Bennett DL, Munson JB, Wood JN, McMahon SB (2000) Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. *Science* 290: 124-127
5. Sten STJ, Cui JG, Meyerson BA, Linderth B, Hokfelt T (1999) Regulation of galanin and neuropeptide Y in dorsal root ganglia and dorsal horn in rat mononeuropathic models: possible relation to tactile hypersensitivity. *Neuroscience* 93: 741-757
6. Kumar K, Toth C, Nath PK, Laing P (1998) Epidural spinal cord stimulation for treatment of chronic pain: some predictors of success. A 15-year experience. *Surg Neurol* 50: 110-120
7. North RB, Kidd DH, Zahurak M, James CS, Long DM (1993) Spinal cord stimulation for chronic, intractable pain: experience over two decades. *Neurosurgery* 32: 384-394
8. 森本昌宏, 河田圭司, 森本悦司, 口分田理, 古賀義久 (1998) 慢性疼痛に対する経皮的埋め込み脊髄電気刺激療法 (PISCES) —適応基準の試作—。慢性疼痛 17: 39-44
9. 森本昌宏, 古賀義久 (1998) 経皮的埋め込み脊髄電気刺激療法 (PISCES) とその臨床効果。LiSA 5: 90-95
10. 蔵 昌宏, 森本昌宏, 河田圭司, 坂口雅彦, 村上晴也, 古賀義久 (1999) 頸部脊髄空洞症での強度の疼痛に対して PISCES が奏効した 1 症例。慢性疼痛 18: 122-124
11. 加藤 実, 長井仁志, 小川節郎 (2000) 末梢神経障害に起因した痛みに対する硬膜外脊髄刺激療法の臨床成績。ペインクリニック 21: 525-532
12. 森本昌宏, 蔵 昌宏 (2001) 脊髄電気刺激療法。ペインクリニック 22: 753-759
13. Yakhnista V, Linderth B, Meyerson BA (1999) Spinal cord stimulation attenuates dorsal horn neuronal hyperexcitability in a rat model of mononeuropathy. *Pain* 79: 223-233
14. Campbell JN, Davis KD, Meyer RA, North RB (1990) The mechanism by which dorsal column stimulation affects pain: Evidence for a new hypothesis. *Pain Suppl* 5: 228
15. Koyama N, Yokota T (1994) Inhibition of activities of VPL nociceptive neurons by dorsal column stimulation. *Pain Res* 9: 77-86
16. Linderth B, Stiller CO, Gunasekera L, O'Connor WT, Franck J, Gazelius B, Brodin E (1993) Release of neurotransmitters in the CNS by spinal cord stimulation: Survey of present state of knowledge and recent experimental studies. *Stereotact Funct Neurosurg* 61: 157-170
17. Meyerson BA, Linderth B (2000) Mechanisms of spinal cord stimulation in neuropathic pain. *Neurol Res* 22: 285-292
18. Seltzer Z, Dubner R, Yoram S (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial nerve injury. *Pain* 43: 205-218
19. Yaksh TL, Rudy TA (1976) Chronic catheterization of spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 17: 1031-1036
20. Wada Y, Egashira T, Takayama F, Yamanaka Y, Takada K, Takeda H, Matsumiya T (1998) Variation of monoamines and their metabolite contents in the cerebrospinal fluid of conscious rats. *Jpn J Pharmacol* 78: 237-240
21. Tohgi H, Takahashi S, Abe T (1993) The effect of age on concentration of monoamines, amino acids, and their related substances in the cerebrospinal fluid. *J Neural Transm* 5: 215-226
22. Cui JG, O'Connor WT, Ungerstedt U, Linderth B, Meyerson BA (1997) Spinal cord stimulation attenuates augmented dorsal horn release of excitatory amino acids in mononeuropathy via a GABAergic mechanism. *Pain* 73: 87-95
23. Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87-107
24. Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87: 149-158
25. Takaishi K, Eisele JH Jr, Carstens E (1996) Behavioral and electrophysiological assessment of hyperalgesia and changes in dorsal horn responses following partial sciatic nerve ligation in rats. *Pain* 66: 297-306
26. Shapiro S (1997) Neurotransmission by neurons that use serotonin, noradrenaline, glutamate, glycine, and γ -aminobutyric acid in the normal and injured spinal cord. *Neurosurgery* 40: 168-177
27. Basbaum AI, Fields HL (1984) Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7: 309-338
28. Yaksh TL (1984) Spinal superfusion in the rat and cat, In: Marsden CA (eds): Measurement of neurotransmitter release in vivo. Chichester, John Wiley, pp 107-124
29. Satoh O, Omote K (1996) Roles of monoaminergic, glycinergic and GABAergic inhibitory systems in the spinal cord in rats with peripheral neuropathy. *Brain Res* 728: 27-36
30. Yamamoto T, Sakashita Y (1999) Differential effects of intrathecally administered morphine and its interaction with cholecystokinin (CCK)-B antagonist on thermal hyperalgesia following two models of experimental mononeuropathy in the rat. *Anesthesiology* 90: 1382-

- 1391
31. Woolf C, Thompson SWN (1991) The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation: implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 44: 293-299
 32. Inoue T, Mashimo T, Shibata M, Shibata S, Yoshiya I (1998) Rapid development of nitric oxide-induced hyperalgesia depends on an alternate to the cGMP-mediated pathway in the rat neuropathic pain model. *Brain Res* 792: 263-270
 33. Azkue JJ, Zimmermann M, Heieh TF, Herdegen T (1998) Peripheral nerve insult induces NMDA receptor mediated delayed degeneration in spinal neurons. *Eur J Neurosci* 10: 2204-2206
 34. Ishikawa T, Nakanishi O (1999) Development of apoptosis of spinal cord neurons in rat neuropathic pain. *Pain Res* 14: 81-87
 35. Todd AJ, Sullivan AC (1990) Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *Comp Neurol* 296: 496-505
 36. Woolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353: 1959-1964
 37. Simpson RK Jr, Huang W (1998) Glycine receptor reduction within segmental gray matter in a rat model of neuropathic pain. *Neurol Res* 20: 161-168
 38. Castro-Lopes JM, Tavares I, Coimbra A (1993) GABA decreases in the spinal cord dorsal horn after peripheral neurectomy. *Brain Res.* 620: 287-291
 39. Kawamata M, Omote K (1996) Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. *Pain* 68: 85-96
 40. Yaksh TL, Yamamoto T (1991) Studies on the pharmacology of spinal systems underlying anomalous pain states, In Nashold BS, Ovelman-Levitt J (eds): *Deafferentation Pain Syndromes: Pathophysiology and Treatment*. New York, Raven Press, pp 197-207
 41. Mertens P, Ghaemmaghami C, Bert L, Perret-Liaudet A, Sindou M, Renaud B (2000) Amino acids in spinal dorsal horn of patients during surgery for neuropathic pain or spasticity. *NeuroReport* 11: 1795-1798
 42. Stiller CO, Cui JG, O'Connor WT, Brodin E, Meyerson BA, Linderth B (1996) Release of GABA in the dorsal horn and suppression of tactile allodynia by spinal cord stimulation in mononeuropathic rats. *Neurosurgery* 39: 367-375
 43. Simpson RK, Robertson CS, Goodman JC, Halter JA (1991) Recovery of amino acid neurotransmitters from the spinal cord during posterior epidural stimulation: a preliminary study. *J Am Paraplegia Soc* 14: 3-8
 44. Franks NP, Lieb WR (1994) Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367: 607-614
 45. Aprison MH (1990) The discovery of the neurotransmitter role of glycine, In: Ottersen OP, Strom-Mathisen J (eds): *Glycine Neurotransmission*, Chichester, John Wiley, pp 1-23