



第 43 卷

第 2 号

JUNE

2015年

愛知医科大学医学会雑誌

Journal of The Aichi Medical University Association

原 著

- 17 マウス術後痛モデル動物が示す痛覚過敏と術後癒痕部および DRG の遺伝子発現変化
..... 李 玉強, 木全弘治, 飯田博己, 卓 麗聖, 牛田享宏

症 例

- 35 Exploratory laparotomy by laparoscopy proved to be effective for the emergency treatment of a case of simultaneous inferior vena cava and hepatic portal vein gas related to ischemic colitisTsutomu Iwata, Norifumi Ohashi
Hideyuki Mishima, Masahiko Miyachi and Tsuyoshi Sano

CODEN : AIDZAC

ISSN 2189-2563

愛知医大誌

J. Aichi Med.
Univ. Assoc.

愛知医科大学医学会

マウス術後痛モデル動物が示す痛覚過敏と術後癒痕部および DRG の遺伝子発現変化

李 玉 強 木 全 弘 治 飯 田 博 己 卓 麗 聖 牛 田 享 宏

愛知医科大学学際的痛みセンター (主任教授: 牛田享宏)

Development of mouse model of post injury scar associated chronic pain: Hyperalgesia and gene expression change study

YUQIANG LI, KOJI KIMATA, HIROKI IIDA, LISHENG ZHUO and TAKAHIRO USHIDA

Department of Multidisciplinary Pain Center, Aichi Medical University (Professor: Takahiro Ushida)

Background: The long-lasting pain in limb or back receiving surgical operation is clinically frequently observed, and leads to the low activities of daily living (ADL) in these patients. Surgical operation is associated by the scar formation in muscle, joint and the peripheral tissues, which impairs the blood circulation in these tissues and cause the tissue contracture and pain. To understanding the involvement of extracellular matrices and nerve system in the formation of persistent post-operative pain during the wound healing process, we established a mouse model of persistent post-operative pain by generating a sustained painful scar in the plantar of hind paw, and examined the changes of gene expression.

Methods: Mice in the operation group received an extensive stripping of subcutaneous tissue from the plantar in the hind paw (Operation group). Some operated mice receiving the analgesic Neurotropin (Neurotropin group). The pain was evaluated by measuring the threshold of mechanical stimulation by von Frey fiber causing a behavioral response of hind paw until 10 weeks after operation. The plantar tissues and the dorsal horn tissues were collected at 1 and 2 weeks after operation and subjected to RNA isolation and microarray analysis for gene expression. In some genes, the change of expression was further confirmed by quantitative real-time PCR.

Results: The pain threshold decreased rapidly after operation and kept at a level significantly lower than that of sham-operated mice for 3 weeks. Afterward, the threshold increased eventually and returned to a level comparable to that of sham-operated mice at the seventh week after operation. Neurotropin administration significantly prevented the decrease of pain threshold. Interestingly, one day later than the ipsilateral hind paw, the non-operated contralateral hind paw also became sensitive to mechanic stimulation, which lasted for a period comparable to that of ipsilateral hind paw. Microarray analysis revealed that hundreds of genes were up-regulated more than 2 folds or down-regulated by >50% in plantar tissues. Neurotropin administration abolished the change of expression level in some genes. The number of up-regulated or down-regulated genes was much smaller in dorsal horn tissue. The involved genes were largely different from those in plantar tissue. In most cases, real-time PCR results were consistent with those of microarray analysis.

Conclusion: A mouse model of persistent post-operative pain was established by through

extensive injury of the peripheral tissues, making it possible to utilize the rich resource of genetically modified mice, including gene targeting mice, in the study of pain formation. Microarray analysis result will provide useful hints for the future study of molecular mechanism of pain formation.

Key words: scar formation model, long-lasting pain, gene expression

緒 言

慢性疼痛は長期に渡って持続する病態であるが、疼痛部位で最も多いのは腰背部であり、その多くの患者は整形外科を受診することがこれまでの疫学調査の結果から分かっている¹⁾。腰背部に生じる難治性慢性腰痛症の代表的なものとして Failed Back Surgery Syndrome (FBSS) があるが、これは脊椎・脊髄疾患に対して手術を行ったにも関わらず、なお腰下肢痛が持続し、日常生活動作 (Activities of Daily Living, ADL) の低下もきたしている病態である。その患者の殆どは背中 (腰) に鉄板や鉛が張り付いた感じの痛みを訴えているが、病態生理が特定されていないため根本的治療が難しいのが実情である²⁾。

組織的には、筋や手指や肩・肘関節およびその周囲組織の手術に伴った癒痕形成がみられる事が知られている^{3,4)}。腰椎手術後の報告では、筋組織における癒痕化 (Fibrosis) が術後 25 年までもつづいているとの報告がある⁵⁾。我々は、これまで行われてきた手指や肩・肘の手術症例において、術後に癒痕拘縮が認められる場合に動作時の痛みが出現することから、術後の癒痕形成やそれに伴う組織・器官の血流障害と拘縮が慢性的な痛みに関与しているものと考えてきている。過去の病理学的研究ではヒトの痛性癒痕組織に、神経ペプチドを含有した神経線維が含まれることや、ラット実験では術後癒痕内の再生神経には CGRP, Substance P 陽性のものが含まれることが報告されており⁶⁾、癒痕の形成や癒痕内に増加した神経ペプチド陽性神経が痛みの発症維持メカニズムに関与しているのではないかと推察してきている⁷⁾。

我々は、これまでに癒痕性疼痛の動物モデルとしてラットを用いた研究を進めてきており、そこでは行動学的に足底の皮膚剥離施術後の痛覚過敏状態が 12 週間後まで持続することを明らかにしてきている⁸⁾。手術癒痕部の組織では、上皮の肥厚、真皮内でのコラーゲン線維蓄積、真皮と皮下組織の境界の不明瞭化、コラーゲン線維間における円形・楕円形核の遊走細胞の出現が観察され⁹⁾、同時に後根神経節より近位の L5 脊髄神経においては神経線維のミエリン鞘の断片化が検出されることを報告してき

ている。しかし、癒痕化に伴う痛みの治療をめざし、さらに研究を進めるには、遺伝子ノックアウト動物が豊富にあるマウスモデル動物を用いて、発生維持メカニズムを分子レベルから解析する研究が必要と考えられる。そこで本研究では、まずマウスの慢性疼痛モデルの樹立を試みた。さらに、マイクロアレイを用いて創傷治癒過程における遺伝子の発現変化を網羅的に解析し、特に結合組織や痛み神経系の分子の関与を調べる基礎的研究を行った。

ノイトロトピン (以下 NTP) は、ワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液で、NSAIDs やオピオイド系薬と異なり、下行性疼痛抑制系神経の作用を活性化させることによって鎮痛作用を発揮し、炎症による痛みから神経痛まで幅広い痛みを抑えることができ、腰痛症や頸肩腕症候群、肩関節周囲炎、変形性関節症などの整形領域に対しても有効性を示す^{10,11)}。本研究は、痛性癒痕モデルに対する NTP 投与の効果も調べた。

方 法

1. 実験動物

10 週齢の野生型 C57BL/6J 雄マウスは日本エスエルシー株式会社 (静岡) から購入した。マウスは室温 23±1 °C, 相対湿度 50±15%, 12 時間明暗周期, 自由摂水, 摂食環境下で飼育された。本研究の動物実験計画は愛知医科大学実験動物管理委員会の承認を受けている。

2. 痛性癒痕モデルの作製

マウス痛性癒痕モデルの作製には、ラットモデルの作製を参考にして行った。具体的には、マウス左後肢の踵部に 19G 針を用いて孔をあけ、そこから遠位方向に専用のロッドを刺入し、後肢踵部から足趾まで、腱組織様の深部組織を広範に剥離することで、皮下組織に癒着性癒痕の作製を行った。また、孔のみをあけ、剥離しなかったマウスを対照とした (Sham 群: n=6)。手術群の半分のマウスは、手術直後から 10 日間、毎日 10 μl/一匹で NTP (日本臓器製薬株式会社・大阪, 20 NU/ml, 室温保存) を腹腔内注射により投与した (NTP 投薬群: n=7)。それ以外のマウスには生理食塩水を注射した (手術群: n=7)。

3. 手術や投薬による体重への影響の調査

足底の筋腱組織の広範剥離手術のマウス個体全体への影響、また NTP 投与のマウス個体全体への影響の可能性を、各群間で経時的に体重を測定することにより検討した。

4. 痛みの閾値測定

ラットモデルにおける測定方法を参考にして¹²⁾、マウス後肢足底への機械刺激に対する脚の引っ込み反射の閾値の測定を行った。手術前と手術後の各時点で、マウスを金属メッシュに乗せて、15分間の待ち時間と筆によるならし刺激でマウスを落ち着かせた後、メッシュの下方から von Frey フィラメント (Bioseb-In Vivo Research Instruments・フランス) (0.008 g, 0.4 g, 0.6 g, 1 g, 1.35 g, 2 g, 2.12 g, 3.14 g, 4 g, 5.25 g, 8.19 g) で、強度の低いものから順次使用して足底の趾根部を刺激した。脚引っ込み、速い足蹴りの行動を観察し、最も弱い強さのフィラメントによる刺激で反応が2回記録された刺激強度を痛みの閾値とした。閾値測定は、術前2日目、1日目、術後2時間、1日目、2日目、3日目、1週間目から10週間目まで毎週とし、測定時間は各テスト日の10時から13時までの間に行った。

5. 組織の採集

マウスにイソフルラン (アヴィ合同会社・東京) ガスによる吸引麻酔をかけた後、背側から皮膚を開けて脊柱外の筋肉を取り除いた。リウエルで脊柱管を開け、顕微鏡下で速やかに後根神経節 (DRG, L2~L5) を採取した。また、手術した左後肢からも足底筋腱部組織を採取した¹³⁾。

採取した組織を直ちに液体窒素で凍結した後、 -80°C で保存した。筋腱部組織は Beads Clasher $\mu\text{T}-12$ (Taitec 社製・埼玉) で粉砕した。筋腱部組織粉末または DRG 組織を、1.5 ml 試験管の中に、1 ml の Trizol (Ambion® | Life Technologies・東京) 溶液の存在下でハンディホモジナイザーを用いて均質化した。その後、(Trizol メーカーの説明に従って) TotalRNA を抽出した。RNA 濃度を NanoDrop™ND-1000 (株式会社 スクラム・東京) で測定した。

6. マイクロアレイ

手術後1週間と2週間目のマウスから前記した方法5に従って、後根神経節 (DRG)、及び左後肢の足底筋腱部組織を採取し、各々の組織サンプルから Total RNA を抽出した。マイクロアレイ分析は株式会社 Oncomics に依頼して行った。まず、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社・東京) による純度測定し、

RNA の品質を確認した。次に、Low Input Quick Amp labeling kit, one-color と RNA Spike-In kit (Agilent Technologies 社・東京) を用いて、RNA 100 ng に T7 promoter が付いた poly dT primer と逆転写酵素を用いて cDNA を作成し、さらに作成した cDNA と T7 RNA polymerase から Cy dye (Cy3) 標識 RNA を合成し、RNeasy mini kit で標識 RNA を probe として精製した。次に、標識 RNA probe を SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイキット 8x60k (Agilent Technologies 社・東京) にハイブリダイゼーションし、個々のアレイの蛍光度を測定し、GeneSpring GX 解析ソフト (Agilent Technologies 社・東京) を用いて結果を解析した。マイクロアレイには約 2.5 万個の遺伝子由来の約 5 万個のプロープが含まれていた。

7. リアルタイム PCR

マイクロアレイの結果に基づき、変動の大きな遺伝子、特に細胞外マトリクス成分と痛み関連成分に対して、より定量性のあるリアルタイム PCR 法を用いて、確認した。マイクロアレイ分析の時と同様に、手術後1週間と2週間目のマウスから前記した(方法5)に従って、後根神経節 (DRG)、及び左後肢の足底筋腱部組織を採取し、各々の組織サンプルから Total RNA を得た。Total RNA 2 μg から High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 社製・東京) を用いて、cDNA を作成し、リアルタイム PCR に供した。リアルタイム PCR は、SYBR Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ株式会社・滋賀) を用い、ABI Prism 7000 (Applied Biosystems 社製・東京) で行った。PCR は、 95°C 30 秒間の熱変性後、 95°C 、5 秒間の熱変性と 55°C 、30 秒間の伸長反応を 40 サイクル、最後に 72°C 34 秒間で実施した。PCR 用プライマーはタカラバイオ製のものを使用した。

8. 統計処理

閾値測定に関する有意差検定は、各群内での変化についての検定は Non parametric repeated measures ANOVA (Freedman 検定) で行い、有意差のある場合には Post Hoc test を行った。また、NTP 投薬群と手術群における群間差の検定は Mann-Whitney 検定で行った。

結 果

手術群、NTP 投薬群、Sham 群の何れの群も手術直後は処置を行った足に一過性の出血、発赤、腫脹を認めたが1週後の時点では視認で何れの群のマウスも術前と明確な差異がない程度に改善していた。

体 重

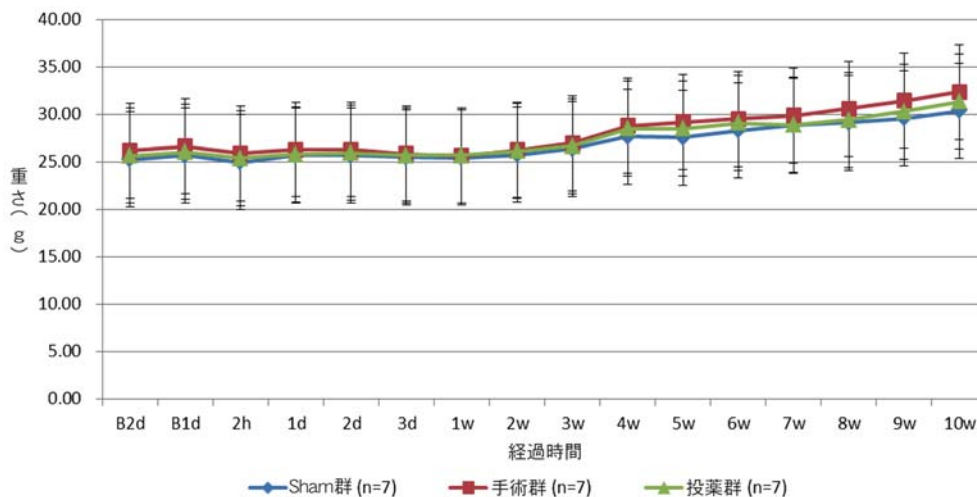


図 1. 手術前後各群のマウスの平均体重の変化
体重は正常に徐々に増加した. 各群の間に体重の差は見られなかった.

手術側

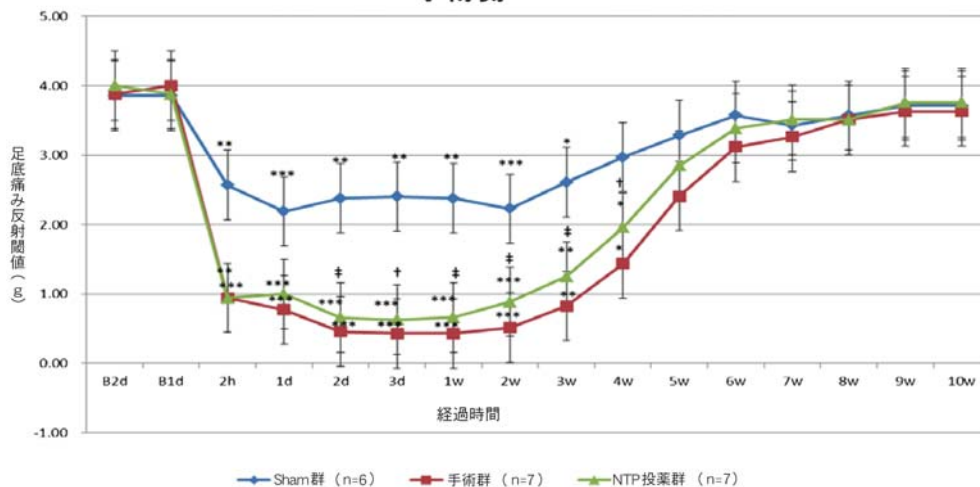


図 2. 手術した左後肢の足底機械刺激に対する脚引っ込め反射の閾値変化
術前の左後肢足底の機械刺激に対する反射閾値は約 4 g だったが, 手術群では術後急激に 1 g 以下までに低下した ($p < 0.01$). その過敏状態は術後 4 週間目まで, 手術による創傷が治癒した後もなお続いていた. NTP 投薬群は, 術後急激に 1 g 以下までに低下した ($p < 0.01$). その過敏状態は術後 4 週間目まで続いていた. Sham 群も術後 2 時間から 2 週間まで同じような変化傾向を示した.
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.
手術群と NTP 投薬群の比較では 2 日から 4 週間まで有意差が認められた ($p < 0.05$).
†: $p < 0.05$, ‡: $p < 0.01$.

1. 手術や投薬による体重への影響の調査

足底の筋腱組織の広範剥離手術および NTP 投与がマウス個体に及ぼす体重変化は, 手術群, NTP 投薬群, Sham 群の群間で統計学的な差異は認めなかった (図 1).

2. 脚引っ込め反射の閾値の変化 (図 2)

術前の左後肢 (手術側) 足底の機械刺激に対する脚引っ込め反射の閾値は約 4 g だった. 手術群では手術後 2 時間で 1 g 以下までに低下し ($p < 0.05$), その閾値低下は術後 4 週間目まで持続していた. NTP 投薬群では, 痛み閾値は低下した状態が手術後 2 時間から 4 週間の時点ま

非手術側

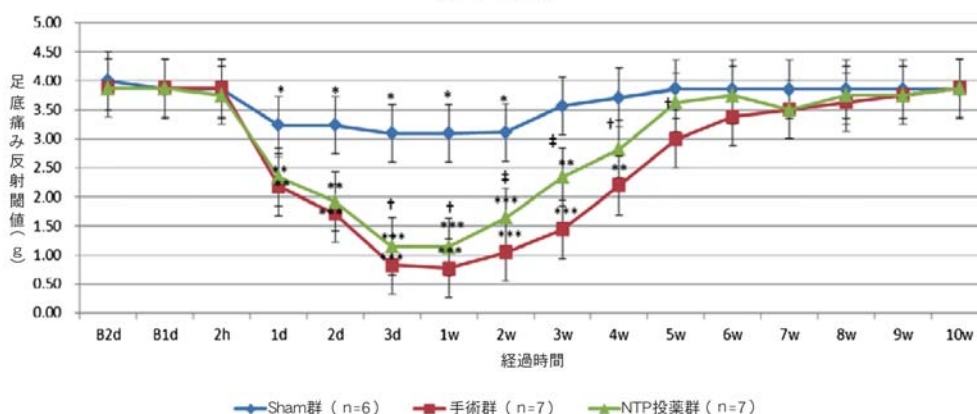


図3. 手術しなかった右後肢の足底機械刺激に対する脚引っ込め反射の閾値変化
手術をしなかった右後肢(非手術側)においても、痛み閾値の低下が観察された。手術群では術後1日から4週間目まで持続していた。NTP投薬群は、術後1日から3週間目まで閾値低下が持続していた。Sham群も術後1日から2週間まで同じような変化傾向を示した。
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.
手術群とNTP投薬群比較すると術後3日から5週間まで有意差が認められた ($p < 0.05$).
†: $p < 0.05$, ‡: $p < 0.01$.

で続いた。Sham群でも閾値低下は術後2時間から生じ、3週まで有意に低下した。

手術をしなかった右後肢(非手術側)においても、脚引っ込め反射の閾値の低下が観察された(図3)。手術群の非手術側の足底の閾値低下は、術後1日目から出現し、3週まで持続していた。NTP投薬群でも非手術側の足底の閾値低下は、術後1日目から出現し、4週まで持続していた。Sham群でも閾値低下は術後1日目から出現し、2週まで持続していた。

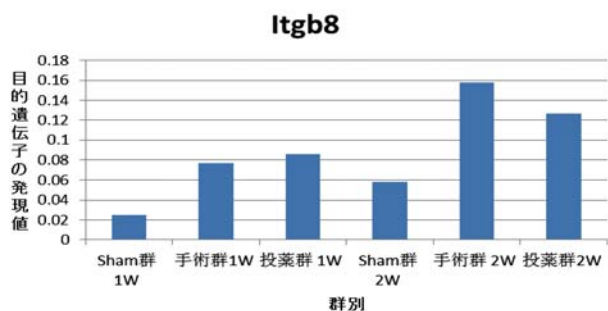
手術群とNTP投薬群の群間比較では術後2日から4週間までの間、手術側における脚引っ込め反射の閾値に有意差が認められた。また、非手術側でも術後3日から5週間まで有意差が認められた。

3. マイクロアレイによる遺伝子発現変化の解析

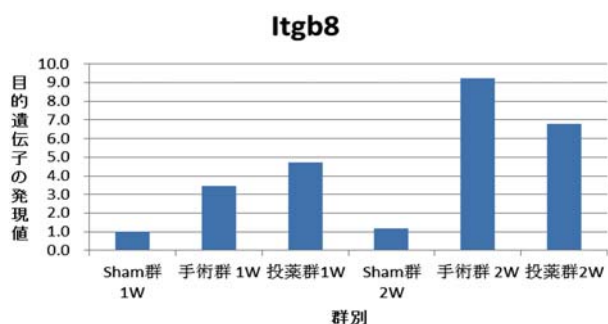
足底癒痕組織については、術後1週目と2週目も継続してsham群に対して手術群で2倍以上増加した遺伝子の数は128個に及んだ(表1*)、中には、組織癒痕化変化に関与する細胞外マトリックス関連遺伝子が多数含まれていた。手術後に左後肢足底筋腱部組織でsham群に対して1週と2週連続で2倍以上発現低下した遺伝子(計49個)を表2*に、手術後に左後肢足底筋腱部組織でsham群に対して1週目で2倍以上発現増加した遺伝子(計392個)を表3*に、手術後に左後肢足底筋腱部組織でsham群に対して2週で2倍以上発現増加した遺伝子(計341個)を表4*に示した。NTP投薬の影響とし

て、術後に左後肢足底筋腱部組織で手術群とNTP投薬群間の比較して1週と2週連続して2倍以上発現増加しなかった遺伝子(計78個)を表5*に、2週目で2倍以上発現増加しなくなった遺伝子(計36個)を表6*に示した。さらに、術後に左後肢足底筋腱部組織で手術群とNTP投薬群間と比較して1週と2週連続して2倍以上発現増加した遺伝子(計66個)を表7*に示した。一方、DRGにおける遺伝子発現の変化は、術後1週目と2週目に継続してsham群に対して手術群で2倍以上増加した遺伝子の数は4個のみで、痛み関連遺伝子はなかった(表8)。DRG組織で、術後に1週と2週連続で2倍以上発現低下した遺伝子(計3個)を表9に、術後1週目で2倍以上発現増加した遺伝子(計156個)を表10*に、また術後に2週目で2倍以上発現増加した遺伝子(計181個)を表11*に示した。DRGにおけるNTP投薬の影響として、術後にDRG組織に手術群とNTP投薬群間とを比較して1週と2週連続して2倍以上発現増加しなかった遺伝子(計6個)を表12に、術後に手術群とNTP投薬群間とを比較して2週目2倍以上発現増加しなかった遺伝子(計2個)を表13に、手術群とNTP投薬群間を比較して1週と2週連続して2倍以上発現増加した遺伝子(計2)を表14に示した。

(注: *代表として細胞外マトリックス関連遺伝子と痛みの関連遺伝子を示している。)



a. RT-PCR



b. マイクロアレイ

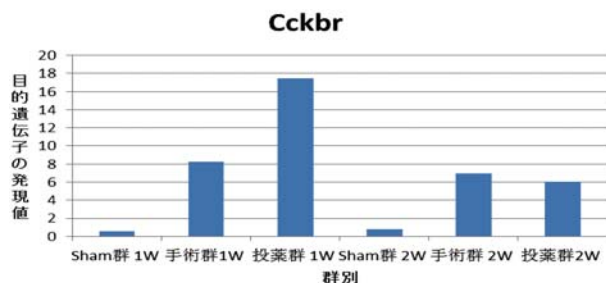
図 4. 筋腱部組織における integrin $\beta 8$ の発現
筋腱部組織における integrin $\beta 8$ の発現は RT-PCR の結果とマイクロアレイの結果が一致した。このことから、マイクロアレイの結果が信頼できることが確認できた。

4. リアルタイム PCR による確認

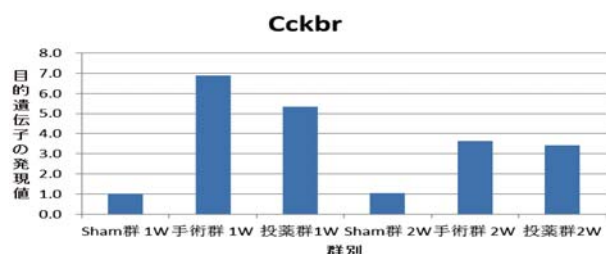
リアルタイム PCR を行ったプライマーの配列を表 15 に示す。

筋腱部の癒痕では、Col1a1, Col15a1, Col5a2, Integrin $\beta 8$ (図 4), hyaluronan synthase 2, lumican, テネイン C, テネイン N, Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), Thrombospondin 2, Adamts 9, MyoD family inhibitor, midkine, CCL6, Ankyrin repeat domain 2, secreted frizzled-related protein 2 などの発現は経時的に上昇したが, solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger) member 2 (Slc24a2) の発現は経時的に低下した。

DRG では, Cholecystokinin B receptor (図 5), Neuropeptide Y, NMDA2A (glutamate receptor, ionotropic), Activating transcription factor 3 (Atf3) の発現は経時的に上昇したが, olfactory receptor 1535 と voltage-gated sodium channel type III alpha (Scn3a) は逆に低下した。一方, グリン 2a, Gria1, neuropilin 1 と Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (Camk4) NRP1 の発現はほとんど変わらなかった。



a. RT-PCR



b. マイクロアレイ

図 5. 後根神経節 (DRG) での Cckbr の発現
後根神経節 (DRG) での Cckbr の発現は RT-PCR の結果とマイクロアレイの結果が一致した。このことから、マイクロアレイの結果が信頼できることが確認できた。

考 察

1. 新しいタイプの術後疼痛モデルマウス実験モデルに始めて成功した。

手術群のマウスでは手術施行部に機械的刺激を与えた際の脚引っ込み反射の閾値が 4 週にわたって低下していた。過去の痛み動物モデルに関する研究では von Frey フィラメントによる刺激閾値低下は疼痛に関連した行動学的変化と考えられてきていることから、本モデルについても動物が痛みによって行動変容をしていると推察された。また、今回の結果は我々がラットで行ったモデル実験系と類似した結果であった。またラットの実験系では substance-P と CGRP などが癒痕組織内で増加していることが報告されているが、今回のマイクロアレイの結果から組織抗体染色で観察された活性 (Tac1 と Calca) が継続増加していることもこの変化に関連していると推察された。また、本モデル動物では興味深いことに手術をしていない側の後肢においても、術後 1 日目以降に反射閾値の低下がみられていた。過去のモデル動物を用いた実験でも同様の変化がみられており、末梢神経から脊髄における神経系の感作がその要因と考えられる。

癒痕化の可能性は、マイクロアレイの結果 (表 1, 表 3, 表 4) から、また部分的であるが RT-PCR の結果から

も、癬痕化に関連する遺伝子(主に細胞外マトリックス分子)と細胞増殖因子の継続的に発現上昇で示唆された。さらにマイクロアレイの結果から、調べた限りでERKなどの細胞外マトリックスシグナル伝達系分子の関与が(特に、表3と表4の1週、または2週目に2倍以上増加する遺伝子を参照)から示唆された¹⁴⁾¹⁵⁾。

2. 癬痕化と痛み発症の確認とその機構の解析の予備的な実験をマイクロアレイにより行い、示唆的な多くの情報を得た。

まず、第一に手術群の足底の筋腱組織において発現増加する分子と手術群のDRGに発現増加する分子が、大きく異なり、ほとんど重複がないことが、分かった¹⁶⁾。前者では、癬痕化に関与するコラーゲンなどの細胞外マトリックス分子を主にする発現の増加が¹⁷⁾、後者では、痛みの伝達と発症に関連する遺伝子やグルタミン酸受容体(Grin2a)などの神経シグナル分子受容体の発現の増加が観察された¹⁸⁾。このことは、これらの分子の発現制御に関連する分子も、筋腱組織とDRGでそれぞれ異なって発現してきているものと考えられ、それぞれの部分が病態に及ぼすメカニズムを考える上で重要な所見と思われる。

2番目に、筋腱組織とDRGサンプルそれぞれで、手術後1週目で2倍以上発現増加し、その後低下するもの、また手術後2週目になって2倍以上の発現増加を示す遺伝子があった。おそらく、1週目で急上昇するものは、筋腱組織では手術による組織の損傷を契機として組織修復を目的とした遺伝子群の発現上昇と推察される、またDRGでは組織損傷によって引き起こされる痛みなどが刺激となって出現した遺伝子群と考えられる。2週目になって発現が上昇する遺伝子は、筋腱組織では筋肉組織の再構築に関連した遺伝子(例えばコラーゲン、myogenin、筋肉アクチン、ミオシンなどの遺伝子)が多く認められた。

3番目に筋腱組織挫滅手術後にNTPを投与した実験群は、ほとんどの場合、手術操作に依存して発現上昇した遺伝子の発現が減少しており、癬痕化や痛みが抑制されていると考えられた。また、この結果は、行動実験の結果と良い一致を示した。今後は、NTP投与で特異に発現が上昇した分子の解析を進める必要がある。つまり、このような遺伝子は、おそらくNTPの作用機構に関連する分子と推定されるからである。

3. RT-PCRでの発現上昇の確認

マイクロアレイで発現がみられた遺伝子の1部についてはRT-PCRにより、発現上昇の確認を行った。マイ

クロアレイの結果とRT-PCRの結果は、マイクロアレイの結果が定量的にも信頼のおけるものであることを示唆した。しかし、今後、機構を解析する上で、重要と思われる分子については、RT-PCRを行い、再確認する必要があると思われる。特に、時間経過で発現がどのように変化するかを調べる必要があると思われる。

遺伝子の発現上昇は必ずしもコードされる蛋白分子の量に反映されるとは限らない。例えば、ヒアルロン酸合成酵素1(Has1)は遺伝子発現が上昇してもその蛋白質は特異抗体による検出でも検出限界以下である。従って、今後、筋腱組織とDRGで遺伝子発現上昇を確認した分子について、組織切片の免疫染色(immunohistology)や組織抽出液の電気泳動後の免疫染色(ウエスタンブロッティング)を行い、蛋白質としての発現を確認する必要があると思われる。

結 語

1. マウス癬痕性疼痛モデルの開発

組織損傷後に持続的に痛みが継続するげっ歯類のモデル動物はこれまでほとんど報告がなかった。今回のマウスモデル実験系では組織学的に創傷部に癬痕性組織を認め、同時にvon Freyフィラメントによる刺激に対して4週間まで持続的な閾値低下(痛み感受性の増加)を認めた。従って、創傷による癬痕性動物モデルのひとつとして有用と思われた。

2. 癬痕性疼痛動物モデルにおける遺伝子発現解析

上記のモデルを用いて癬痕化と疼痛発症の機構の解析を目指して、予備的な実験を行った。モデル動物の癬痕部では細胞外マトリックス関連の遺伝子の持続上昇、DRGではCckbrの遺伝子の上昇などが認められた。今後は、これらの因子の関連性を解明することで機構の解析の足がかりを得たい。

謝辞 稿を終えるにあたり、本研究にご協力いただいた先端医学研究センター羽瀧弘子先生、羽瀧脩躬先生、解剖学講座大道裕介先生、大道美香先生、学際的痛みセンターの各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 服部政治. 日本における慢性疼痛保有率. 日薬理誌 2006; 127: 176-80.
- 2) Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. Cell 2009; 139(2): 267-84.

- 3) Henderson J, Terenghi G, McGrouther DA, Ferguson MW. The reinnervation pattern of wounds and scars may explain their sensory symptoms. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2006; 59: 942-50.
- 4) Kawaguchi Y, Matsui H, Tsuji H. Back muscle injury after posterior lumbar spine surgery. Part 2: Histologic and histochemical analyses in humans. *Spine (Phila Pa 1976)* 1994; 19(22): 2598-602.
- 5) 辻 陽雄. 基本腰椎外科手術書 1996; 110-35.
- 6) Scott JR, Muangman PR, Tamura RN, Zhu KQ, Liang Z, Anthony JBS, Engrav LH, Gibran NS. Substance P levels and neutral endopeptidase activity in acute burn wounds and hypertrophic scar. *Plast Reconstr Surg* 2005; 115: 1095-102.
- 7) 菊池正知. ヒト皮膚癒痕および癒痕ケロイドにおける chemicalmediator の動態. *日形会誌* 1984; 4: 873-85.
- 8) Kajita Y, Suetomi K, Okada T, Ridwan H, Binti C, Sato J, Sato K, Ushida T. Animal model with painful scar: pain-related behavior and immunohistochemical study on the spinal dorsal horn and peripheral tissue. *Pain Res* 2010; 25: 135-44.
- 9) 郡司裕則, ほか. トラニラストが線維芽細胞の TGF- β 1, コラーゲン, コラゲナーゼ産生に与える影響に関する実験的研究. *日形会誌* 1996; 16: 765-72.
- 10) Hata T, Kita T, Itoh E, Oyama R, Kawabata A. Mechanism of the analgesic effect of neurotropin. *Jpn J Pharmacol* 1988; 48(2): 165-73.
- 11) Itoh E, Hata T. Analgesic mechanism of neurotropin: relation to the serotonergic system and influence of spinal cord transection. *Jpn J Pharmacol* 1989; 51(2): 267-72.
- 12) Ohmichi M, Ohmichi Y, Ohishi H, Yoshimoto T, Morimoto A, Li Y, Sakurai H, Nakano T, Sato J. Activated spinal astrocytes are involved in the maintenance of chronic widespread mechanical hyperalgesia after cast immobilization. *Mol Pain* 2014; 24: 10-23.
- 13) Ohmichi Y, Sato J, Ohmichi M, Sakurai H, Yoshimoto T, Morimoto A, Hashimoto T, Eguchi K, Nishihara M, Arai YC, Ohishi H, Asamoto K, Ushida T, Nakano T, Kumazawa T. Two-week cast immobilization induced chronic widespread hyperalgesia in rats. *Eur J Pain* 2012; 16(3): 338-48.
- 14) Sluka KA, Kalra A, Moore SA. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve* 2001; 24(1): 37-46.
- 15) Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain* 2003; 104(3): 567-77.
- 16) Zhang J, De Koninck Y. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J Neurochem* 2006; 97: 772-83.
- 17) Zavan B, Ferroni L, Giorgi C, Calò G, Brun P, Cortivo R, Abatangelo G, Pinton P. Hyaluronic acid induces activation of the κ -opioid receptor. *PLoS One* 2013; 8(1): 555-610.
- 18) Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, Borsello T, Bonny C, Strichartz GR, Decosterd I, Ji RR. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J Neurosci* 2006; 26: 3551-560.

表 1. 術後の左後肢足底筋腱部組織で 1 週と 2 週連続で 2 倍以上発現増加した遺伝子 (全部で 128 個)

GeneSymbol	GeneName
Adamts19	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 19
Adamts3	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 3
Adamts9	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9
Adora3	adenosine A3 receptor
Adra2a	adrenergic receptor, alpha 2a
Cacna1g	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit
Calca	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha
Camk4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV
Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4
Ccl6	chemokine (C-C motif) ligand 6
Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7
Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8
Cdh11	cadherin 11
Col14a1	collagen, type XIV, alpha 1
Col15a1	collagen, type XV, alpha 1
Col18a1	collagen, type XVIII, alpha 1
Col5a2	collagen, type V, alpha 2
Creb3l1	cAMP responsive element binding protein 3-like 1
Ctsk	cathepsin K
Efemp2	epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2
Fndc1	fibronectin type III domain containing 1
Gad2	glutamic acid decarboxylase 2
Glb1l	galactosidase, beta 1-like
Itgb8	integrin beta 8
Lox	lysyl oxidase
Lrrc32	leucine rich repeat containing 32
Lum	lumican
Mdk	midkine
Mmp9	matrix metallopeptidase 9
Pcdh12	protocadherin 12
Rab12	RAB, member of RAS oncogene family-like 2
Sfrp1	secreted frizzled-related protein 1
Sfrp2	secreted frizzled-related protein 2
Slc14a1	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1
Spon1	spondin 1, (f-spondin) extracellular matrix protein
Tac1	tachykinin 1
Thbs2	thrombospondin 2
Tnc	tenascin C
Tnf	tumor necrosis factor
Tnfaip6	tumor necrosis factor alpha induced protein 6
Tnn	tenascin N

表には、細胞外マトリックス関連遺伝子 (27 個, 青字) と痛み関連遺伝子 (12 個, 緑字) のみを示した。赤字は CGRP と substanceP 合成に関連する遺伝子 (2 個, 本文を参照)。

表 2. 術後の左後肢足底筋腱部組織で 1 週と 2 週連続で
2 倍以上発現低下した遺伝子 (全部で 49 個)

GeneSymbol	GeneName
Atp1b2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2 polypeptide
Gpc5	glypican 5
Npnt	nephronectin
Pla2g4d	phospholipase A2, group IVD
Slc15a2	solute carrier family 15 (H ⁺ /peptide transporter), member 2
Slc24a2	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 2

表には, 細胞外マトリックス関連遺伝子 (2 個, 青字) と痛み関連遺伝子 (4 個, 緑字) のみを示した.

表 3. 術後の左後肢足底筋腱部組織で 1 週で 2 倍以上発現増加した遺伝子 (全部で 392 個)

GeneSymbol	GeneName
Agri	agrin
Atp6v1g3	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit G3
B4galt1	UDP-Gal: betaGlcNAc beta 1, 4-galactosyltransferase, polypeptide 1
B4galt7	xylosylprotein beta 1, 4-galactosyltransferase, polypeptide 7 (galactosyltransferase I)
C1qtnf1	C1q and tumor necrosis factor related protein 1
Cacnb3	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit
Chpf	chondroitin polymerizing factor
Chst1	carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1
Chst5	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 5
Cib1	calcium and integrin binding 1 (calmyrin)
Cnr1	cannabinoid receptor 1 (brain)
Creb5	cAMP responsive element binding protein 5
Ephb4	Eph receptor B4
Gabrd	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit delta
Gmpbb	GDP-mannose pyrophosphorylase B
Grm1	glutamate receptor, metabotropic 1
Gstm2	glutathione S-transferase, mu 2
Icam2	intercellular adhesion molecule 2
Il11	interleukin 11
Il17ra	interleukin 17 receptor A
Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist
Il25	interleukin 25
Il1t1b	interleukin 10-related T cell-derived inducible factor beta
Kctd17	potassium channel tetramerisation domain containing 17
Kif27	kinesin family member 27
Kif5a	kinesin family member 5A
Kif6	kinesin family member 6
Kif9	kinesin family member 9
Kifc5b	kinesin family member C5B
Krtap1-3	keratin associated protein 1-3
Lgals1	lectin, galactose binding, soluble 1
Mark4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4
Mcpt9	mast cell protease 9
Mgat5	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5
Mrc2	mannose receptor, C type 2
Nr5a2	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2

Oscpl	organic solute carrier partner 1
Pcdh17	protocadherin 17
Pcdhb1	protocadherin beta 1
Pglyrp3	peptidoglycan recognition protein 3
Plod3	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3
Prss53	protease, serine, 53
Rab3i1	RAB3A interacting protein (rabin3)-like 1
Rab7i1	RAB7, member RAS oncogene family-like 1
Rab8a	RAB8A, member RAS oncogene family
Slc12a1	solute carrier family 12, member 1
Slc13a5	solute carrier family 13 (sodium-dependent citrate transporter), member 5
Slc16a2	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 2
Slc16a7	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 7
Slc17a3	solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3
Slc27a3	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3
Slc30a7	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 7
Slc35f4	solute carrier family 35, member F4
Slc38a6	solute carrier family 38, member 6
Slc38a8	solute carrier family 38, member 8
Slc39a5	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 5
Slc5a7	solute carrier family 5 (choline transporter), member 7
Slc9a10	solute carrier family 9, member 10
Slco1a5	solute carrier organic anion transporter family, member 1a5
Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein
Sulf1	sulfatase 1
Sult1d1	sulfotransferase family 1D, member 1
Sult2a7	sulfotransferase family 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 7
Trpm6	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6
Uap1l1	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1-like 1
Ugcg	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
Xcl1	chemokine (C motif) ligand 1
Ywhaq	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide

表には、細胞外マトリックス関連遺伝子 (28 個, 青字) と痛み関連遺伝子 (40 個, 緑字) のみを示す.

表 4. 術後の左後肢足底筋腱部組織で 2 週目で 2 倍以上発現増加した遺伝子 (全部で 341 個)

GeneSymbol	GeneName
Accn1	amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal (degenerin)
Adamts18	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 18
Cckbr	cholecystokinin B receptor
Ccr9	chemokine (C-C motif) receptor 9
Cdh10	cadherin 10
Cdk11	cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)
Chrm4	cholinergic receptor, muscarinic 4
Clec16a	C-type lectin domain family 16, member A
Col12a1	collagen, type XII, alpha 1
Csnk1g3	casein kinase 1, gamma 3
Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Esr1	estrogen receptor 1 (alpha)
Faah	fatty acid amide hydrolase
Fndc1	fibronectin type III domain containing 1
Fut7	fucosyltransferase 7
Fut9	fucosyltransferase 9
Gabra2	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 2
Galnt14	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14
Gpx6	glutathione peroxidase 6
Hif1a	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
Igf1	insulin-like growth factor 1
Il22ra2	interleukin 22 receptor, alpha 2
Il4	interleukin 4
Ilkap	integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C
Irx3	Iroquois related homeobox 3 (Drosophila)
Itgb3bp	integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)
Kcnj10	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 10
Kcnk9	potassium channel, subfamily K, member 9
Kcnv1	potassium channel, subfamily V, member 1
Kctd11	potassium channel tetramerisation domain containing 11
Kif12	kinesin family member 12
Kif17	kinesin family member 17
Kif2a	kinesin family member 2A
Kif2b	kinesin family member 2B
Klf1	Kruppel-like factor 1 (erythroid)
Krt71	keratin 71
Krt9	keratin 9
Krtap16-7	keratin associated protein 16-7
Krtap20-2	keratin associated protein 20-2
Muc19	mucin 19
Muc4	mucin 4
Nab2	Ngfi-A binding protein 2
Nlgn3	neuroligin 3
Pla2g3	phospholipase A2, group III
Prkch	protein kinase C, eta
Rgs3	regulator of G-protein signaling 3
Rptn	repetin
Scgb3a2	secretoglobin, family 3A, member 2

Scn3a	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha
Slc15a5	solute carrier family 15, member 5
Slc16a4	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 4
Slc22a15	solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 15
Slc22a20	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 20
Slc22a28	solute carrier family 22, member 28
Slc22a30	solute carrier family 22, member 30
Slc36a3	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 3
Slc38a5	solute carrier family 38, member 5
Slc5a12	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 12
Slc7a12	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, γ^+ system), member 12
Tnfrsf8	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
Ugt2b38	UDPglucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B38

表には、細胞外マトリックス関連遺伝子 (21 個, 青字) と痛み関連遺伝子 (40 個, 緑字) のみを示した。

表 5. 術後の左後肢足底筋腱部組織で手術群と投薬群間を比較して 1 週と 2 週で連続して 2 倍以上の発現増加が見られなかった遺伝子 (全部で 78 個)

GeneSymbol	GeneName
C1qtnf1	C1q and tumor necrosis factor related protein 1
Col15a1	collagen, type XV, alpha 1
Col16a1	collagen, type XVI, alpha 1
Fndc1	fibronectin type III domain containing 1
Glt1d1	glycosyltransferase 1 domain containing 1
Igsf10	immunoglobulin superfamily, member 10
Kif6	kinesin family member 6
Krtap4-2	keratin associated protein 4-2
Nr5a2	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2
Pcdh1	protocadherin 1
Uggt2	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 2

表には、細胞外マトリックス関連遺伝子 (9 個, 青字) と痛み関連遺伝子 (2 個, 緑字) のみを示した。

表 6. 術後の左後肢足底筋腱部組織で手術群と投薬群間を比較して 2 週目で 2 倍以上発現増加が見られなかった遺伝子 (全部で 36 個)

GeneSymbol	GeneName
Adamts12	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 12
Adamts19	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 19
Adora2b	adenosine A2b receptor
Col12a1	collagen, type XII, alpha 1
Col14a1	collagen, type XIV, alpha 1
Fgf15	fibroblast growth factor 15
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3
Muc16	mucin 16
Pcdha9	protocadherin alpha 9
Slc35d2	solute carrier family 35, member D2
Ugt3a2	UDP glycosyltransferases 3 family, polypeptide A2

表には、細胞外マトリックス関連遺伝子 (9 個, 青字) と痛み関連遺伝子 (2 個, 緑字) のみを示した。

表 7. 術後の左後肢足底筋腱部組織で手術群と投薬群間を比較して 1 週と 2 週で連続して 2 倍以上発現増加した遺伝子 (全部で 66 個)

GeneSymbol	GeneName
Adamts2	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2
Col14a1	collagen, type XIV, alpha 1
Col6a5	collagen, type VI, alpha 5
Ecm1	extracellular matrix protein 1
Emcn	endomucin
Fzd6	frizzled homolog 6 (Drosophila)
Gbp7	guanylate binding protein 7
Gdf10	growth differentiation factor 10
Icam1	intercellular adhesion molecule 1
Igf1	insulin-like growth factor 1
Kcnk3	potassium channel, subfamily K, member 3
Krtap5-4	keratin associated protein 5-4
Krtap8-2	keratin associated protein 8-2
Lrg1	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1
Lrrc18	leucine rich repeat containing 18
Mmp8	matrix metalloproteinase 8
Tnfaip2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
Tnfrsf14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)
Tnfsf11	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11

表には、細胞外マトリックス関連遺伝子 (16 個, 青字) と痛み関連遺伝子 (3 個, 緑字) のみを示した。

表 8. 術後の DRG 組織で 1 週と 2 週で連続して 2 倍以上発現増加した遺伝子 (全部で 4 個)

GeneSymbol	GeneName
Cd163l1	CD163 molecule-like 1
Grin2a	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1)
Cckbr	cholecystokinin B receptor
Slc35d1	solute carrier family 35 (UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine dualtransporter), member D1

緑字は痛み関連遺伝子を示す(3 個). 細胞外マトリックス関連遺伝子はなかった。

表 9. 術後の DRG 組織で 1 週と 2 週で連続して 2 倍以上発現低下した遺伝子 (全部 3 個)

GeneSymbol	GeneName
Olf1535	olfactory receptor 1535
Epcam	epithelial cell adhesion molecule
Ankrd2	ankyrin repeat domain 2 (stretch responsive muscle)

青字は細胞外マトリックス関連遺伝子を示す。

表 10. 術後の DRG 組織で 1 週目で 2 倍以上発現増加した遺伝子 (全部で 156 個)

GeneSymbol	GeneName
Abpz	androgen binding protein zeta
Adam22	a disintegrin and metallopeptidase domain 22
Adamdec1	ADAM-like, decysin 1
Adamts18	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 18
Adrb3	adrenergic receptor, beta 3
Cacng2	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 2
Coll1a2	collagen, type XI, alpha 2
Col2a1	collagen, type II, alpha 1
Cpn2	carboxypeptidase N, polypeptide 2
Csf1	colony stimulating factor 1 (macrophage)
Egflam	EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains
Flrt3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3
Fst	follistatin
Hif3a	hypoxia inducible factor 3, alpha subunit
Il27ra	interleukin 27 receptor, alpha
Il9r	interleukin 9 receptor
Il1f1b	interleukin 10-related T cell-derived inducible factor beta
Itga5	integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)
Kcnk16	potassium channel, subfamily K, member 16
Kctd8	potassium channel tetramerisation domain containing 8
Kif2c	kinesin family member 2C
Krt76	keratin 76
Lamb3	laminin, beta 3
Matn1	matrilin 1, cartilage matrix protein
Mepe	matrix extracellular phosphoglycoprotein with ASARM motif (bone)
Ostn	osteocrin
Prg4	proteoglycan 4 (megakaryocyte stimulating factor, articular superficial zone protein)
Slc22a14	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 14
Slc39a11	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 11
Slc6a18	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 18
Tgfbr1	transforming growth factor, beta receptor I

表には、細胞外マトリックス関連遺伝子 (17 個, 青字) と痛み関連遺伝子 (13 個, 緑字) のみを示した。

表 11. 術後の DRG 組織で 2 週目で 2 倍以上発現増加した遺伝子 (全部で 181 個)

GeneSymbol	GeneName
Adam18	a disintegrin and metalloproteinase domain 18
Atp4b	ATPase, H ⁺ /K ⁺ exchanging, beta polypeptide
Ces1b	carboxylesterase 1B
Ctsr	cathepsin R
Egfl6	EGF-like-domain, multiple 6
Fgf11	fibroblast growth factor 11
Fsd2	fibronectin type III and SPRY domain containing 2
Fut9	fucosyltransferase 9
Has2as	HAS2 antisense RNA (non-protein coding)
Ifnab	interferon alpha B
Il12rb1	interleukin 12 receptor, beta 1
Il9	interleukin 9
Itih1	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 1
Lrrc6	leucine rich repeat containing 6 (testis)
Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1
Pcdh15	protocadherin 15
Rab25	RAB25, member RAS oncogene family
Slc22a26	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 26
Slc24a4	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 4
Slco1b2	solute carrier organic anion transporter family, member 1b2
Slco5a1	solute carrier organic anion transporter family, member 5A1
Tnfrsf13b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b

表には、細胞外マトリックス関連遺伝子 (13 個, 青字) と痛み関連遺伝子 (8 個, 緑字) のみを示した。

表 12. 術後の DRG 組織で手術群と投薬群間を比較して 1 週と 2 週連続して 2 倍以上の発現増加が見られなかった遺伝子 (全部で 6 個)

GeneSymbol	GeneName
Clnk	cytokine-dependent hematopoietic cell linker
Foxr2	forkhead box R2
Gm11545	predicted gene 11545
Krtap4-1	keratin associated protein 4-1
Pdcd1lg2	programmed cell death 1 ligand 2
Trank1	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1

青字は、細胞外マトリックス関連遺伝子を示す (1 個)。

表 13. 術後の DRG 組織で手術群と投薬群間を比較して 2 週目 2 倍以上の発現増加が見られなかった遺伝子 (2 個)

GeneSymbol	GeneName
Slc27a2	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2
Galnt6	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 6

緑字は痛み関連遺伝子を示す (1 個)。

表 14. 術後の DRG 組織で手術群と投薬群間を比較して 1 週と 2 週連続して 2 倍以上発現増加した遺伝子 (2 個)

GeneSymbol	GeneName
Lif	leukemia inhibitory factor
Masp1	mannan-binding lectin serine peptidase 1

表 15. RT-PCR に用いたプライマーの配列 (49 個)

GeneSymbol	GeneSequence	GeneSymbol	GeneSequence
Adamts9	F: AGGCTGCAGGACTCAGCACA R: AGGTCCCAAAGTGGCTCCAA	Itgb8	F: AGATTGCTGCTGGTGATGACAGA R: GAAAGTTGGCCTAATGACGGATG
Ambp	F: AACACTGCCAGATATCCAGGTTCA R: GTGCTCAGCTCATCTTGTCCCTTA	Itih1	F: GAACCTGGTGATCCTGAACCTA R: CCGAAGTATGTGCTCTCGTGTTG
Ankrd2	F: GCAGAGAGCCACAGAGCTCATC R: AGGCGTTTCTTCTCTAGCA	Lox	F: GAGTGGCTGAAGGCCACAAAG R: TGCTGCCGCATAGGTGTCATAA
Atf3	F: GCTGCTGCCAAGTGTGCGAA R: CGGTGCAGGTTGAGCATGTATATC	Lum	F: ATCCTTGCTCGAGCTTGATCTCT R: AGACAGTGGTCCAGGATCTTACA
Cacna2d1	F: TATCAGCACGCAGCAGTCCA R: AAACCTCATCTAAGGCACTTGTTCA	Mdfi	F: AGCAGGCTCTGAACAGCATTGA R: GCTGGAGCCATTTGGCAGTA
Camk4	F: GTGCTCATGAAGACAGTATGTGGAA R: CTACAGACCACATGTCCACCTCAG	Mdk	F: TAAGCCCTGCACCTCCAAGA R: AGGACAGGCGTGATTGACAGA
Cckbr	F: GTGCTCCCTCAACAGCAGTA R: CATCAGAAAGATCACCGCATAAAGG	Mmp3	F: ACTTTGACGATGATGAACGATGGA R: TTCATGAGCAGCAACCAGGAATAG
Ccl6	F: CTTTATCCTTGTGGCTGTCCTTG R: GCTTGATGCACCCACCACT	Npy	F: CGCTCTGCGACACTACATCAAT R: TGAGATGAGGGTGGAAACTTGG
Cd63l1	F: GCCATGAGGACAACGCTCTG R: CTCAGATTGCCTTGGTCACCTTC	Nrp1	F: AGCTACTGGGCTGTGAAGTGGAA R: TGTGAGCTGGAAGTCATCACCTG
Cd44	F: CCAGCCAGTGACAGGTTCCA R: CTGCGTAGCGGCAGGTTACA	Ntsr1	F: CCGTTGATGTCTTGATGCTCCTA R: ATGACCTGGCCGAAGCTA
Cdhr3	F: CCAGATGAACTCTGTCTTTGATGGA R: AATTCGGCAGCTGGGTTAATG	Ofr1535	F: TGTGAAGTTCAGTGATGCTGAAG R: GTGAGAGCCACAGGTTCCAAAG
Clca6	F: CCAGCTCTTGCAAACCTTACCTACA R: TCACTCAACAGCAAGATCTCAGTCC	Pacsin1	F: AGCAGATCATGGGTGGCTTC R: TGCTCAGGTGTGACCGATTG
Col15a1	F: GGACAGCCTGGACTTGATGGA R: TCGCCAGCCGAACCATTAG	Prkce	F: TGCCACGAGCTCATAATCACAA R: GACCCACAGTGATCGCAGAAAG
Colla1	F: GACATGTTTACGCTTTGTGGACCTC R: GGGACCCTTAGGCCATTGTGTA	Scn3a	F: AACTTGGTGCCATCAAATCCCTAC R: GCACCAACAAGAGCGTTTACCA
Col15a2	F: CATTGGTCCACCTGGTGAAGA R: AGGTAAACCATCAGACCCTGGAA	Sfrp2	F: AACGACATCATGGAACCCTTTGT R: CACGCCGTTTACGCTTGTAATG
Dbh	F: GACCGGCTACTGCACAGACAAG R: CGTCAGGTGTGTATGAAGCTGAGA	Slc24a2	F: CAGTGTCATAGTGGCCCGAAAG R: GCTGACAGTCACTGGGCTGAA
Epcam	F: GGATCATCGCTGTCATTGTGG R: GTTCAGCACTCAGCACGGCTA	Tank	F: GTAAATACGTTCCACTTCAAGACC R: AAAGCTCTTGACAGAATTCACACAC
Gabrg3	F: ATGTAAACAGCATTGGTCTGTGTC R: CCACCATGTTGCTGTTTACAGAGTTAG	Thbs2	F: TGTGTGCTACTAATGCCACCTACCA R: GTCACAAGCATCTCCGATTCCA
Gata6	F: CAGCAGTGGCTCTGTCCCTATG R: AGGCCGTCTTGACCTGAATACTTG	Timp1	F: GGAACGGAAATTTGCACATCAG R: CTGATCCGTCCACAAACAGTGAG
Gfap	F: AGCTAGCCCTGGACATCGAGA R: GGTGAGCCTGTATTGGGACAAC	Tnc	F: GAATTGCTCCAGCATCCGTA R: CGTCTGGAGTGGCATCTGAAAC
Glr2	F: AACGATGACCACCCAGAGTTTACG R: CGTATTCCAGTAAGGCAGCAAACA	Tnf	F: ACTCCAGGCGGTGCCTATGT R: GTGAGGCTGTTGGCCATAGAA
Grial	F: GGCCATGCTGGTTGCCTTA R: CTTCATTGATGGATTGCTGTGGA	Tnfaip6	F: GAAGCTCGGGCTGGCAGATA R: ACAGTTGGGCCCAGGTTTCA
Grin2a	F: ACCTCGCTCTGTCCAGTTTG R: TCCTGCCATGTTGTGATGTC	Tnn	F: CCAAGTGGCATCCAGCAAAG R: GGTTGGCCAAATGGCAGTTC
Has1	F: GTGTCTGCATCAGTGGTCTCT R: TGGTTGTACCAGGCCTCCAAG	Vcan	F: AGCAAACAGCATCTTGCAGGTC R: CCATTCAGGCGCTTCGTGTA
Has2	F: TGTGGCCTAAATGTGGCAGAC R: TCGCCATGTAAACATCACTAACAG		

症 例

Exploratory Laparotomy by Laparoscopy Proved to be Effective for the Emergency Treatment of a Case of Simultaneous Inferior Vena Cava and Hepatic Portal Vein Gas Related to Ischemic Colitis

TSUTOMU IWATA¹⁾, NORIFUMI OHASHI¹⁾, HIDEYUKI MISHIMA²⁾, MASAHIKO MIYACHI¹⁾, TSUYOSHI SANO¹⁾

¹⁾ *Department of Gastroenterological Surgery, Aichi Medical University School of Medicine, Aichi, Japan*

²⁾ *Cancer Center, Aichi Medical University School of medicine, Aichi, Japan*

A 64-year-old male presented with acute abdominal pain during in-hospital treatment for chronic heart failure due to dilated cardiomyopathy. A computed tomography (CT) scan demonstrated simultaneous inferior vena cava and hepatic portal vein gas, ascites, and intramural emphysema of small intestine. Physical examination showed only mild tenderness without peritoneal signs. We conducted an emergent exploratory laparotomy by laparoscopy, which is considered less invasive than open surgery. Intestinal necrosis was not detected, although serous ascites and intramural emphysema were identified. Abdominal pain was relieved by fasting and administration of antibiotics. Abdominal CT scan 3 days after the laparoscopy showed disappearance of inferior vena cava and portal vein gas, and wall thickening of the ileum and ascending colon. A colonoscopy 6 days after laparoscopy revealed mucosal erosion and ulceration of terminal ileum without necrosis. Histological diagnosis of this ulceration was ischemic colitis. His general status improved gradually and the diet was resumed on the 3rd postoperative day. Here we report a case of simultaneous inferior vena cava and hepatic portal vein gas related to ischemic colitis.

Key words: hepatic portal vein gas, inferior vena cava gas, ischemic colitis, laparoscopy

INTRODUCTION

Hepatic portal vein gas (HPVG), commonly detected by computed tomography (CT), is an ominous sign that has resulted in approximately 29% mortality in spite of various kinds of treatment¹⁾. Also, because patients with a history of vascular surgery or bowel obstruction may have a higher mortality rate, careful clinical evaluation is mandatory for that population. We experienced a case of ischemic coli-

tis with inferior vena cava gas (IVCG), which may be a more serious condition than HPVG. This case was treated conservatively with success, and may indicated the value of urgent laparoscopy prior to definitive open surgery, especially in patients with serious comorbidities.

CASE REPORT

A 64-year-old male under medical treatment

Table 1. Laboratory data when patient complained of abdominal pain

WBC ($\times 10/\mu\text{g}$)	4600	Amylase (IU/l)	57
RBC ($\times 10/\mu\text{g}$)	436	Na (mEq/l)	138
Hemoglobin (g/dl)	11.9	K (mEq/l)	4.4
Hematocrit (%)	36.6	Cl (mEq/l)	99
MCV (fl)	83.8	BUN (mg/dl)	21.7
Platelet ($\times 10$)	14.5	Creatinine (mg/dl)	1.24
Total protein (g/dl)	6.8	CRP (mg/dl)	0.1
Albumin (g/dl)	3.8	ABG (room air)	
Total-bilirubin (mg/dl)	1.36	pH	7.415
Direct-bilirubin (mg/dl)	0.58	pCO ₂ (mmHg)	42.6
AST (IU/l)	13	pO ₂ (mmHg)	50.9
ALT (IU/l)	9	HCO ₃ (mmol/L)	26.7
LDH (IU/l)	264	Base excess (mmol/L)	1.9
CPK (IU/l)	96	Lactate (mg/dl)	10.9

WBC: white blood cells; RBC: red blood cells;
 MCV: mean corpuscular volume; AST: aspartate aminotransferase;
 ALT: alanine aminotransferase; LDH lactate dehydrogenase;
 CPK: creatine phosphokinase; BUN: Blood urea nitrogen;
 CRP: C-reactive protein

for chronic heart failure due to dilated cardiomyopathy had a chief complaint of acute abdominal pain. His medical history included atrial fibrillation, chronic renal failure, and diabetes mellitus. There was no history of abdominal surgery. Hemodialysis was not indicated. Physical examination showed normothermia (36.8 °C), mild hypotension (84/70 mmHg), and mild tachycardia (Heart rate 101/min). Although mild tenderness in the lower abdomen was shown, no signs as symptoms of peritonitis were observed. Hematological examination showed a normal hemoglobin value and no leukocytosis (Table 1). Biochemical examination showed mild elevation of blood creatinine and blood urea nitrogen. The liver enzymes were not elevated. Arterial blood gas analysis revealed moderate hypoxemia without pH change. Abdominal CT showed ascites, left renal vein gas, IVCG, HPVG in the bilateral lobes, and intramural emphysema in the small intestine. Neither splenomegaly nor liver deformity suggesting cirrhosis were observed (Figure 1, 2). In addition, spleno-

renal venous shunts were detected. Blood flow of mesenteric and celiac artery was well maintained. To make a definitive diagnosis and evaluate bowel necrosis, an emergency exploratory laparoscopy, which is considered minimally invasive, was performed under general anesthesia. Serous ascites and intramural gas of small intestine were observed, but intestinal necrosis was not obvious by intra-abdominal surveillance using laparoscopy. The liver was of a normal appearance without cirrhosis. Bacterial culture of ascites was negative. An information drainage tube was placed in the abdominal cavity, and removed 24 hours after laparoscopy without alteration of drainage fluid. Conservative treatment with fasting and 4 day administration of antibiotics were indicated, after which abdominal pain subsided.

Abdominal CT reviewed 3 days after laparoscopy revealed disappearance of the IVCG and HPVG. Bowel wall thickness from the ileum to the ascending colon was detected (Figure 3). Colonoscopy 6 days after laparoscopy revealed the presence of mucosal erosion and ulceration

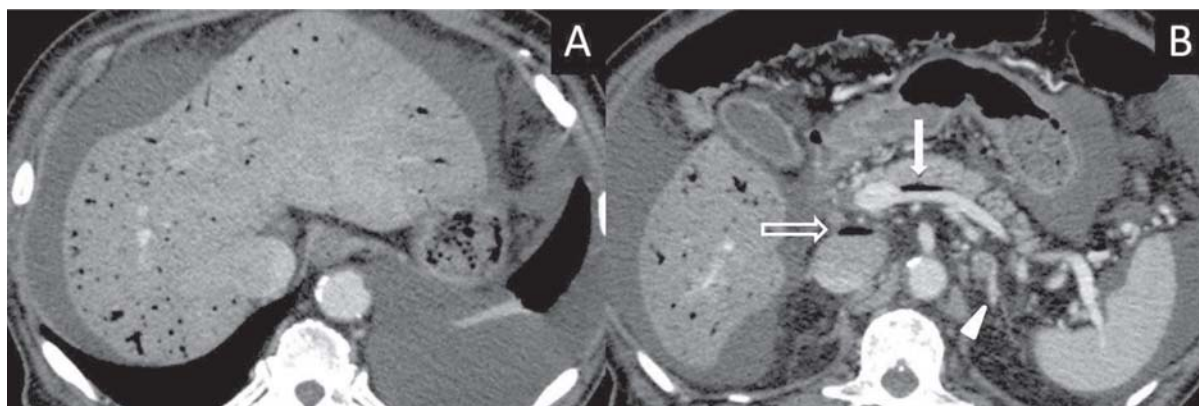


Figure 1. Abdominal CT scan showed ascites, hepatic portal vein gas (A), inferior vena cava gas (open arrow) and splenic vein gas (white arrow) and detected splenoportal shunts (white arrowhead) (B).



Figure 2. Abdominal CT scan on admission showed intramural gas in the small intestine (white arrowhead).

of the ileum 5 cm proximal from the Bauhin's valve, but obvious findings of bowel necrosis were absent (Figure 4). Histological findings from the colonoscopic biopsy were consistent with ischemic colitis.

The patient's general condition gradually improved, and he was discharged 22 postoperative days after treatment of chronic heart failure. Postoperatively, the patient has not suffered from abdominal symptoms for 13 months.

DISCUSSION

In our case, ischemic colitis of the terminal

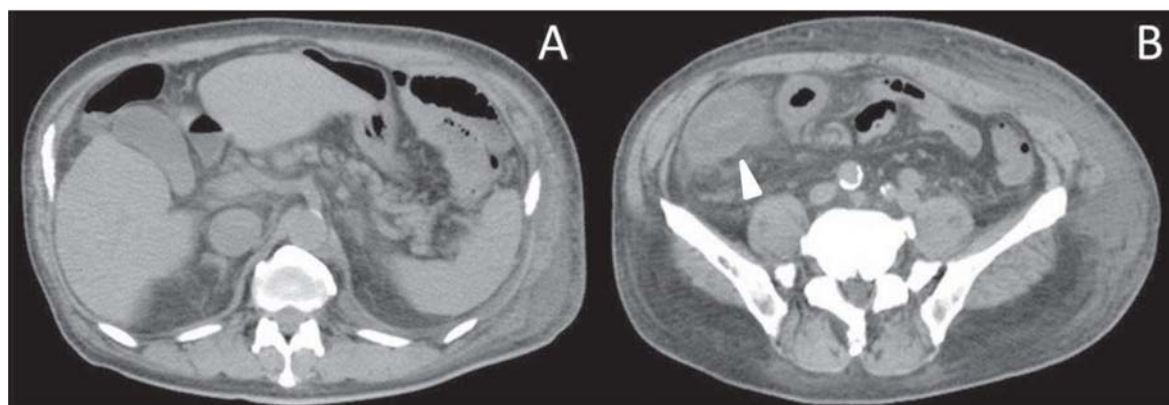


Figure 3. Abdominal CT scan 3 days after operation resulted in disappearance of inferior vena cava gas and hepatic portal vein gas (A), and thickness of the wall at the ileocecal bowel was revealed (white arrow) (B).



Figure 4. Results of colonoscopy showed ulceration from the ileum 5 cm proximal to Bauhin's valve to ascending colon, with definitive diagnosis ischemic colitis.

ileum to the ascending colon caused HPVG. To evaluate bowel conditions, we performed exploratory laparotomy by laparoscopy. Several cases of conservatively treated HPVG have been reported, but we should still regard HPVG as a critical condition with a poor prognosis, and pay special attention to the presence of bowel necrosis. Our patient was treated for chronic heart failure, and potentially had a restricted physical functional capacity. Thus, delay in making a diagnosis as to the cause of HPVG might lead to a poor prognosis even in a condition without peritoneal signs, as in this case. Accordingly, we conducted an emergent diagnostic laparoscopy, which is useful for making diagnoses and is less invasive than definitive open surgery²³⁾.

Also, we reviewed the relevant literature describing IVCG and HPVG in terms of their relation to ischemic colitis. To characterize this rare situation, we searched the PUBMED databases using the keywords 'inferior vena cava gas,' and 'hepatic portal vein gas.' As of May 2014, there were 7 cases describing IVCG co-

exist with HPVG related to digestive disease (Table 2)⁴⁻⁸⁾. Kamikado et al.⁵⁾ reported two potential routes of HPVG to the systemic veins: one is a drainage for hepatic vein, and the other is a portosystemic shunt. Kato et al.⁹⁾ reported a potential mechanism of shunt blood flow from the portal vein to systemic veins through the liver parenchyma or extrahepatic collaterals in response to increased portal pressure. The Japan Society for Portal Hypertension suggested congestive heart failure as a cause of portal hypertension¹⁰⁾. Although the cause of the splenorenal shunt in this case is unknown, it is considered that portal hypertension may be caused by high pressure of the right atrium with dilated cardiomyopathy. The important point is that IVCG was not necessarily related to the poor prognosis in contrast to the impressive CT findings in this case.

In 1955, Wolfe and Evans, in their first case series, described portomesenteric venous gas in six infants died who of intra-abdominal catastrophes¹¹⁾. In 1960, Susman reported the first critically ill adult patient with small bowel infarction¹²⁾. Recent increases in the use of abdominal CT have led to increased detection of HPVG associated with various non-ischemic conditions¹³⁾. Liebmann et al.¹⁴⁾ stated three potential causes of HPVG; mucosal damage, bowel distention, and sepsis (bacterial translocation). Kinoshita et al.¹⁵⁾ reviewed 182 cases of HPVG, and found that the most common cause was bowel necrosis (43%), followed by digestive tract dilatation (12%), intraperitoneal abscess (11%), ulcerative colitis (4%), Crohn's disease (4%), complications of endoscopic procedures (4%), intraperitoneal tumor (3%), and others (15%). The mechanism of HPVG in terms of ischemic colitis may be considered as direct inflow of bowel gas into the intraluminal venula through an ulcer of the intestine^{16,17)}.

Table 2. Cases of systemic vein gas coexist with intrahepatic portal vein gas

Author	Age	Sex	Portal vein gas	Site of gas	Cause
Mallens	31	F	IHPV, left colic vein, IMV, SMV, hemorrhoidal veins	internal iliac vein, IVC	iatrogenic mucosal disruption
Kriegshauser	54	M	IHPV	hepatic vein, IVC	not available
	68	M	IHPV	prostatic venous plexus, common femoral veins	necrosis of small intestinal tumor
Wiot	63	M	IHPV, portal vein, mesenteric vein	hepatic veins, jugular veins, right atrium, right ventricle vessels at base of brain	bowel necrosis
	52	F	IHPV, mesenteric vein	jugular vein	bowel necrosis
Kamikado	92	F	IHPV, portal vein, splenic vein, SMV	hepatic vein, IVC, right atrium, right ventricle	alteration of colon mucosa
Zhang	50	M	SMV, splenic vein, portal vein, IMV, mesenteric vein	IVC	necrotizing enterocolitis
Present case	64	M	portal vein, SMV	IVC, left renal vein	ischemic colitis

Author	Age	Sex	Operation	Outcome	Route to systemic vein
Mallens	31	F	not operated	survived	via portosystemic shunt
Kriegshauser	54	M	not operated	dead	via liver
	68	M	resection	survived	enterovenous fistula caused by the tumor or polysurgery
Wiot	63	M	not operated	dead	not available
	52	F	not operated	dead	not available
Kamikado	92	F	not operated	survived	via liver
Zhang	50	M	not operated	dead	not available
Present case	64	M	exploratory laparotomy by laparoscopy	survived	via splenorenal shunt

IHPV: intrahepatic portal vein; IMV: inferior mesenteric vein; SMV: superior mesenteric vein; IVC: inferior vena cava

The existence of HPVG has not always indicated an exploratory laparotomy. However, it is necessary to make a precise diagnosis of the cause of HPVG. Emergency laparoscopy has a significant role in prevention due to the delay in obtaining a definitive diagnosis especially in patients with poor functional reserve due to several comorbidities.

REFERENCES

- 1) Faberman RS, Mayo-Smith WW. Outcome of 17 patients with portal venous gas detected by CT. *Am J Roentgenol* 1997; 169: 1535-8.
- 2) Navez B, Dudekem Y, Cambier E, Richer C, de Pierpont B, Guiot P. Laparoscopy for management of nontraumatic acute abdomen. *World J Surg* 1995; 19: 382-6.

- 3) Chung RS, Diaz JJ, Chari V. Efficacy of routine laparoscopy for the acute abdomen. *Surg Endosc* 1998; 12: 219-22.
- 4) Zhang J, Yan R. Inferior vena cava gas, portal venous system gas, and pneumatosis intestinalis. *J Gastrointest Surg* 2010; 14: 1338-9.
- 5) Kamikado C, Nagano S, Takumi K, Senokuchi T, Kubo M, Mitsue S, et al. Gas embolism caused by portal vein gas: case report and literature review. *Case Rep Gastroenterol* 2008; 15: 262-71.
- 6) Mallens WM, Schepers-Bok R, Nicolai JJ, Jacobs FA, Heyerman HG. Portal and systemic venous gas in a patient with cystic fibrosis: CT findings. *Am J Roentgenol* 1995; 165: 338-9.
- 7) Kriegshauser JS, Reading CC, King BF, Welch TJ. Combined systemic and portal venous gas: sonographic and CT detection in two cases. *Am J Roentgenol* 1990; 154: 1219-21.
- 8) Wiot JF, Felson B. Gas in the portal venous system. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1961; 86: 920-9.
- 9) Kato R, Ishida H. Portal vein emphasis on sonographic findings normal image and abnormal image. *Jpn Med Ultrasonic* 2009; 36: 329-40.
- 10) The Japan Society for Portal Hypertension. *The General Rules for Study of Portal Hypertension*. 2nd ed. Tokyo: KANEHARA, 2004: 3.
- 11) Wolfe JN, Evans WA. Gas in the portal veins of the liver in infants. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1955; 74: 486-9.
- 12) Susman N, Senturia HR. Gas embolization of the portal venous system. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1960; 83: 847-50.
- 13) Uematsu T, Kitamura H, Iwase M, Kuze S, Toyoda F, Yamashita K. A case of hepatic portal venous gas without bowel necrosis. *J Jpn Surg Assoc* 1999; 60: 1370-4 (in Japanese with English abstract).
- 14) Liebman PR, Patten MT, Manny J, Benfield JR, Hechtman HB. Hepatic-portal venous gas in adults: etiology, pathophysiology and clinical significance. *Ann Surg* 1978; 187: 281-7.
- 15) Kinoshita H, Shinozaki M, Tanimura H, Umemoto Y, Sakaguchi S, Takifuji K, et al. Clinical features and management of hepatic portal venous gas: four case reports and cumulative review of the literature. *Arch Surg* 2001; 136: 1410-4.
- 16) Lazar HP. Survival following portal venous air embolization: report of a case. *Am J Dig Dis* 1965; 10: 259-64.
- 17) Furuya Y, Yasuhara H, Ariki K, Yanagie H, Naka S, Nojiri T, et al. Hepatic portal venous gas caused by blunt abdominal trauma: is it a true ominous sign of bowel necrosis? Report of a case. *Surg Today* 2002; 32: 655-8.

愛知医科大学医学会雑誌 第43巻 第2号

2015年6月10日印刷 2015年6月15日発行

編集兼
発行人 小林章雄

発行所 (〒480-1195) 愛知県長久手市岩作雁又1番地1

愛知医科大学内 愛知医科大学医学会

印刷人 名古屋市昭和区円上町1-23 東崎元彦

印刷所 名古屋市昭和区円上町1-23 東崎印刷合名会社

Journal of The Aichi Medical University Association

CONTENTS

Original Articles

- 17 Development of mouse model of post injury scar associated chronic pain:
Hyperalgesia and gene expression change study Y. Li et al.

Case Reports

- 35 Exploratory laparotomy by laparoscopy proved to be effective for the emergen-
cy treatment of a case of simultaneous inferior vena cava and hepatic portal
vein gas related to ischemic colitis T. Iwata et al.

Volume 43

Number 2

June

2015

Aichi Medical University Association

1-1, Karimata, Yazako, Nagakute-shi, Aichi-ken, 480-1195, JAPAN