

学 位 論 文

メタンフェタミンの鎮痛効果における
ドパミン神経とノルアドレナリン神経の関与：
ホルマリンテストおよび脳マイクロダイアリス法による検討

小田 綾

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)

2018 年度

要旨	5
----	---

第1章 緒論	7
--------	---

第2章 Methamphetamine および GBR-12909 の鎮痛作用の検討

第1節 Formalin test

第1項 緒言	10
第2項 実験材料および方法	10
第3項 結果	11

第2節 Formalin による痛み反応の抑制作用における methamphetamine および GBR-12909 の作用発現時間と持続時間

第1項 緒言	11
第2項 実験材料および方法	11
第3項 結果	12

第3節 Formalin による痛み反応に及ぼす methamphetamine および GBR-12909 の用量反応作用

第1項 緒言	12
第2項 実験材料および方法	13
第3項 結果	13

第3章 Formalin test 単独あるいは methamphetamine 併用時の黒質線条体における
ドパミン (DA) 量あるいは前頭前野におけるノルアドレナリン (NA) 量の変化の検討

第1節 緒言	14
第2節 実験材料および方法	14
第3節 結果	16

第4章 Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす
各種薬物の影響の検討

第1節 Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす
ドパミン (DA) 受容体拮抗薬の影響

第1項 緒言	17
第2項 実験材料および方法	17
第3項 結果	18

第2節 Formalin による侵害刺激に対する Methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす
ノルアドレナリン (NA) 受容体拮抗薬の影響

第1項 緒言	18
第2項 実験材料および方法	18
第3項 結果	19

第3節 Formalin による侵害刺激に対する Methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす
ノルアドレナリン (NA) 受容体作動薬の影響

第1項 緒言	19
第2項 実験材料および方法	20
第3項 結果	20

第4節 Formalin による侵害刺激に対する Methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす
NA 神経毒 (DSP-4) の影響

第1項 緒言 21
第2項 実験材料および方法 21
第3項 結果 21

第5章 考察 22

第6章 総括および結論 27

謝辞 29

引用文献 30

図表 33

要 旨

全身麻酔は健忘、意識消失、鎮痛、骨格筋弛緩、侵害刺激による体動の抑制(不動化)など様々な要素からなるが、その中でも鎮痛は特に重要な要素と考えられる。手術中には機械的・化学的侵害刺激だけでなく、それに伴う炎症反応も生じると考えられる。また、痛みの抑制にドパミン(DA)神経やノルアドレナリン(NA)神経の関与が知られている。さらに、これらの神経系が下行性疼痛抑制系に重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、本研究では、DA 取り込み阻害作用と NA 遊離促進作用を有する methamphetamine および選択的 DA 取り込み阻害薬である GBR-12909 をマウスに全身投与し、急性持続性疼痛評価のモデルとして確立されている formalin test を用いてこれらの薬物が鎮痛効果を有するか検討した。また、formalin 単独や methamphetamine の併用が線条体での DA 量および前頭前野での NA 量を変化させるか、脳マイクロダイアリシス法を用いて神経生化学的手法により検討した。さらに、それぞれ DAD₁、DAD₂ 受容体拮抗薬の SCH-23390、haloperidol、それぞれ α 、 α_1 、 α_2 、 β アドレナリン受容体拮抗薬の phenoxybenzamine、prazosin、yohimbine、propranolol、アドレナリン α_2 受容体作動薬の dexmedetomidine および NA 神経毒である DSP-4 が、methamphetamine の鎮痛効果に影響を及ぼすか行動薬理学的手法により検討した。本研究により選択的 DA あるいは NA 受容体作動薬の活用により痛覚抑制系を増強する、全く新しい全身麻酔法が確立できれば、呼吸・循環抑制といった重篤な副作用のある麻薬性鎮痛薬を使用しなくてもよくなるかも知れない。

実験動物：ddY 系成熟雄性マウスを用い、formalin は片側後肢足蹠皮下に、その他の薬物はすべて腹腔内に投与した。

行動薬理学実験：マウスの片側後肢足蹠に 1-4% formalin を 10 μ l 皮下注射した後ビーカーに戻し、投与後 1 分毎に 0 から 3 までスコア化した痛み行動を観察、記録した。スコア 0 は注射された後肢の位置および動きがもう一方の後肢と区別できない状態、スコア 1 は注射された後肢に体重をほとんどか全くかけられない状態、スコア 2 は注射された後肢を持ち上げいずれの面とも接触していない状態、スコア 3 は注射された後肢を舐めたり噛んだり振ったりしている状態を示すものとした。また、formalin 注射の 10、20、30 分前に methamphetamine または GBR-12909 を腹腔内投与し、formalin による痛みスコアに及ぼす影響を検討した。次に、methamphetamine を投与するさらに 10 分前に DSP-4 を除いた前述の各種薬物を腹腔内投与し、methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす影響を検討した。DSP-4 は methamphetamine 投与 6 時間前または 7 日前に腹腔内投与した。

神経生化学実験：Saline または methamphetamine 投与 10 分後に formalin を皮下注射した際の線条体および前頭前野での細胞外液を脳マイクロダイアリシス法により回収した。回収した細胞外液中の DA あるいは NA 量の測定は、HPLC-ECD を用いて行った。

結果を以下に示す。

1. 1-4% formalin は濃度依存性に痛みスコアを増加させた。スコアの増加はホルマリンの化学刺

激による第1相（投与直後—約6分後）と炎症反応と考えられる第2相（投与後約10分以降）の2相性に観察され、約60分間持続した。また、この2相の間の約5分間（投与約6—10分後）は痛み反応が消失した。この後の実験ではすべて4% formalin を使用した。

2. Methamphetamine と GBR-12909 は、両薬物とも formalin による痛みに対し用量依存性に鎮痛効果を認めた。また、methamphetamine は formalin 注射の10分前、GBR-12909 は30分前に投与したとき、鎮痛効果が最も強かった。さらに、methamphetamine が formalin による第1相と第2相の両相で有意な鎮痛効果があったのに対し、GBR-12909 は第2相でのみ有意であった。本結果から、この後の実験では、methamphetamine (2 mg/kg) は formalin 注射10分前に投与した。

3. マイクロダイアリス法による線条体の DA 量の測定では、methamphetamine 投与後の formalin 注射により線条体での DA 量は有意に増加した。Formalin 単独では DA 量がわずかに増加したが、有意ではなかった。

4. 前頭前野での NA 量の測定では、methamphetamine 投与後の formalin 注射により NA 量は増加した。

5. 低用量の SCH-23390 (0.1 mg/kg) は、第2相での methamphetamine による鎮痛効果を有意にリバースした。低用量の haloperidol (0.2 mg/kg) は methamphetamine の鎮痛効果に影響しなかったが、高用量(1 mg/kg)では第2相での鎮痛効果のみ有意に拮抗した。

6. Phenoxybenzamine および prazosin は、第2相において methamphetamine の鎮痛効果に拮抗した。Yohimbine は影響を与えなかったが、propranolol は逆に第1相において methamphetamine の鎮痛効果を増強した。

7. Dexmedetomidine は高用量(200-400 µg/kg)で、第1相における methamphetamine の鎮痛効果を増強した。

8. 7日前に DSP-4 を投与した場合、formalin に対する methamphetamine の鎮痛効果に影響を与えなかった。しかし、6時間前に DSP-4 を投与した場合、第1相と第2相の両方とも methamphetamine の鎮痛効果が拮抗された。

以上の結果より、methamphetamine は formalin による急性持続性疼痛に対し鎮痛効果を有し、その効果には線条体での DA 量の増加や前頭前野での NA 量の増加が関与し、下行性疼痛抑制系を介している可能性が示唆された。また、GBR-12909 が formalin test で第2相の痛み反応のみを抑制したことや、DA 受容体拮抗薬が第2相に対する methamphetamine の鎮痛効果のみを拮抗したことから、DA 神経は第1相よりも第2相の鎮痛効果により強く影響すると考えられた。さらに、DSP-4 の結果は、NA 神経が両相の鎮痛効果に関与することを示唆した。本研究を通して得られた研究成果は、選択的 DA あるいは NA 受容体作動薬を活用した新しい全身麻酔法の開発に資することが期待できる。

第1章 緒論

全身麻酔下手術を世界で初めて成功させたのは、アメリカにおいて William T.G. Morton がエーテル麻酔を施し外科手術を行った 1846 年のことである。それ以来、全身麻酔薬や全身麻酔法は進展を続け、現在の医療の現場において不可欠なものとなった。その一方で、全身麻酔薬の詳細な作用機序は未だ十分には解明されていない。そのため、全身麻酔薬の作用機序解明および全身麻酔時や手術侵襲時の生体内変化の原因を明らかにすることで、新薬の開発やより安全な全身麻酔の実現につなげることができるかもしれない。

現在では、全身麻酔の概念は、①無痛、②意識の消失、③ストレス反応の減弱、という大きな 3 つの要素から成るとされており【1, 2】、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、様々な要素が複合した状態によって実現される【3】。これらの要素のうち、鎮痛は最も重要な要素の一つと考えられ、手術中は機械的・化学的侵害刺激だけでなく、それらに伴って起こる炎症反応によっても痛みは生じる。このような痛み刺激は、体動や、血圧上昇・頻脈などの有害な自律神経反射を惹起して麻酔深度が浅くなり覚醒の方向に向かわせることを、私たちの研究室において脳波・筋電図測定による実験で確認している【4, 5】。現在術中に使用される鎮痛薬としては、フェンタニルやレミフェンタニルなど強力な鎮痛作用を有する麻薬性鎮痛薬が一般的であるが、これらの薬物には、徐脈などの循環抑制や換気量減少などの呼吸抑制、胸部や腹部の筋硬直による換気困難などの副作用が知られている。本研究により新しい鎮痛法が確立できれば、循環・呼吸抑制といった重篤な副作用のある麻薬性鎮痛薬を使用する必要がなくなるかも知れない。

痛みの抑制には、麻薬性鎮痛薬などオピオイド受容体を介するものだけでなく、ドパミン(DA)神経やノルアドレナリン (NA) 神経も関与することが知られている。また、これらの神経系が下行性疼痛抑制系に重要な役割を果たしていると考えられている。ごく初期の電気生理学的研究で、痛覚との関連が明らかでなかった様々な脳の領域を電気刺激すると強力な鎮痛作用が得られることがわかり、これを下行性疼痛抑制系と呼んだ。この痛覚抑制系は、大きく 3 つの連結した経路からなる。①中脳水道周囲灰白質領域のニューロンは、信号を神経伝達物質である内因性オピオイドのエンケファリンを介し、②縫線核および傍巨大細胞網様核へと伝える。これらの核から二次信号が、③脊髄後角へと送られ、セロトニンを遊離させる。セロトニンは、脊髄ニューロンからエンケファリンを遊離させる【6】。エンケファリン神経は、脊髄後角でシナプスを形成し痛みの伝導路である一次求心性ニューロンの A δ 線維と C線維からの入力をシナプス前およびシナプス後抑制すると考えられている。また、橋にある青斑核の NA 作動性神経は、脊髄前側索を下行し、A δ 線維や C線維の神経終末部に発現する α_2 受容体を介して脊髄後角の一次求心性ニューロンを抑制する。さらに、青斑核からは、大脳皮質の前頭前野へ NA 作動性神経が入力しており、ここから中脳水道周囲灰白質領域への出力が認められている。これらの神経経路によっても鎮痛作用の内因性機構が賦活される。このように、生理的痛覚抑制系は脊髄への最初

の入力点で侵害刺激により引き起こされる痛み信号を阻止することが可能である。

臨床において、黒質線条体系 DA 神経細胞の変性・脱落がパーキンソン病を惹起することはよく知られているが、パーキンソン病患者の 83%が痛みを抱えており、その中には、神経障害性疼痛があることが報告されている。この痛みは、はっきり特定できない体の部位に出現し、灼熱感、疼くような痛み、チリチリする痛みなどと表現される。さらに、パーキンソン病患者で、痛みの閾値そのものが低下していることが報告されている。一方、基礎実験では、パーキンソン病モデルラットで、機械的刺激や熱刺激に対する引っ込め反射の閾値の低下、化学物質誘発疼痛テストの反応増強が観察され、大脳基底核の DA システムが痛みの認知に関与することを示唆している【7】。また、線条体からの DA 神経が下行性疼痛抑制系を促通することがわかっている。一方で、腹側被蓋野から帯状回、側坐核、扁桃体への DA 神経経路は、報酬系と同様の作用があり、末梢からの痛みの入力があっても、痛いと感じる脳の部位での感じ方を弱くしていると考えられている【8】。

覚醒剤として知られる methamphetamine は、気分爽快、自信増加、積極性増加、精力増進、疲労感減少、多弁、不眠、常同行動などの中枢興奮作用と瞳孔散大、立毛感、心悸亢進、末梢血管の収縮、四肢の冷感、血圧上昇などの交感神経刺激作用を引き起こし、強い渴望感を伴う依存が形成されるため、覚せい剤取締法によりその使用が厳しく制限されている。また、マウスやラットなどに methamphetamine を急性投与すると低用量 (0.25-1.0 mg/kg) では移所運動量 (例：ケージの中を走り回る) が増加する。さらに高用量 (> 2.5 mg/kg) では移所運動量の増加に引き続き、常同行動 (例：一か所で舐める・嗅ぐなどの行動を強迫的に繰り返す) が出現する。このような methamphetamine の行動のうち、移所運動量は中脳辺縁系 DA ニューロン (A10：腹側被蓋野から側坐核や扁桃体に投射)、常同行動は黒質線条体 DA ニューロン (A9：黒質緻密層から線条体に投射) が関与するといわれている【9】。以上のような methamphetamine の薬理作用は、DA、NA、セロトニンのトランスポーターおよびシナプス小胞モノアミントランスポーターを標的分子として引き起こされており、特に DA トランスポーターが重要な役割を担っていると考えられている。また、NA ニューロンのシナプス前神経終末からの NA 遊離を促進することによりシナプス間隙での NA 量を増加させているともいわれている【10】。

本研究では、DA 取り込み阻害作用と NA 遊離促進作用の両方を有する methamphetamine および選択的 DA 取り込み阻害薬である GBR-12909 をマウスに全身投与し、急性持続性疼痛評価のモデルとして確立されている formalin test を用いてこれらの薬物が鎮痛効果を有するか検討した。

また、formalin 単独や methamphetamine の併用によって下行性疼痛抑制系経路の一部と考えられる線条体や前頭前野でのそれぞれ DA 量や NA 量が増加するか、脳マイクロダイアリス法を用いた神経生化学的手法により検討した。

さらに、DA 受容体拮抗薬の SCH-23390、haloperidol、アドレナリン受容体拮抗薬の phenoxybenzamine、prazosin、yohimbine、propranolol、アドレナリン α_2 受容体作動薬の dexmedetomidine および NA 神経毒である DSP-4 が methamphetamine の鎮痛効果に影響を

及ぼすか，行動薬理学的手法により検討した．本研究により選択的 DA あるいは NA 受容体作動薬の活用により痛覚抑制系を増強する，全く新しい全身麻酔法が確立できれば，循環・呼吸抑制といった重篤な副作用のある麻薬性鎮痛薬を使用する必要がなくなるかも知れない．

第2章 Methamphetamine および GBR-12909 の鎮痛作用の検討

第1節 Formalin test

第1項 緒言

本節では, formalin をマウスの片側後肢足蹠に皮下注射し, 痛み反応の変化を痛みスコアを用いて観察した.

第2項 実験材料および方法

実験材料

実験動物として ddY 系成熟雄性マウス (6 - 8 週齢, 日本エス エル シー株式会社, 浜松市, 静岡県) を使用した. 明期/暗期 12 時間サイクル (明期; 8:00 - 20:00), 室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 50% に設定し, 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 1 回のみ使用した. なお, 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おり, 実験は承認後に行った (承認番号: A16-8)

使用薬物

本実験では薬物として, 10% formalin (Kenei Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) を使用した.

実験方法

Formalin は 0.9% saline で希釈した. 実験室内の温度は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に調節し, マウスを白熱灯使用のヘッドランプにより保温し, 体温が低下しないよう維持した. 実験は午前 9 時から午後 7 時の間で行った.

Saline または 1, 2, 4% の formalin 10 μl をマウスの片側後肢足蹠に皮下注射後, ただちにビーカー (直径 13.5cm \times 高さ 19cm) に入れ, 1 分毎に痛み反応の変化を観察し, 記録した. 痛み反応の評価は, Dubuisson and Dennis の痛みスコア【11】を使用し, 以下のように判定した. スコア 0 は注射された後肢の位置および動きはもう一方の後肢と区別できない状態, 1 は注射された後肢に体重をほとんどまたは全くかけない状態, 2 は注射された後肢を持ち上げていずれの面とも接触していない状態, 3 は注射された後肢を舐めたり噛んだり振ったりしている状態, と

した。

Saline および各濃度の formalin について、マウス 6 - 8 匹を 1 群とし、1 分毎に痛みスコアを記録した後、そのグラフ下の面積 (area under the curve : AUC) を求め、統計処理をおこなった。

第 3 項 結果

Formalin (1, 2, 4%) は濃度依存性に痛みスコアを増加させた。Formalin 注射直後に痛みスコアの急激な上昇がみられた後、約 6 分で一度スコアが低下し、痛み反応の消失期間があった。その後、formalin 投与約 10 分後から再び痛みスコアの上昇がみられ、その上昇の程度は濃度依存性であった。痛み反応は濃度に依存して約 40 - 60 分程度持続した【図 1】。最初に痛みスコアの上昇がみられた第 1 相 (formalin 投与後 0 - 7 分) と、その後の第 2 相 (formalin 投与後 8 - 65 分) に分けて痛みスコアの AUC を総計した場合も、濃度依存性に痛みスコアの上昇がみられた【図 2】。

本節の結果より、この後の実験では formalin test では 4% formalin (10 μ l) を皮下注射し、65 分間観察、記録することとした。

第 2 節 Formalin による痛み反応の抑制作用における methamphetamine および GBR-12909 の作用発現時間と持続時間

第 1 項 緒言

Formalin による痛み反応に及ぼす methamphetamine (2 mg/kg) および GBR-12909 (10 mg/kg) の作用発現時間と持続時間を観察し、投与時間を決定した。

第 2 項 実験材料および方法

実験材料

実験動物は第 1 節に準じた。

使用薬物

本実験では使用薬物として、methamphetamine hydrochloride (Philopon[®] Dainippon

Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) および GBR-12909 dihydrochloride (Sigma-Aldrich Co., LLC., St.Louis, U.S.A.) を使用した。Formalin は第 1 節で使用したものに準ずる。

実験方法

Methamphetamine (2 mg/kg) および GBR-12909 (10 mg/kg) は 0.9% saline に溶解し、マウスの体重 10 g あたり 0.1ml となるよう調製し、マウスの腹腔内に投与した。各薬物について、マウス 5 - 8 匹を 1 群とし、薬物投与の 10, 20, 30 分後に 4% formalin 10 μ l をマウスの片側後肢足蹠に皮下注射し、第 1 節の方法に準じて痛みスコアを観察、記録した。

第 3 項 結果

DA 取り込み阻害作用と NA 遊離促進作用を有する methamphetamine (2 mg/kg) は formalin test における第 1 相、第 2 相の両相において痛み反応を抑制した。Methamphetamine 投与から formalin 投与までの時間は、methamphetamine 投与 10 分後に formalin を皮下注射した群が最も鎮痛効果が強く、投与からの時間が長くなるにつれて弱くなった【図 3-A, B】。

選択的 DA 再取り込み阻害作用を有する GBR-12909 (10 mg/kg) は formalin test における第 2 相においてのみ痛み反応を抑制したが有意ではなかった。GBR-12909 投与から formalin 投与までの時間は、GBR-12909 投与 30 分後に formalin を皮下注射した群が最も鎮痛効果を強く認め、時間が短くなるにつれて弱くなった【図 4-A, B】。

本節の結果より、この後の実験では methamphetamine は formalin 投与の 10 分前、GBR-12909 は formalin 投与の 30 分前に腹腔内投与することとした。

第 3 節 Formalin による痛み反応に及ぼす methamphetamine および GBR-12909 の用量反応作用

第 1 項 緒言

Methamphetamine および GBR-12909 投与後に formalin test を行った時の痛み反応の変化を観察し、用量反応作用を検討した。

第2項 実験材料および方法

実験動物，使用薬物，各薬物の溶解方法，痛みスコアの判定基準は，第2節に準じた．Methamphetamine (1, 2, 4 mg/kg) は formalin 投与の10分前に，GBR-12909 (3, 5, 10, 15, 20 mg/kg) は formalin 投与の30分前にそれぞれ腹腔内に投与した．

第3項 結果

Methamphetamine (1, 2, 4 mg/kg) は，formalin test の第1相，第2相の両相において用量依存性に痛み反応の抑制を認めた【図5-A,B】．

GBR-12909 (3, 5, 10, 15, 20 mg/kg) は，formalin test の第2相において用量依存性に痛み反応の抑制を認めた【図6-A,B】．

本節の結果より，この後の実験では，methamphetamine は2 mg/kg の用量で，formalin 投与の10分前に腹腔内投与することとした．

第3章 Formalin test 単独あるいは methamphetamine 併用時の黒質線条体におけるドパミン量あるいは前頭前野におけるノルアドレナリン量の変化の検討

第1節 緒言

緒論で述べたように線条体や前頭前野は下行性疼痛抑制系経路の一部と考えられる。

前章では methamphetamine の鎮痛効果について検討し, formalin による痛み反応に要する methamphetamine の投与時間と用量を求めた。本章では黒質線条体における DA 遊離量と前頭前野における NA 遊離量の変化について, saline (vehicle) 投与後に formalin test を行った群と, methamphetamine 投与後に formalin test を行った群について, マイクロダイアリシス法を用い神経生化学的に検討した。

第2節 実験材料および方法

実験材料

実験動物は第2章第1節で使用した実験動物に準じ, 6-9 週齢のマウスを使用した。

マイクロダイアリシス法には, 以下の実験材料を用いた。

マイクロダイアリシスプローブ埋め込み手術では, 脳定位固定装置 (KOPFmodel900, David Kopf Instruments, California, U.S.A.), ミニルータードリル (BAS Japan, Tokyo, Japan), ステンレス製アンカー用スクリュー (BAS Japan, Tokyo, Japan), マウス用ガイドカニューラ (CXG-6 ガイドカニューラ, Eicom, Kyoto, Japan), マウス用ダミーカニューラ (CXD-6 ダミーカニューラ, Eicom, Kyoto, Japan) を用いた。

マイクロダイアリシスの実施時には, マイクロダイアリシスプローブ (CX-I-6-02, 膜長 2mm, 膜外径 0.22mm, Eicom, Kyoto, Japan), インジェクションポンプ (CMA102 マイクロインジェクションポンプ, CMA microdialysis, Solna, Sweden), シリンジ (CMA102 シリンジ 2.5ml, CMA microdialysis, Solna, Sweden), アクリル製透明ケージ (CMA125/L), フリームービングユニット (TSU-20: 2 チャンネルリキッドシーベル (TCS2-23), バランスアーム (TSB-23), フリームービングチューブ (WT-20T), テフロンチューブ (JT-10), Eicom, Kyoto, Japan) を用いた。

脳灌流液のリンゲル液の組成は, NaCl 147mM, KCl 4mM, CaCl₂ 2.3mM とした。

DA および NA の定量には, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を用いた。HPLC-ECD は以下の実験装置から構成された。微量生体試料分析システム (HTEC-500, Eicom, Kyoto, Japan), オートインジェクター (EAS-20S, Eicom, Kyoto, Japan), データプロセッサー

(EPC-500, Eicom, Kyoto, Japan), 分離カラム (PP-ODS II (DA), CAX (NA), Eicom, Kyoto, Japan). 移動相は, DA では 0.1M リン酸ナトリウムバッファー, 2%メタノール, デカンスルホン酸ナトリウム 500 mg/L, EDTA-2Na 50 mg/L, NA では 0.1M 酢酸アンモニウムバッファー, メタノール, 0.05M 硫酸ナトリウム, EDTA-2Na 50 mg/L を用いた.

使用薬物

使用薬物, 各薬物の溶解方法, 投与方法は, 第 2 章第 3 節に準じた. また, マイクロダイアリシスプローブ埋め込み手術時の全身麻酔薬として pentobarbital sodium (Somnopentyl[®], Kyoritsu Seiyaku Co., Tokyo, Japan) を使用し, 局所麻酔薬として 2% lidocaine hydrochloride (Xylocaine[®] Aspen Japan K.K., Tokyo, Japan) を用いた.

実験方法

(1) マイクロダイアリシス法

実験室内の温度は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に調節し, 実験中はヘッドランプによる保温でマウスの体温を維持した. マウスを pentobarbital (60 mg/kg, 腹腔内投与) および 2% lidocaine (頭部の局所麻酔) で麻酔した後, マウス脳定位固定装置に固定した. 頭部の皮膚を切開・剥離し翻転させ, マウス脳地図に従い, ミニルータードリルを用いて頭蓋骨に穴を開け, 線条体もしくは前頭前野に向けてガイドカニューラを挿入し, ガイドカニューラ内にダミーカニューラ挿入した. ガイドカニューラの先端は線条体群においてブレグマから前方に 0.2 mm, 左側に 2 mm, 腹側に 2.5 mm とし【図 7-A】, 前頭前野群ではブレグマから前方に 1.8 mm, 左側に 0.3 mm, 腹側に 1.1 mm とした【図 7-B】. 両群ともブレグマから後方へ約 3 mm の部位の左右両側にステンレス製アンカー用スクリューを頭蓋骨内に埋め, ガイドカニューラごと歯科用アクリリックレジンで固定した. 手術による侵襲と薬物からの回復期間として手術後少なくとも 48 時間の回復期間をおいた.

マイクロダイアリシス実験当日は朝 9 時に pentobarbital 鎮静下 (50 mg/kg, 腹腔内投与) にてダミーカニューラを除去し, マイクロダイアリシスプローブを挿入した. プローブはフリームービングユニットに接続し, 実験中はマウスがアクリルケージ内を自由に動いて飲水および固形食を摂取できるようにした. プローブ挿入後はマイクロインジェクションポンプおよびシリンジを用いシリンジフィルターで濾過を行ったリンゲル液の送液を開始した.

(2) HPLC-ECD 法

マイクロダイアリシスプローブ挿入約 4 時間後から回収した灌流液中 DA および NA 量を測定した. DA の測定では送液ポンプの流速は $500 \mu\text{L}/\text{min}$ とし, カラムオープンにて分析用カラム内を 25°C に維持した. マイクロダイアリシスにより回収したサンプルは, オートインジェクターを用い 10 分毎に分析用カラムおよび電気化学分析機に送液され, DA 量をデータプロセッサにて解析した. NA の測定では送液ポンプの流速は $250 \mu\text{L}/\text{min}$ とし, カラムオープンで分析用カラム内を 35°C に維持した. マイクロダイアリシスにより回収したサンプルは, オートイ

ンジェクターを用い 20 分毎に分析用カラムおよび電気化学分析機に送液され、NA 量をデータプロセッサにて解析した。

実験終了後は頸椎脱臼法でマウスを死亡させ、脳を摘出した。摘出した脳は、凍結後、クライオスタットで 30 μm に薄切し、ニッスル染色を行い透徹、封入した。光学顕微鏡を用いてプローブの位置を確認し、適切にプローブが線条体あるいは前頭前野に留置されていたことが確認された実験のみをデータとして使用した。

(3) 薬物投与および侵害刺激

DA および NA 量測定開始約 2 時間経過してから測定量が安定したことを確認した後、saline もしくは methamphetamine (2 mg/kg) を腹腔内投与した。その 10 分後に 4% formalin 10 μl をマウスの片側後肢足蹠に皮下注射した。

第 3 節 結果

線条体 DA 量は、saline 投与群の formalin 投与後にわずかな増加がみられたが、有意ではなかった【図 8-A】。しかし、methamphetamine 投与群では、投与後から急激な増加がみられ、formalin 投与後もさらに増加した。これは saline 投与群と比較して有意であった【図 8-B】。

また、前頭前野での NA 量は、saline 投与群の formalin 投与後では変化がみられなかったが、methamphetamine 投与群では methamphetamine 投与直後から増加がみられ、formalin 投与後も増加した【図 9】。

このことから、formalin による痛み反応に対する methamphetamine の鎮痛効果には線条体における DA 量の増加や前頭前野での NA 量の増加が関係していると推測された。

第 4 章 Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす各種薬物の影響の検討

第 1 節 Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼすドパミン (DA) 受容体拮抗薬の影響

第 1 項 緒言

前章では、線条体の DA 遊離量および前頭前野での NA 遊離量と、formalin の痛み反応に対する methamphetamine の鎮痛効果の関係が示された。本章では formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす各種薬物の影響について検討する。本節では、選択的ドパミン D₁ 受容体拮抗薬である SCH-23390 と選択的ドパミン D₂ 受容体拮抗薬である haloperidol について、formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす影響を検証する。

第 2 項 実験材料および方法

実験材料

実験材料は第 2 章で使用したものに準ずる。

使用薬剤

本実験では薬物として (+)-SCH23390 hydrochloride (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan), haloperidol (Serenace[®], Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) を使用した。Formalin および methamphetamine は第 2 章で使用したものに準ずる。また、各薬剤の溶解方法、投与方法も第 2 章に準じた。

実験方法

マウスに saline, SCH-23390 (0.1 mg/kg) あるいは haloperidol (0.2, 1.0 mg/kg) のいずれかを腹腔内投与した 10 分後に methamphetamine (2 mg/kg) を腹腔内投与し、さらに 10 分後に 4% formalin 10 μ l をマウスの片側後肢足蹠に皮下注射した。その後ただちにマウスをビーカーに入れ、1 分毎に痛み反応の変化を 65 分間観察、記録した。痛みスコアの判定基準は、第 2 章に準じた。

第3項 結果

ドパミン D₁ 受容体拮抗薬である SCH-23390 (0.1 mg/kg) は第 1 相に影響を与えなかったが、第 2 相において methamphetamine の鎮痛効果を有意に拮抗した【図 10-A, B】。

ドパミン D₂ 受容体拮抗薬である haloperidol は低用量 (0.2 mg/kg) のとき第 1 相、第 2 相の両相において影響を与えなかったが、高用量 (1.0 mg/kg) では第 2 相の範囲で methamphetamine の鎮痛効果に有意な拮抗作用を認めた【図 10-C, D】。

第2節 Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす ノルアドレナリン (NA) 受容体拮抗薬の影響

第1項 緒言

前節では、SCH-23390 と haloperidol について、それぞれ formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果を拮抗することが示されたが、本節では非選択的アドレナリン α 受容体拮抗薬である phenoxybenzamine, 選択的アドレナリン α_1 受容体拮抗薬である prazosin, 選択的アドレナリン α_2 受容体拮抗薬である yohimbine および非選択的アドレナリン β 受容体拮抗薬である propranolol について、formalin 刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす影響を検証する。

第2項 実験材料および方法

実験材料

実験材料は第 2 章で使用したものに準ずる。

使用薬剤

本実験では薬物として phenoxybenzamine hydrochloride (Tokyo Chemical Industry CO., Ltd., Tokyo, Japan), prazosin hydrochloride (Tokyo Chemical Industry CO., Ltd., Tokyo, Japan), yohimbine hydrochloride (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan), (±)-propranolol hydrochloride (Sigma-Aldrich Co., LLC., St. Louis, U.S.A.) を使用した。Formalin および methamphetamine は第 2 章で使用したものに準じ、溶解方法、投与方法も第 2 章に準じた。

実験方法

Propranolol は 0.9% saline に溶解した。Phenoxybenzamine, prazosin および yohimbine は 1% CMC に溶解した。各薬物はマウスの体重 10g あたり 0.1ml となるように調製し、マウスの腹腔内に投与した。

マウスに saline, 1% CMC, phenoxybenzamine (10 mg/kg), yohimbine (5 mg/kg) および propranolol (20 mg/kg) のいずれかを腹腔内投与した 10 分後に methamphetamine (2 mg/kg) を腹腔内投与し、さらに 10 分後に 4% formalin 10 μ l をマウスの片側後肢足蹠に皮下注射した。Prazosin (5 mg/kg) は腹腔内投与した 30 分後に methamphetamine (2 mg/kg) を腹腔内投与し、さらに 10 分後に 4% formalin 10 μ l を片側後肢足蹠に皮下注射した。その後ただちにマウスをビーカーに入れ、1 分毎に痛み反応の変化を 65 分間観察、記録した。痛みスコアの判定基準は、第 2 章に準じた。

第 3 項 結果

非選択的 α 受容体拮抗薬である phenoxybenzamine (10 mg/kg) は第 1 相に影響を与えなかったが、第 2 相での methamphetamine の鎮痛効果を有意に拮抗した【図 11-A, B】。

選択的 α_1 受容体拮抗薬である prazosin (5 mg/kg) も第 1 相においては影響を与えなかったが、第 2 相の methamphetamine による鎮痛効果を有意に拮抗した【図 11-C, D】。

選択的 α_2 受容体拮抗薬である yohimbine (5 mg/kg) は第 1 相、第 2 相の両相において影響を与えなかった【図 11-E, F】。

非選択的アドレナリン β 受容体拮抗薬である propranolol (20 mg/kg) は第 1 相において methamphetamine の鎮痛効果を有意に増強したが、第 2 相においては有意な影響はみられなかった【図 11-G, H】。

第 3 節 Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼすノルアドレナリン (NA) 受容体作動薬の影響

第 1 項 緒言

前節では、phenoxybenzamine と prazosin について、それぞれ formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に拮抗することや、propranolol について、formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果を増強することが示されたが、本節では

選択的アドレナリン α_2 受容体作動薬である dexmedetomidine について, formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす影響を検証する.

第 2 項 実験材料および方法

実験材料

実験材料は第 2 章で使用したものに準ずる.

使用薬剤

本実験では薬物として dexmedetomidine hydrochloride (PRECEDEX[®], Maruishi Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) を使用した. Formalin および methamphetamine は第 2 章で使用したものに準じる. 薬剤の溶解方法, 投与方法も第 2 章に準じた.

実験方法

マウスに saline または dexmedetomidine (30, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$) のいずれかを腹腔内投与した 10 分後に methamphetamine (2 mg/kg) を腹腔内投与し, さらに 10 分後に 4% formalin 10 μl をマウスの片側後肢足蹠に皮下注射した. その後ただちにマウスをビーカーに入れ, 1 分毎に痛み反応の変化を 65 分間観察, 記録した. 痛みスコアの判定基準は, 第 2 章に準じた.

第 3 項 結果

選択的 α_2 受容体作動薬である dexmedetomidine (30, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$) は第 1 相において methamphetamine の鎮痛効果を用量依存性に増強したが, 第 2 相においては高用量でも有意な影響はみられなかった【図 12-A,B】.

第4節 Formalinによる侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす NA 神経毒 (DSP-4) の影響

第1項 緒言

前節では dexmedetomidine について, formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果の増強が示されたが, 本節では NA 神経選択的神経毒である DSP-4 について, formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす影響を検証する.

第2項 実験材料および方法

実験材料

実験材料は第2章で使用したものに準ずる.

使用薬剤

本実験では薬物として N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride (DSP-4) (Sigma-Aldrich Co. LLC., St.Louis, U.S.A.) を使用した. Formalin および methamphetamine は第2章で使用したものに準じる. 薬剤の溶解方法, 投与方法も第2章に準じた.

実験方法

マウスに Saline か DSP-4 (50 mg/kg) のいずれかを腹腔内投与した7日後または6時間後に methamphetamine (2 mg/kg) を腹腔内投与し, さらに10分後に4% formalin 10 μ l をマウスの片側後肢足蹠に皮下注射した. その後ただちにマウスをビーカーに入れ, 1分毎に痛み反応の変化を65分間観察, 記録した. 痛みスコアの判定基準は, 第2章に準じた.

第3項 結果

NA 神経選択的神経毒である DSP-4 (50 mg/kg) の投与7日後では第1相, 第2相の両相において methamphetamine の鎮痛効果に影響はみられなかったが【図 13-A, B】, 投与6時間後では両相において methamphetamine の鎮痛効果が有意に拮抗された【図 13-C, D】.

第5章 考察

痛覚実験に用いられる方法は様々なものがあるが、テイルフリック試験やホットプレート試験など一過性刺激によるものが多い。刺激が一過性の場合、刺激そのものによって誘発される痛みの調節機構や痛みに対する薬剤の鎮痛効果を評価することは難しい。一方、持続する刺激は、内因性疼痛調節系の役割の観察を容易にする。また、持続性疼痛は、短時間刺激によって誘発される疼痛とは中枢神経系において異なる経路により調節されると考えられている【12】。本実験の結果からも実証されたように、formalin 刺激に対する反応は2相性にみられ、約60分間持続した。第1相は注射部位の炎症を伴わない化学的侵害受容器の直接刺激によるもので、第2相は末梢組織の炎症によると考えられている【12-14】。この2相の反応にはA δ 線維やC線維の活性が寄与するとの報告がある【12.14.15】一方、formalin 誘発性の痛み反応はC線維にある侵害受容器の大部分を切除した場合でも持続するとの報告もあり【16】、まだ明確には解明されていない。また、2相間の約5分間にみられる痛み反応の消失は、内因性の疼痛抑制系が活性化されることにより生じると考えられている【17】。

このような、組織への直接的な機械・化学刺激による急性疼痛から、その組織の炎症を伴う持続性疼痛に移行する formalin test の特徴は、手術時における疼痛の変化と似ている。そのため、一過性機械または熱刺激による試験と比較して、formalin test は麻酔臨床におけるより有効な疼痛モデルと考えられる【11.12】。また、formalin に対する痛み反応の評価方法も数多く報告されているが、今回は古くから広く用いられている Dubuissou and Dennis による0-3の痛みスコアを1分ごとに記録し、そのグラフ下の面積 (area under the curve : AUC) を求めることで、統計処理を行った。

第2章では methamphetamine および GBR-12909 の鎮痛作用について検討したが、DA 取り込み阻害作用と NA 遊離促進作用を有する methamphetamine (2 mg/kg) は formalin による痛み反応を第1相と第2相の両相において有意に抑制した。Methamphetamine の作用には運動活性の増加もあり、methamphetamine の投与から5ないし10分後には自発運動量の増加や常同行動がみられ始める。Methamphetamine 投与から formalin 投与までの投与時間のずれによって、第1相においては大きな違いがみられなかったのに対し、第2相では投与間隔を10分とした場合が最も鎮痛効果が強く、投与時間のずれが長くなるにつれて弱くなった。この理由としては、methamphetamine の作用発現開始時間と持続時間が関係していると考えられる。また、methamphetamine の鎮痛効果は用量依存性であった。このような methamphetamine の鎮痛効果は以前から報告されているが【18.19】、第1相と第2相に分けて詳細に調べた研究はなく、その鎮痛効果を引き起こすメカニズムもよくわかっていない【18】。Methamphetamine は DA 取り込み阻害作用と NA 遊離促進作用を有しており、DA 作動系が formalin test における鎮痛において主要な役割を果たす可能性があるとの報告【19】もあるが、DA および NA 作動系の両方を中心とした様々な経路が関与していると考えられる。ただし、前述のとおり

methamphetamine には運動活性の増加作用もあるため、その自発運動量の亢進が痛み反応の評価を妨げる可能性もある。しかし、methamphetamine と同様に有意な運動亢進作用を有するモルヒネの投与量でも formalin test に対する鎮痛作用の評価が行われていることや【19】、methamphetamine の多動性が疼痛スコアに影響する可能性は低いとの報告【20】もあり、このことを考慮する必要はないと考えている。

また、選択的 DA 再取り込み阻害作用を有する GBR-12909 の投与から formalin 投与までの間隔は、30 分の場合が第 2 相での鎮痛効果が最も強く、時間が短くなるにつれて弱くなった。この結果は GBR-12909 が投与 30 分後に側坐核における DA 遊離量を有意に増加させるという本研究室における石井らのマイクロダイアリシス法での結果とも一致した【21】。GBR-12909 の formalin による痛み反応に対する鎮痛効果は用量依存性であった。しかし、methamphetamine が formalin による第 1 相、第 2 相の両相に対し有意な鎮痛効果を示したのに対し、GBR-12909 は第 2 相でのみ有効であった。GBR-12909 は極めて強力で選択的な DA 取り込み阻害薬であり、放出された DA のシナプス前終末への再取り込みを阻害することで内因性 DA のシナプス間隙レベルを上昇させる【22】。また、NA 作動性またはセロトニン作動性神経系より DA 作動性神経系に対し GBR-12909 がより選択的な作用を有することが神経生化学実験で明らかにされている【23】。今回の実験から、DA 神経特異的な作用を有する GBR-12909 と DA・NA の両神経系に作用する methamphetamine の薬理的差異が、行動薬理学実験における両薬物の鎮痛効果の違いに反映している可能性が示唆された。

今回、脳マイクロダイアリシス法で DA 量を測定した線条体は、DA 神経の入力が多く内因性 DA 濃度は高い【24】。黒質線条体 DA 量の減少が原因で発症するパーキンソン病患者の約 40～50%が、運動症状とは臨床的に無関係な痛み感覚を伴う知覚障害を訴えていることが示されたり【25】、線条体中の DA 受容体が急性および持続性侵害受容の調節に関与しているとの報告【25】もある。また、下行性疼痛抑制経路を線条体からの DA 神経が促進している【8】ことから、今回観察された線条体での DA 量の増加は methamphetamine の鎮痛効果に関与していると考えられた。一方、大脳皮質には青斑核からの NA 神経の入力があり【27】、大脳皮質から中脳水道を経由する下行性疼痛抑制系経路がみられる【28】。また、青斑核 (NA) から前頭前野、中脳水道周囲灰白質、大縫線核を経由する別の経路の報告もある【29】。前頭前野は実行機能において重要であるばかりか、痛みの処理においても重要といわれているため【29】、今回の前頭前野での methamphetamine による NA 量増加がこの下行性疼痛抑制系を介した鎮痛効果に関与している可能性が示された。

DA 受容体には D₁ から D₅ までのサブタイプが存在し、全て 7 回膜貫通構造を持つ G タンパク質共役型受容体である。これらは、Gs/olf に共役してアデニル酸シクラーゼを活性化する D₁ 様受容体 (D₁, D₅) と Gi/o に共役してアデニル酸シクラーゼを抑制する D₂ 様受容体 (D₂, D₃, D₄) の二つに大別されている。D₁ 受容体は線条体などに強く発現しており、D₅ 受容体は辺縁系に発現している。D₁ 受容体欠損マウスを用いてリガンド結合解析を行うと、D₁ 様受容体リガンドの結合の大部分が無くなり、残りの D₅ 受容体由来と考えられる結合が海馬等にみられる。D₁

と D₅ を薬理学に明確に区別することはできないが、D₅ 受容体は D₁ 受容体よりも DA に対する親和性が強い。一方、D₂、D₄ 受容体は線条体、大脳皮質、辺縁系などに強く発現している。D₃ 受容体は主に中脳一皮質・辺縁系に発現しており、線条体での発現は弱い。このように、DA 受容体は G タンパク質共役型受容体であり、それぞれが共役する G タンパク質としては、ドパミン D₁ 受容体が G_s、ドパミン D₂ 受容体が G_i のため、相反するシグナル伝達が起こると考えられる。しかし、本実験で使用したドパミン D₁ 受容体拮抗薬である SCH-23390 とドパミン D₂ 受容体拮抗薬である haloperidol はともに methamphetamine の第 2 相に対する鎮痛効果に拮抗した。前述のように脳内のドパミン D₁ 受容体とドパミン D₂ 受容体の分布は微妙に異なっており、線条体ではドパミン D₂ 受容体は比較的均一に広く分布しているのに対し、ドパミン D₁ 受容体の分布は不均一といわれている【27】。線条体ドパミン D₂ 受容体が神経障害性疼痛を減弱させたり【30】、線条体の鎮痛作用はドパミン D₂ 受容体の活性化を介している【25】との報告もあり、線条体におけるドパミン D₂ 受容体は methamphetamine の鎮痛効果に関与していると考えられる。また、脊髄上位でのオピオイドの抗侵害刺激作用はドパミン D₁ 受容体を介するとの報告【31】や、ドパミン D₁ 受容体刺激が formalin test におけるドパミン D₂ 受容体を介する鎮痛を可能にしているといわれているため【32】、ドパミン D₁ 受容体も methamphetamine の鎮痛効果に貢献している可能性がある。これらの報告はドパミン D₁ 受容体拮抗薬、ドパミン D₂ 受容体拮抗薬の両方ともに methamphetamine の鎮痛効果を逆転させた今回の結果を支持している。

また、非選択的 α 受容体拮抗薬である phenoxybenzamine および選択的 α_1 受容体拮抗薬である prazosin によって methamphetamine の鎮痛効果が拮抗されたにもかかわらず、選択的 α_2 受容体拮抗薬である yohimbine は全く影響しなかった。通常、NA 神経終末にある α_2 受容体の刺激は、負のフィードバックを生じ NA 遊離を抑制するため、yohimbine による α_2 受容体の拮抗は NA 遊離抑制に拮抗し、methamphetamine による NA 遊離促進作用を増強するはずであるが、その鎮痛作用の増強はみられなかった。また、脊髄での α_2 受容体刺激は抗侵害受容作用を生じ、 α_1 受容体刺激は逆に痛みの伝達を促進することが報告されている【33】。さらに、前頭前野での α_1 受容体のレセプター総数(Bmax)は α_2 受容体に比較して約 1.4 倍多く、親和性(Kd)に関しては約 7 倍も高い【34】。したがって、今回の結果からは、methamphetamine の鎮痛効果は脊髄レベルではなく前頭前野など脊髄より上位中枢での NA 神経の α_1 受容体を介している可能性が示唆された。一方、非選択的アドレナリン β 受容体拮抗薬である propranolol は、単独では formalin test の疼痛反応には影響を及ぼさないが、モルヒネの抗侵害受容効果を増強し、その作用はドパミン受容体が関与するとの報告【35】があり、今回みられた methamphetamine の鎮痛効果の増強もドパミン受容体を介している可能性がある。

さらに、前述のとおり、通常 α_2 受容体刺激は NA 遊離抑制に働くため、 α_2 受容体作動薬は methamphetamine の鎮痛効果に拮抗すると考えられたが、dexmedetomidine は methamphetamine の第 1 相の鎮痛効果を増強した。Dexmedetomidine は青斑核のシナプス前膜にある α_2 受容体に作用し NA 遊離を抑制することにより鎮静作用を発現するとともに、脊髄

後角の α_2 受容体を刺激して侵害受容ニューロンの活動を抑制し、脊髄後角の一次求心性線維からのサブスタンス P 遊離を抑制して鎮痛作用を引き起こすと考えられている【36】。今回、dexmedetomidine によって methamphetamine の鎮痛効果の増強がみられたことより、methamphetamine の鎮痛効果は脊髄より上位の NA 神経を介しており、脊髄後角の α_2 受容体に作用する dexmedetomidine とは別の機序で作用していることが示唆された。

一方、DSP-4 [N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine] は中枢および末梢 NA 神経の強力かつ極めて選択的な神経毒で、げっ歯類への全身投与では脳および脊髄における NA レベル、NA 取り込み能力およびドパミン- β -ヒドロキシラーゼ (DBH) 活性の長期的な低下をもたらす【37】。DSP-4 の作用発現は急速であり、脳における NA レベルの著しい減少が投与後数時間以内に確認され、その作用は 6 時間後には大脳皮質および脊髄においてほぼ最大になる【38】。その後 1~2 週間かけて DBH の喪失および NA 軸索の構造的崩壊を特徴とする神経変性期となる【38】。今回、DSP-4 投与から 6 時間後の結果では、methamphetamine の鎮痛効果が有意に拮抗されていた。6 時間後には NA の枯渇が最大になることから、methamphetamine の鎮痛効果に NA 神経が関与することが強く示唆された。また、投与 7 日後に青斑核、背側縫線核および前頭前野における NA の減少が観察されたという報告【39】もあることから、今回の 7 日後での実験でも methamphetamine の鎮痛効果が拮抗されることが予測されたが、実際には影響はみられなかった。この結果は、DSP-4 の効果には脳の領域によって差があり、DSP-4 の全身投与は青斑核に由来する NA 神経終末突起の優先的な変性を引き起こす【37.40】ため、DSP-4 での急激な NA 枯渇後に、非青斑核領域からの代償機構が働くようになった可能性が推測された。さらに、methamphetamine の NA 遊離促進作用が関与するシナプス前膜のわずかな回復や、残った軸索の感受性の増加などが今回の結果に影響した可能性はあるが、明確な要因は定かではない。

痛みスコアの AUC 変化に着目すると、4%の formalin 刺激により、第 1 相の AUC は約 10 程度、第 2 相の AUC は約 65 程度に増加した【図 2】が、methamphetamine (2mg/kg) 投与で第 1 相の AUC は約 5 程度、第 2 相の AUC は約 3 程度に低下した【図 13】。また、その methamphetamine の鎮痛効果による AUC の低下は、6 時間前の DSP-4 投与により第 1 相の AUC は約 12 程度、第 2 相の AUC は約 40 程度まで戻った【図 13】。この DSP-4 投与時の AUC は 4%formalin 刺激の AUC と比較すると第 1 相はほぼ 100%、第 2 相は約 60%までのリバー스를みとめた。また、DA 受容体拮抗薬である SCH-23390 と haloperidol の第 2 相の AUC はそれぞれ約 16 と約 18 程度であり【図 10】、こちらも 4%formalin 単独の AUC のそれぞれ約 25%、約 28%まで値が戻っていた。つまり、DSP-4 による NA 枯渇では第 2 相は methamphetamine による鎮痛効果を約 60%拮抗していたが、DA 受容体拮抗薬の効果と合わせると、ほぼ 100%拮抗されたと考えられる。このことから、methamphetamine の鎮痛効果は formalin による痛み反応の第 1 相では NA 神経が、第 2 相では NA と DA の両神経が関与することが強く示唆された。

本実験により、methamphetamine の鎮痛効果は線条体での DA 量増加や前頭前野での NA

量増加による下行性疼痛抑制系の賦活と関係していると推測された。また、formalin は 2 相性の痛み反応を誘発するが、その抑制には、第 1 相、第 2 相の両相で NA 神経が、第 2 相では DA 神経が関与することが示唆された。今回の研究結果から methamphetamine に鎮痛効果があることは明確であるが、methamphetamine は中枢興奮作用や交感神経刺激作用、依存性を引き起こす覚せい剤であり、高用量では神経毒となることから直接臨床に使用することは難しい。緒論でも述べた通り、現在手術中に鎮痛薬として一般的に使われているのは麻薬性鎮痛薬であるが、麻薬性鎮痛薬は強力な鎮痛作用を示す一方、呼吸・循環抑制など重篤な副作用を有することも知られている。本研究により、methamphetamine の formalin による痛み反応の抑制はドパミン D₁、D₂ 受容体およびノルアドレナリン α₁ 受容体を介しているということが明らかになったことから、ドパミン D₁ - D₅ 受容体を含めたこれら受容体の中枢神経への選択的作用薬を臨床応用することにより手術時の疼痛制御が可能になるかも知れない。

第6章 総括および結論

今回, formalin による侵害刺激に対する methamphetamine および GBR-12909 の鎮痛効果と, formalin 単独や methamphetamine の併用によって線条体や前頭前野でのそれぞれ DA 量や NA 量が増加するか, さらに DA 受容体および NA 受容体リガンドが methamphetamine の鎮痛効果に影響を及ぼすかを行動薬理学的手法とマイクロダイアリス法を用いて検討し, 以下のような結果および結論を得た.

1. 1-4% formalin は濃度依存性に痛みスコアを増加させ, スコアの増加は formalin の直接化学刺激による第 1 相と炎症反応によると考えられる第 2 相の 2 相性にみられ, 約 60 分間持続した. この 2 相間の約 5 分間 (投与約 6~10 分後) は痛み反応が消失した.
2. Methamphetamine と GBR-12909 は formalin による痛み反応に対して鎮痛効果をもとめた. Methamphetamine は formalin test の 10 分前, GBR-12909 は formalin test の 30 分前に投与した場合が最も鎮痛効果が強くみられた
3. Methamphetamine と GBR-12909 は formalin による痛み反応に対して用量依存性に鎮痛効果をもとめた. Methamphetamine が formalin による第 1 相, 第 2 相の両相の痛みに対して有意な鎮痛効果を示したのに対し, GBR-12909 は第 2 相でのみ有効であった.
4. マイクロダイアリス法による線条体 DA 量の測定では, formalin 注射によりわずかに増加したが, 有意ではなかった. しかし, methamphetamine 投与後の formalin 注射では DA 量の有意な増加がみられた. 前頭前野での NA 量の測定では methamphetamine 投与後の formalin 注射により NA 量が増加した.
5. 低用量の SCH-23390 (0.1 mg/kg) は第 2 相での methamphetamine による鎮痛効果を有意に拮抗した. 低用量の haloperidol (0.2 mg/kg) は methamphetamine の鎮痛効果に影響しなかったが, 高用量 (1.0 mg/kg) では第 2 相での鎮痛効果を有意に拮抗した. Phenoxybenzamine および prazosin は第 2 相において methamphetamine の鎮痛効果をリバースした. Yohimbine は影響を与えなかったが, propranolol は逆に第 1 相において methamphetamine の鎮痛効果を有意に増強した.
6. Dexmedetomidine は高用量 (200 µg/kg および 400 µg/kg) で第 1 相における methamphetamine の鎮痛効果を有意に増強した.
7. 7 日前に DSP-4 を投与した場合, methamphetamine の鎮痛効果には影響を与えなかったが, 6 時間前の DSP-4 投与は, 第 1 相, 第 2 相の両相ともに methamphetamine の鎮痛効果を有意に拮抗した.

以上の結果から, methamphetamine および GBR-12909 は formalin による痛みに対して鎮痛効果を有し, methamphetamine の鎮痛効果は線条体における DA 量および前頭前野におけ

る NA 量に関与することが示唆された。また、GBR-12909 が formalin test での第 1 相に影響を与えなかったことや、DA 受容体拮抗薬は第 2 相に対する methamphetamine の鎮痛効果のみを拮抗したことから、DA 神経は第 1 相よりも第 2 相の鎮痛効果により強く影響すると考えられた。Methamphetamine が第 1 相、第 2 相の両相に対して鎮痛効果を示すことや、DSP-4 がその両相の鎮痛効果を拮抗していることから、NA 神経は両相の鎮痛効果と関与すると考察された。本研究を通して得られた研究成果は、選択的 DA あるいは NA 受容体作動薬を活用した新しい全身麻酔法の開発に資することが期待できる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり，本研究の遂行および論文作成において終始ご懇切なご指導・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（歯科麻酔学）入船正浩教授に心より感謝の意を表します。また，本論文の作成に際し，ご懇篤なるご教示およびご指導を賜りました本学医歯薬学保健学研究科（細胞分子薬理学）兼松隆教授，本学医歯薬保健学研究科（歯科放射線学）柿本直也教授，本学医歯薬保健学研究科（薬効解析科学研究室）森岡徳光教授に深甚なる感謝の意を表します。

最後に，本研究を進めるに際して，終始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ならびに硬組織代謝生物学教室関係各位に心より感謝いたします。

引用文献

- 【1】Pinsker M. Anesthesia: A pragmatic construct. *Anesthesia and Analgesia* 1986; 65: 819-820.
- 【2】金子 讓. 第1章 I 麻酔の概念. 福島 和昭, 原田 純, 嶋田 昌彦, 一戸 達也, 丹羽 均 編集. 歯科麻酔学. 第7版. 東京: 医歯薬出版; 2011. P. 1-2.
- 【3】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.
- 【4】好中 大雅. 各種 GABA 神経作用薬による行動薬理作用と脳波・筋電位変化の比較検討. 広島大学大学院医歯薬保健学研究科博士論文; 2016 (未公開)
- 【5】菊池 友香. 各種神経作動薬による行動薬理作用と脳波・筋電位変化の関係解析. 広島大学大学院医歯薬保健学研究科博士論文; 2018 (未公開)
- 【6】John E. Hall PhD. Chapter 49 Somatic Sensations: II. Pain, Headache, and Thermal Sensations: Pain suppression (Analgesia) system in the brain and spinal cord. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 13e. Amsterdam: Elsevier B.V.; 2015. P. 625.
- 【7】川上順子, 木内有希. 大脳基底核ドパミンシステムと痛み. *BRAIN MEDICAL* 2009; 21 (3): 31-36.
- 【8】宇川義一. 感覚情報と大脳基底核. *臨床神経* 2012; 52: 862-865.
- 【9】秋山一文, 齋藤淳. VI章 薬物依存の基礎と臨床 覚せい剤依存の基礎. 脳とこころのプライマリケア 第8巻 依存. 第1版. 東京: シナジー; 2011.
- 【10】北山滋雄. 第4編 各論II 第10章9 社会的に問題となる化合物. 石田 甫, 大浦 清, 上崎 善規, 土肥 敏博, 五十嵐 治義 編集. 歯科薬理学. 第5版. 東京: 医歯薬出版; 2005. P. 387-390.
- 【11】Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977 Dec; 4(2): 161-74.
- 【12】Arne Tjolsen, Odd-Geir Berge, Steinar Hunskaar, Jan Henrik Rosland, Kjell Hole. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17.
- 【13】柴田学, 大久保つや子, 高橋宏. 炎症性疼痛モデルと関連する体内活性物質の検討. *日薬理誌* 1986; 87: 405-415.
- 【14】Sajedianfard J, Khatami S, Semnianian S, Naghdi N, Jorjani M. In vivo measurement of noradrenaline in the locus coeruleus of rats during the formalin test: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 2005 Apr 11; 512(2-3): 153-6.
- 【15】W.D. McCall, Kimberly D. Tanner, Jon D. Levine. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neuroscience Letters* 1996; 208: 45-48.

- 【16】 Shannon D. Shields, Daniel J. Cavanaugh, Hyosang Lee, David J. Anderson, Allan I. Basbaum. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain* 2010 November; 151(2): 422–429.
- 【17】 K. B. J. Franklin, F. V. Abbott. Pentobarbital, Diazepam, and Ethanol Abolish the Interphase Diminution of Pain in the Formalin Test: Evidence for Pain Modulation by GABAA Receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1993; Vol. 46: 661-666.
- 【18】 Camarasa J, Ratés SG, Pubill D, Escubedo E. The involvement of nicotinic receptor subtypes in the locomotor activity and analgesia induced by methamphetamine in mice. *Behav Pharmacol* 2009 Oct; 20(7): 623-30.
- 【19】 Tomohiro Mori, Jun Baba, Yasuyuki Ichimura, Tsutomu Suzuki. Effects of Rolipram, a Selective Inhibitor of Phosphodiesterase 4, on Hyperlocomotion Induced by Several Abused Drugs in Mice. *Jpn. J. Pharmacol* 2000; 83: 113-118.
- 【20】 P.B.S. Clarke, K.B.J. Franklin. Infusions of 6-hydroxydopamine into the nucleus accumbens abolish the analgesic effect of amphetamine but not of morphine in the formalin test. *Brain Research* 1992; 580: 106-110.
- 【21】 石井 裕明. ペントバルビタールの全身麻酔作用における側坐核および線条体ドーパミン神経の役割. 広島大学大学院医歯薬保健学研究科博士論文; 2015 (未公刊)
- 【22】 Masahiro Irifune, Masahiro Nomoto, Takeo Fukuda. Effects of GBR 12909 on locomotor activity and dopamine turnover in mice: comparison with apomorphine. *European Journal of Pharmacology* 1995; 272: 79-85.
- 【23】 Kenji Hirate, Hisashi Kuribara. Characteristics of the Ambulation-Increasing Effect of GBR-12909, a Selective Dopamine Uptake Inhibitor, in Mice. *Japan. J. Pharmacol* 1991; 55: 501-511.
- 【24】 井上敦子, 仲田義啓. ドーパミン受容体の多様性と抗精神病薬の及ぼす影響. *日薬理誌* 1998; 112: 351-361.
- 【25】 Ana C. Barcelo, Barbara Filippini, Jorge H. Pazo. The Striatum and Pain Modulation. *Cell Mol Neurobiol* 2012; 32: 1–12.
- 【26】 Jane E. Magnusson, Kim Fisher. The involvement of dopamine in nociception: the role of D1 and D2 receptors in the dorsolateral striatum. *Brain Research* 2000; 855: 260-266.
- 【27】 小川紀雄, 貫名至. 第Ⅱ部 神経伝達物質のレセプター. 小川紀雄編著. 新 脳のレセプター. 第1版. 大阪: 世界保健通信社; 1989. 159-195.
- 【28】 Antti Pertovaara, Armando Almeida. Descending Inhibitory Systems. *Handbook of Clinical Neurology* 2006; Vol. 81 (3rd series. Vol. 3).
- 【29】 Wei-Yi Ong, Christian S. Stohler, Deron R. Herr. Role of the Prefrontal Cortex in Pain Processing. *Mol Neurobiol* 2018 Jun 6.
- 【30】 Ansah OB, Leite-Almeida H, Wei H, Pertovaara A. Striatal dopamine D2 receptors

attenuate neuropathic hypersensitivity in the rat. *Exp Neurol*. 2007 Jun, 205(2): 536-46.

【 31 】 Flores JA, El Banoua F, Galán-Rodríguez B, Fernandez-Espejo E. Opiate anti-nociception is attenuated following lesion of large dopamine neurons of the periaqueductal grey: critical role for D₁ (not D₂) dopamine receptors. *Pain* 2004 Jul; 110(1-2): 205-14.

【32】 Michael J. Morgan, Keith B. J. Franklin. Dopamine Receptor Subtypes and Formalin Test Analgesia. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 1991; 40: 317-322.

【33】 Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 2002 Apr; 66(6): 355-474.

【34】 Laurent Diop, Richard Brière, Louise Grondin and Tomfis A. Reader. Adrenergic receptor and catecholamine distribution in rat cerebral cortex: binding studies with [³H] prazosin, [³H]idazoxan and [³H]dihydroalprenolol. *Brain Research* 1987; 402: 403-408.

【35】 Elham A. Afify, Najlaa M. Andijani. Potentiation of Morphine-Induced Antinociception by Propranolol: The Involvement of Dopamine and GABA Systems. *Front. Pharmacol* 2017 Nov 10; 8: 794.

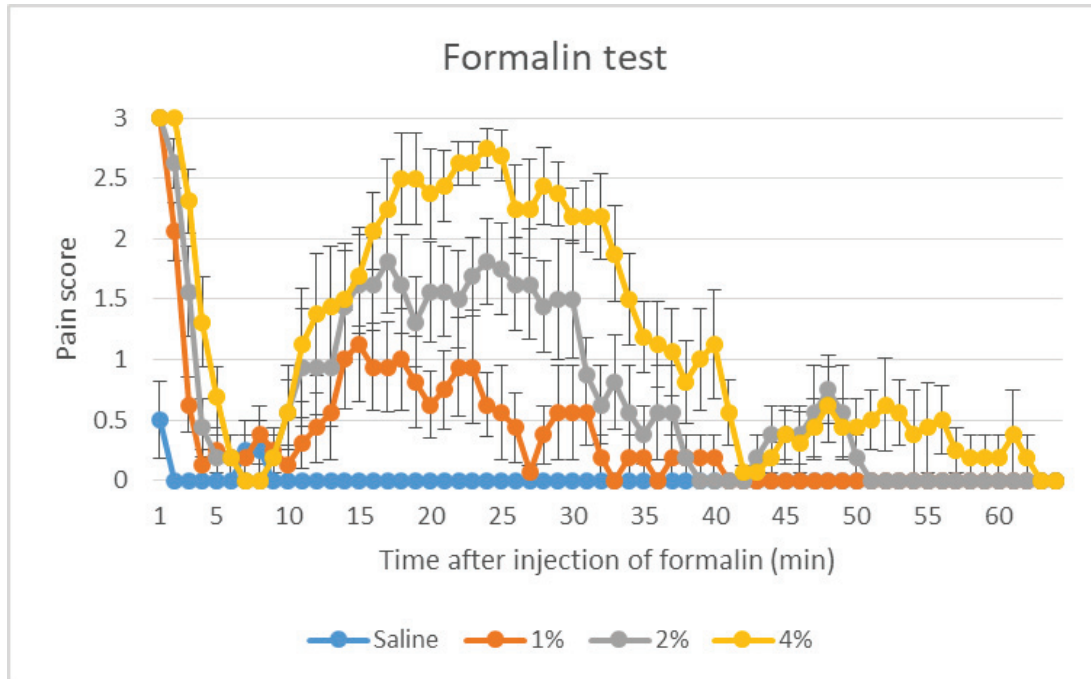
【36】 Isao Takamatsu, Dexmedetomidine- α_2 -Adrenoceptors and Imidazoline Receptors. *Anesthesia 21 Century* 2011; 13: 2495-2502.

【37】 Grzanna R, Berger U, Fritschy JM, Geffard M. Acute action of DSP-4 on central norepinephrine axons: biochemical and immunohistochemical evidence for differential effects. *J Histochem Cytochem*. 1989 Sep; 37(9): 1435-42.

【38】 Fritschy JM, Geffard M, Grzanna R. The response of noradrenergic axons to systemically administered DSP-4 in the rat: an immunohistochemical study using antibodies to noradrenaline and dopamine-beta-hydroxylase. *J Chem Neuroanat*. 1990 Jul-Aug; 3(4): 309-21.

【39】 Tommaso Cassano, Silvana Gaetani, Maria Grazia Morgese, Teresa Macheda, Leonardo Laconca, Pasqua Dipasquale, Juan Taltavull, Toni S. Shippenberg, Vincenzo Cuomo, Gabriella Gobbi. Monoaminergic Changes in Locus Coeruleus and Dorsal Raphe Nucleus Following Noradrenaline Depletion. *Neurochem Res*. 2009 August; 34(8): 1417-1426.

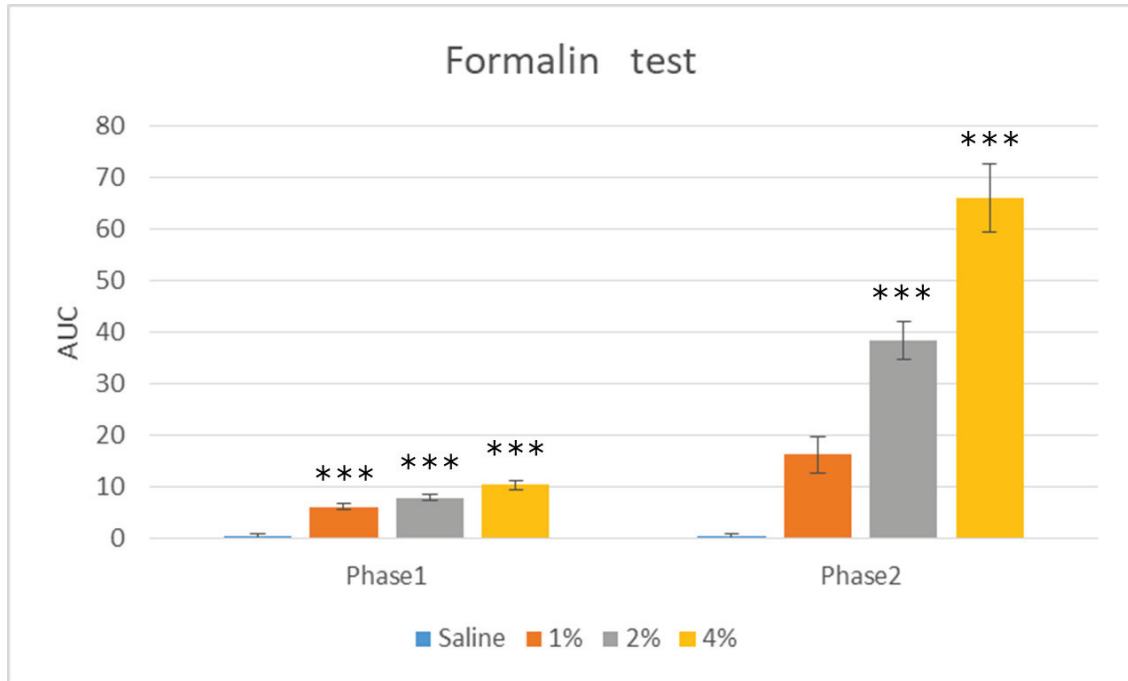
【 40 】 G. Jonsson, H. Hallman, F. Ponzio, S. Ross. DSP4 (N-(2-Chloroethyl)-N-Ethyl-2-Bromobenzylamine)—A Useful Denervation Tool For Central And Peripheral Noradrenaline Neurons. *European Journal of Pharmacology* 1981; 72: 173-188.



【図 1】 痛みスコアに及ぼす formalin の時間経過効果

AUC で表わすマウスの痛みスコアに及ぼす formalin による 1 分毎の時間経過変化を示す。マウス 6-8 匹を 1 群とし、saline または 1, 2, 4% の formalin 10 μ l をマウスの片側後肢足蹠に皮下注射しビーカーに入れた後、1 分毎に痛みスコア (0-3) を評価、記録した。0 は注射された後肢の位置および動きはもう一方の後肢と区別できない状態、1 は注射された後肢に体重をほとんどまたは全くかけない状態、2 は注射された後肢を持ち上げていずれの面とも接触していない状態、3 は注射された後肢を舐めたり噛んだり振ったりしている状態、とした。1 分毎にこの痛みスコアを記録した。

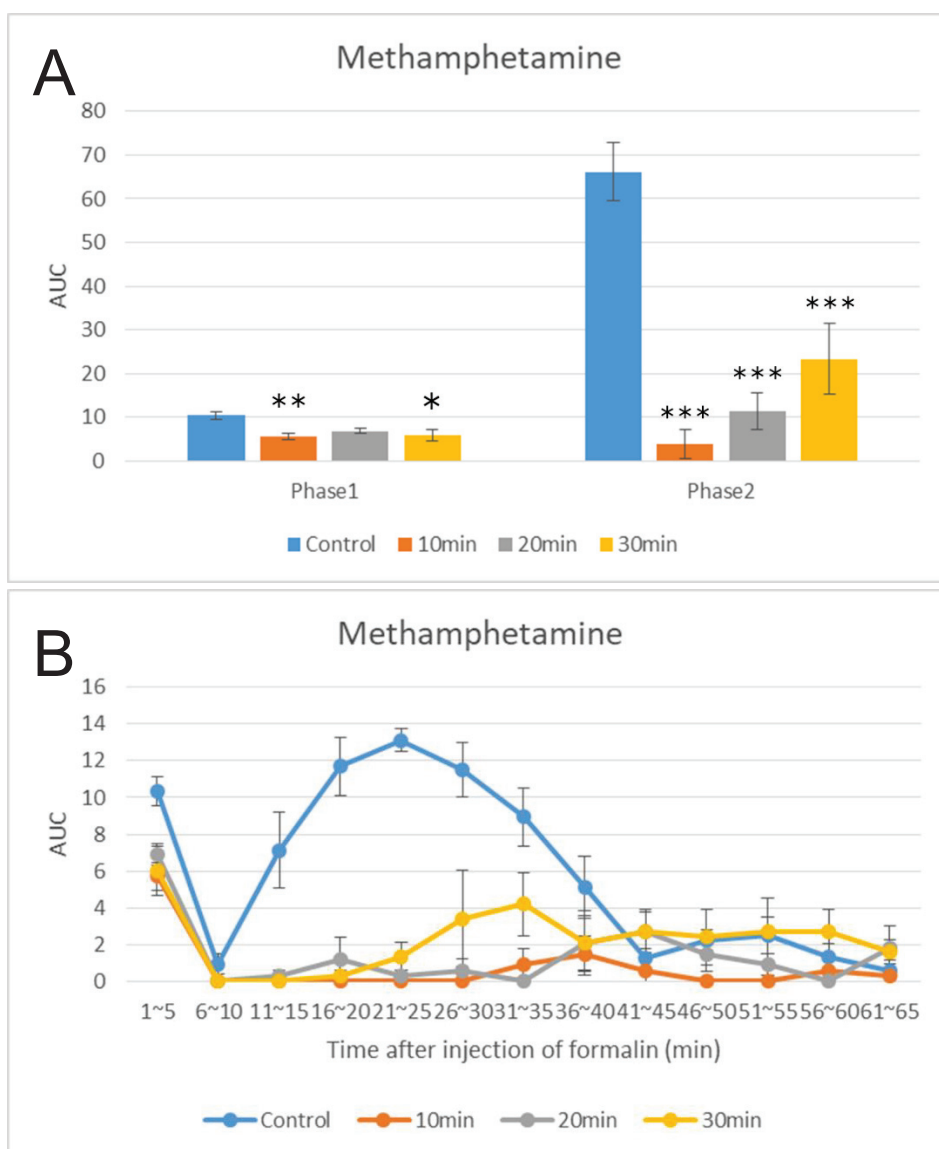
各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=6-8)。



【図 2】 Formalin test における痛みスコアの総 AUC に及ぼす第 1 相と第 2 相での影響

痛みスコアの AUC を第 1 相と第 2 相の総数で示す。マウス 6-8 匹を 1 群とし、saline または 1, 2, 4% の formalin 10 μ l をマウスの片側後肢足蹠に皮下注射しビーカーに入れた後、1 分毎に痛みスコア (0-3) を観察、記録した。記録した痛みスコアのグラフ下の面積 (Area under the curve : AUC) を求めた。求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分; Phase 1) と第 2 相 (formalin 投与後 8 分-65 分; Phase 2) に分け、それぞれを合計した。

統計処理は Prism version 7.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い、各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=6-8, ***p<0.001 compared with saline group; One-way Factorial ANOVA and Multiple Comparison tests) .



【図 3】 Formalin による痛み反応に及ぼす methamphetamine の投与時間の影響

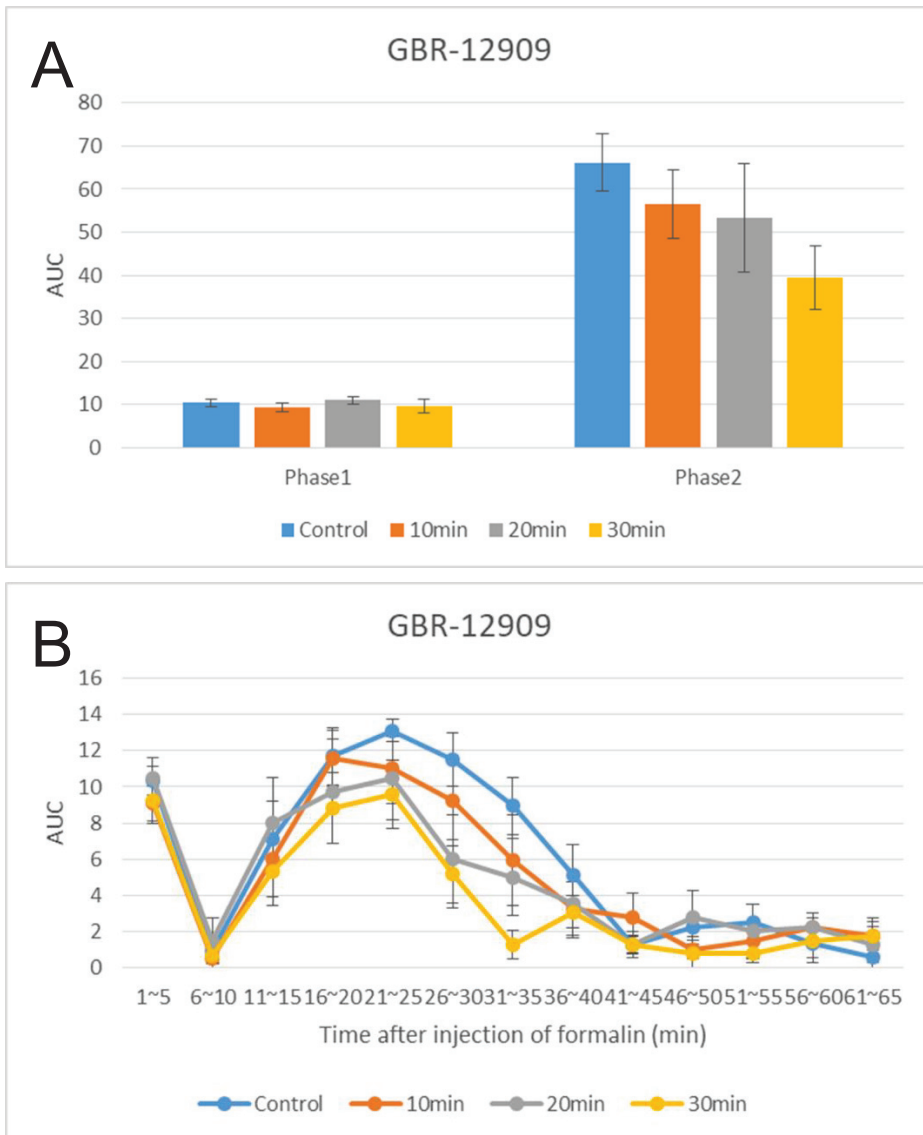
Formalin による痛み反応に及ぼす methamphetamine の投与時間の影響を示す。まず，methamphetamine の効果時間を調べるためにマウス 5-8 匹を 1 群とし，methamphetamine (2 mg/kg) を腹腔内投与した 10, 20, 30 分後にマウスの片側後肢足蹠に 4% formalin (10 μ l) を皮下注射し，1 分毎に痛みスコア (0-3) を観察，記録した。

【A】痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分; Phase 1) と第 2 相 (formalin 投与後 7-65 分; Phase 2) に分け，それぞれを合計した。

統計処理は Prism version 7.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い，各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-8, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with control group; One-way Factorial ANOVA and Multiple Comparison tests)。

【B】痛みスコアから求めた AUC を投与後 5 分毎に合計した。

各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-8)。



【図 4】 Formalin による痛み反応に及ぼす GBR-12909 の投与時間の影響

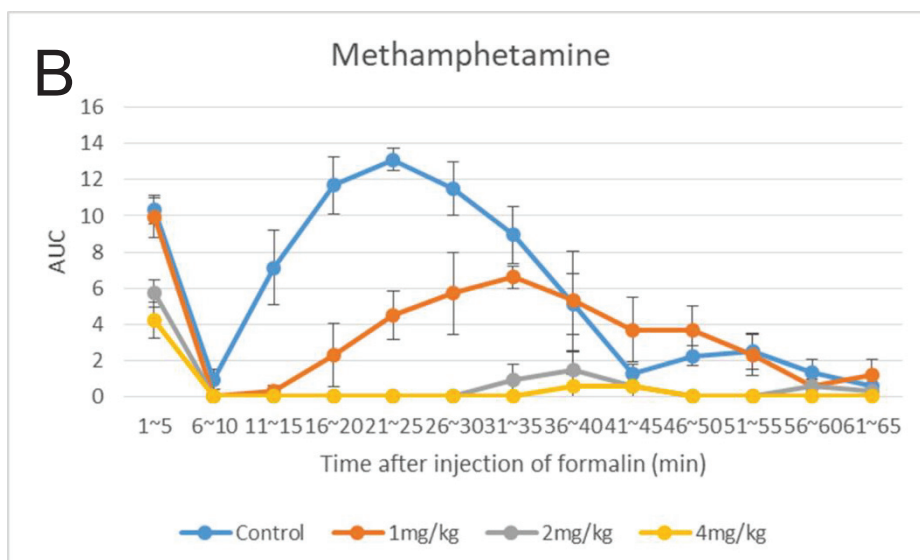
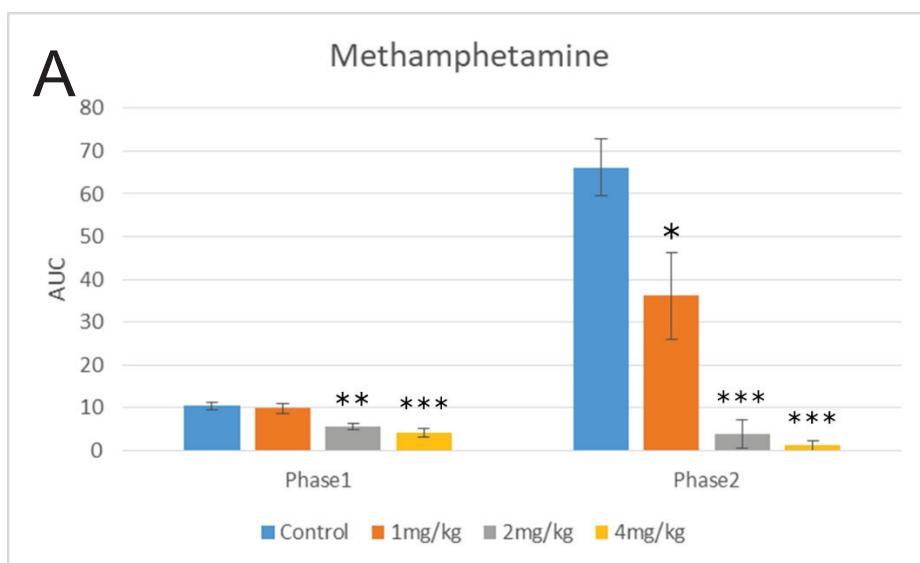
Formalin による痛み反応に及ぼす GBR-12909 の投与時間の影響を示す。まず、GBR-12909 の効果時間を調べるためにマウス 6-8 匹を 1 群とし、GBR-12909 (10mg/kg) を腹腔内投与した 10, 20, 30 分後にマウスの片側後肢足蹠に 4% formalin (10 μ l) を皮下注射し、1 分ごとに痛みスコア (0-3) を観察、記録した。

【A】痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分) と第 2 相 (formalin 投与後 8-65 分) に分け、それぞれを合計した。

統計処理は Prism version 7.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い、各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=6-8 compared with control group; One-way Factorial ANOVA and Multiple Comparison tests)。

【B】痛みスコアから求めた AUC を投与後 5 分毎に合計した。

各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=6-8)。



【図 5】 Formalin による痛み反応に及ぼす methamphetamine の投与量の影響

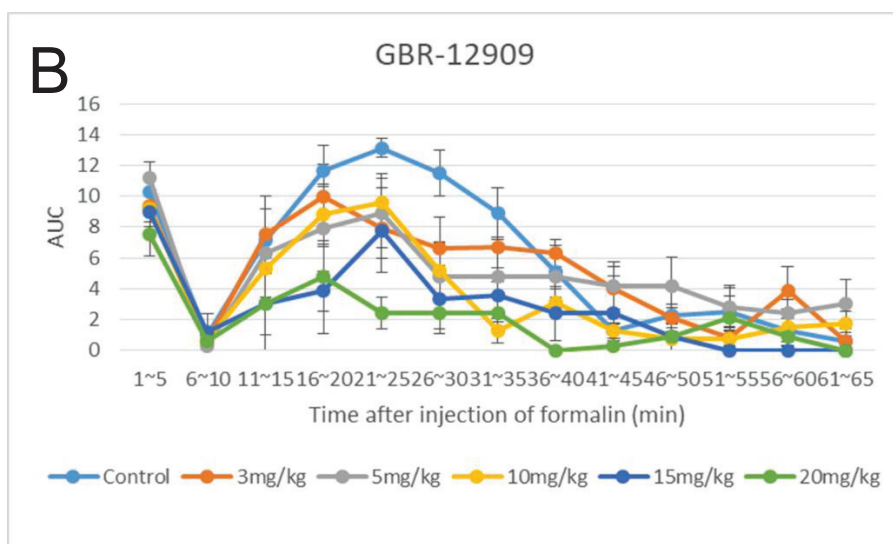
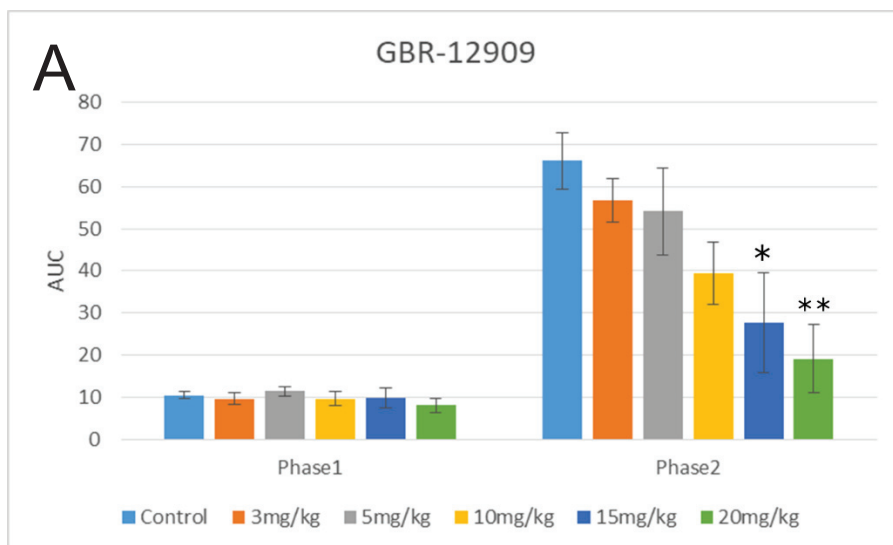
Formalin による痛み反応に及ぼす methamphetamine の投与量の影響を示す。Formalin による痛み反応に及ぼす methamphetamine の影響を調べるために、saline または各用量の methamphetamine (1, 2, 4mg/kg) を腹腔内投与した 10 分後にマウスの片側後肢足蹠に 4% formalin (10 μ l) を皮下注射し、1 分毎に痛みスコア (0-3) を観察、記録した。

【A】痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分) と第 2 相 (formalin 投与後 8-65 分) に分け、それぞれを合計した。

統計処理は Prism version 7.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い、各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-8, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with control group; One-way Factorial ANOVA and Multiple Comparison tests)。

【B】痛みスコアから求めた AUC を 5 分毎に分け、それぞれを合計した。

各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-8)。



【図 6】 Formalin による痛み反応に及ぼす GBR-12909 の投与量の影響

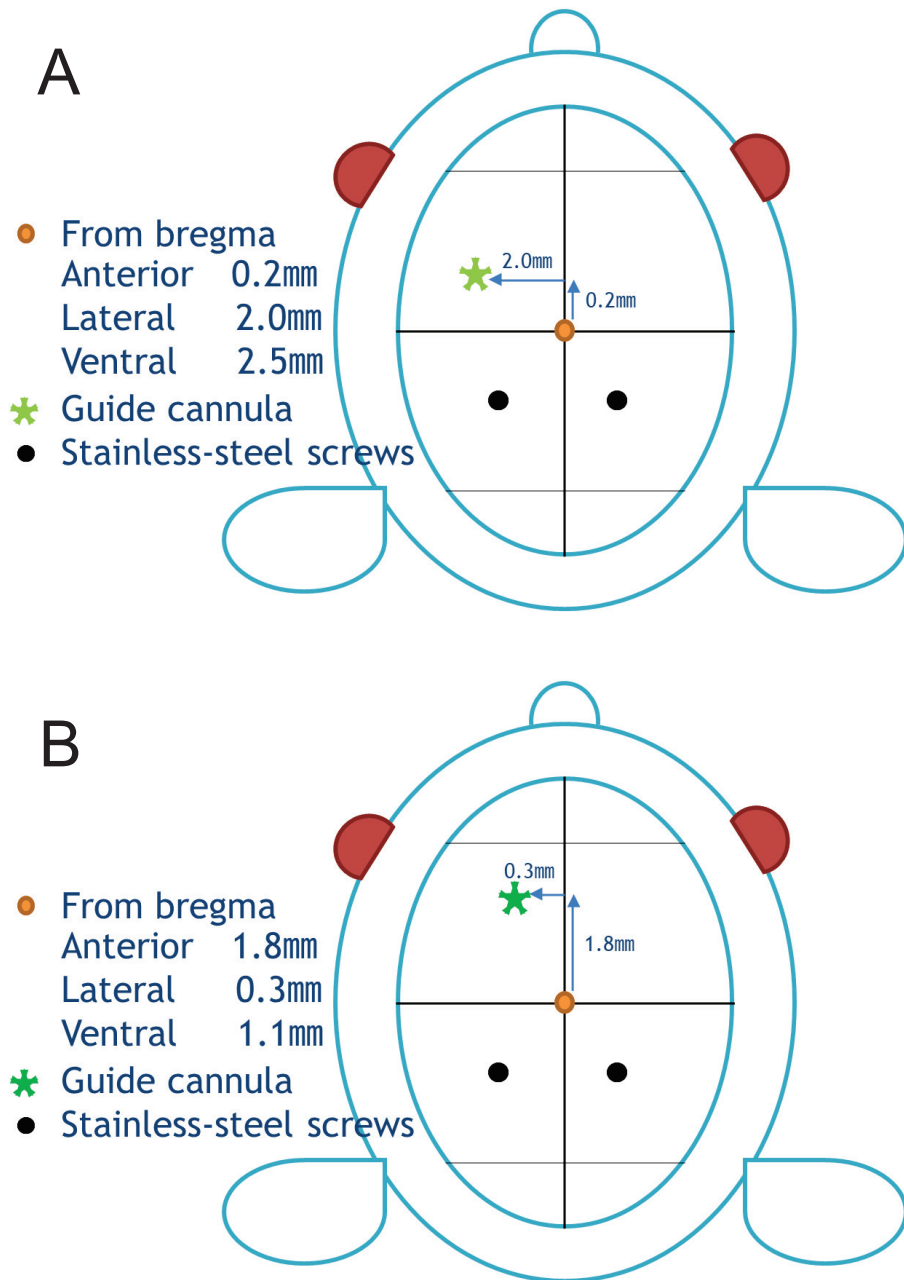
Formalin による痛み反応に及ぼす GBR-12909 の投与量の影響を示す. Formalin による痛み反応に及ぼす GBR-12909 の影響を調べるために, saline または各用量の GBR-12909 (3, 5, 10, 15, 20mg/kg) を腹腔内投与した 30 分後にマウスの片側後肢足蹠に 4% formalin (10 μ l) を皮下注射し, 1 分毎に痛みスコア (0-3) を観察, 記録した.

【A】 痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分) と第 2 相 (formalin 投与後 8-65 分) に分け, それぞれを合計した.

統計処理は Prism version 7.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い, 各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-8, *p<0.05, **p<0.01 compared with control group; One-way Factorial ANOVA and Multiple Comparison tests) .

【B】 痛みスコアから求めた AUC を 5 分毎に分け, それぞれを合計した.

各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-8) .

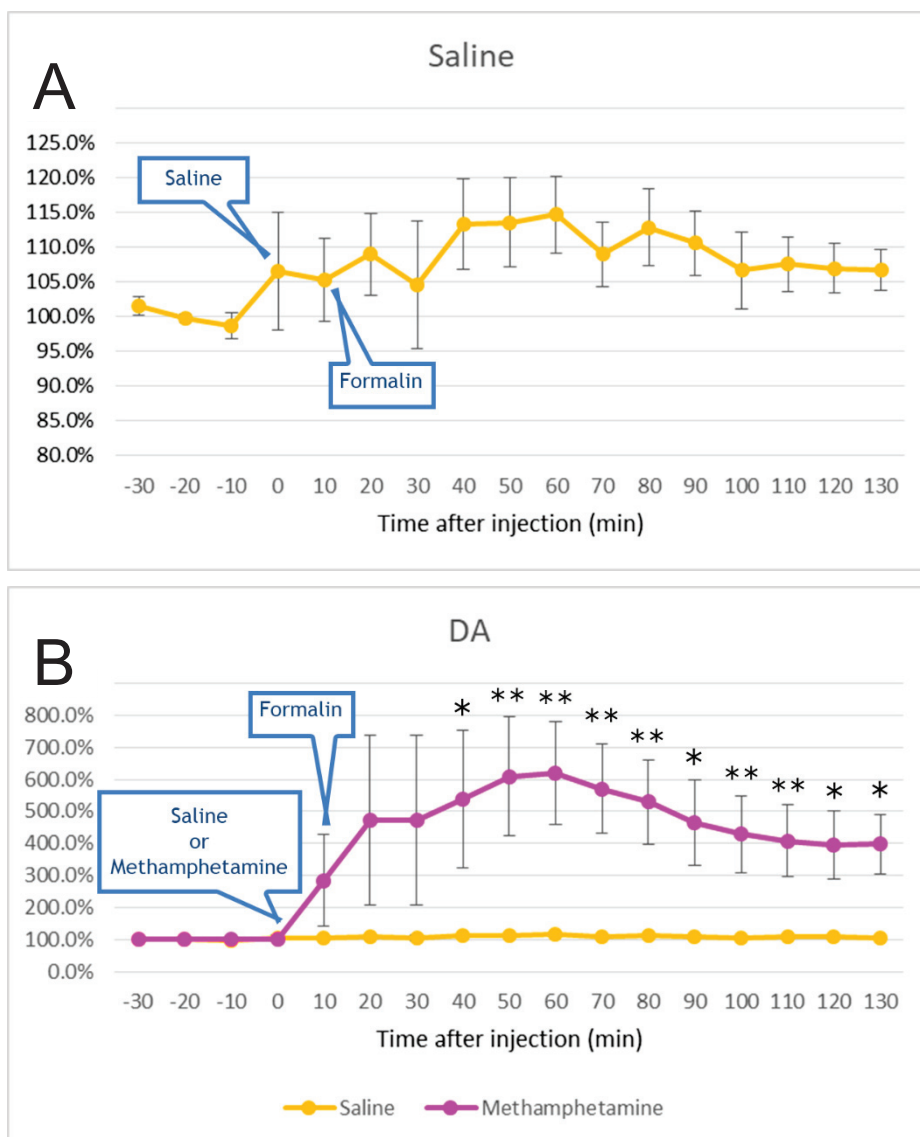


【図 7】 ガイドカニューラ埋入位置

マイクロダイアリス法のためのガイドカニューラ埋入位置を図に示す。

【A】 線条体

【B】 前頭前野

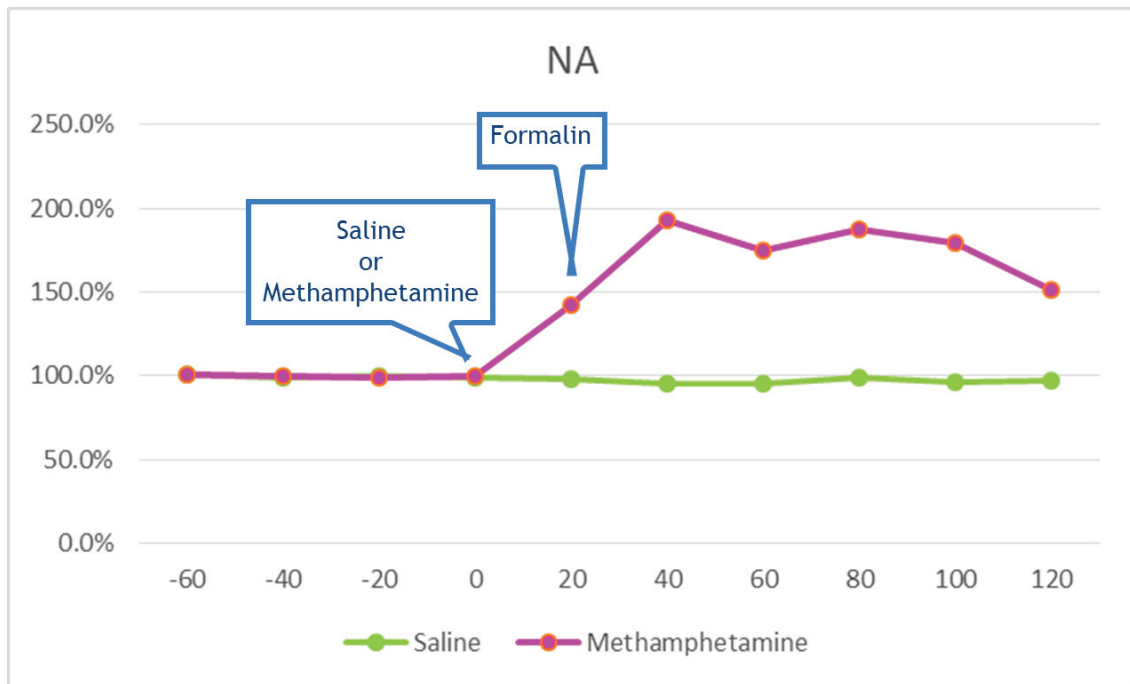


【図 8】 線条体におけるドパミン (DA) 遊離量に及ぼす methamphetamine (2 mg/kg) の影響

Saline または methamphetamine (2 mg/kg) 投与後に formalin test を行った時の線条体におけるドパミン (DA) 遊離量の変化を示す。Saline または methamphetamine 投与時 (0 分時点) 以前 30 分間の DA 遊離量を平均したものをベースライン (100%) とし、各時点の平均値および標準誤差 (n=5) を相対値で示す。

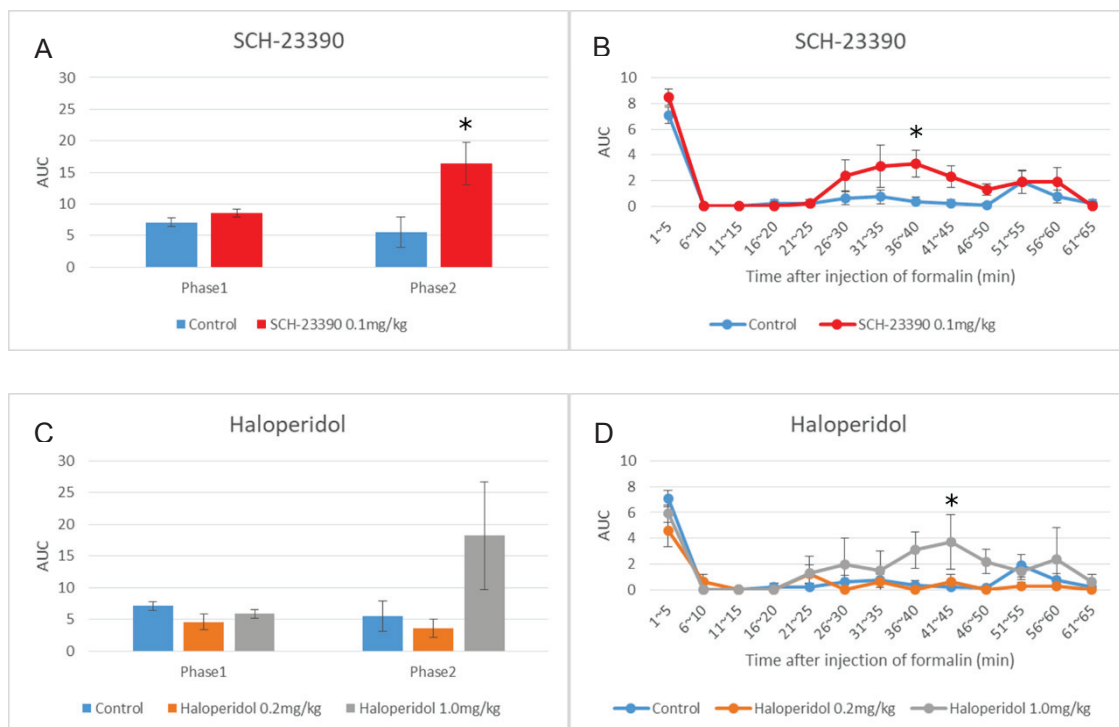
【A】 Saline 投与後に formalin test を行った時の線条体 DA 量の変化を示す。各点は平均値±標準誤差を示す (n=5)。

【B】 Saline または methamphetamine 投与後に formalin test を行った時の線条体 DA 量の変化を示す。統計処理は Statview Ver.5.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.)を用い、各点は平均値±標準誤差を示す (n=5, *p<0.05, **p<0.01 compared with saline group; Two-way Factorial ANOVA with post-hoc test, Fisher's PLSD)。



【図 9】 Formalin test 下での前頭前野 NA 量に及ぼす methamphetamine (2 mg/kg) の影響

Saline または methamphetamine 投与後に formalin test を行った時の前頭前野におけるノルアドレナリン (NA) 遊離量の変化を示す。Saline または methamphetamine (2 mg/kg) 投与時 (0 分時点) 以前 60 分間の NA 遊離量を平均したものをベースライン (100%) とし、各時点の平均値 (n=2-3) を相対値で示す。



【図 10】 Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼすドパミン (DA) 受容体拮抗薬の影響

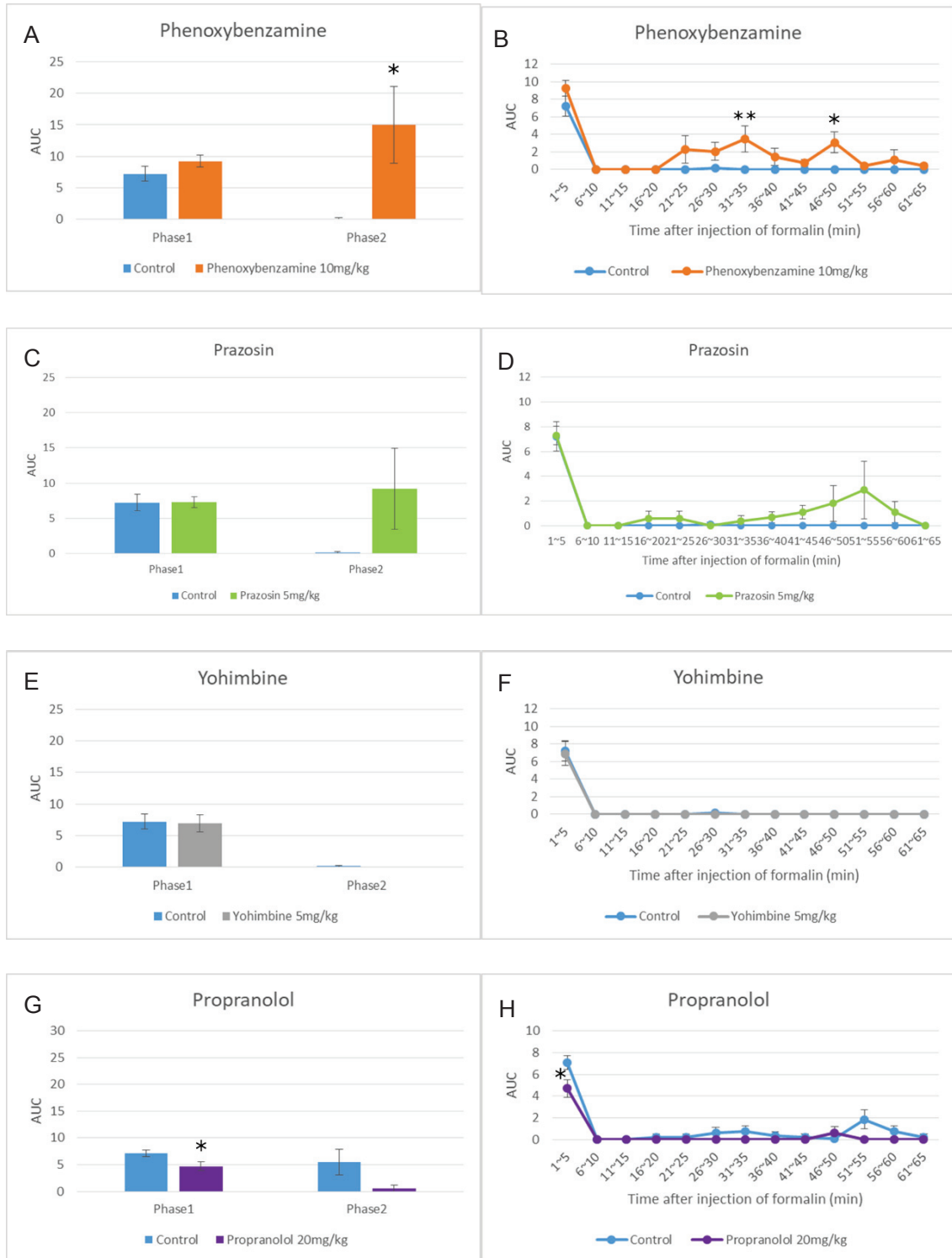
Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼすドパミン (DA) 受容体拮抗薬の影響を示す。まず saline, SCH-23390 (0.1 mg/kg), haloperidol (0.2, 1.0 mg/kg) のいずれかを腹腔内投与し, 10 分後に methamphetamine (2 mg/kg) を腹腔内投与, さらにその 10 分後にマウスの片側後肢足蹠に 4% formalin (10 μ l) を皮下注射し, 1 分毎に痛みスコア (0-3) を観察, 記録した。統計処理は Prism version 7.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いた。

【A】 痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分) と第 2 相 (formalin 投与後 8-65 分) に分け, それぞれを合計した。各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-12, *p<0.05 compared with control group; Student's t test)。

【B】 痛みスコアから求めた AUC を 5 分毎に分け, それぞれを合計した。各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-12, *p<0.05 compared with control group; Two-way Factorial ANOVA with post-hoc test, Bonferroni)。

【C】 痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分) と第 2 相 (formalin 投与後 8-65 分) に分け, それぞれを合計した。各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-12 compared with control group; One-way Factorial ANOVA and Multiple Comparison tests)。

【D】 痛みスコアから求めた AUC を 5 分毎に分け, それぞれを合計した。各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-12, *p<0.05 compared with control group; Two-way Factorial ANOVA with post-hoc test, Bonferroni)。



【図 11】 Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼすノルアドレナリン (NA) 受容体拮抗薬の影響

Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼすノルアドレナリン (NA) 受容体拮抗薬の影響を示す。まず saline, 1% CMC, phenoxybenzamine (10 mg/kg),

yohimbine (5 mg/kg), propranolol (20 mg/kg) のいずれかを腹腔内投与し, 10 分後に methamphetamine (2 mg/kg) を腹腔内投与, さらにその 10 分後にマウスの片側後肢足蹠に 4% formalin (10 μ l) を皮下注射し, 1 分毎に痛みスコア (0-3) を観察, 記録した. Prazosin (5 mg/kg) は腹腔内投与した 30 分後に methamphetamine を腹腔内投与, さらに 10 分後にマウスの片側後肢足蹠に 4% formalin (10 μ l) を皮下注射した.

統計処理は Prism version 7.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いた.

【A】 痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分) と第 2 相 (formalin 投与後 8-65 分) に分け, それぞれを合計した. 各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=7-8, *p<0.05 compared with control group; Student's t test) .

【B】 痛みスコアから求めた AUC を 5 分毎に分け, それぞれを合計した. 各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=7-8, *p<0.05, **p<0.01 compared with control group; Two-way Factorial ANOVA with post-hoc test, Bonferroni).

【C】 痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分) と第 2 相 (formalin 投与後 8-65 分) に分け, それぞれを合計した. 各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-7 compared with control group; Student's t test) .

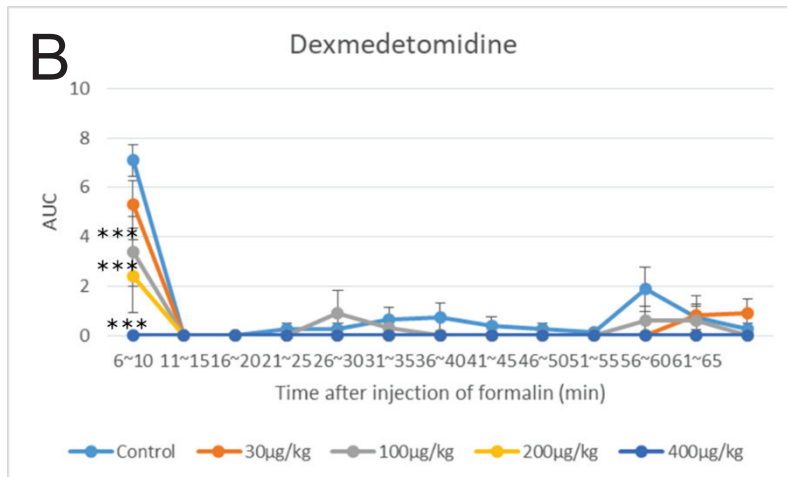
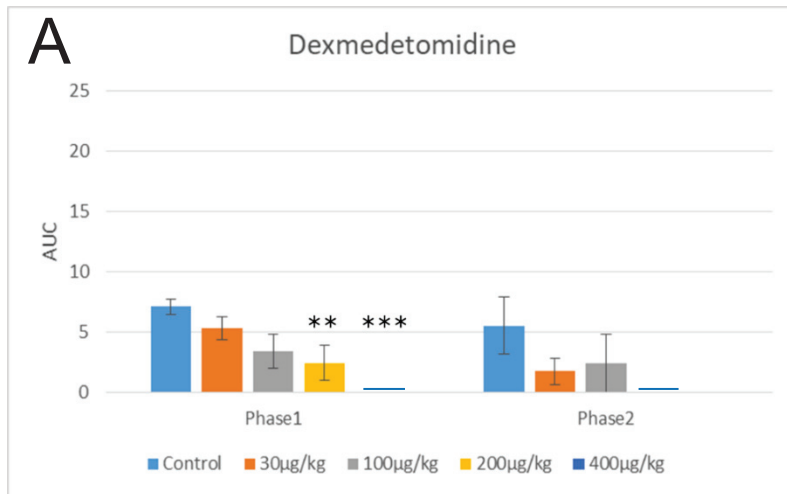
【D】 痛みスコアから求めた AUC を 5 分毎に分け, それぞれを合計した. 各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-7, *p<0.05 compared with control group; Two-way Factorial ANOVA with post-hoc test, Bonferroni).

【E】 痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分) と第 2 相 (formalin 投与後 8-65 分) に分け, それぞれを合計した. 各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-7 compared with control group; Student's t test) .

【F】 痛みスコアから求めた AUC を 5 分毎に分け, それぞれを合計した. 各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-7; Two-way Factorial ANOVA with post-hoc test, Bonferroni).

【G】 痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分) と第 2 相 (formalin 投与後 8-65 分) に分け, それぞれを合計した. 各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-12, *p<0.05 compared with control group; Student's t test) .

【H】 痛みスコアから求めた AUC を 5 分毎に分け, それぞれを合計した. 各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5-12, *p<0.05 compared with control group; Two-way Factorial ANOVA with post-hoc test, Bonferroni).



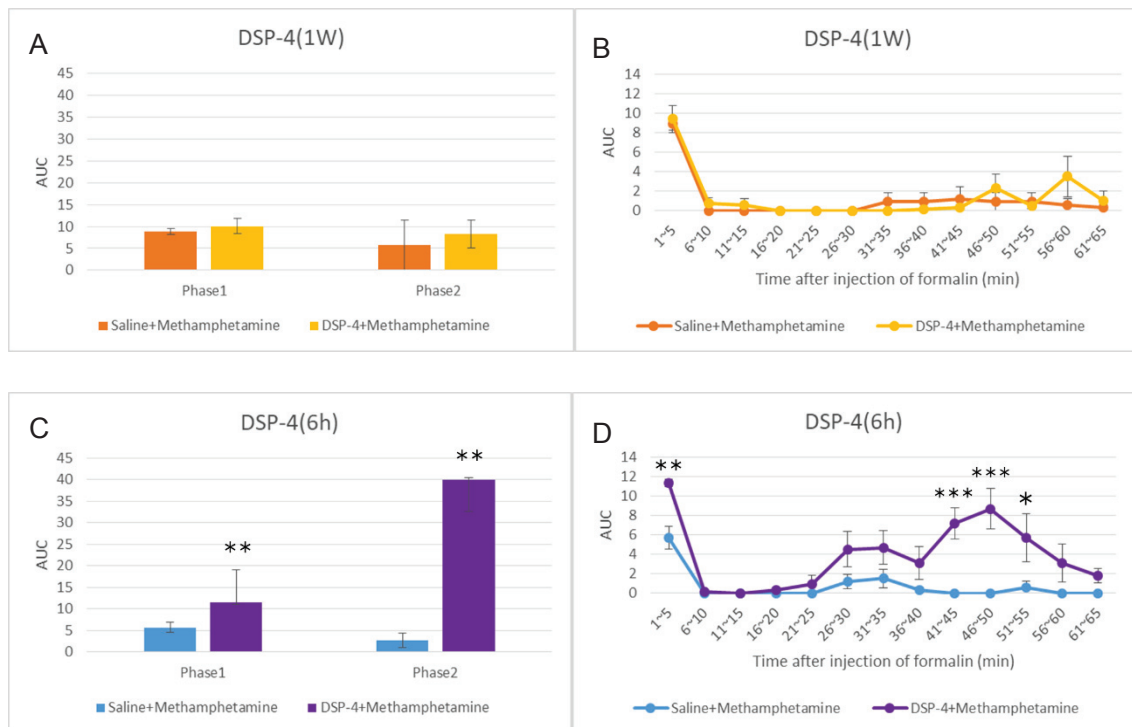
【図 12】 Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす dexmedetomidine の影響

Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼすノルアドレナリン (NA) 受容体作動薬の影響を示す。まず saline または各用量の dexmedetomidine (30, 100, 200, 400 µg/kg) を腹腔内投与し、10 分後に methamphetamine (2 mg/kg) を腹腔内投与、さらにその 10 分後にマウスの後肢足蹠に 4% formalin (10 µl) を皮下注射し、1 分毎に痛みスコア (0-3) を観察、記録した。

統計処理は Prism version 7.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いた。

【A】痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分) と第 2 相 (formalin 投与後 8-65 分) に分け、それぞれを合計した。各棒は平均値±標準誤差を示す (n=5-12, **p<0.01, ***p<0.001 compared with control group; One-way Factorial ANOVA and Multiple Comparison tests)。

【B】痛みスコアから求めた AUC を 5 分毎に分け、それぞれを合計した。各点は平均値±標準誤差を示す (n=5-12, ***p<0.001 compared with control group; Two-way Factorial ANOVA with post-hoc test, Bonferroni)。



【図 13】 Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼす DSP-4 の影響

Formalin による侵害刺激に対する methamphetamine の鎮痛効果に及ぼすノルアドレナリン (NA) 神経毒の影響を示す。まず saline または DSP-4 (50 mg/kg) を腹腔内投与し、7 日後または 6 時間後に methamphetamine (2 mg/kg) を腹腔内投与、さらにその 10 分後にマウスの片側後肢足蹠に 4% formalin (10 μ l) を皮下注射し、1 分毎に痛みスコア (0-3) を観察、記録した。統計処理は Prism version 7.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いた。

【A】痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分) と第 2 相 (formalin 投与後 8-65 分) に分け、それぞれを合計した。各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5 compared with saline group; Student's t test)。

【B】痛みスコアから求めた AUC を 5 分毎に分け、それぞれを合計した。各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5 compared with saline group; Two-way Factorial ANOVA with post-hoc test, Bonferroni)。

【C】痛みスコアから求めた AUC を第 1 相 (formalin 投与後 0-7 分) と第 2 相 (formalin 投与後 8-65 分) に分け、それぞれを合計した。各棒は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5, **p<0.01 compared with saline group; Student's t test)。

【D】痛みスコアから求めた AUC を 5 分毎に分け、それぞれを合計した。各点は平均値 \pm 標準誤差を示す (n=5, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with saline group; Two-way Factorial ANOVA with post-hoc test, Bonferroni)。