

学位論文

ラット脊髄後角神経からのサブスタンスP遊離に及
ぼす静脈麻酔薬の影響

－脊髄後根神経節(DRG)培養細胞及び脊髄後角組織
(chopped tissue)を用いた研究－

学位申請者 小川 雄也

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

(主任指導教員：入船 正浩教授)

2016年度

第一章	緒論	3
第二章	全身麻酔薬の構成要素である不動化に及ぼす各種麻酔薬の影響	7
第一節	不動化 ED ₅₀ に及ぼす全身麻酔薬の影響	7
第一項	緒言	7
第二項	実験材料および方法	7
第三項	結果	9
第四項	考察および小括	10
第三章	脊髄でのサブスタンス P 遊離に及ぼす全身麻酔薬の影響	12
第一節	不動化 ED ₅₀ に及ぼす全身麻酔薬の影響	12
第一項	緒言	12
第二項	実験材料および方法	12
第三項	結果	14
第四項	考察および小括	15
第二節	脊髄後角組織 (chopped tissue) での検討	16
第一項	緒言	16
第二項	実験材料および方法	16
第三項	結果	17
第四項	考察および小括	18

第四章 総括および結論 21

謝辞 24

引用文献 25

図表 28

第一章 緒 論

全身麻酔下手術を世界で初めて成功させたのは、科学的に検証するのが困難なため世界的に認められているわけではないが、日本において 1804 年、江戸時代のことであった。華岡青洲が 60 歳の患者にマンダラゲを主成分とする通仙散を服用させて乳癌の根治手術を行っている。その後、1846 年にアメリカで、Morton がエーテル麻酔による外科手術に成功した。以来、全身麻酔薬は 200 年以上にわたって臨床応用されており、全身麻酔法の確立は医学史上最大の功業の一つといっても過言ではない。今日に至るまで、様々な全身麻酔薬、全身麻酔法が開発され、全身麻酔は比較的安全に行われるようになった。しかし、一方で、現在使用されている吸入麻酔薬や静脈麻酔薬においても、本来の麻酔作用以外に多くの副作用を有している。全身麻酔薬には、一般的に循環抑制、呼吸抑制、肝・腎毒性、術後の悪心・嘔吐などの副作用があり、特に全身状態が不良な患者の周術期においては、これらの副作用によって重篤な状態に陥りかねない。したがって、全身麻酔薬の作用機序を究明することにより、副作用のない、安全な全身麻酔薬の開発につなげることが望まれる。

全身麻酔とは、全身麻酔薬が脳や脊髄に可逆的に作用することにより薬理的に生じた全身状態と定義される。それは、健忘、鎮痛、意識消失、侵害刺激による体動の抑制（不動化）、筋弛緩および有害な自律神経反射の抑制などの様々な要素が複合した状態である【1】。このような麻酔現象が単一の作用部位や作用機序を介しているとは考えにくく、麻酔を構成する各要素はそれぞれ異なった部位に作用し、異なった機序を介して生じていると推測される【2】。

全身麻酔薬は γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid; GABA) 神経やグリシン神経などの抑制性神経を促進するか、

グルタミン酸神経などの興奮性神経を抑制するか，あるいはその両方の作用により麻酔状態を引き起こしていると一般的に考えられている．

全身麻酔薬の細胞レベルでの電気生理学的影響などを検討することにより，麻酔薬の分子レベルにおける作用部位の存在が指摘されており【3】，主に中枢神経系にある神経シナプスに作用しているといわれている．シナプス前・後部には，様々な受容体やイオンチャネル，トランスポーター，細胞内情報伝達系が存在し，いずれも全身麻酔薬の標的になり得る．

全身麻酔薬は，GABA に対する GABA_A 受容体の感受性を高めることで抑制性神経伝達を促進し，神経活動を抑制すると考えられている【4】．しかし，麻酔要素のうちどの要素が麻酔薬の GABA_A 受容体への作用と関連しているのかは未だ推測の域をでない．GABA は，中枢神経系における主な抑制性神経伝達物質であり，すべてのシナプスのうち 25 - 45% が GABA 作動性である【5】．GABA 受容体には，リガンド依存性イオンチャネル内蔵型の GABA_A 受容体と G 蛋白に共役した代謝型の GABA_B 受容体がある．GABA_A 受容体が活性化されると，Cl⁻チャネルが開口し，細胞内に Cl⁻が流入し過分極となり，興奮性が抑制される．また，GABA_A 受容体には鎮静薬のベンゾジアゼピン類や静脈麻酔薬のバルビツール酸の結合部位が存在し，多くの全身麻酔薬が GABA_A 受容体を賦活することが知られている．

GABA_A 受容体やグリシン受容体，神経性ニコチン受容体，グルタミン酸受容体は，イオンチャネル内蔵型受容体スーパーファミリーの一員である．グリシンは中枢神経系において主に抑制性神経伝達物質として働き，中枢神経系に広範囲に分布する GABA に比べて脊髄，延髄に豊富に存在し，より限定された機能を有する【6】．全身麻酔薬は，脊髄にあるグリシン受容体の活性化を介して侵害刺激反応を抑制している可

能性がある。したがって、脊髄のグリシン受容体は、全身麻酔薬による不動化や筋弛緩と関連があるのかもしれない。

神経性ニコチン受容体は、自律神経系のみならず、中枢神経系にも広範囲に分布し、麻酔濃度以下の全身麻酔薬により抑制されることが報告されており、全身麻酔薬による健忘や鎮痛効果の発現に関与するといわれている【7】。

グルタミン酸は、中枢神経系での主たる興奮性神経伝達物質であり、すべてのシナプスの50%以上がグルタミン酸作動性といわれている【5】。グルタミン酸は、運動系と関連する他、脊髄後角での痛覚伝達においても重要な役割を果たしている。グルタミン酸受容体のサブタイプの一つであるN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体は、静脈麻酔薬であるketamineの主要な標的部位であり、NMDA受容体の遮断を介して意識消失をもたらすと推測されている。

末梢組織に対する侵害刺激によって生じる一次知覚神経からの脊髄後角神経への侵害情報伝達にはサブスタンスPが重要な役割を果たしている。侵害刺激による一次知覚神経からのサブスタンスP遊離は、オピオイドや α_2 アドレナリン受容体作動薬により抑制されることがマイクロダイアリシス実験により明らかにされている【8, 9】。また、*in vitro*の実験系で全身麻酔薬がアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させたサブスタンスP受容体機能を抑制することが報告されている【10】。当研究室のこれまでの実験で、GABA分解酵素阻害薬であるgabaculineの投与によりGABA神経を選択的に促進したり、NMDA受容体の拮抗薬であるMK-801とドパミン受容体拮抗薬のhaloperidolを併用し興奮性神経を抑制したりすると意識(正向反射)消失を生じるが、不動化は起こさないことを明らかにしてきた。

一方、前述のように、侵害刺激の情報伝達にサブスタンスPが重要な役割を果たしており、侵害刺激による一次知覚神

経からのサブスタンス P の遊離はオピオイド受容体作動薬により抑制されることから，全身麻酔の構成要素である鎮痛や不動化作用にサブスタンス P が重要な役割を果たしている可能性が考えられる．

本研究では様々な全身麻酔関連薬の投与がサブスタンス P 遊離にどのような影響を及ぼすか脊髄後根神経節（DRG）培養細胞および脊髄後角組織（chopped tissue）を用いて検討し，全身麻酔における鎮痛や不動化の作用機序を解明することを目的とした．

第二章 全身麻酔薬の構成要素である不動化に及ぼす各種麻酔薬の影響

第一節 不動化 ED₅₀ に及ぼす全身麻酔薬の影響

第一項 諸言

全身麻酔の麻酔構成要素には，鎮痛，筋弛緩，意識消失，不動化などが含まれ，吸入麻酔薬はそのすべてを兼ね備えているといわれている．一方，静脈麻酔薬であるバルビツール酸は健忘作用と意識消失作用を有するが鎮痛作用はないといわれている．したがって，静脈麻酔薬は吸入麻酔薬に比べ麻酔要素をより選択的に引き起こしている可能性がある．

本実験では間接的な GABA 受容体作動薬である gabaculine や NMDA 受容体拮抗薬の MK-801 およびオピオイド受容体作動薬 morphine を全身投与した際に及ぼす麻酔要素への影響を行動薬理学的に検討した．

第二項 実験材料および方法

本実験において，動物の飼育と実験方法は，広島大学動物実験指針および広島大学自然科学研究支援開発センター動物実験施設内規にしたがって行った．また，本研究は，広島大学動物実験委員会の許可(承認番号:A15-7-2)を得て行った．

実験材料

実験動物として ddY 系成熟雄性マウス (7-11 週齢, Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan) を使用した．明／暗 12 時間 (8:00 - 20:00), 室温 23 ± 1℃, 固形飼料および飲料水

は自由に摂取できる環境下で飼育した。すべての実験においてマウスは一回のみ使用した。

使用薬剤

本実験では薬物として、(+)-MK-801 hydrogen maleate, 3-amino-2,3-dihydrobenzoic acid (gabaculine) hydrochloride, haloperidol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), morphine (Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。

実験方法

実験室内の温度は $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に調節し、ヘッドランプにより保温してマウスの体温を保持した。実験は午前 10 時から午後 6 時の間で行った。全身麻酔作用は、鎮痛作用の指標として Haffner 法による抗侵害効果の有無の 50% 有効量 (50% effective dose ; ED_{50}) を、意識消失の指標として正向反射の消失の有無の ED_{50} を、また不動化の指標として侵害刺激に対する体動の有無の ED_{50} を用いて評価した。

鎮痛作用の ED_{50} の決定には Haffner 法を用いた。侵害刺激として tail-clamp を 30 秒間加え、マウスが鳴いたり、頭を後ろに向けてクレンメを咬もうとしたりする反応 (仮性疼痛反応) が観察されなければ、鎮痛作用有りとした。

各薬物を腹腔内に投与した後、ただちにマウスを一匹ずつビーカー (直径 13.5cm × 高さ 19cm) に入れた。正向反射の観察と記録は、投与後 2 分毎に行った。正向反射の有無の評価は、Boast ら【11】の方法により、記録時に手でビーカーを水平面から約 45° の角度に傾け、3 回この操作を繰り返して以下の麻酔スコアにより評価した。スコア 0 はマウスを裏

返そうとしてもすぐに正位に向き直る，すなわち正向反射が正常な状態，+1は3回とも2秒以内に正向反射がある状態（軽度正向反射障害），+2は2秒から10秒の間に少なくとも1回は正向反射がある状態（中等度～高度正向反射障害），+3は3回とも10秒以内には正向反射がない状態（正向反射消失）を示すものとした．

不動化のED₅₀の決定には，侵害刺激として鎮痛作用と同様のtail-clampを用いた．麻酔スコアが最高となる時間に，正向反射が消失したマウスの尾根部から約1cmの部分を実験クレンメで最長で30秒間挟み，この間体動のない場合を体動無し（不動化）とした．体動の有無のみを観察し，咳，過呼吸などの反応は除外した．

麻酔作用それぞれのED₅₀の算出は，各投与群に付きマウス6-8匹を用い，各薬物について5-8の用量を用いて判定した後，Prism version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を使用して用量-反応曲線を描かせ，ED₅₀（95%信頼限界）とHill slopesを算出させた．

第三項 結果

Gabaculine（35, 50, 70, 100, 200 mg/kg）は用量依存性に麻酔スコアを増加させ，正向反射を消失させた【図1】．そのときのED₅₀は100（95%信頼限界；75-134）mg/kgであったが，高用量（400 mg/kg）を投与しても不動化は認めなかった．オピオイド受容体作動薬 morphine 単独による鎮痛作用のED₅₀は5.5（2.6 - 11.6）mg/kgであったのに対し，gabaculine（200 mg/kg）による正向反射消失下でのマウスにおける不動化に必要な morphine のED₅₀は12.2（5.2 - 28.2）mg/kgであった【図2】．また，同様に，MK-801を単独で高用量（50 mg/kg）投与してもマウスの正向反射は消失

しなかったため、MK-801 (0.4, 0.75, 1, 3, 5, 7 mg/kg)に haloperidol (0.2 mg/kg)を併用すると、MK-801 は用量依存性にマウスの正向反射スコアを増加させ、正向反射を消失させた【図3】。Haloperidol (0.2 mg/kg)を併用したときのMK-801の正向反射消失のED₅₀は1.5 (0.9-2.5) mg/kgであった。しかし、侵害刺激による体動は、20 mg/kgの高用量を投与したときでも消失しなかった。そこで、morphineを併用すると、morphineによる鎮痛のED₅₀が4.4(1.3 - 15.0) mg/kgであったのに対し、MK-801 (5.0 mg/kg)と haloperidol (0.2 mg/kg)の併用による正向反射消失下のマウスにおける不動化に必要な morphine の ED₅₀は 9.0 (2.9 - 28.2) mg/kgであった【図4】。

第四項 考察及び小括

不動化は麻酔構成要素のひとつであり、意識消失下での侵害刺激に対する体動の抑制をいう。侵害刺激は一次知覚神経の痛覚受容器が受容し、脊髄後角で一次知覚神経から二次神経に伝達された後、上位中枢である視床を経て大脳皮質へと伝達されて痛みと認識される。サブスタンス P を含む神経ペプチドは、侵害刺激に応じて一次知覚神経の末梢、中枢両終末部より遊離されて、末梢で遠心性機能を発揮するとともに、脊髄において痛み情報を中枢神経に伝達する。侵害刺激受容後、視床下部から痛みを制御するよう下部神経へ指令が送られるが、これを下行性疼痛抑制系と呼んでいる。この系を介しオピオイド神経は脊髄後角において一次知覚神経とシナプスを形成し、痛みの伝導路である一次知覚神経からの入力をシナプス前抑制することで侵害刺激によるサブスタンス P 遊離を制御している。Morphine はこの部位に作用してサブスタンス P 遊離を抑制することにより鎮痛作用を生じると考え

られている。

本章の実験では GABA 分解酵素阻害薬である gabaculine の投与あるいは MK-801 と haloperidol の併用投与による正向反射消失下のマウスでは，侵害刺激の強さは同等であるにも拘らず不動化に必要な morphine の ED₅₀ は morphine 単独による鎮痛の ED₅₀ より 2 倍以上大きいことが分かった。このことから GABA 神経促進作用あるいは NMDA とドパミン両受容体の遮断作用によって、脊髄後角での下行性疼痛抑制系を介する morphine によるサブスタンス P 遊離抑制作用が脱抑制されている可能性が考えられた。そこで次章では脊髄におけるサブスタンス P 遊離に及ぼす麻酔関連薬物の影響を *in vitro* で検討した。

第三章 脊髄でのサブスタンス P 遊離に及ぼす全身麻酔薬の影響

第一節 DRG 初代培養細胞での検討

第一項 諸言

麻薬性鎮痛薬である morphine などのオピオイドは，侵害刺激による一次知覚神経からのサブスタンス P 遊離を抑制することが報告されている．このことから，全身麻酔の構成要素である鎮痛や不動化の作用機序にサブスタンス P が重要な役割を果たしている可能性が考えられる．そこで，一次知覚神経の解析モデルとして，ラット DRG 初代培養細胞を用い，サブスタンス P 遊離に及ぼす全身麻酔薬の影響を *in vitro* で検討した．

第二項 実験材料及び方法

実験材料

実験動物として Wistar 系成熟ラット（6 週齢，Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan）を使用した．明／暗 12 時間サイクル（明；8：00 - 20：00），室温 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿度 50%，固形飼料および飲料水は自由に摂取できる環境下で飼育した．

使用薬物

DRG 初代培養には以下のものを用いた．ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）（Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan），ウマ血清，ペニシリン／ストレプトマイシン（GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA），2.5%トリプシン（Invitrogen Co., Burlington, Ontario, Canada），コラゲ

ナーゼ (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), ^{125}I -Tyr⁸-SP (81.4 TBq / mmol) (New England Nuclear, Boston, MA, USA).

サブスタンス P 遊離実験には, capsaicin, potassium chloride (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), morphine, propofol および ketamine を使用した.

実験方法

DRG 細胞初代培養

Wistar 系成熟ラットを断頭した後, 氷冷した Hank's buffer 中で脊髄を速やかに摘出し, 実体顕微鏡下で DRG のみを無菌的に単離した. 採取した DRG を Hank's buffer で 3 回洗浄し, 5 分間, 1000 rpm で遠心分離した. 次に 0.125% コラゲナーゼ溶液を加え, 37°C, 90 分間, 震盪恒温槽にて酵素処理を 2 回行い, 1000 rpm で 10 分間遠心分離した後, 再度 Hank's buffer で洗浄した. さらに, 0.25% トリプシン溶液を加え, 37°C で 30 分間, 震盪恒温槽にて酵素処理した後, 再度 1000 rpm で 10 分間遠心分離した. その後, 10% 非働化処理済ウマ血清, 1% ペニシリン / ストレプトマイシン, 30 ng/ml の神経栄養因子 (NGF) を添加した DMEM に細胞を分散させ, ラミニン処理した 35 mm dish を用いて, 37°C, 5%CO₂ の条件下で 7 日間培養した.

サブスタンス P 遊離実験

培養 DRG 細胞からのサブスタンス P の遊離は, 100 nM の capsaicin もしくは 50mM の高濃度カリウムイオンで刺激することにより行った. Krebs-HEPES buffer で DRG 細胞を 2 回洗浄した後, ペプチダーゼインヒビターと 0.1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含有させた Krebs-HEPES buffer で調整

した本章で検討する薬物を溶解させ 10 分間処置した。その後，capsaicin (100 nM) もしくは高濃度カリウムイオン (50 mM) を加え，10 分後に release 液を回収した。5000 rpm で 5 分間遠心分離し，得られた上清をサブスタンス P 遊離サンプルとした。

試薬は morphine (10 μ M, 100 μ M, 1 mM), propofol (1 mM) および ketamine (10 μ M, 100 μ M, 1 mM) で検証した。

ラジオイムノアッセイ法

サブスタンス P 遊離サンプルに抗サブスタンス P 抗体を加え，さらに 0.1 % Triton X を添加した BSA 含有 Krebs-HEPES buffer で希釈した $^{125}\text{I-Tyr}^8$ -サブスタンス P を加え，4°C で 18 時間処置した。抗体と結合していない遊離型 $^{125}\text{I-Tyr}^8$ -サブスタンス P を 0.9% BSA 含有 2% チョール溶液に吸着させ，2500 rpm で 10 分間遠心分離した後，上清中の結合型 $^{125}\text{I-Tyr}^8$ -サブスタンス P の放射能活性を γ カウンターにより測定した。

第三項 結果

DRG 培養細胞を capsaicin で刺激すると，無刺激ではサブスタンス P の遊離は平均 59 ± 36 pg/dish であるのに対し，100 nM で刺激すると平均 249 ± 74 pg/dish のサブスタンス P が遊離された。また，高濃度 (50 mM) のカリウムイオン溶液 (50 mM K^+) で刺激すると平均 201 ± 57 pg/dish のサブスタンス P が遊離された【図 5】。そこで，DRG 細胞刺激は，100nM capsaicin もしくは 50 mM K^+ で行うことにした。

Capsaicin もしくは高濃度 K^+ で刺激したときのサブスタ

ンス P 遊離に及ぼす全身麻酔関連薬の影響を調べたところ、高濃度 (1 mM) の morphine , propofol および ketamine は capsaicin あるいは高濃度 K⁺ 刺激によるサブスタンス P 遊離のいずれにも影響しなかった【図 6-9】.

第四項 考察及び小括

サブスタンス P は痛覚系において最も詳細に研究されている代表的な神経ペプチドであり【6】、侵害刺激に応じて一次知覚神経のうち主として C 線維から遊離され、脊髄後角において二次神経に痛みを伝達すると同時に、末梢組織で遊離されると免疫担当細胞、肥満細胞、血管平滑筋に作用して、血管拡張の結果、発赤、発熱、血漿滲出による腫脹、知覚神経興奮性亢進などを主な症状とする神経因性炎症反応を生じる。サブスタンス P は DRG で生合成され、large dense core vesicle (LDCV) と呼ばれる比較的大きなシナプス小胞に封入され、カルシウムイオン依存性の開口分泌により遊離される。高濃度 K⁺ は細胞膜全体を脱分極させることによりサブスタンス P 遊離を引き起こすのに対し、トウガラシの成分である capsaicin は DRG に存在する capsaicin 受容体 (transient receptor potential vanilloid receptor 1 ; TRPV1) を刺激することによりサブスタンス P 遊離を引き起こす【12】.

TRPV1 受容体は 6 回の膜貫通領域を持ち、外向き整流性を有するカルシウムイオン透過性の高い非選択性陽イオンチャネル内蔵型受容体である。Capsaicin の他にも酸(プロトン)、熱 (43℃ 以上) によっても活性化される複数の有効刺激をもつ多刺激痛み受容体として機能する【13】. 43℃ という TRPV1 受容体の熱活性化温度閾値は、ヒトや動物に痛みを引き起こす温度閾値とほぼ一致しており、TRPV1 受容体が侵害性熱刺

激受容に關与することを示唆している。TRPV1 受容体は後根神経節の無髓 C 線維の細胞体に発現することが遺伝子レベル、タンパク質レベルで確認されており、痛みや熱がポリモーダル受容器と呼ばれる C 線維で受容され伝達されるとする理論に一致する。

今回の実験では、capsaicin 刺激あるいは高濃度 K⁺刺激によりサブスタンス P 遊離量は有意に増加した。しかし、オピオイド受容体作動薬である morphine、静脈麻酔薬である GABA_A 受容体に作用する propofol および NMDA 受容体拮抗薬 ketamine はサブスタンス P 遊離に影響を及ぼさなかった。この実験系では、morphine が DRG 細胞からの SP 遊離に影響しなかった。これは今回使用した DRG 培養細胞が、オピオイド受容体、特に μ -オピオイド受容体を発現していなかったか、発現していたとしてもオピオイドによるサブスタンス P 遊離調節機能を有していなかったことを示唆しているのかも知れない。このことから次節の実験では、一次知覚神経からのシナプス伝達を含んだ部位で検討を行うため、脊髄後角組織 (chopped tissue) を用いて検討することとした。

第二節 脊髄後角組織 (chopped tissue) での検討

第一項 諸言

本節では脊髄後角組織 (chopped tissue) を用いて全身麻酔関連薬物のサブスタンス P 遊離に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。

第二項 実験材料及び方法

実験材料

実験動物は，第 1 節で使用した動物に準じた．

使用薬物

サブスタンス P 遊離の使用薬物は第 1 節で使用した薬物に準じた．

実験方法

脊髄後角からの組織の採取

Wistar 系成熟ラットを断頭した後，L4-L5 相当部の脊髄後角部位を速やかに摘出した．この脊髄組織をシャーレ上で細かく刻み，生理食塩水で 2 回洗浄を行った．この組織を用いて実験を行った．

サブスタンス P 遊離実験

脊髄後角組織からのサブスタンス P の遊離は，100 nM の capsaicin もしくは 50 mM の高濃度カリウムイオンで刺激することにより行った．ペプチターゼインヒビターと 0.1% ウシ血清アルブミンを含有させた Krebs-HEPES buffer 中に薬剤を溶解させ 37°C で 10 分間処置した．その後，buffer を回収しサブスタンス P 遊離液のサンプルとした．そのサンプルを 4°C，13,000 回転で 10 分間遠心し，得られた上清をサブスタンス P 遊離サンプルとした．

ラジオイムノアッセイ法によるサブスタンス P 遊離量の測定

ラジオイムノアッセイ法は前節に準じて行った．

第三項 結果

脊髄後角組織に対する capsaicin 刺激あるいは高濃度 K⁺刺激によりサブスタンス P 遊離量は有意に増加し，この遊離促進作用は morphine により有意に抑制された【図 10-11】. Propofol によりサブスタンス P 遊離量は濃度依存性に増加し，この propofol によって促進されたサブスタンス P 遊離は morphine によって濃度依存性に抑制された【図 12, 14】. 一方，ketamine はサブスタンス P 遊離に全く影響しなかった. 【図 13】

第四項 考察及び小括

前節の DRG 培養細胞と異なり，本節では一次知覚神経が他の神経系とシナプスを形成する部位である脊髄後角組織を用いた. 下行性疼痛抑制系はこの部位で痛覚の伝達をシナプス前抑制しているとされる【14】. DRG 培養細胞では capsaicin 刺激あるいは高濃度 K⁺刺激によりサブスタンス P 遊離量は有意に増加したが morphine によって抑制されなかったのに対し，脊髄後角組織 (chopped tissue) では capsaicin 刺激あるいは高濃度 K⁺刺激により促進されたサブスタンス P 遊離は morphine により有意に抑制された. これは今回実験で用いた DRG 培養細胞が脊髄後角組織と異なり μ -オピオイド受容体を発現していなかったか，発現していたとしてもオピオイドによるサブスタンス P 遊離調節機能を有していなかったことを示唆しているのかも知れない.

一方，propofol によってサブスタンス P 遊離量は有意に増加しており，この遊離促進作用は morphine によって濃度依存性に抑制された. Propofol が脊髄後角組織からのサブスタンス P 遊離を促進する機序はよくわからないが，この促進作用はオピオイド神経刺激により抑制されることが示された.

PropofolはGABA神経を促進すると考えられていることから行動薬理学実験からの本研究結果とあわせて考察すると、少なくとも部分的には、この部位で下行性疼痛抑制系を抑制しているのかも知れない。

Morphineは麻薬性の鎮痛薬であり、 μ -オピオイド受容体に対する選択性が比較的高く、その作用のほとんどが μ -オピオイド受容体を介して発現する。Morphineは脊髄における感覚神経による痛覚伝達の抑制や、脳内痛覚情報伝導経路の興奮抑制といった上行性痛覚情報伝達の抑制に加え、中脳水道周囲灰白質、延髄網様体細胞および大縫線核に作用し、延髄-脊髄下行性ノルアドレナリンおよびセロトニン神経からなる下行性疼痛抑制系の賦活化により鎮痛作用を生じる。本実験においてもサブスタンスPの遊離を抑制しているが、作用機序については明らかではない。今後の課題として作用機序解明のためにノルアドレナリンやセロトニン神経の関与についての実験なども必要と思われる。

Propofolは全身麻酔の導入、維持をはじめ、静脈内鎮静法でも臨床応用されているが、明確な鎮痛作用はないとされてきた。一方で、最近の知見によりpropofolが痛覚過敏の発現に影響を与えている可能性が示唆されている。Gotoらは、催眠量以下のpropofolが侵害刺激の感受性を亢進させることを証明している【15】。しかし、Jewettらは、propofolの脊髄灌流によるpropofolの痛覚抑制効果を報告している【16】。

臨床的には、propofolの注入時の血管痛がしばしば問題となっている。宮本らは、propofolによる血管痛の発症には血管周囲に分布するC線維のTRPA1受容体が関与する可能性を示唆している【17】。

前述のようにpropofolが痛覚に対して痛みを誘発するのか、抑制するのかについては意見の一致をみていないが【18】、この原因としてpropofolの投与量や作用部位による違いなどが

あると考えられる。

以上、今回の実験より、**propofol** は少なくとも部分的には脊髄後角部位で下行性疼痛抑制系を抑制している可能性が示唆された。

第四章 総括及び結論

今回、行動薬理学的手法を用いた *in vivo* 実験と、DRG 培養細胞および脊髄後角組織を用いた *in vitro* 実験を行い、種々の全身麻酔関連薬の投与がサブスタンス P 遊離にどのような影響を及ぼすか検討した。

行動薬理学実験では、morphine の鎮痛作用の ED₅₀、GABA 分解酵素阻害薬である gabaculine の投与あるいは MK-801 と haloperidol の併用による正向反射消失下でのマウスの不動化に必要な morphine の ED₅₀ を測定した。

さらに、サブスタンス P 遊離に及ぼす全身麻酔関連薬の影響について、一次知覚神経の解析モデルとしての DRG 初代培養細胞を、他の神経からの入力を含めた神経系の解析モデルとして脊髄後角組織 (chopped tissue) を用いて *in vitro* 実験を行い、以下のような結果および結論が得られた。

1. Gabaculine による正向反射消失下のマウスにおける不動化に必要なオピオイド受容体作動薬 morphine の ED₅₀ は 12.2 (5.2 - 28.2) mg/kg であり、morphine 単独による鎮痛作用の ED₅₀ は 5.5 (2.6 - 11.6) mg/kg であった。また、同様に、MK-801 と haloperidol の併用による正向反射消失下のマウスにおける不動化に必要な morphine の ED₅₀ は 9.0 (2.9 - 28.2) mg/kg であり、morphine による鎮痛の ED₅₀ は 4.4 (1.3 - 15.0) mg/kg であった。Gabaculine または MK-801 と haloperidol の併用による正向反射消失下のマウスにおける不動化に必要な morphine の ED₅₀ は、鎮痛に必要な ED₅₀ に比べ 2 倍以上の高用量が必要であった。

2. DRG 初代培養細胞を capsaicin (100 nM) で刺激すると、無刺激では SP の遊離は平均 59 ± 36 pg/dish であるのに対し、100 nM の capsaicin で刺激すると平均 249 ± 74 pg/dish のサブスタンス P が遊離された。また、高濃度 (50mM) のカリウムイオン溶液 (50 mM K^+) で刺激すると平均 201 ± 57 pg/dish のサブスタンス P が遊離された。
3. DRG 培養細胞において、capsaicin もしくは高濃度 K^+ で刺激したときのサブスタンス P 遊離に及ぼす全身麻酔関連薬の影響を調べたところ、1 mM の morphine , propofol と ketamine は、capsaicin および高濃度 K^+ 刺激によるサブスタンス P 遊離のいずれにも影響しなかった。
4. 脊髄後角組織に対する capsaicin 刺激あるいは高濃度 K^+ 刺激によりサブスタンス P 遊離量は有意に増加したが、この増加作用は morphine により有意に抑制された。Propofol によりサブスタンス P 遊離量は濃度依存性に増加し、この propofol によって促進されたサブスタンス P 遊離は morphine により濃度依存性に抑制された。一方、1 mM の ketamine はサブスタンス P 遊離に影響しなかった。

本研究により、GABA 神経の促進や NMDA とドパミンの両受容体の遮断による正向反射消失下では、鎮痛に比べ不動化に必要な morphine の用量が増加することが明らかになった。このことは、これらの処置が下行性疼痛抑制系を抑制している可能性を示唆している。

また、propofol によって脊髄後角組織よりサブスタンス P 遊離が濃度依存性に増強された。この増強作用はオピオイド神経刺激により抑制されることが明確になった。このことか

ら， propofol は，少なくとも部分的には，この部位で下行性疼痛抑制系の脱抑制に関与している可能性が示唆された．

本研究により，全身麻酔に使用される薬物は一次知覚神経からのサブスタンス P 遊離に影響を与えることが明らかになった．このことが全身麻酔薬の鎮痛や不動化に影響を与えているのかも知れない．

謝辞

本稿の擧筆にあたり，始終ご懇切なご指導・ご高閲を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究科統合健康科学部門（歯科麻酔学研究室）入船正浩教授に心より深謝の意を表します．また，本研究の遂行および本論文の作成に際し，ご懇篤なるご教示を賜りました，本学医歯薬保健学研究科応用生命科学部門（薬効解析科学）仲田義啓前教授ならびに森岡徳光教授，本学医歯薬保健学研究科応用生命科学部門（歯科補綴学）津賀一弘教授，本学医歯薬保健学研究科基礎生命科学部門（口腔生理学）杉田誠教授に満腔の謝意を表します．

最後に，本研究の完遂に際して，多大なるご支援ならびにご協力を頂きました歯科麻酔学，薬効解析科学の研究室関係各位に心より奉謝いたします．

引用文献

- 【1】 Evers AS, Crowder CM. General anesthetics. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG eds. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001: pp337-365.
- 【2】 Sawamura S, Kingery WS, Davies MF, Agashe GS, Clark JD, Kobilka BK, Hashimoto T, Maze M. Antinociceptive action of nitrous oxide is mediated by stimulation of noradrenergic neurons in the brainstem and activation of α_{2B} adrenoceptors. *J Neurosci* 2000; 20: 9242-9251.
- 【3】 Krasowski MD, Harrison NL. General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 1278-1303.
- 【4】 Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* 1997; 389: 385-389.
- 【5】 Nicholls DG. Amino acids as neurotransmitters (Proteins, transmitters and synapses), Blackwell Science Oxford 1994; 155-185.
- 【6】 Becker CM. Disorders of the inhibitory glycine receptor: the spastic mouse. *The FASEB J* 1990; 4: 2767-2774.
- 【7】 Violet JM, Downie DL, Nakisa RC, Lieb WR, Franks NP. Differential sensitivities of mammalian neuronal and muscle nicotinic acetylcholine

receptors to general anesthetics. *Anesthesiology* 1997; 86: 866-874.

- 【 8 】 Kuraishi Y, Hirota N, Sugimoto M, Satoh M, Takagi H. Effect of morphine on noxious stimuli-induced release of substance P from rabbit dorsal horn in vivo. *Life Sci* 1983; 33: 693-696.
- 【 9 】 Kendig JJ, Savola MKT, Woodley SJ, Maze M. α_2 -Adrenoceptors inhibit a nociceptive response in neonatal rat spinal cord. *Eur J Pharmacol* 1991; 192: 293-300.
- 【 10 】 Minami K, Shiraishi M, Uezono Y, Shigematsu A. The inhibitory effects of anesthetics and ethanol on substance P receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesth Analg* 2002; 94: 79-83.
- 【 11 】 Boast CA, Pastor G, Gerhardt SC, Hall NR, Liebman JM. Behavioral tolerance and sensitization to CGS 19755, a competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;247:556-561.
- 【 12 】 富永真琴. 生体はいかに温度をセンスするかーTRP チャネル受容体ー. *日生誌* 2003;65:130-137.
- 【 13 】 Meldrum BS. GABAergic mechanisms in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Br J Clin Pharmacol* 1989;27 Suppl1:3S-11S
- 【 14 】 川崎康彦, 河野達郎. 脊髄における下行性抑制系の役割. *Brain Medical* 2009;vol21 No3
- 【 15 】 Goto T, Marota JJ, Crosby G. Pentobarbitone, but

not propofol, produces pre-emptive analgesia in the rat formalin model. Br J Anaesth, 1994;72:662-667

【16】Jewett BA, Gibbs LM, Tarasiuk A, Kendig JJ. Propofol and barbiturate depression of spinal nociceptive neurotransmission. Anesthesiology. 1992;77:1148-1154

【17】宮本真記子，高田耕司，大井良之，本田訓也．プロポフォルによる血管痛に対する TRPA1 チャンネルの関与．日歯麻誌；2012:40(3):284-291

【18】倉田眞治，鮎瀬卓郎，大井久美子．低用量プロポフォルが，ラット脊髄くも膜下腔の NO 産生および疼痛行動に与える影響．日歯麻誌；2006:34(2):155-163

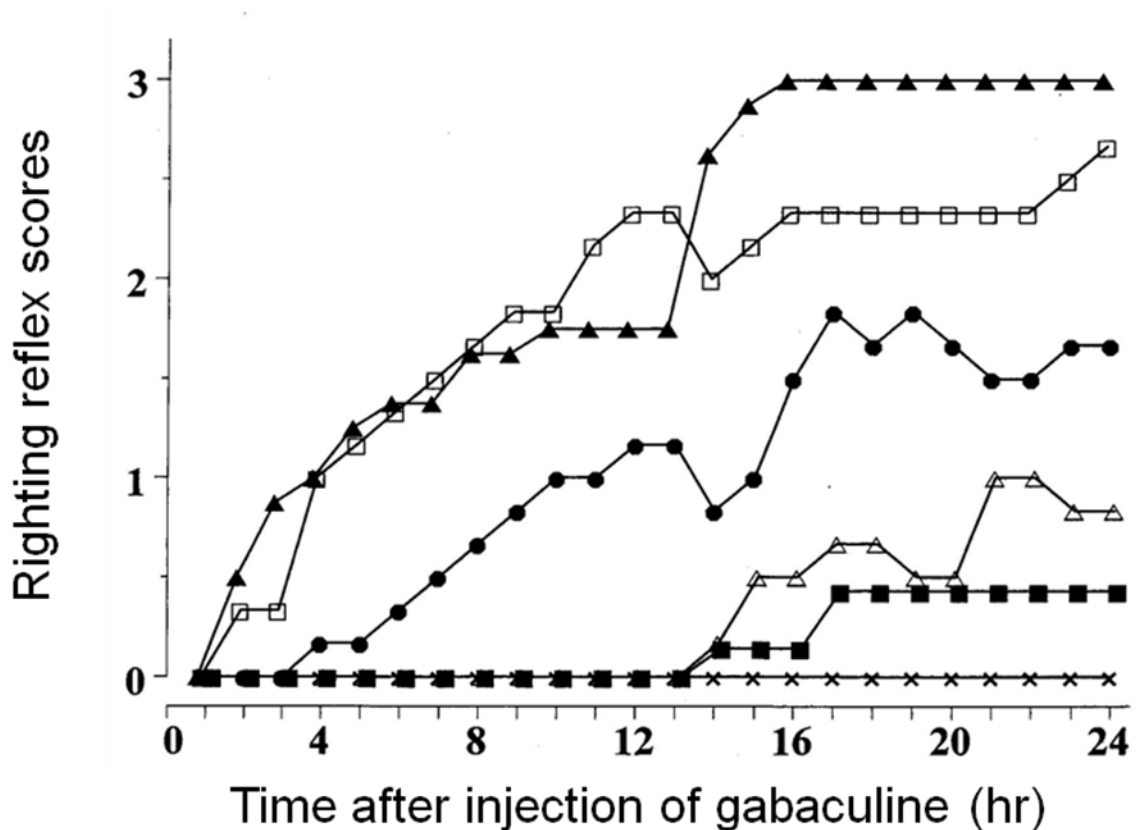


図1 マウスの正向反射スコアに及ぼす gabaculine の影響を経時的変化で示す。種々の用量の gabaculine (X, 35 mg/kg; ■, 50 mg/kg; △, 70 mg/kg; ●, 100 mg/kg; □, 140 mg/kg; ▲, 200 mg/kg) は腹腔内に投与した。正向反射スコアは, gabaculine 投与後 24 時間にわたり, 1 時間ごとに計測した(各投与量につき, 5-7 匹のマウスを使用した)。正向反射スコア 0 は正常, +1 は 3 回とも 2 秒以内に正向反射がある状態(軽度正向反射障害), +2 は 2 秒から 10 秒の間に少なくとも 1 回は正向反射がある状態(中等度~高度正向反射障害), +3 は 3 回とも 10 秒以内に正向反射がない状態(正向反射消失)を示す。

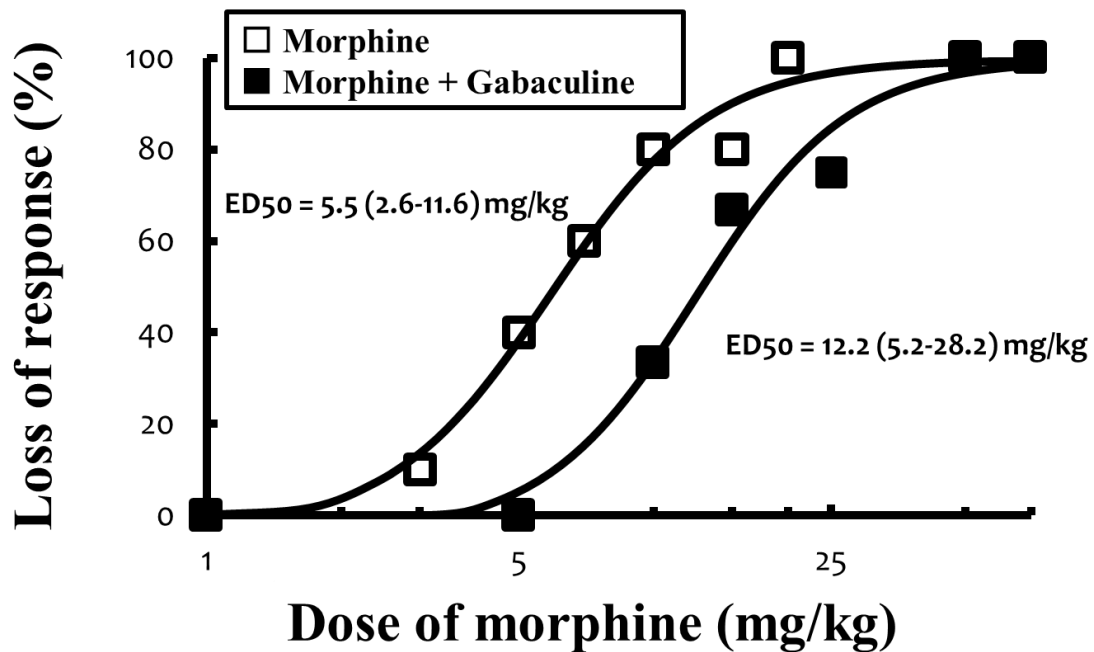


図2 マウスにおける tail-clamp 刺激に対する仮性疼痛反応と gabaculine 投与下での侵害刺激に対する体動に及ぼす morphine の影響. Morphine の皮下投与 30 分後に tail-clamp 刺激を加え, 仮性疼痛反応の抑制効果を検討した (□). また, gabaculine (200 mg/kg) を腹腔内投与した 16.5 時間後に morphine を皮下投与し, その 30 分後に正向反射の消失が認められたマウスにのみ tail-clamp 刺激を加え不動化を観察した (■). Prism version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用して, tail-clamp 刺激に対する反応を消失したマウスのパーセンテージ (%) をグラフにプロットし用量-反応曲線を描かせ, ED₅₀ (95% 信頼限界) と Hill slopes を算出させた. Morphine の鎮痛作用の ED₅₀ が 5.5 (2.6-11.6) mg/kg であるのに対し, gabaculine による正向反射消失下での不動化に必要な morphine の ED₅₀ は 12.2 (5.2-28.2) mg/kg と増加した.

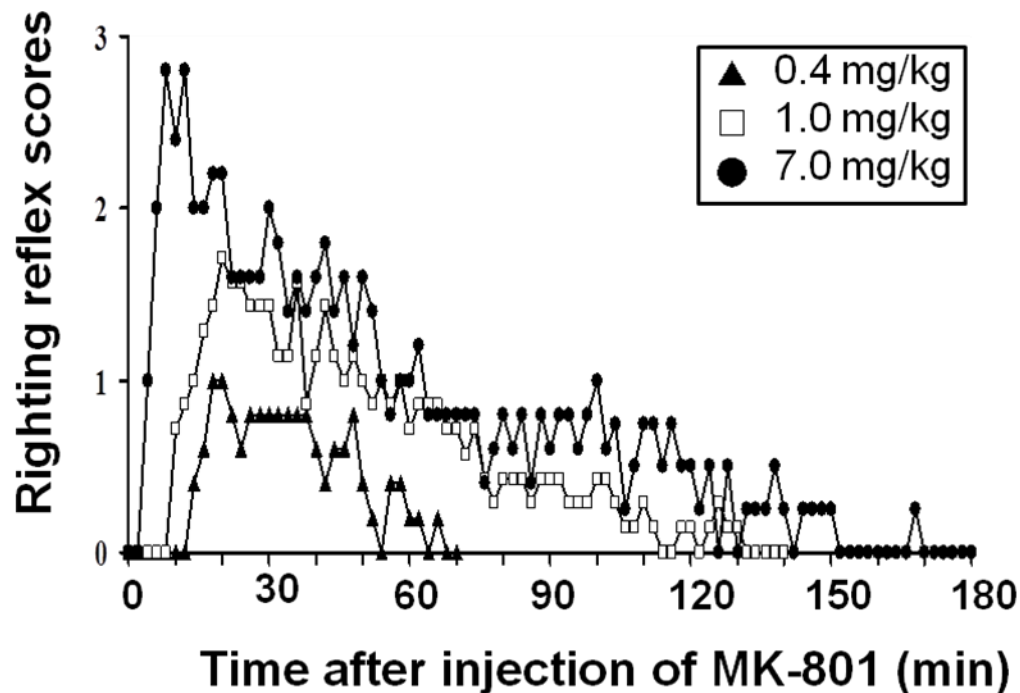


図 3 マウスの正向反射スコアに及ぼす MK-801 と haloperidol の併用の影響を経時的変化で示す. Haloperidol (0.2mg/kg) は MK-801 の投与 30 分前に腹腔内投与した. 種々の用量の MK-801 (▲, 0.4mg/kg; □, 1mg/kg; ●, 7mg/kg) を腹腔内投与した後, 正向反射スコアは 180 分間にわたり, 2 分ごとに計測した (各投与量につき, 5-7 匹のマウスを使用した). 正向反射スコア 0 は正常, +1 は 3 回とも 2 秒以内に正向反射がある状態 (軽度正向反射障害), +2 は 2 秒から 10 秒の間に少なくとも 1 回は正向反射がある状態 (中等度~高度正向反射障害), +3 は 3 回とも 10 秒以内に正向反射がない状態 (正向反射消失) を示す.

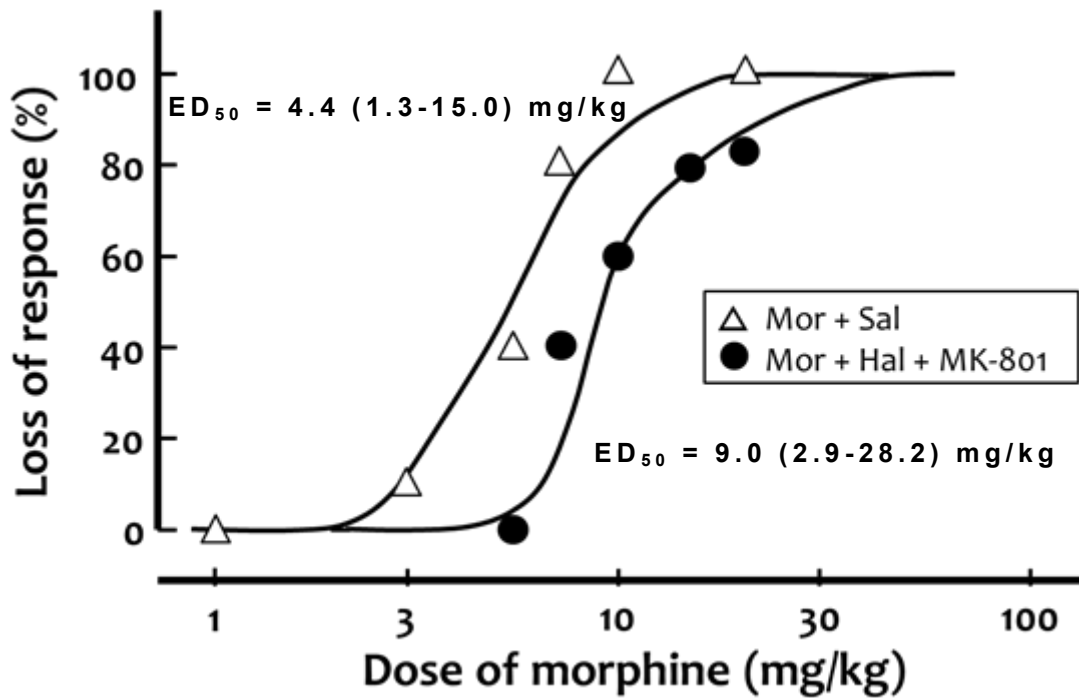


図4 マウスにおける tail-clamp 刺激に対する仮性疼痛反応と MK-801 (5 mg/kg) および haloperidol (0.2 mg/kg) の併用投与下での侵害刺激に対する体動に及ぼす morphine の影響. Morphine の皮下投与と haloperidol (0.2 mg/kg) を腹腔内投与し, 30 分後に MK-801 を腹腔内投与した. Tail-clamp 刺激に対する反応は, MK-801 投与 15 分後に調べた. Prism version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用して, tail-clamp 刺激に対する反応を消失したマウスのパーセンテージ (%) をグラフにプロットし用量-反応曲線を描かせ, ED_{50} (95% 信頼限界) と Hill slopes を算出させた. Morphine の鎮痛作用の ED_{50} が 4.4 (1.3-15.0) mg/kg であるのに対し, MK-801 及び haloperidol 併用による正向反射消失下での不動化に必要な morphine の ED_{50} は 9.0 (2.9-28.2) mg/kg と増加した.

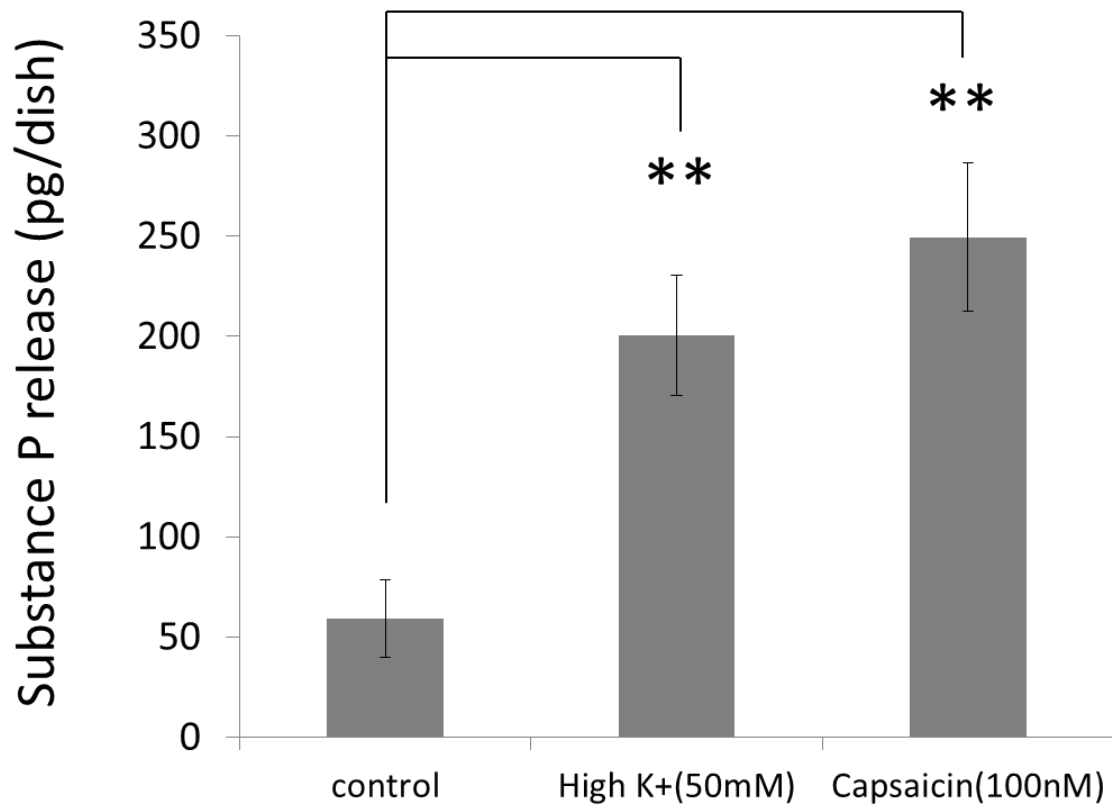


図 5 Capsaicin および高濃度 K^+ 刺激によるサブスタンス P 遊離. 縦軸は dish 1 枚あたりのサブスタンス P 遊離量を示す. 100 nM capsaicin および高濃度 (50 mM) K^+ で培養 DRG 細胞を刺激すると, SP 遊離量の有意な増加が認められた. 各棒は, 平均値 \pm 標準誤差で示す ($n = 4 - 5$). ** $p < 0.01$ (Student's t-test).

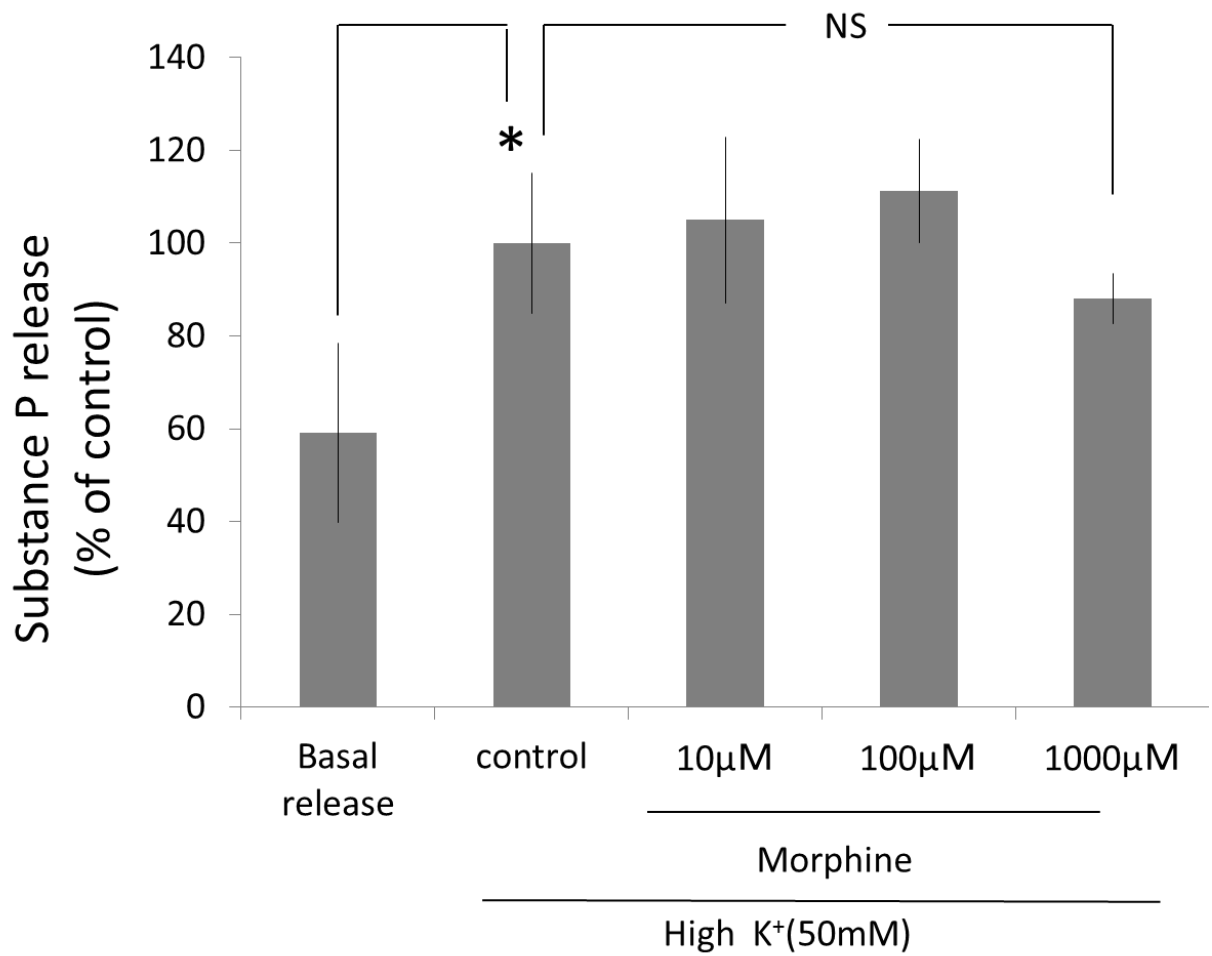


図 6 DRG 培養細胞における高濃度 K⁺刺激時サブスタンス P 遊離に及ぼす morphine の影響を示す．高濃度 K⁺刺激により増加したサブスタンス P 遊離量に morphine は影響を及ぼさなかった．各棒は，平均値±標準誤差で示す (n = 4 - 5)．* p < 0.05 (One-WAY ANOVA)．

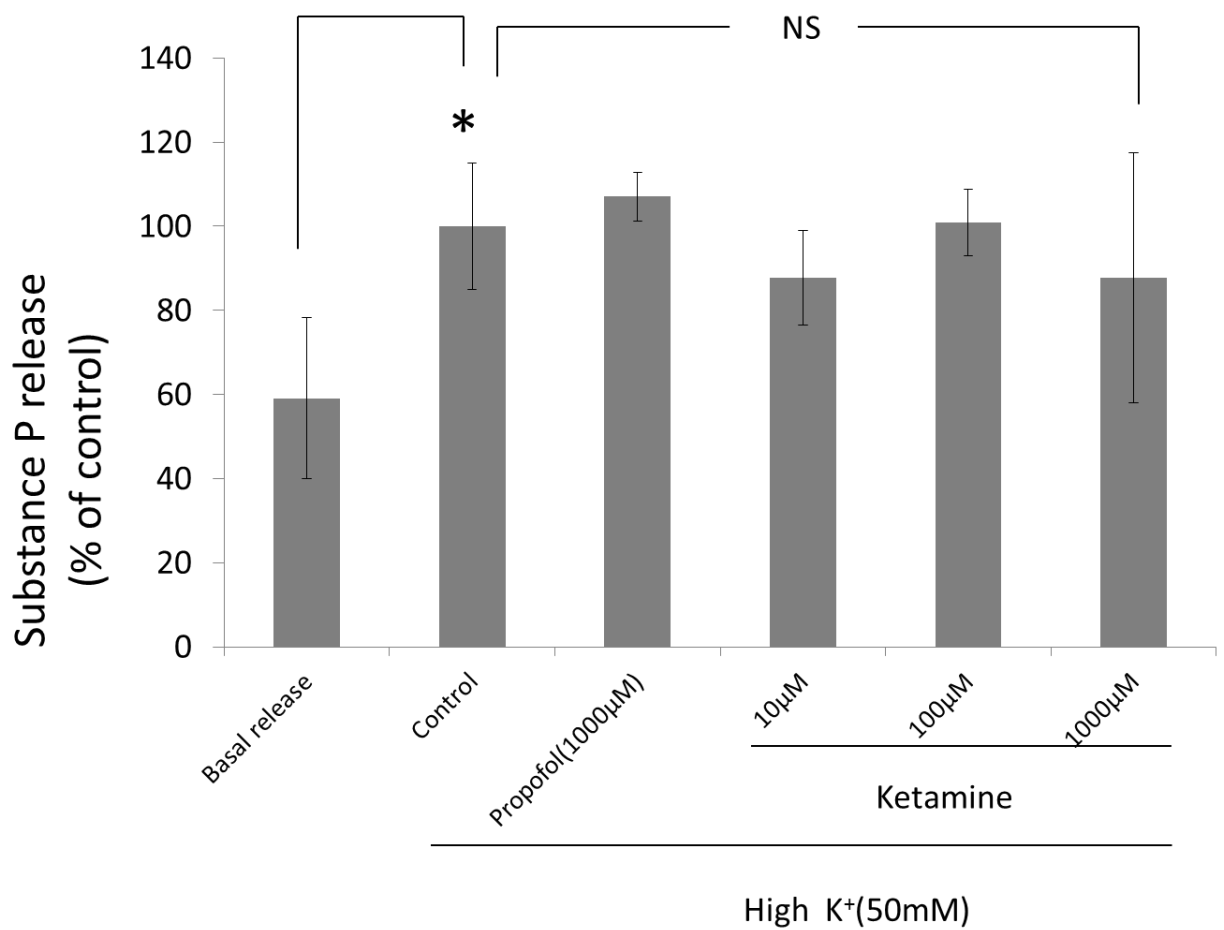


図 7 DRG 培養細胞における高濃度 K^+ 刺激時サブスタンス P 遊離に及ぼす propofol 及び ketamine の影響を示す. 高濃度 K^+ 刺激により増加したサブスタンス P 遊離量に propofol 及び ketamine は影響を及ぼさなかった. 各棒は, 平均値 \pm 標準誤差で示す ($n = 4 - 5$). * $p < 0.05$ (One-WAY ANOVA).

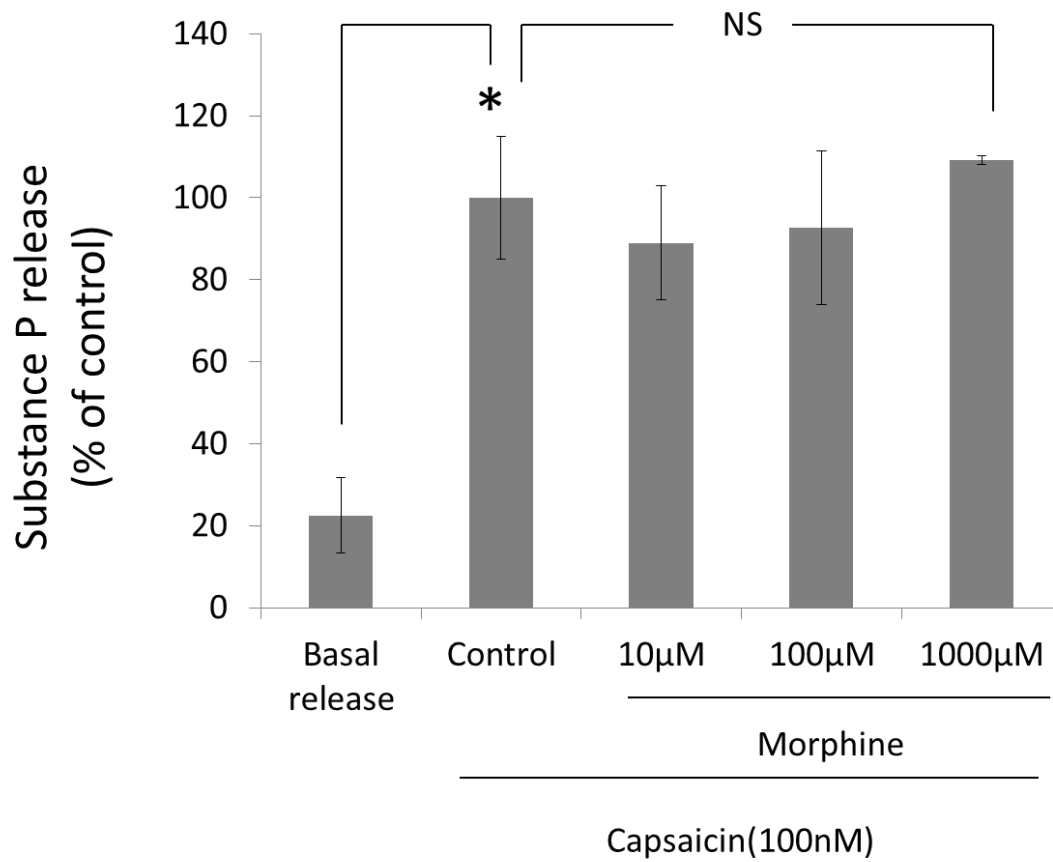


図 8 DRG 培養細胞における capsaicin 刺激時サブスタンス P 遊離に及ぼす morphine の影響を示す. capsaicin 刺激により増加したサブスタンス P 遊離量に morphine は影響を及ぼさなかった. 各棒は, 平均値 ± 標準誤差で示す (n = 4 - 5).
 * p < 0.05 (One-WAY ANOVA).

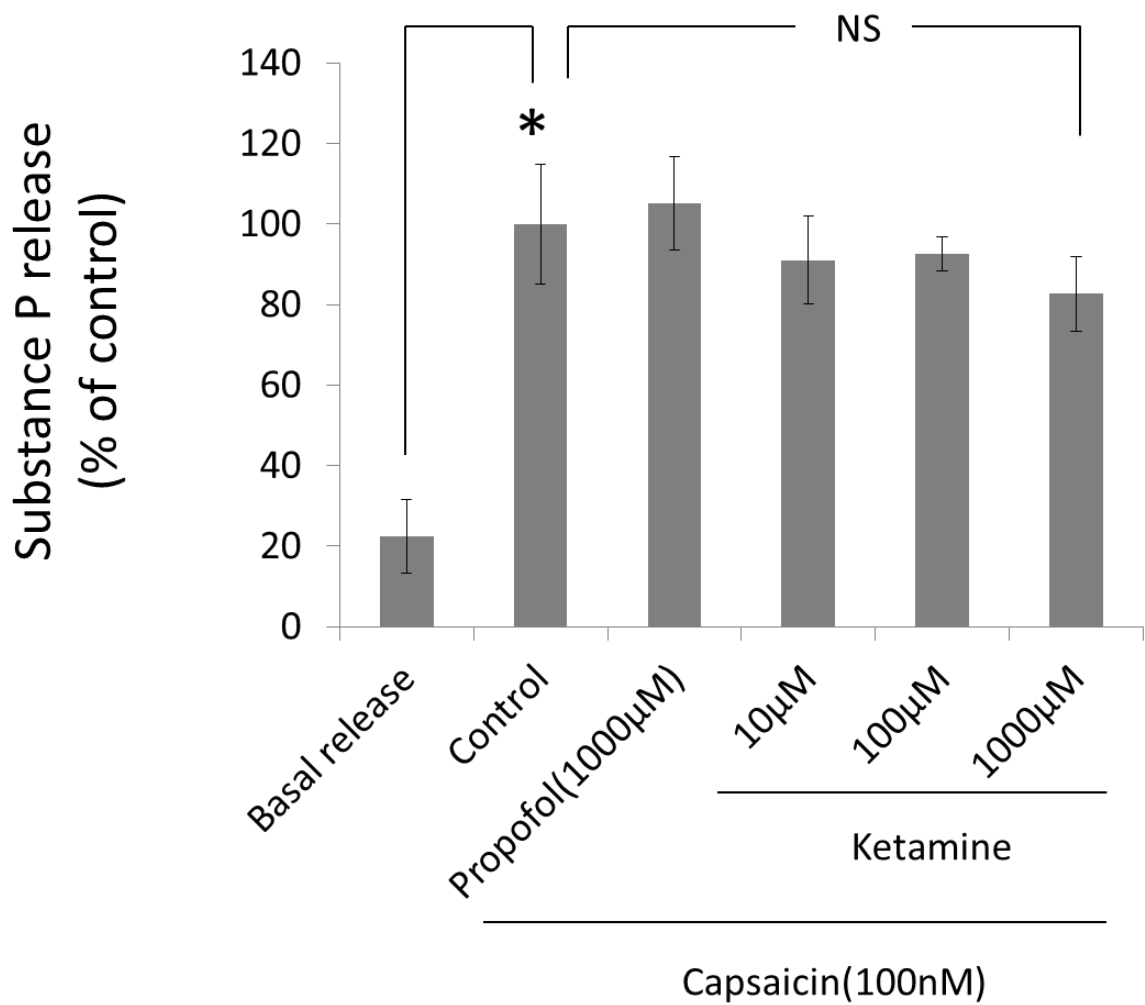


図 9 DRG 培養細胞における capsaicin 刺激時サブスタンス P 遊離に及ぼす propofol 及び ketamine の影響を示す. capsaicin 刺激により増加したサブスタンス P 遊離量に propofol 及び ketamine は影響を及ぼさなかった. 各棒は, 平均値±標準誤差で示す (n=4 - 5). * p<0.05 (One-WAY ANOVA).

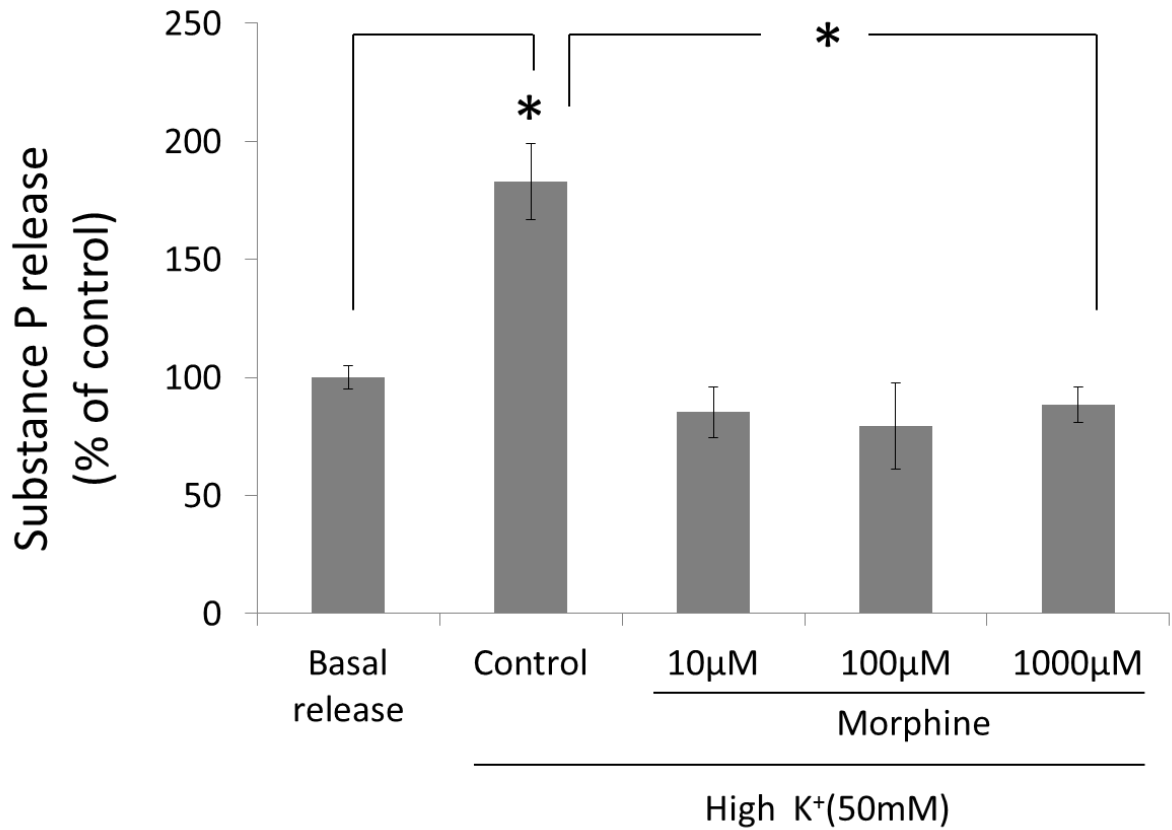


図 10 脊髄後角組織における高濃度 K^+ 刺激時サブスタンス P 遊離に及ぼす morphine の影響を示す. 脊髄後角組織において高濃度 K^+ 刺激により増加したサブスタンス P 遊離量は morphine により有意に抑制された. 各棒は, 平均値 \pm 標準誤差で示す ($n = 4 - 5$). * $p < 0.05$ (One-WAY ANOVA).

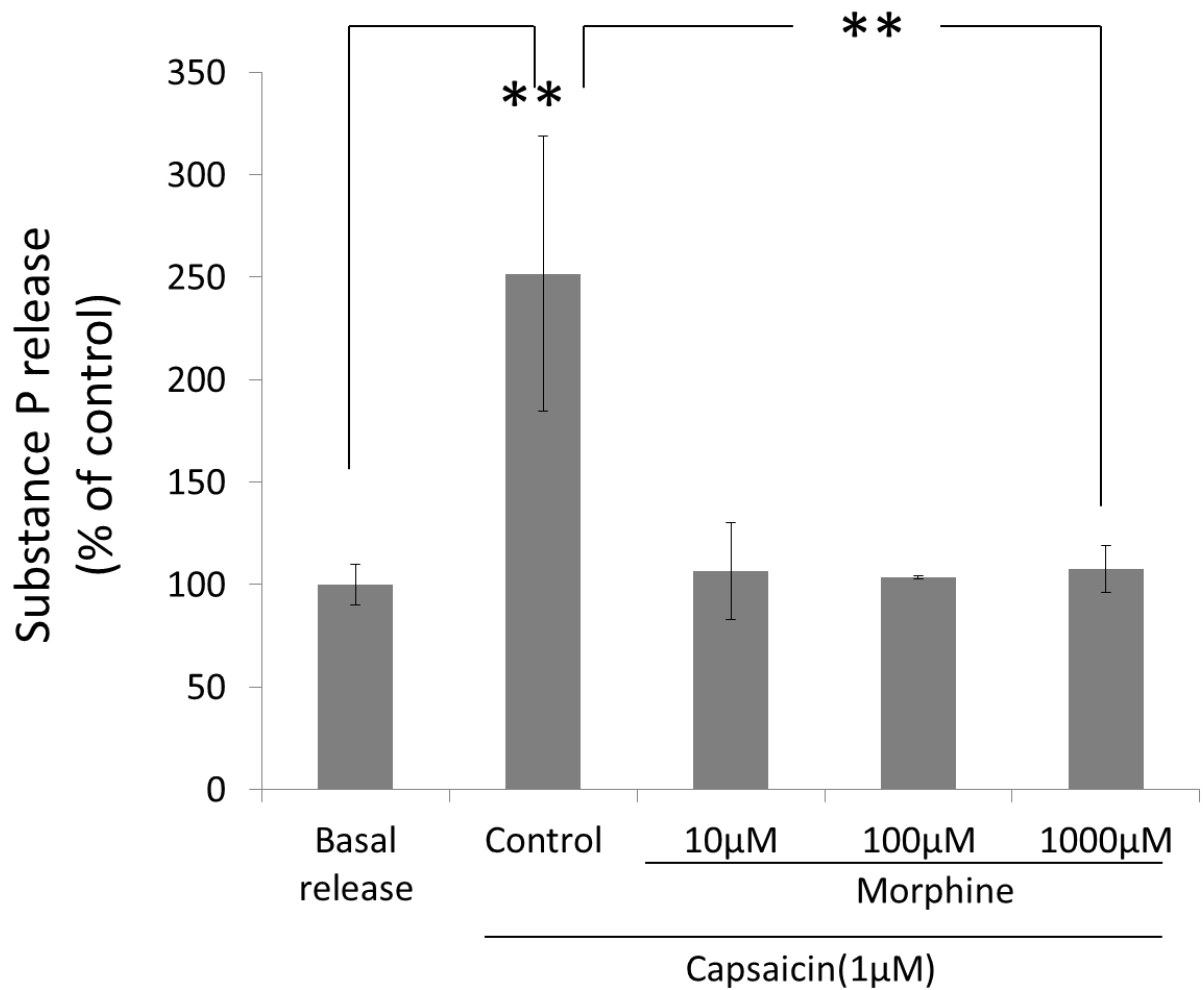


図 11 脊髄後角組織における capsaicin 刺激時サブスタンス P 遊離に及ぼす morphine の影響を示す．脊髄後角組織において capsaicin 刺激により増加したサブスタンス P 遊離量は morphine により有意に抑制された．各棒は，平均値±標準誤差で示す (n = 4 - 5)．** p < 0.01 (One-WAY ANOVA)．

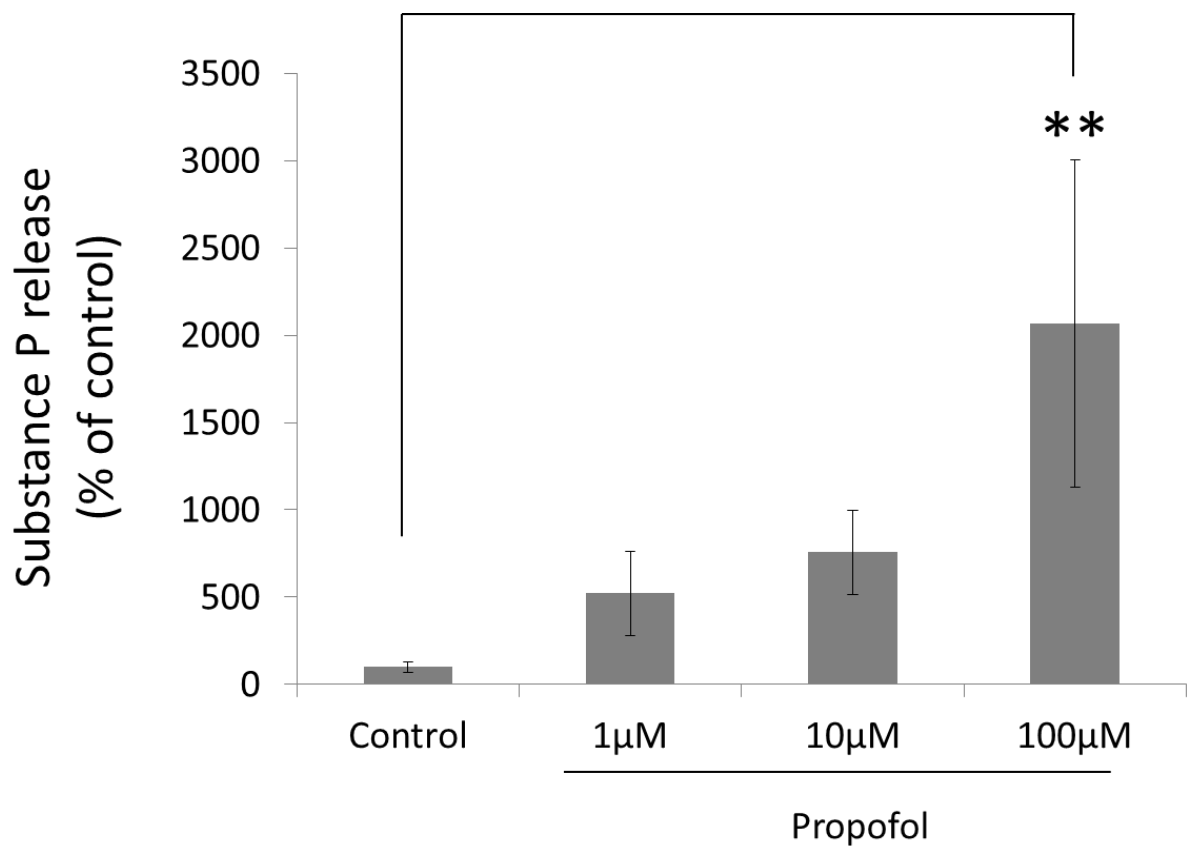


図 12 脊髄後角組織からのサブスタンス P 遊離に及ぼす propofol の影響を示す。脊髄後角組織において propofol は濃度依存性にサブスタンス P 遊離を増強した。各棒は、平均値 ± 標準誤差で示す (n = 4)。** p < 0.01 (One-WAY ANOVA)。

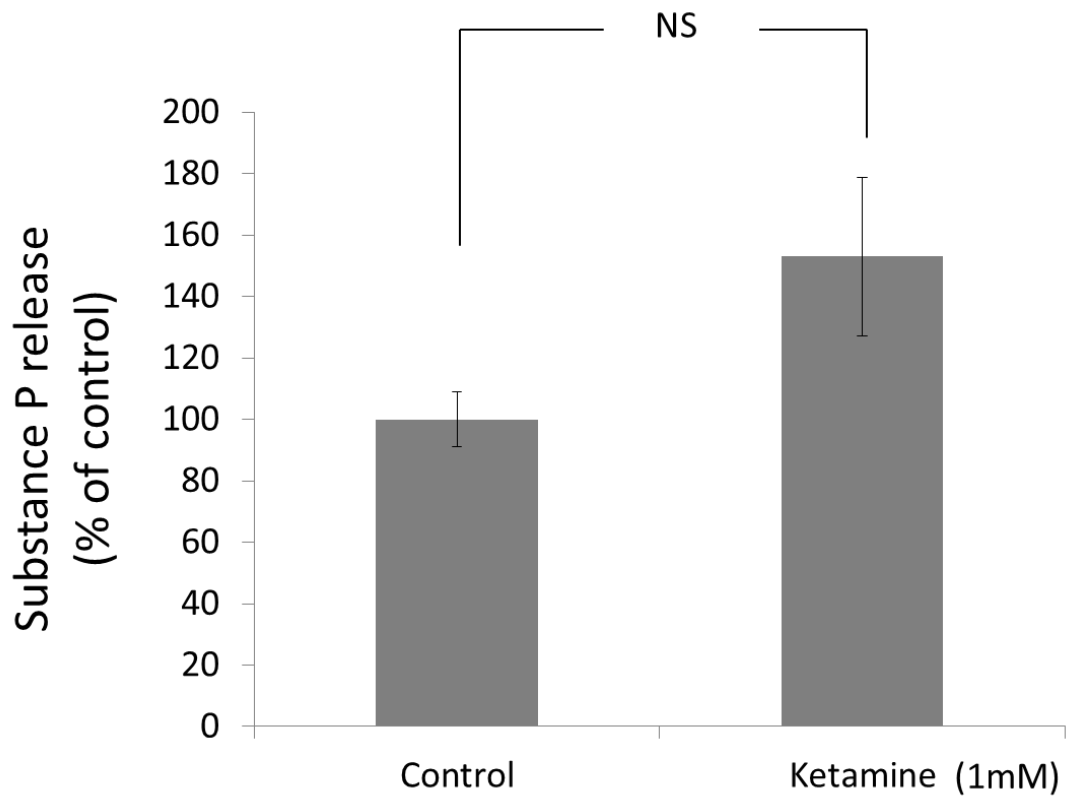


図 13 脊髄後角組織からのサブスタンス P 遊離に及ぼす ketamine の影響を示す。脊髄後角組織において ketamine はサブスタンス P 遊離に影響を及ぼさなかった。各棒は、平均値±標準誤差で示す (n=4)。 (Student's t-test)。

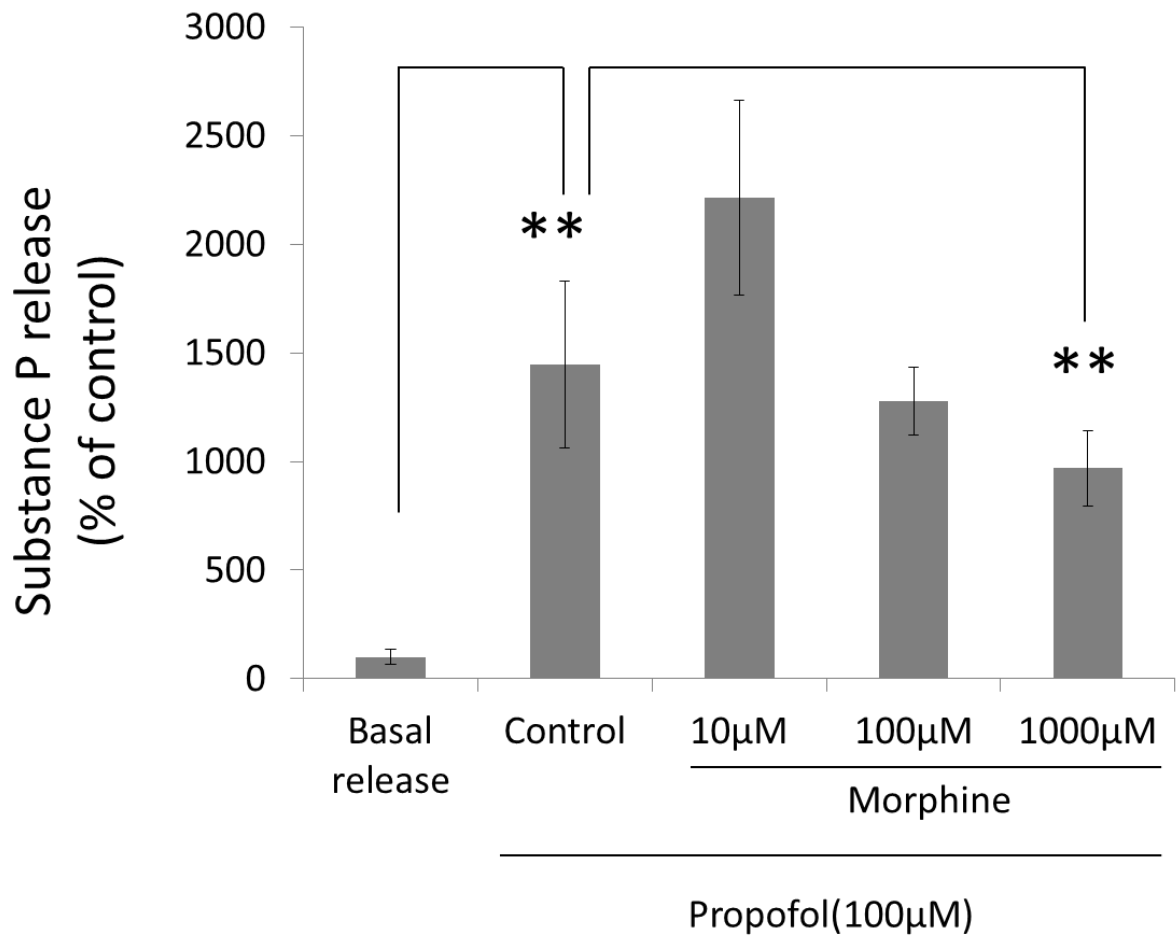


図 14 脊髄後角組織における propofol によるサブスタンス P 遊離増強作用に及ぼす morphine の影響を示す. Propofol により増強されたサブスタンス P 遊離量は morphine により濃度依存性に抑制された. 各棒は, 平均値±標準誤差で示す (n = 4). ** p < 0.01 (One-WAY ANOVA).