

## 学位論文

Effects of general anesthetic-related drugs on  
substance P release in rat spinal cord dorsal  
horn neurons  
-Studies using spinal dorsal horn tissue slice and in  
vivo microdialysis-

(ラット脊髄後角ニューロンからのサブスタンス  
P遊離に及ぼす全身麻酔関連薬物の影響  
—脊髄後角組織スライスおよび in vivo マイクロダイア  
リシス法を用いた研究—)

向井 友宏

広島大学大学院医歯薬保健学研究科  
博士課程 医歯薬学専攻

主任指導教員：入船正浩 教授  
(医系科学研究科 歯科麻酔学)

2019年度

第 1 章	緒論	5
第 2 章	脊髄後角組織スライスからの SP 遊離量に及ぼすモルヒネ，デクスメデトミジン，イミプラミンおよびプロポフォルの影響	
第 1 節	脊髄後角組織スライスからの SP 遊離に及ぼす capsaicin および高濃度 K <sup>+</sup> の影響	
第 1 項	緒言	8
第 2 項	実験材料および方法	8
第 3 項	結果	10
第 2 節	Capsaicin あるいは高濃度 K <sup>+</sup> 刺激 SP 遊離に及ぼすモルヒネ，デクスメデトミジン，イミプラミンの影響	
第 1 項	緒言	10
第 2 項	実験材料および方法	11
第 3 項	結果	11
第 3 節	イミプラミン，GABA 関連作動薬単剤での SP 遊離に及ぼす影響についての検討	
第 1 項	緒言	12
第 2 項	実験材料および方法	12
第 3 項	結果	13

### 第 3 章 In vivo マイクロダイアリス下脊髄後角における SP 遊離量変化に関する検討

#### 第 1 節 本実験で使用するプローブの SP 回収率の検討

第 1 項	緒言	14
第 2 項	実験材料および方法	14
第 3 項	結果	14

#### 第 2 節 Capsaicin 足底皮下注射による脊髄後角からの SP 遊離量変化及び行動薬理学的変化の検討

第 1 項	緒言	15
第 2 項	実験材料および方法	15
第 3 項	結果	18

#### 第 3 節 In vivo マイクロダイアリス下 capsaicin 誘発 SP 遊離および flinching 行動に及ぼす各種麻酔関連薬物の影響

第 1 項	緒言	18
第 2 項	実験材料および方法	19
第 3 項	結果	19

第 4 章	考察	21
-------	----	----

第 5 章 総括および結論	29
謝辞	32
引用文献	33
図表	40

## 第1章 緒 論

疼痛は侵害性刺激により起こり、生体を様々な危害から回避させるための警告反応として重要な役割を果たしている。脊髄後角は A $\delta$  および C 線維からなる侵害受容性一次知覚ニューロンから痛覚情報を受け取る最初の中樞神経系の部位であり、A $\delta$  線維からはグルタミン酸、C 線維からはグルタミン酸やサブスタンス P (SP) が遊離されていることはよく知られている。侵害刺激はまず一次知覚ニューロンの痛覚受容器が受容し、一次知覚ニューロンによって脊髄後角で二次ニューロンに伝達された後、新脊髄視床路を上行し、視床の腹側基底核群(特殊核)さらに大脳皮質体性感覚野に投射され痛みとして認識される。SP はウマの脳および腸管に存在し、血圧を下降させ、平滑筋を収縮させる物質として、von Euler と Gaddum によって発見された 11 個のアミノ酸からなる神経ペプチドである【1】。1974 年に大塚らによって SP が新生ラット脊髄ニューロンに対し興奮性作用を持つことが報告され【2】、ペプチド性物質が哺乳類において神経伝達物質として機能している可能性が初めて示された。これ以降 SP 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る。SP は、一次知覚ニューロン、特に C 線維に多く含まれ、侵害刺激に応じて脊髄後角にある神経終末のシナプス小胞から遊離され脊髄ニューロンに時間経過の長い脱分極をひきおこし、痛みを二次ニューロンへ伝達する。一方、脊髄後角で侵害情報が伝達されると高位中枢からの下行性疼痛抑制系の影響を受ける。この下行性疼痛抑制系は Allan や Howard らによって初めて実証された。【3】

全身麻酔薬は中枢性神経系の機能全体を可逆的に抑制し、あらゆる外的刺激への反応や記憶を消失させると定

義されている【4】。また，麻酔状態の定義は様々な要素から構成されており，健忘，鎮痛，意識消失，侵害刺激に対する体動の抑制（不動化）や自律神経反応の抑制が挙げられる。これらの要素のうち，鎮痛と不動化は特に重要な要素と考えられ，外科手術には全身麻酔薬だけでなく麻薬性鎮痛薬のような麻酔補助薬が使用される。手術中は機械的・化学的侵害刺激だけでなく，それらに伴う炎症反応によっても疼痛は生じる。このような侵害刺激により，麻酔深度は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明らかにしている。

現在，臨床の場においてバランス麻酔が推奨されており，主に鎮静，鎮痛，筋弛緩の作用をもつ薬物が日常的に使用されている。しかし，これらの麻酔薬は先述したように複合的な要素を有しているため，各々の要素について不鮮明な部分が多い。また，動物実験の外科処置に使用されていたペントバルビタールに鎮痛の要素がないということが明らかにされ，単独使用下の外科処置が推奨されなくなったことは記憶に新しい。我々の研究室では，ラット脊髄後根神経節（DRG）培養細胞を用い，侵害受容器の一つである TRPV1 受容体の作動薬 capsaicin もしくは高濃度  $K^+$  で刺激したときに SP 遊離は有意に増加するが，麻薬性鎮痛薬であるモルヒネやアドレナリン  $\alpha 2$  受容体アゴニストであるデクスメデトミジンは，これらの刺激による SP 遊離のいずれにも影響しないことを確認した。つまり，このことは，DRG 培養細胞にモルヒネやデクスメデトミジンによる SP 遊離抑制機能がないことを示している。そこで，本研究では，モルヒネ，デクスメデトミジン，イミプラミンおよびプロポフォールがラット脊髄後角組織スライスで SP 遊離

にどのような影響を及ぼすか *in vitro* 実験を行った。また、capsaicin 単独やモルヒネ、デクスメデトミジン、イミプラミンおよびプロポフォール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脊髄後角での SP 遊離量への影響を、脊髄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。同時に、行動薬理学的手法を用いて痛みによるプリンチング行動を観察し、SP 遊離量と相関するか検討した。

## 第二章 脊髄後角組織スライスからの SP 遊離量に及ぼすモルヒネ，デクスメデトミジン，イミプラミンおよびプロポフォールの影響

### 第 1 節 脊髄後角組織スライスからの SP 遊離に及ぼす capsaicin および高濃度 $K^+$ の影響

#### 第 1 項 緒言

TRPV1 受容体アゴニストである capsaicin は，細径一次知覚ニューロンである C あるいは  $A\delta$  繊維を選択的に興奮させ，脊髄後角組織スライスに適用すると神経ペプチドの遊離が誘発されることが報告されている

【5】. そこで，本節では，capsaicin か高濃度  $K^+$  で灌流したときの，脊髄後角組織スライスからの SP 遊離量変化について検討した．また，この SP 遊離が細胞外  $Ca^{2+}$  依存性に引き起こされるか検討した．

#### 第 2 項 実験材料及び方法

##### 実験動物

実験動物として Wistar 系成熟雄性ラット (250-350g, 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．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 : A16-125)

##### 使用薬物



本実験では薬物として，capsaicin, potassium chloride, EDTA (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) を使用した。

#### 脊髄後角切片の作製および灌流実験

ラット断頭後，腰膨大部を含む脊髄組織を速やかに摘出し，氷冷した生理食塩水中に移した。軟膜，前根，後根をすべて取り除いた後，後角から切片を作製した。脊髄後角切片には，capsaicin 感受性一次知覚ニューロンが投射している膠様質を切り出し，白質は可能な限り除去した。切片は生理食塩水で 10 分間 2 回洗浄し Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer 中に 30 分間 37°C でインキュベート後，灌流実験を行った。capsaicin ( $1\ \mu\text{M}$ ) もしくは高濃度  $\text{K}^+$  ( $50\ \text{mM}$ ) を加え，10 分後に release 液を回収した。12,000 rpm で 10 分間遠心分離し，得られた上清を SP 遊離サンプルとした。使用した Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer の組成 (mM) を以下に示す。塩化ナトリウム 119.78，塩化カリウム 4.56，塩化マグネシウム 0.49，リン酸水素二ナトリウム 0.70，リン酸二水素ナトリウム 1.30，炭酸水素ナトリウム 14.99，グルコース 10.00，塩化カルシウム 2.00 (pH 7.3)。灌流液は Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer に  $500\ \mu\text{M}$  AEBSF 塩酸塩， $150\ \text{nM}$  アプロチニン， $1\ \mu\text{M}$  E-64， $1\ \mu\text{M}$  ロイペプチンヘミ硫酸，0.1%ウシ血清アルブミンを添加したものを使用した。高濃度  $\text{K}^+$  刺激による SP 遊離量を検討する実験では  $\text{K}^+$  投与前に Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer 中の  $50\ \text{mM}$   $\text{K}^+$  を等モルの  $\text{Na}^+$  で置換した。また，細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の検討実験では Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer 中の  $2\ \text{mM}$   $\text{Ca}^{2+}$

を等モルの EDTA に置換し， $\text{Ca}^{2+}$  を含まない灌流液を使用した．

#### ラジオイムノアッセイ法

SP 遊離サンプルに抗 SP 抗体を加え，さらに 0.1% Triton X を添加した BSA 含有リン酸水素二ナトリウム，リン酸二水素ナトリウム水溶液 (pH 7.5) で希釈した  $^{125}\text{I}$ -Tyr8-SP (PerkinElmer, Inc., Massachusetts, USA) を加え， $4^{\circ}\text{C}$  で 18 時間処理した．抗体と結合していない遊離型  $^{125}\text{I}$ -Tyr8-SP を 0.9% BSA 含有 2% チャコール溶液に吸着させ，2,500 rpm で 10 分間遠心分離した後，上清中の結合型  $^{125}\text{I}$ -Tyr8-SP の放射能活性を  $\gamma$  カウンターにより測定した．

### 第 3 項 結果

脊髄後角組織スライスを capsaicin で刺激すると，basal release に比較し， $275 \pm 31\%$  へ有意に SP 遊離量が増加した【図 1】．また，高濃度  $\text{K}^{+}$  で刺激すると basal release と比較し， $211 \pm 9\%$  へ有意に SP 遊離量が増加した【図 2】．2mM EDTA で置換した細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下では capsaicin 刺激しても SP 遊離量は変化しなかった【図 3】．

### 第 2 節 Capsaicin あるいは高濃度 $\text{K}^{+}$ 刺激 SP 遊離に及ぼすモルヒネ，デクスメデトミジン，イミプラミンの影響

#### 第 1 項 緒言

第 1 節より脊髄後角組織スライスから capsaicin あるいは  $\text{K}^{+}$  刺激により SP 遊離の促進を確認することがで

きた．そこで，本節では， $\mu$  受容体選択的アゴニストであるモルヒネ，アドレナリン  $\alpha_2$  受容体作動薬であるデクスメデトミジン，セロトニンとノルアドレナリン再取り込み阻害薬であるイミプラミンの capsaicin あるいは高濃度  $K^+$  誘発 SP 遊離に対する効果について検討した．

## 第 2 項 実験材料及び方法

### 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モルヒネ(Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan)，デクスメデトミジン，イミプラミン(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)を使用した．Capsaicin と高濃度  $K^+$  は第 1 節で使用したものに準ずる．

### 実験方法

脊髄後角組織スライスの調整法及び灌流実験の条件は第 1 節に準ずる．モルヒネ，デクスメデトミジン，イミプラミンは  $1 \mu M$  capsaicin または  $50mM$  高濃度  $K^+$  の投与 10 分前から灌流液中投与した．

## 第 3 項 結果

モルヒネは  $0.1-100 \mu M$  の範囲で濃度依存的に  $1 \mu M$  capsaicin 誘発 SP 遊離を抑制した． $10 \mu M$ ， $100 \mu M$  で SP 遊離量は control のそれぞれ 48%，42%まで有意に抑制された【図 4】．また， $50mM$  高濃度  $K^+$  投与で誘発

された SP 遊離量も 0.1-100  $\mu$  M のモルヒネ投与で濃度依存性に抑制され，10  $\mu$  M，100  $\mu$  M で SP 遊離量は control のそれぞれ 55%，53% まで有意に抑制された【図 5】.

デクスメデトミジンは 0.1-10  $\mu$  M の範囲で濃度依存的に 1  $\mu$  M capsaicin 誘発 SP 遊離を抑制した. また，10  $\mu$  M のデクスメデトミジン灌流液中投与で SP 遊離量は control の 53% まで有意に抑制された【図 6】.

セロトニン再取り込み阻害薬であるイミプラミンは 100  $\mu$  M の灌流液中投与で 1  $\mu$  M capsaicin 誘発 SP 遊離をさらに増加させた【図 7】.

### 第 3 節 イミプラミン，GABA 関連作動薬単剤での SP 遊離に及ぼす影響についての検討

#### 第 1 項 緒言

第 2 節で予想していた結果に反し，脊髄後角組織スライスでのイミプラミンの灌流液中投与は capsaicin 誘発 SP 遊離をさらに増加させた. そこで，本節では，イミプラミン及び全身麻酔薬や鎮静薬として使用されている GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬のプロポフォール及び選択的 GABA 受容体作動薬の脊髄後角組織スライスからの SP 遊離量を検討した.

#### 第 2 項 実験材料及び方法

##### 実験材料

実験動物は第 1 節に準じた.

##### 使用薬物

本実験ではプロポフォール，ムシモール，バクロフェン，THIP(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)を使用した．イミプラミンは第1節に準ずる．

#### 実験方法

脊髄後角組織スライスの調整法及び灌流実験の条件は第1節に準ずる．37℃で30分間 Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer 中でインキュベートした後，使用薬物を溶解した Buffer 中で10分間灌流し，上清を回収した．

#### 第3項 実験結果

イミプラミンの灌流液中投与は濃度依存的に基礎 SP 遊離量を増大させた．30，100，1000  $\mu$  M イミプラミン灌流投与は，basal release (100%)と比較し，それぞれ  $155.8 \pm 21.5$ ， $196.9 \pm 18$ ， $392.4 \pm 37\%$ へ有意に基礎 SP 遊離量を増大させた【図8】．

一方，プロポフォールの灌流液中投与は低濃度(10  $\mu$  M，100  $\mu$  M)では基礎 SP 遊離量に変化は認められなかったが，高濃度(1000  $\mu$  M)では基礎 SP 遊離量を  $187.7 \pm 16.4\%$ へ有意に増大させた【図9】．そこで，1mM の GABA 受容体作動薬を灌流液中投与させたときに基礎 SP 遊離量に変化するか検討したところ，プロポフォールと同様の薬理作用を有するムシモールは基礎 SP 遊離量を  $144.1 \pm 13.7\%$ へ有意に増大させたのに対し，GABA<sub>B</sub> 作動薬であるバクロフェン，シナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体に結合する THIP では基礎 SP 遊離量の変化は認められなかった【図10】．

### 第 3 章 In vivo マイクロダイアリシス下脊髄後角における SP 遊離量変化に関する検討

#### 第 1 節 本実験で使用するプローブの SP 回収率の検討

##### 第 1 項 緒言

In vivo マイクロダイアリシスを用いて SP 遊離に及ぼす各種全身麻酔関連薬物の影響を検討した。In vivo マイクロダイアリシスは無麻酔自由行動下に生体の細胞外液中から神経伝達物質や神経ペプチドを回収することができ、より生体に近い条件下で薬物の影響を検討することができ得ると考えられている。しかし、微小透析プローブから細胞外液中 SP 量を 100% 全て回収することはできない。そこで、本実験では、使用する透析プローブの SP 回収率を測定し、実際の脊髄後角からの細胞外 SP 遊離量を推定可能にすると共に in vivo マイクロダイアリシス実験で用いる灌流液の流量及び回収時間を決定する指標を作製するため、まず in vitro 下で SP 回収率を測定した。

##### 第 2 項 実験材料及び方法

微小透析プローブを SP 濃度  $1 \mu\text{g/mL}$  に調整した溶液の入ったチューブに挿入し、 $2\text{-}5 \mu\text{L/min}$  の速度で灌流して得られたサンプル内の SP 含有量と  $1 \mu\text{g/mL}$  チューブに存在した SP 含有量を比例計算することで微小透析プローブからの SP 回収率を算出した。

##### 第 3 項 実験結果

$1, 2, 3, 4 \mu\text{L/min}$  の流速で灌流したところ、SP 回収率はそれぞれ  $11.7 \pm 1.5$ ,  $8.7 \pm 0.5$ ,  $7.9 \pm 1.9$ ,  $4.5 \pm 2.5\%$

であった【図 11】。これらの結果より，後述する *in vivo* マイクロダイアリシス実験では灌流速度を  $3\mu$  L/min に設定した。

## 第 2 節 Capsaicin 足底皮下注射による脊髄後角からの SP 遊離量変化及び行動薬理学的変化の検討

### 第 1 項 緒言

第 1 章第 1 節では，capsaicin 刺激による脊髄後角スライスからの SP 遊離を *in vitro* 下で認めた。そこで，本節では，脊髄後角への微小透析プローブ埋入部位と同側足底に capsaicin を皮下注射したときに SP 遊離の促進を認めるか検討した。

### 第 2 項 実験材料及び方法

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，脊髄・脳定位固定装置（ST-7R-HT，NARISHIGE SCIENTIFIC INSTRUMENT LAB.，Tokyo，Japan），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（Eicom，Kyoto，Japan），歯科用セメントを用いた。

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（AtomosLM 透析プローブ PAP-12-02，膜長 2mm，膜外径 0.32mm，Eicom，Kyoto，Japan），インジェクションポンプ（ESP-32 インフュージョンポンプ，Kyoto，Japan），ローラーポンプ（ERP-10，Eicom，Kyoto，Japan），ガスタイトシリン

ジ (1002LTN, 2.5ml, Hamilton Company Inc., Nevada, USA), アクリル製透明ケージ (FC30), フリームービングユニット (カニューレシーベル (TCS2-21), バランスアーム (TSB-23), フック付クリアチューブ (AWT-50-40), テフロンチューブ (JT-10, JF-10), Eicom, Kyoto, Japan) を用いた.

脊髄灌流液として用いたリンゲル液の組成は, 塩化ナトリウム 147mM, 塩化カリウム 4mM, 塩化カルシウム 2.3mM とした.

#### 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ラットの体温を維持した. ラットを pentobarbital (35 mg/kg, 腹腔内投与) および 1% lidocaine で局所麻酔した後, 第 11 胸椎および第 1 腰椎をクランプにより脊髄定位固定装置に固定した. ミニルータードリルを用いて Th13 での椎弓切除後, 左側腰膨大部 (脊髄セグメント L4~L5) のレベルで, 硬膜および軟膜を一部剥離した. 次に, マイクロマニピュレーターを使用して, 微小透析プローブ (EICOM: 分子カットオフ 100kDa, 直径 0.32 mm, 長さ 2 mm) を, 約  $20^\circ$  の角度で吻尾方向に脊髄後角 entry zone へ挿入した. Th12, Th13, L1 椎骨にステンレス製アンカー用スクリューを埋入し, 歯科用アクリリックレジン及び瞬間接着剤で固定した. 手術による侵襲と薬物からの回復期間として手術後 24 時間の回復期間をおいた. また, 実験当日, 運動神経麻痺やアロディニア等の知覚異常を示したラットは使用しなかった.

マイクロダイアリシス実験当日は微小透析プローブをフリームービングユニット回路の微小チューブに接続し,



実験中はラット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。微小透析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したリンゲル液の送液を開始しておいた。実験終了後は頸椎脱臼法でラットを死亡させ、脊髄を摘出した。摘出した脊髄は、凍結させた後クライオスタットで 30  $\mu\text{m}$  に薄切し、光学顕微鏡を用いて微小透析プローブの位置を確認した。そのうち適切に微小透析プローブが脊髄後角に留置されていたことが確認できたラットのみを実験データとして使用した。

#### 疼痛行動評価

ラットは、capsaicin の後肢足底への皮下投与により licking, flinching などさまざまな疼痛による行動変化を示すが、本研究では、後肢を振り回す flinching 行動の頻度が高く認められたため、flinching 行動の回数を疼痛行動の指標とした。Capsaicin 投与後 2 分毎に約 60 分間観察し、経時的変化を記録した。

#### 薬物投与および侵害刺激

Basal release 量が安定するまで約 2 時間リンゲル液で灌流させた後、0.1, 0.5, 1% capsaicin 50  $\mu\text{l}$  をラットの微小透析プローブ埋入位置の同側後肢足蹠に皮下注射した。

#### SP 遊離量変動の評価

SP 値の変動については、基礎状態（リンゲル液による灌流開始約 2 時間後、連続して安定した 3 検体が得られた状態）における 3 検体の平均値を基礎遊離量 (basal

release)とし，これを 100%としてそれに対する%変換値により評価した．

### 第 3 項 結果

0.1, 0.5, 1%の capsaicin を皮下注射すると flinching 回数および脊髄後角 SP 遊離量は濃度依存性に増大した．また，1%capsaicin を皮下注射した際の flinching 回数は，投与直後の 2 分後にはピークとなり，その後経時的に減少した【図 12】．一方，in vivo マイクロダイアリシスでの SP の基礎遊離量(basal release)は 0.1, 0.5, 1%capsaicin でそれぞれ  $0.13 \pm 0.02$ ,  $0.10 \pm 0.02$ ,  $0.08 \pm 0.01 \text{pg}/\mu\text{L}$  であり，有意差はなかった ( $p > 0.05$ , One-way ANOVA)．また，1%の capsaicin 左側後肢足底皮下投与直後より脊髄後角からの SP 遊離量は有意であった投与 75 分後と同程度に増加傾向を示し，投与 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180 分後にはそれぞれ  $133.0 \pm 5.3$ ,  $139.0 \pm 5.4$ ,  $162.4 \pm 14.2$ ,  $161.5 \pm 15.2$ ,  $156.5 \pm 13.7$ ,  $171.2 \pm 19.6$ ,  $161.3 \pm 13.4$ ,  $161.1 \pm 14.9\%$  と basal release 量に比べ有意に増加した【図 13】．

### 第 3 節 In vivo マイクロダイアリシス下 capsaicin 誘発 SP 遊離および flinching 行動に及ぼす各種麻酔関連薬物の影響

#### 第 1 項 緒言

第 2 節で capsaicin の足底皮下注射が脊髄後角の SP 遊離を増加させることが明らかになった．そこで本節では，麻酔関連薬物であるモルヒネ，デクスメデトミジン，イミプラミン，プロポフォールが capsaicin 誘発

SP 遊離および flinching 行動にどのような影響を及ぼすか検討した。

## 第 2 項 実験材料及び方法

マイクロダイアリシス実験および疼痛行動評価は第 2 節に準ずる。

モルヒネ (10mg/kg) は, capsaicin 皮下注射 15 分前に皮下注射した。デクスメデトミジン (0.1mg/kg) とイミプラミン (50mg/kg) は, capsaicin 皮下注射 15 分前に腹腔内注射した。プロポフォール (100mg/kg) は, capsaicin 皮下注射 10 分前に腹腔内注射した。

## 第 3 項 結果

モルヒネの皮下注射は capsaicin 皮下注射直後から有意に flinching 回数を減少させた。SP 遊離量は capsaicin 注射直後からほぼ basal release 量かそれ以下まで抑制され, vehicle と比較すると投与 60 分後と 105 分後以降に有意差を認めた【図 14】。SP の基礎遊離量(basal release)は vehicle, モルヒネでそれぞれ  $0.15 \pm 0.02$ ,  $0.13 \pm 0.01 \text{ pg}/\mu\text{L}$  であり, 有意差はなかった ( $n = 12$ ,  $p > 0.05$ ; Student' s t test)。デクスメデトミジン腹腔内投与は capsaicin 皮下注射直後から有意に flinching 回数を減少させ, SP 遊離量は capsaicin 注射直後からほぼ basal release 量まで抑制されたが, vehicle と比較すると投与 135 分以降有意であった【図 15】。SP の基礎遊離量(basal release)は vehicle, デクスメデトミジンでそれぞれ  $0.12 \pm 0.02$ ,  $0.11 \pm 0.01 \text{ pg}/\mu\text{L}$  であり, 有意差はなかった ( $n = 12$ ,  $p > 0.05$ ; Student' s t test)。イミプラミンの腹腔内投与は capsaicin 皮下注射直後から有意に flinching 回数を減

少させた． SP 遊離量は capsaicin 注射直後からほぼ basal release 量かそれ以下まで抑制されたが， vehicle と比較すると投与 120 分後以降有意であった【図 14】． SP の基礎遊離量(basal release)は vehicle， イミプラミンでそれぞれ  $0.12 \pm 0.02$ ，  $0.22 \pm 0.03 \text{ pg}/\mu\text{L}$  であり， 有意差を認めた ( $n = 12$ ，  $p < 0.05$ ; Student' s t test)． イミプラミン投与群で基礎遊離量が少し高かった原因はよくわからないが， 手術手技の影響によりデータの散らばりがあり平均値が大きくなったことが考えられた． プロポフォール腹腔内投与群では， capsaicin 皮下注射直後の 2 分後のみ flinching 回数は vehicle 投与群と差がなかったが， 4 分後以降は有意に減少させた． 一方， SP 遊離量は vehicle 投与群と比較し差がなかった【図 17】． SP の基礎遊離量(basal release)は vehicle， プロポフォールでそれぞれ  $0.13 \pm 0.01$ ，  $0.14 \pm 0.01 \text{ pg}/\mu\text{L}$  であり， 有意差はなかった ( $n = 12$ ，  $p > 0.05$ ; Student' s t test)．

#### 第 4 章 考 察

本実験で capsaicin および高濃度  $K^+$  は脊髄後角組織スライスからの SP 遊離を有意に増加させた。Capsaicin は、一次知覚ニューロンのうち主に C 線維の神経末端に存在する TRPV1 受容体に結合し、非選択的カチオンチャネルを開口させて作用を発揮すると考えられている。また、TRPV1 受容体の競合的アンタゴニストであるカプサゼピンは capsaicin 誘発 SP 遊離を抑制するとの報告【6】があり、TRPV1 受容体遮断を介した抑制作用が示唆される。Capsaicin によって誘発される神経ペプチド遊離は細胞外  $Ca^{2+}$  依存性のことが多く、本実験でも capsaicin 誘発 SP 遊離は細胞外  $Ca^{2+}$  依存性であることが明らかになった。Capsaicin 刺激による神経ペプチド遊離は、N 型あるいは L 型  $Ca^{2+}$  チャネル阻害薬で抑制されないことから、電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルよりも TRPV1 受容体-カチオンチャネル複合体から流入した  $Ca^{2+}$  に依存していることを示唆することが報告されている【7】。そのため、SP 遊離も TRPV1-カチオン複合体から流入した  $Ca^{2+}$  に依存している可能性が高い。また、後根神経切断したラットでは capsaicin 誘発 SP 遊離が消失することも報告されている【8】。さらに、本実験では、in vivo マイクロダイアリシス実験において capsaicin を微小透析プローブ埋入位置と同側に皮下注射したところ、脊髄後角から有意な SP 遊離の増加を認めた。以上のことから、一次知覚ニューロンが capsaicin 誘発 SP 遊離に関与していることが示唆された。

一方、今回のマイクロダイアリシス実験では、capsaicin 皮下注射直後より脊髄後角からの SP 遊離量

は有意であった投与 75 分後と同程度に増加傾向を示したが，増加のピークは投与後 105 分以降だったのに対し，行動実験での痛み行動の flinching は投与直後にピークとなりその後減少に転じ約 50 分でほぼ消失した．この SP 遊離作用と flinching 行動の時間経過作用のずれについての理由として，まず，神経可塑性の可能性が考えられる．痛みの可塑性の原因として，痛み刺激が繰り返し続くと次第に痛みが強くなるというwindアップ現象がある．windアップは，一次知覚ニューロンである C 線維などに連続的な刺激を与え続けると二次ニューロンの興奮性が徐々に増加する現象のことである．この機序として，C 線維から遊離された SP により脊髄後角ニューロンにある SP 受容体（neurokinin 1 [NK1]受容体）が活性化されるが，C 線維からの SP 遊離が繰り返されると NK1 受容体を持つ活性化された二次ニューロンが wide dynamic range (WDR)侵害受容性ニューロンを感作することにより生じると考えられている【9】．通常，ループを形成している神経回路内で負のフィードバックが生じ，過剰に遊離された神経伝達物質（SP）は抑制的に制御されるはずであるが，今回の場合高濃度の capsaicin 局所投与によって負のフィードバックが効き難くなったのかも知れない．次に，炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  が SP 遊離を促進させるという報告があり，SP 遊離量の増加が長時間持続した原因として炎症が関与した可能性も考えられる【10】．したがって，capsaicin 皮下注射 50 分以降の SP 遊離量の増加は capsaicin による局所の炎症によって生じたのかも知れない。

オピオイド  $\mu$  受容体は脊髄後角内に比較的多く存在しており【11】，オピオイド神経系は内因性疼痛抑制系と

して機能していると考えられている。麻薬性鎮痛薬であるモルヒネはオピオイド  $\mu$  受容体に強い親和性を持ち、痛覚求心路を選択的に遮断することにより強力な鎮痛作用を生じる。オピオイド  $\mu$  受容体は G タンパク質共役型であり、アデニル酸シクラーゼ抑制系を介して細胞内 cAMP を抑制しており、この活性化により  $\text{Ca}^{2+}$  コンダクダンスを抑制させたり、 $\text{K}^+$  コンダクダンスを増強させたりするといわれている【12】。また、脊髄後角組織スライスからの capsaicin 誘発グルタミン酸をモルヒネが抑制することや DRG 細胞にオピオイド  $\mu$  受容体が発現していることが報告されており【13】、モルヒネが脊髄後角における侵害受容伝達をシナプス前性に抑制し鎮痛作用を発揮していると考えられる。本実験においても、脊髄後角組織スライスおよび *in vivo* マイクロダイアリシスいずれにおいてもモルヒネは capsaicin 誘発 SP を抑制することが明らかとなった。脊髄で求心性侵害受容神経のシナプス前ニューロンの  $\mu$  受容体に結合して、SP の遊離を抑制するとともにシナプス後ニューロンでも  $\mu$  受容体に結合し Gi 蛋白の活性化を介する  $\text{K}^+$  チャンネル開孔による興奮性の抑制をもたらす結果、鎮痛作用を生じたと考えられる。また、モルヒネは脊髄だけでなく脊髄上位中枢にも作用しており、中脳水道周囲灰白質の  $\mu$  受容体に結合して、下降性疼痛抑制系を賦活する。すなわち、大縫線核セロトニン神経を活性化し、神経連絡する脊髄後角ニューロンの興奮を抑制的（シナプス前・後）に作用する【14】。つまり、全身投与されたモルヒネは脊髄および脊髄上位である中脳水道灰白質の両方に作用し強力な鎮痛作用を発揮していると考えられる。



アドレナリン  $\alpha_2$  受容体は中枢神経系に広く分布しており，鎮痛，鎮静などに重要な役割を果たしている

【15】. デクスメデトミジンは高い  $\alpha_2$  受容体親和性 ( $\alpha_1 : \alpha_2 = 1 : 1620$ ) を持ち【16】，麻酔・集中治療領域において鎮静薬として使用されている．  $\alpha_2$  受容体作動薬は脊髄後角において，主に  $\alpha_2A$  受容体を介して鎮痛作用を発揮すると考えられている。ラットを用いた行動薬理的解析では，  $\alpha_2$  受容体作動薬の脊髄，硬膜外，および全身投与で抗侵害作用が発現し，  $\alpha_2$  作動薬による抗侵害効果は  $\alpha_2$  受容体拮抗薬の脊髄投与で阻害される【17】. 今回の実験結果においても疼痛行動評価である flinching 回数は有意に抑制された。また，我々の研究室で，デクスメデトミジンは用量依存性に自発運動量の低下を認めたが，正向反射の消失は認めず，鎮静状態を超えることはないことを確認している。このことは，デクスメデトミジンは鎮静ではなく鎮痛効果により flinching 回数を抑制したことを裏付けている。脊髄後角組織スライスおよび *in vivo* マイクロダイアリシス実験において capsaicin 誘発 SP 遊離はデクスメデトミジンにより抑制された。デクスメデトミジンの鎮痛効果は過去の報告より  $\alpha_2A$  受容体に直接作用してシナプス後に膠様質ニューロンなどを過分極したり【18】，一次求心性ニューロンの脊髄内終末部の  $\alpha_2$  受容体に作用し，C 線維などからのグルタミン酸の放出を抑制したり，GABA/glycine 作動性ニューロンの  $\alpha_1$  受容体に作用して抑制性シナプス伝達を促進したり，【19】興奮性の介在ニューロンの  $\alpha_2C$  受容体に作用したりして興奮性シナプス伝達を抑制していると考えられている

【20】. 一方，デクスメデトミジンはシナプス前膜のアドレナリン  $\alpha_2$  受容体に作用して，ノルアドレナリン遊



離を抑制することにより鎮静作用を発現する【21】。そのため、デクスメデトミジンはノルアドレリン性下行性疼痛抑制系に関与していないと考えられていたが、*in vivo* パッチクランプ法を用いたデクスメデトミジンの鎮痛作用を検討した過去の報告では、鎮静量以下のデクスメデトミジンを全身投与すると、膠様質ニューロンで自発性抑制性シナプス後電流が著明に増加し、この反応は、 $\alpha_1$  受容体拮抗薬で阻害され、さらに頸髄を切断した群では消失した【22】。つまり、デクスメデトミジンを全身投与すると、ノルアドレナリン性下行性疼痛抑制系が活性化し、脊髄後角でのノルアドレナリン分泌が亢進する。脊髄で分泌されたノルアドレナリンが $\alpha_1$ 受容体に作用し、GABA もしくはグリシン作動性抑制性ニューロンを活性化する。本実験でも *in vivo* マイクロダイアリシスでラットに腹腔内投与したデクスメデトミジンの髄腔内濃度は  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  程度の低濃度と推測されることから、ノルアドレナリン性下行性疼痛抑制系の関与も考えられる。

イミプラミンは第一世代の三環系抗うつ薬でノルアドレナリンやセロトニンのトランスポーターに結合し、トランスポーター機能を阻害することで、モノアミンの細胞外レベルを増加させる。主に抗うつ薬として用いられているが、鎮痛補助薬として処方されることもある。そこで、まずイミプラミンの脊髄後角組織スライスからのカプサイシン誘発 SP 遊離を抑制するか検討したところ、予想に反して有意に増加させた。さらに、イミプラミン単独投与でも濃度依存性に SP 遊離は促進された。セロトニン受容体は 5-HT1 から 5-HT7 の 7 種類のサブファミリーからなり、14 個のサブタイプが存在する【23】。5HT2A, 5HT3, 5HT4 受容体は一次知覚ニュー

ロン終末において痛みを促進するといわれており，特に中枢神経系の脊髄においては 5HT-3 受容体の発現が多く【24】，ラット DRG では 5-HT3 と 5-HT2A 受容体 mRNA 量をもっとも多いとされている【25】．5-HT3 受容体はリガンド作動性イオンチャネルとして機能する唯一のモノアミン受容体でそれ以外の 5HT 受容体は 7 回膜貫通 G 蛋白共役型の受容体である．Inoue らは脊髄後角組織スライスを用いた実験で，セロトニンや 5HT-3 受容体作動薬が高濃度 K<sup>+</sup>誘発 SP 遊離をさらに増強させたことを報告しており【26】，これは本実験の脊髄後角組織スライスからのイミプラミンが capsaicin 誘発 SP 遊離を促進したことを裏付けている．しかし，髄腔内にセロトニンを投与すると鎮痛効果があり，5-HT2c 受容体アンタゴニスト，5-HT3 受容体アンタゴニストはこの抗侵害効果をブロックし，5-HT2A，5-HT2B 受容体アンタゴニストは軽度ブロックするという報告や【27】，前述のモルヒネの上位中枢への作用による鎮痛作用の機序のひとつとして，セロトニン性下行性抑制系の賦活化により脊髄内にて遊離されるセロトニンが GABA ニューロン上に存在する 5-HT3 受容体を活性化し，その結果抑制性アミノ酸伝達物質の GABA が遊離して鎮痛作用が出現するという報告がある【28】．そこで *in vivo* マイクロダイアリシスを用いてイミプラミンの capsaicin 誘発 SP 遊離にどのような影響を及ぼすか検討したところ，行動薬理学及び SP 遊離量いずれも抗侵害効果を示した．つまり，5-HT2A や 5-HT3 受容体は，下行性疼痛抑制系が絶たれた脊髄後角では痛みを増強し，脊髄や DRG に多く発現している下行性疼痛抑制系を介して痛みを抑制するよう働いているのかもしれない．しかし，さらなる 5-HT 受容体サブタイプの機能を

解明するには、5-HT の様々なサブタイプの受容体アゴニストや特定遺伝子のノックアウトを用いて検討していく必要がある。

プロポフォールは臨床で最も使用される静脈麻酔薬の一つである。プロポフォールの鎮痛効果や痛覚過敏への関与に関しては多くの研究があるものの、まだ一致した結論は得られていない【29】。また、臨床では、プロポフォールを高流量で静脈内投与すると血管痛を生じる。これらのことより、我々は、まず脊髄後角組織スライスを用いてプロポフォールの SP 遊離量を検討したところ、低濃度では SP の基礎遊離量は変化しなかったのに対し、高濃度では有意に SP 遊離量は増加した。これは、前述の血管痛の原因と関係しているのかもしれない。プロポフォールの血管痛の作用機序としては TRPV1 や TRPA1 受容体を介していることが挙げられており、特に TRPA1 受容体に関与しているという報告が多い【30】。TRPA1 受容体は TRPV1 と同じ TRP ファミリーであり、チャネル活性化により  $Ca^{2+}$  を透過させ、機能を発現する【31】。TRPA1 受容体は後根神経などの侵害受容性 C 線維や A $\delta$  線維に発現しており、TRPV1 受容体と共発現している【32】。また、SP と TRPA1 が共発現していることも報告されている【33】。Nishimoto らはパッチクランプテストでプロポフォールがマウス DRG 細胞の TRPA1 や TRPV1 を活性化することを示している【30】。脊髄後角組織スライスから capsaicin が TRPV1 受容体を活性化させ SP 遊離を促進したことより、プロポフォールが TRPV1 及び TRPA1 受容体を活性化させている可能性は十分考えられる。また、SP 遊離を間接的に示唆する NK1 受容体のインターナリゼーションを検討した過去の報告では、ラット足蹠

へのホルマリン刺激によって増大した NK1 受容体発現はフェンタニルで減少したにも関わらず、プロポフォールでは変化しなかったという報告がある。【34】これは、*in vivo* マイクロダイアリス実験の結果を裏付けている。しかし、アセトアミノフェンの代謝産物のくも膜下投与が TRPA1 を活性化させ、抗侵害作用を得ているという報告【35】もあり、TRPA1 が痛みにもなり、鎮痛にもなる可能性がある。

以上、今回のサブスタンス P 遊離への影響を検討した実験結果から、全身麻酔関連薬物の作用責任部位が下降性疼痛抑制系にあるのか、それとも脊髄後角にあるのか、部分的にはあるが、明らかにすることができた。

## 第 5 章 総括および結論

今回, 脊髄後角組織スライスを用いた *in vitro* 実験と *in vivo* マイクロダイアリシス実験および疼痛行動評価を行い, 種々の全身麻酔関連薬が SP 遊離にどのような影響を及ぼすか検討した.

SP 遊離に及ぼす全身麻酔関連薬の影響について, 脊髄後角組織スライスを用いて *in vitro* 実験及び *in vivo* マイクロダイアリシス実験を行い, 以下のような結果および結論が得られた.

1. 脊髄後角組織スライスに対する capsaicin 刺激あるいは高濃度  $K^+$  刺激により SP 遊離量は有意に増加した. しかし, 細胞外  $Ca^{2+}$  非存在下では SP 遊離は変化しなかった.
2. 脊髄後角組織スライスでモルヒネは capsaicin および高濃度  $K^+$  誘発 SP 遊離を有意に抑制した. また, デクスメトミジンも capsaicin 誘発 SP 遊離を抑制した. しかし, イミプラミンは capsaicin 誘発 SP 遊離量をさらに増強した.
3. 脊髄後角組織スライスでイミプラミンは濃度依存性に基礎 SP 遊離量を増加させた. プロポフォールは低濃度では基礎 SP 遊離量を変化させなかったが, 高濃度 (1mM) で SP 遊離量を有意に増加させた. さらに GABA 関連作動薬のうちムシモールは基礎 SP 遊離量を有意に増加させたが, バクロフェン, THIP は基礎 SP 遊離量に影響しなかった.

4. *In vivo* マイクロダイアリシス実験において，モルヒネ，デクスメデトミジン，イミプラミンは *capsaicin* 皮下注射後，痛み行動である *flinching* 回数を有意に減少させ，さらに脊髄後角からの SP 遊離を抑制した．一方，プロポフォールは *capsaicin* 注射 2 分後では *flinching* 回数を減少させなかったが，4 分以降では有意に減少させた．また，脊髄後角からの SP 遊離は抑制しなかった．

以上の結果から，モルヒネおよびデクスメデトミジンは *capsaicin* による痛みに対し抗侵害効果を有し，モルヒネおよびデクスメデトミジンの抗侵害効果は脊髄後角からの SP 遊離量に関与することが示唆された．

イミプラミンは脊髄後角組織スライスでは SP 遊離増加という痛みを促進させる方向に作用した一方で，*in vivo* マイクロダイアリシスでは抗侵害効果を示した．脊髄後角組織スライスでは一次ニューロン終末で痛みを促進させる 5-HTA や 5-HT3 に作用し SP 遊離を増加させ，さらに下行性疼痛抑制系が加わると，これが優位に働いている可能性が示唆された．

プロポフォールは高濃度では SP 遊離を増加させ，さらに *in vivo* マイクロダイアリシスでは *capsaicin* 刺激により増加した SP 遊離を抑制しなかった．プロポフォールは TRPV1 や TRPA1 に作用した結果 SP 遊離を促し，下行性疼痛抑制系には関与していない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ニューロン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。

## 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系科学研究科（歯科麻酔学）入舩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系科学研究科（顎顔面解剖学）寺山隆司教授，広島大学病院（障害者歯科学）岡田芳幸教授，本学医系科学研究科（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薬効解析科学教室関係各位に心より感謝いたします．



引用文献

【1】 V Euler, U.S., Gaddum, J.H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *The Journal of physiology*, 1931, 72(1), 74-87.

【2】 Konishi, S., Otsuka, M. Excitatory action of hypothalamic substance P on spinal motoneurons of newborn rats. *Nature*, 1974, 252(5485), 734-5.

【3】 Basbaum AI, Fields HL. The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. *J Comp Neurol*. 1979 ;187(3):513-31.

【4】 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.

【5】 Kuraishi Y, Minami M, Satoh M. Serotonin, but neither noradrenaline nor GABA, inhibits capsaicin-evoked release of immunoreactive somatostatin from slices of rat spinal cord. *Neurosci Res*. 1991, 9(4):238-45.

【6】 Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CS, Yeats JC. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone

excitant capsaicin. *Br J Pharmacol.* 1992, 107(2):544-52.

【7】 Bleakman D, Brorson JR, Miller RJ. The effect of capsaicin on voltage-gated calcium currents and calcium signals in cultured dorsal root ganglion cells. *Br J Pharmacol.* 1990, 101(2):423-31.

【8】 Onogi T, Minami M, Kuraishi Y, Satoh M. Capsaicin-like effect of (6)-shogaol on substance P-containing primary afferents of rats: a possible mechanism of its analgesic action. *Neuropharmacology.* 1992, 31(11):1165-9.

【9】 Coste J, Voisin DL, Miraucourt LS, Dallel R, Luccarini P. Dorsal horn NK1-expressing neurons control windup of downstream trigeminal nociceptive neurons. *Pain.* 2008, 137(2):340-51.

【10】 Inoue A, Ikoma K, Morioka N, Kumagai K, Hashimoto T, Hide I, Nakata Y. Interleukin-1beta induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *J Neurochem.* 1999, 73(5):2206-13.

【11】 Besse D, Lombard MC, Besson JM. Autoradiographic distribution of mu, delta and kappa opioid binding sites in the superficial dorsal horn, over the rostrocaudal axis of the rat spinal cord. *Brain Res.* 1991, 548(1-2):287-91.

【 12】 Macdonald RL, Werz MA. Dynorphin A decreases voltage-dependent calcium conductance of mouse dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 1986, 377:237-49.

【 13】 Belanger S, Ma W, Chabot JG, Quirion R. Expression of calcitonin gene-related peptide, substance P and protein kinase C in cultured dorsal root ganglion neurons following chronic exposure to mu, delta and kappa opiates. *Neuroscience.* 2002, 115(2):441-53.

【 14】 Yaksh TL., Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1997, 41(1 Pt 2):94-111.

【 15】 Khan ZP, Ferguson CN, Jones RM. alpha-2 and imidazoline receptor agonists. Their pharmacology and therapeutic role. *Anaesthesia.* 1999, 54(2):146-65.

【 16】 Virtanen R, Savola JM, Saano V, Nyman L. Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an alpha 2-adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 1988, 150(1-2):9-14.

【 17】 Guneli E, Karabay Yavasoglu NU, Apaydin S, Uyar M, Uyar M. Analysis of the antinociceptive effect of systemic administration of tramadol and dexmedetomidine combination on rat models of acute

and neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007, 88(1):9-17.

【18】 Sonohata M, Furue H, Katafuchi T, Yasaka T, Doi A, Kumamoto E, Yoshimura M. Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording. *J Physiol.* 2004, 555(Pt 2):515-26.

【19】 Baba H, Shimoji K, Yoshimura M. Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 1): effects on axon terminals of GABAergic and glycinergic neurons. *Anesthesiology.* 2000, 92(2):473-84.

【20】 Olave MJ, Maxwell DJ. Neurokinin-1 projection cells in the rat dorsal horn receive synaptic contacts from axons that possess alpha2C-adrenergic receptors. *J Neurosci.* 2003, 23(17):6837-46.

【21】 Jorm CM, Stamford JA. Actions of the hypnotic anaesthetic, dexmedetomidine, on noradrenaline release and cell firing in rat locus coeruleus slices. *Br J Anaesth.* 1993, 71(3):447-9.

【22】 Funai Y, Pickering AE, Uta D, Nishikawa K, Mori T, Asada A, Imoto K, Furue H. Systemic dexmedetomidine augments inhibitory synaptic transmission in the superficial dorsal horn through

activation of descending noradrenergic control: an in vivo patch-clamp analysis of analgesic mechanisms. *Pain*. 2014, 155(3):617-28.

【23】 Gerald C, Adham N, Kao HT, Olsen MA, Laz TM, Schechter LE, Bard JA, Vaysse PJ, Hartig PR, Branchek TA. The 5-HT<sub>4</sub> receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J*. 1995,14(12): 2806-15.

【24】 Hamon M, Gallissot MC, Menard F, Gozlan H, Bourgoin S, Vergé D. 5-HT<sub>3</sub> receptor binding sites are on capsaicin-sensitive fibres in the rat spinal cord. *Eur J Pharmacol*. 1989, 164(2):315-22.

【25】 Pierce PA, Xie GX, Levine JD, Peroutka SJ. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience*. 1996, 70(2):553-9.

【26】 Inoue A, Hashimoto T, Hide I, Nishio H, Nakata Y. 5-Hydroxytryptamine-facilitated release of substance P from rat spinal cord slices is mediated by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem*. 1997, 68(1):128-33.

【27】 Bardin L, Lavarenne J, Eschalier A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain*. 2000,

86(1-2):11-8.

【28】 Kawamura M, Ohara H, Go K, Koga Y, Ienaga K. Neurotropin induces antinociceptive effect by enhancing descending pain inhibitory systems involving 5-HT<sub>3</sub> and noradrenergic alpha<sub>2</sub> receptors in spinal dorsal horn. *Life Sci.* 1998, 62(24):2181-90.

【29】 Goto T, Marota JJ, Crosby G. Pentobarbitone, but not propofol, produces pre-emptive analgesia in the rat formalin model. *Br J Anaesth.* 1994, 72(6):662-7.

【30】 Nishimoto R, Kashio M, Tominaga M. Propofol-induced pain sensation involves multiple mechanisms in sensory neurons. *Pflugers Arch.* 2015, 467(9):2011-20.

【31】 Karashima Y, Prenen J, Talavera K, Janssens A, Voets T, Nilius B. Agonist-induced changes in Ca<sup>2+</sup> permeation through the nociceptor cation channel TRPA1. *Biophys J.* 2010, 98(5):773-83.

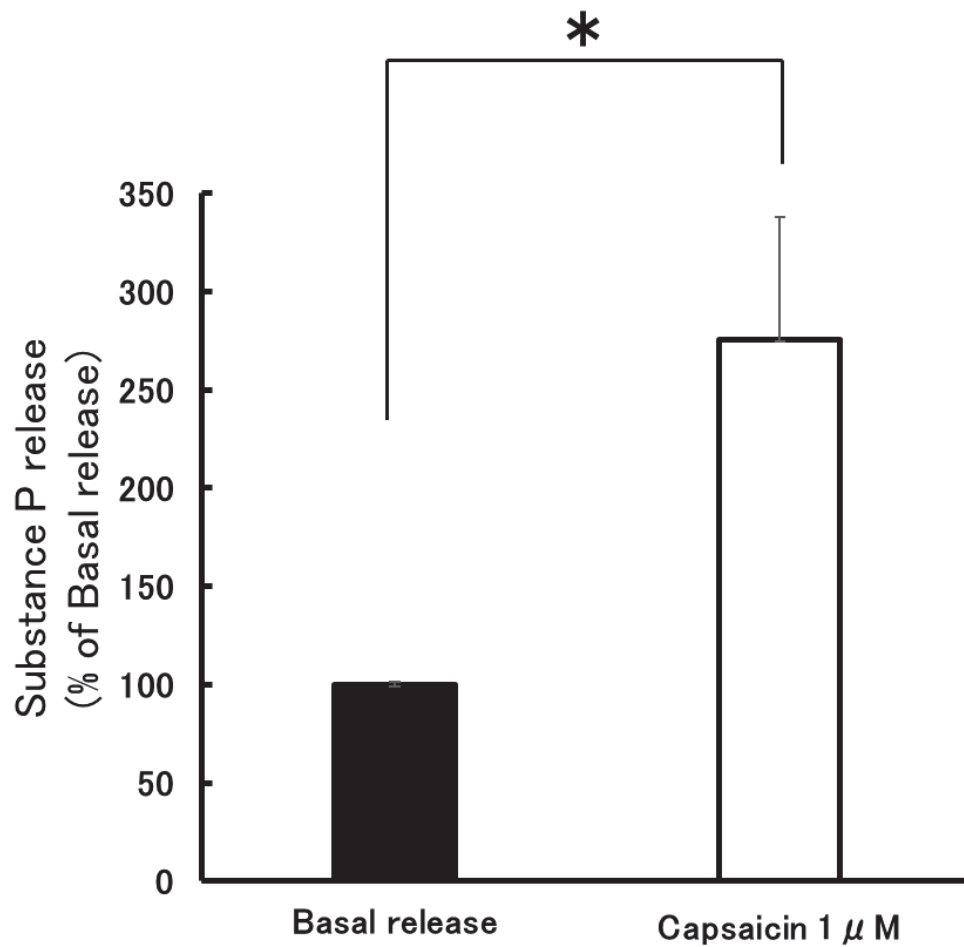
【32】 Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell.* 2002, 108(5):705-15.

【33】 Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy

DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*. 2004, 427(6971):260-5.

【 34】 Takasusuki T, Yamaguchi S, Hamaguchi S, Yaksh TL. Effects of general anesthetics on substance P release and c-Fos expression in the spinal dorsal horn. *Anesthesiology*. 2013, 119(2):433-42.

【 35】 Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci*. 2008, 28(10):2485-94.

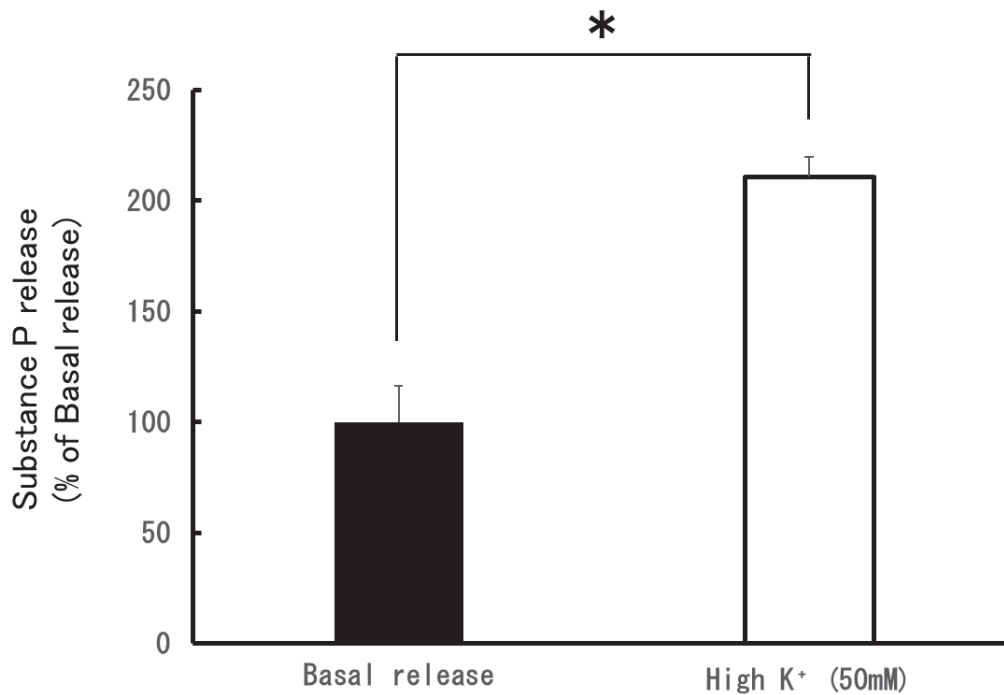


【図 1】 脊髄後角組織スライスにおけるサブスタンス P (SP) 遊離に及ぼす capsaicin 刺激の影響

1 μM の capsaicin で刺激すると, SP 遊離量の有意な増加を認めた. 各棒は, 平均値 ± 標準誤差を示す (n = 5,

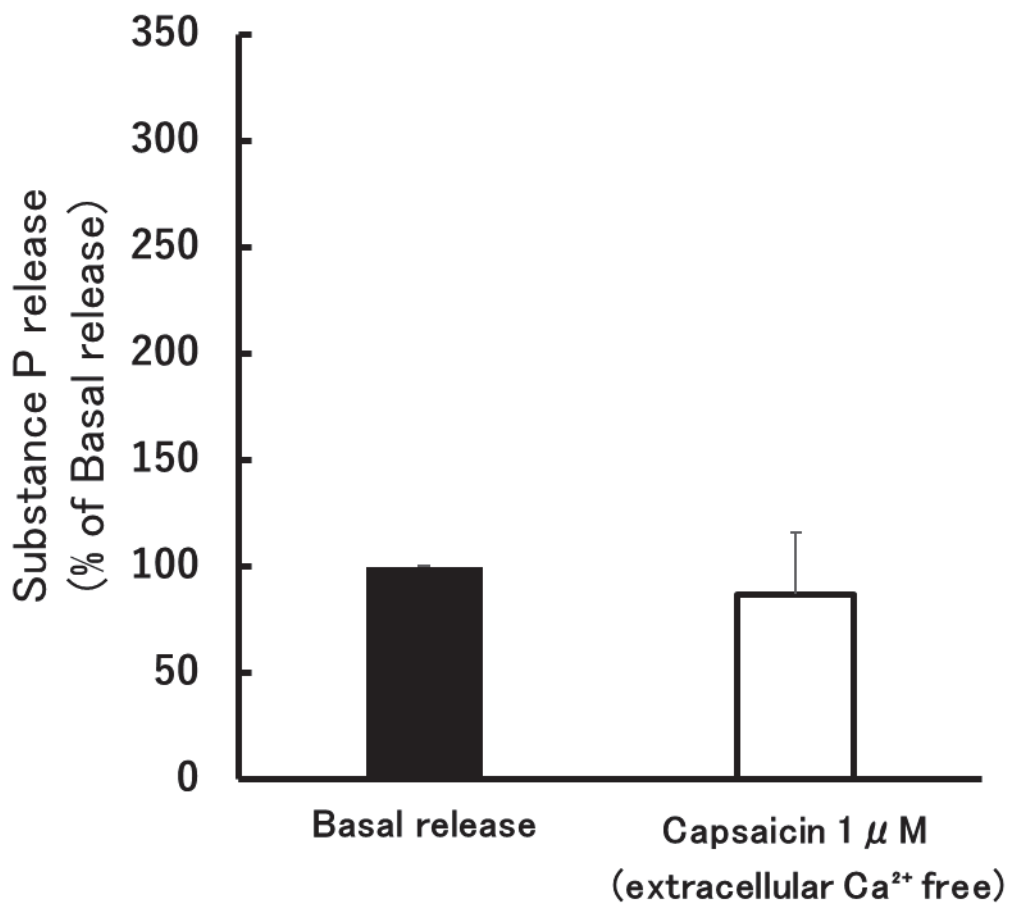
\* p < 0.05, Student's t test).





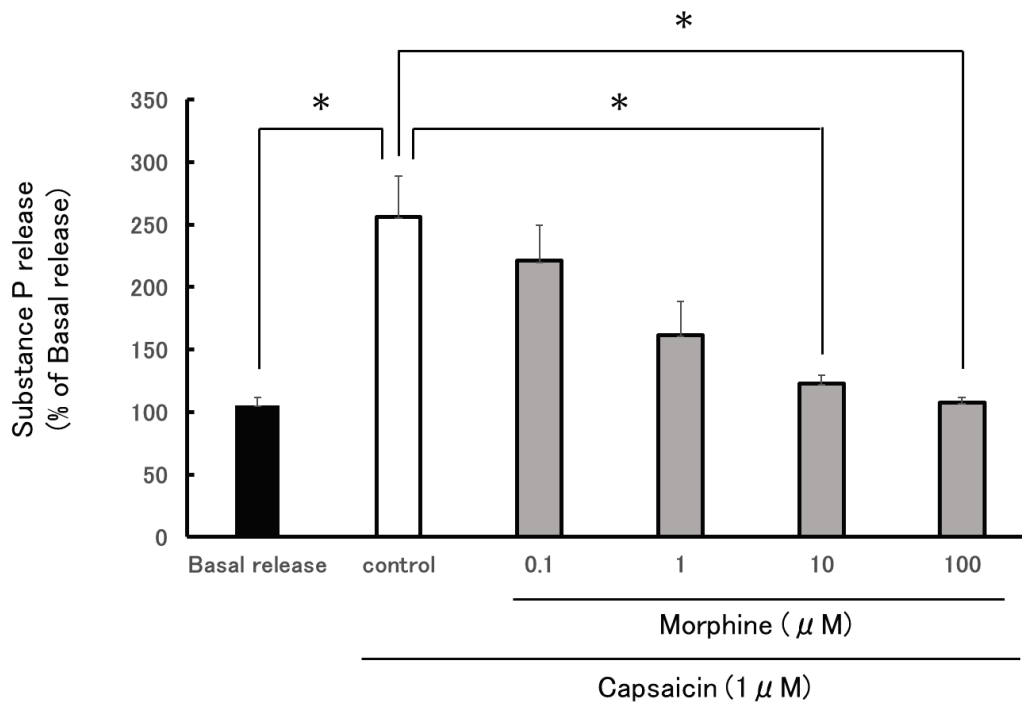
【図 2】 脊髄後角組織スライスにおけるサブスタンス P (SP) 遊離に及ぼす高濃度 K<sup>+</sup> 刺激の影響

50mM の高濃度 K<sup>+</sup> で刺激すると，SP 遊離量の有意な増加を認めた．各棒は，平均値 ± 標準誤差を示す (n = 5, \* p < 0.05, Student's t test)．

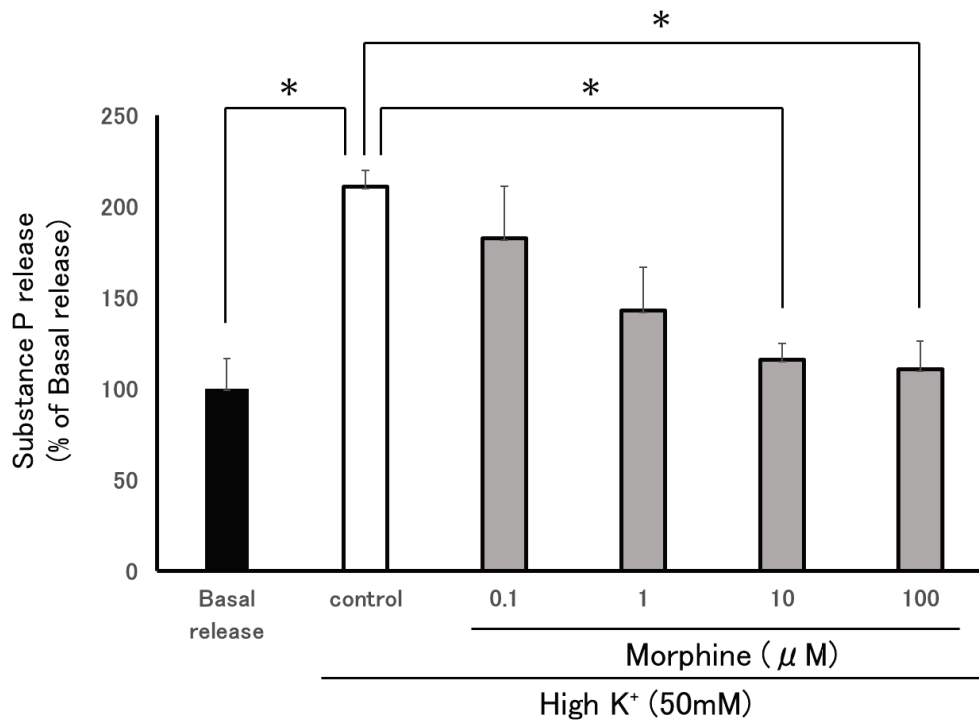


【図 3】 脊髄後角組織スライスにおけるサブスタンス P (SP) 遊離に及ぼす細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下での capsaicin 刺激の影響

1  $\mu$  M の capsaicin で刺激しても, SP 遊離量に変化を認めなかった. 各棒は, 平均値  $\pm$  標準誤差を示す (n = 5, Student's t test).

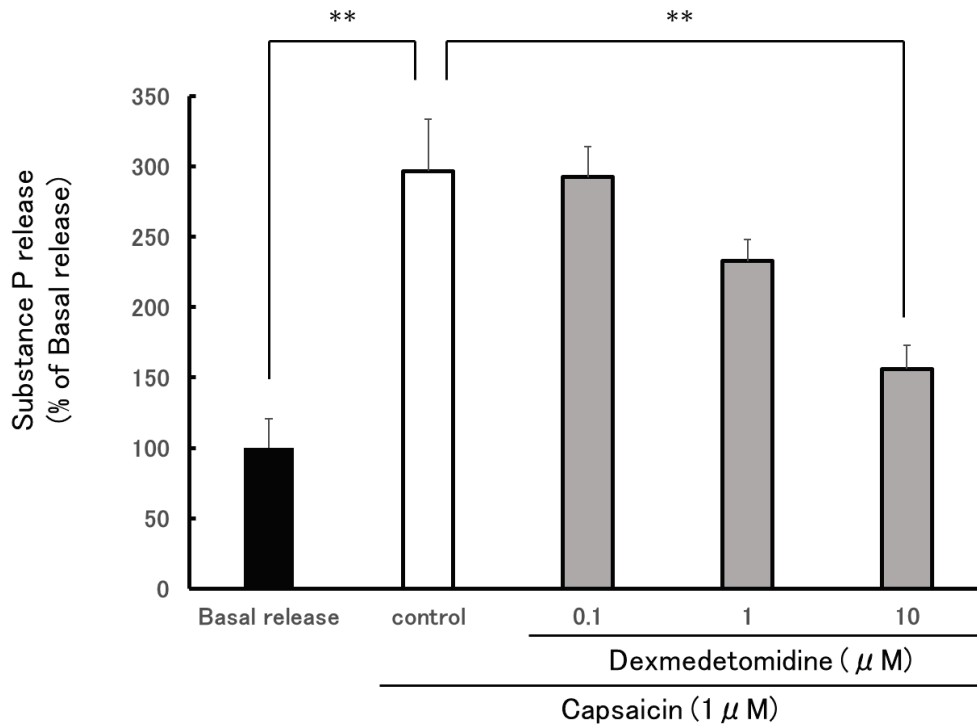


【図 4】 脊髄後角組織スライスにおける capsaicin 刺激サブスタンス P (SP) 遊離に及ぼすモルヒネの影響  
 脊髄後角組織スライスにおいて capsaicin 刺激により増大した SP 遊離量は，モルヒネにより有意に抑制された．各棒は，平均値±標準誤差を示す (n=5, \* p<0.05, One-way ANOVA with post-hoc by Tukey-Kramer test)．



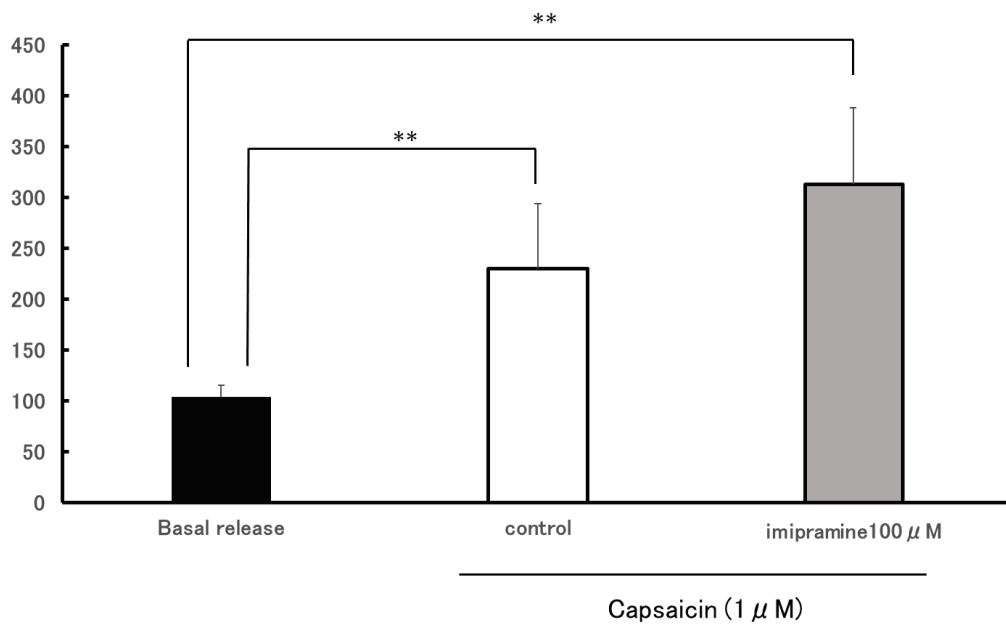
【図 5】 脊髄後角組織スライスにおける高濃度  $\text{K}^+$  刺激サブスタンス P (SP) 遊離に及ぼすモルヒネの影響

脊髄後角組織スライスにおいて高濃度  $\text{K}^+$  刺激により増大した SP 遊離量は，モルヒネ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 with post-hoc by Tukey-Kramer test)．



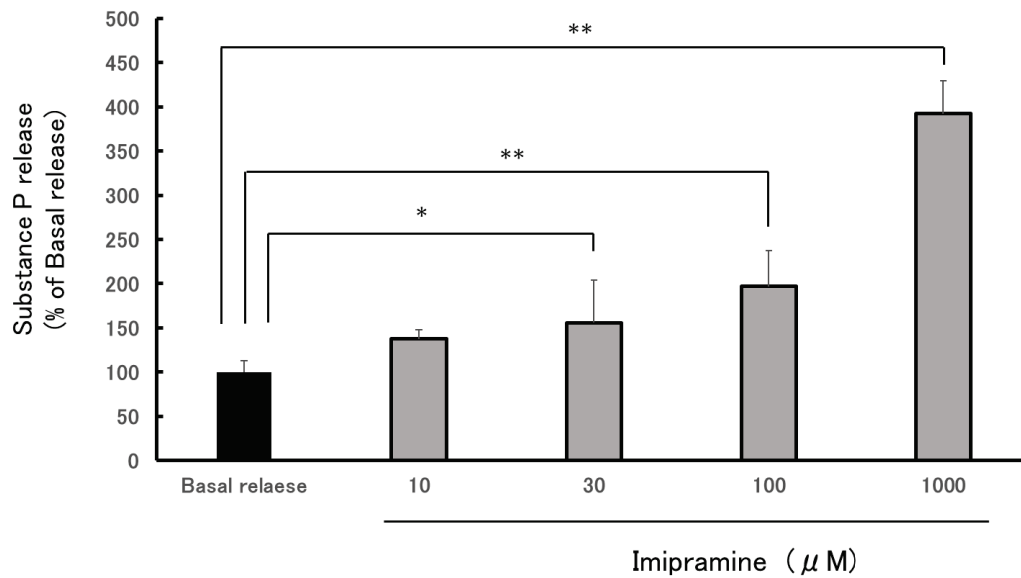
【図 6】 脊髄後角組織スライスにおける capsaicin 刺激サブスタンス P (SP) 遊離に及ぼすデクスメデトミジンの影響

脊髄後角組織スライスにおいて capsaicin 刺激により増大した SP 遊離量はデクスメデトミジンにより有意に抑制された。各棒は、平均値±標準誤差を示す (n=4-5, \* p<0.05, One-way ANOVA with post-hoc by Tukey-Kramer test)。



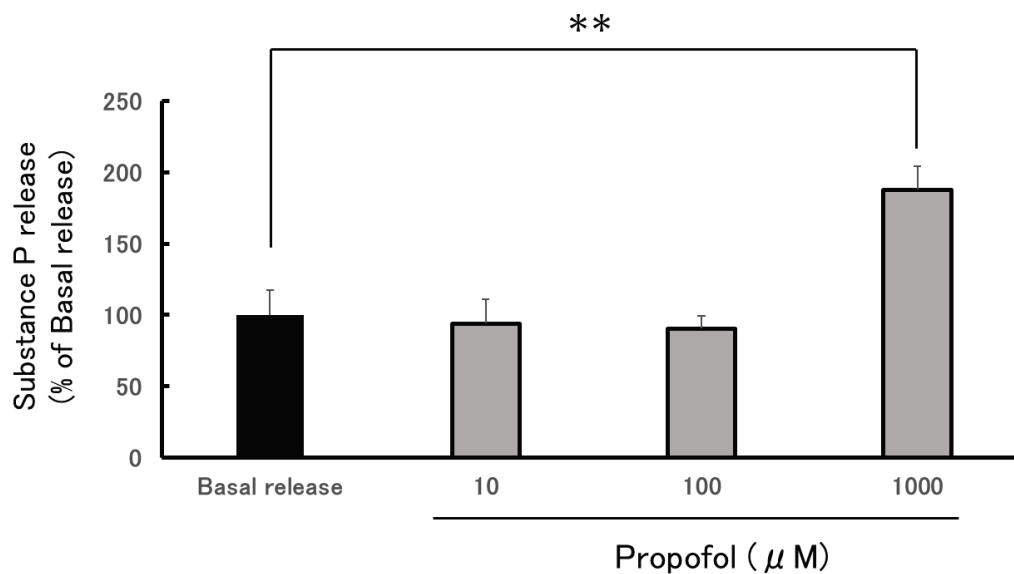
【図 7】 脊髄後角組織スライスにおける capsaicin 刺激サブスタンス P (SP) 遊離に及ぼすイミプラミンの影響

脊髄後角組織スライスにおいて capsaicin 刺激により増大した SP 遊離量は、イミプラミンによりさらに増大した。各棒は、平均値±標準誤差を示す (n=4-5, \*\* p < 0.01, Student's t test)。



【図 8】 脊髄後角組織スライスからのサブスタンス P (SP) 遊離に及ぼすイミプラミンの影響

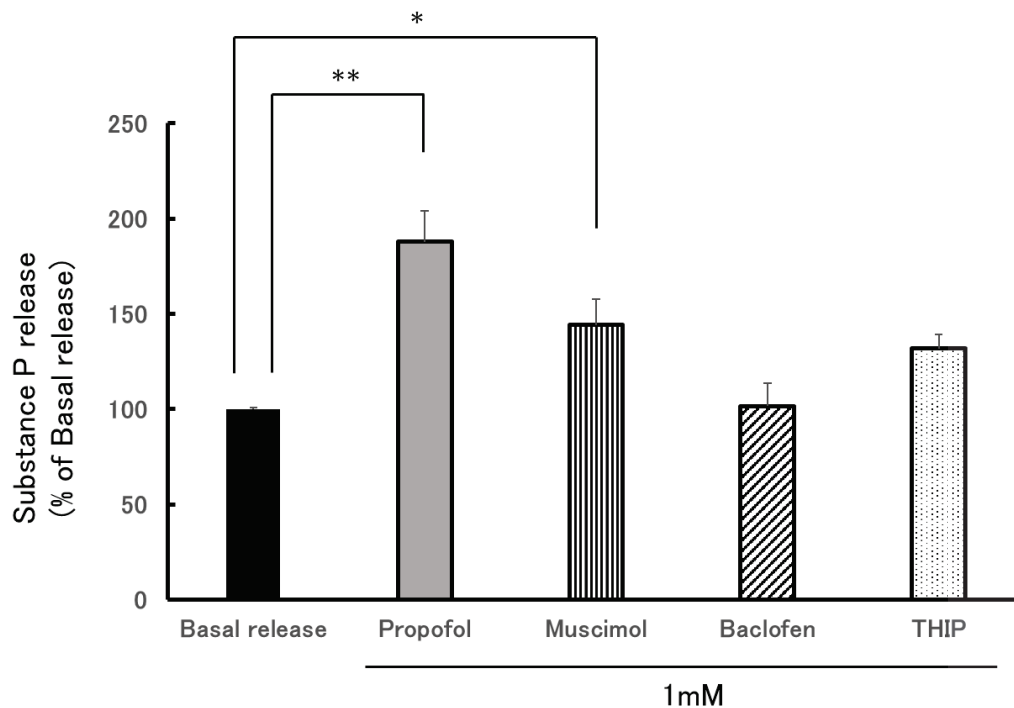
脊髄後角組織スライスにおいてイミプラミンは濃度依存性に SP 遊離量を増大させた。各棒は、平均値±標準誤差を示す (n=5)。\* p<0.05, \*\* p<0.01, One-way ANOVA with post-hoc by Dunnet test)。



【図 9】 脊髄後角組織スライスからのサブスタンス P (SP) 遊離に及ぼすプロポフォールの影響

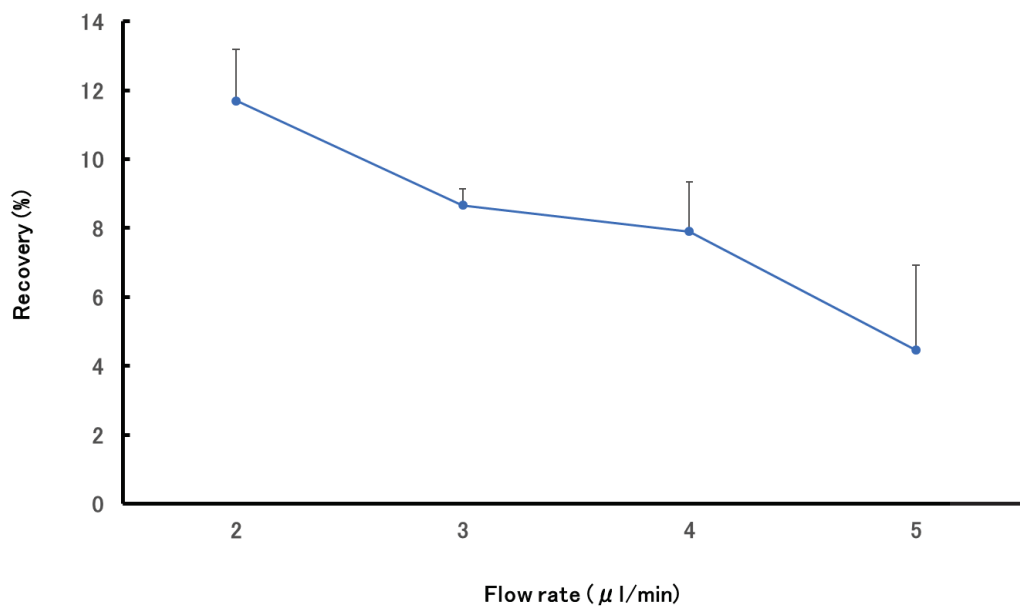
脊髄後角組織スライスにおいてプロポフォールは低濃度では SP 遊離量を変化させなかったが，高濃度では有意に SP 遊離量を増大させた．各棒は，平均値±標準誤差を示す (n=4-5)．\* p<0.05, \*\* p<0.01, One-way ANOVA with post-hoc by Dunnett test).





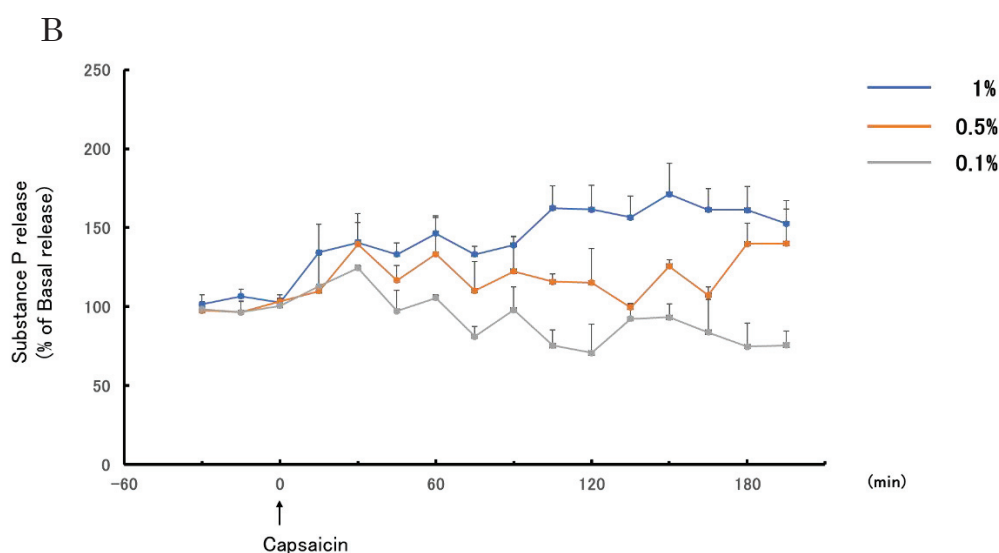
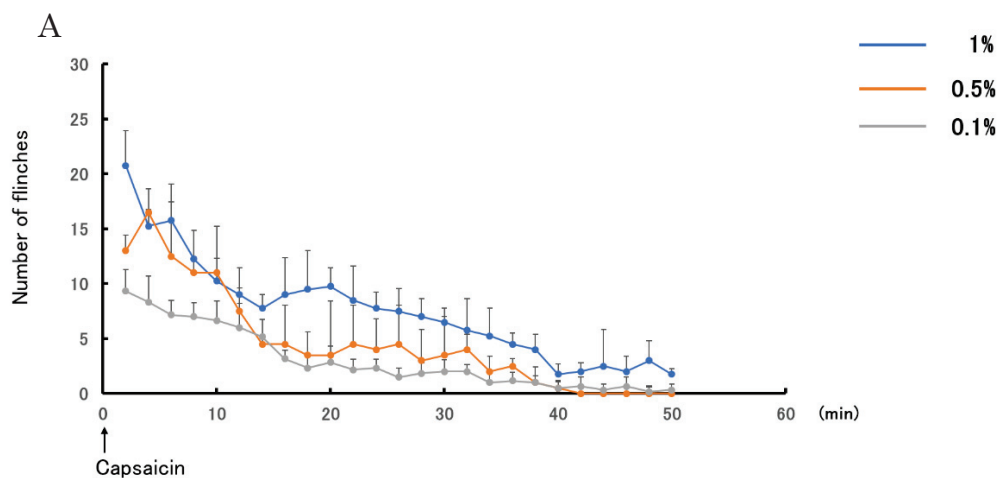
【図 10】 脊髄後角組織スライスからのサブスタンス P (SP) 遊離に及ぼす GABA 関連作動薬の影響

脊髄後角組織スライスにおいてプロポフォール及びムシモールは有意に SP 遊離量を増大させたが、バクロフェンと THIP は SP 遊離を変化させなかった。各棒は、平均値±標準誤差を示す (n=4-5. \* p<0.05, \*\* p<0.01, One-way ANOVA with post-hoc test by Dunnet test).



【図 11】 In vitro 下微小透析プローブによるサブスタンス P (SP) の回収率

濃度を  $1 \mu\text{g/mL}$  に調整した SP を注入したチューブに微小透析プローブを挿入し、 $2 \sim 5 \mu\text{L/min}$  で灌流して得られたサンプル内の SP 含有量と元のチューブに存在した SP 含有量を比較することにより回収率を算出した。各点は、平均値 ± 標準誤差を示す ( $n=3-4$ )。

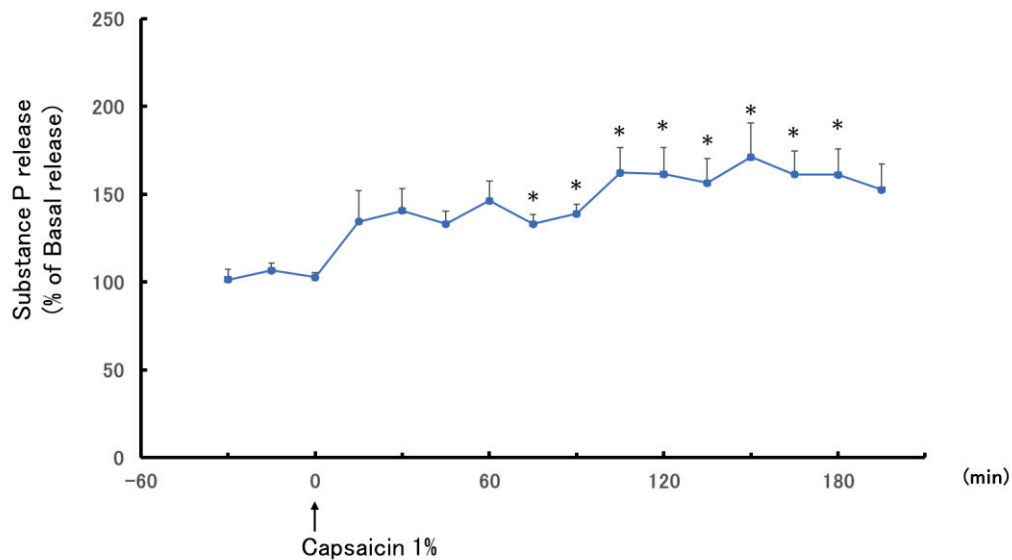


【図 12】 In vivo マイクロダイアリス下脊髄後角におけるサブスタンス P (SP) 遊離量に及ぼす capsaicin の影響

カプサイシン投与後の flinching 回数及び SP 遊離量を比較したところ共に濃度依存性に増大した。各点は、平均値±標準誤差を示す。(n=4-7)

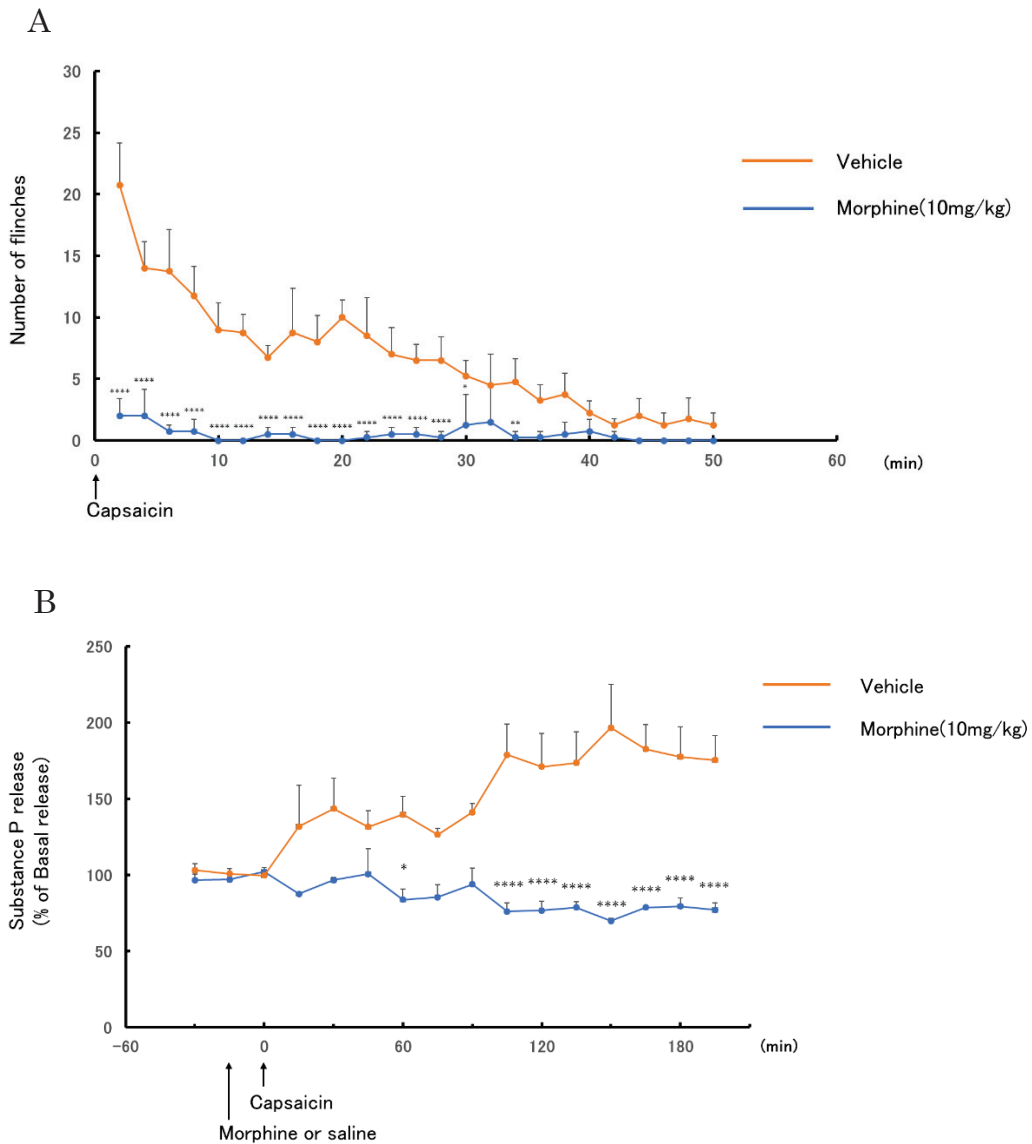
【A】 Capsaicin 皮下注射後の flinching 回数の変化を示す。

【B】 Capsaicin 皮下注射後の脊髄後角における SP 遊離量の変化を示す.



【図 13】 In vivo マイクロダイアリス下脊髄後角におけるサブスタンス P (SP) 遊離量に及ぼす 1% capsaicin の影響

Capsaicin 皮下注射直後から SP 遊離量は有意であった投与 75 分以降と同程度に増加傾向を示し、75 分以降有意となり 180 分後まで持続した。各点は、平均値 ± 標準誤差を示す (n = 7. \* p < 0.05, One-way ANOVA with post-hoc by Dunnet test).



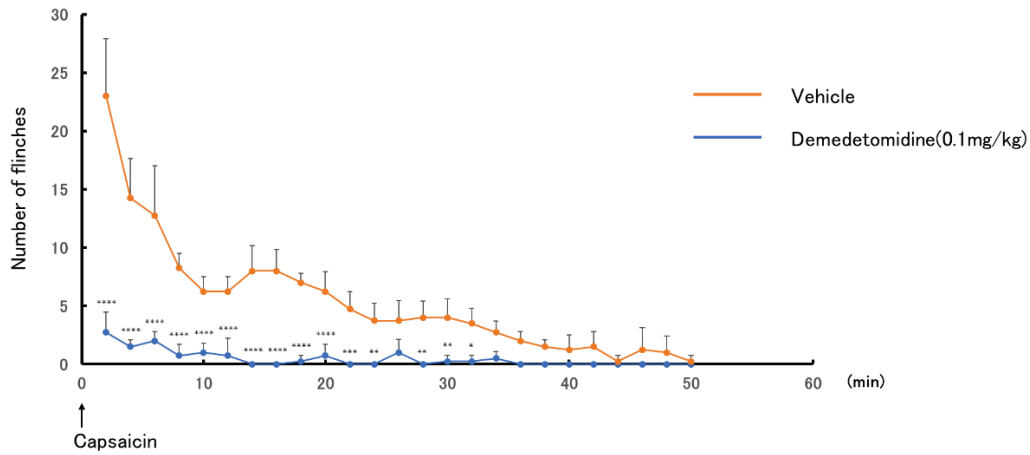
【図 14】 In vivo マイクロダイアリシス下 1% capsaicin 皮下注射による脊髄後角からのサブスタンス P (SP) 遊離量に及ぼすモルヒネ (10 mg/kg) の影響

モルヒネは, capsaicin 投与後 30 分間 vehicle 投与群と比較し有意に flinching 回数を抑制し, SP 遊離量も capsaicin 投与後 60 分と 105 分以降有意に抑制した. 各点は, 平均値±標準誤差を示す (n=4. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*\* p<0.001, Two-way Factorial ANOVA with post-hoc by Bonferroni test).

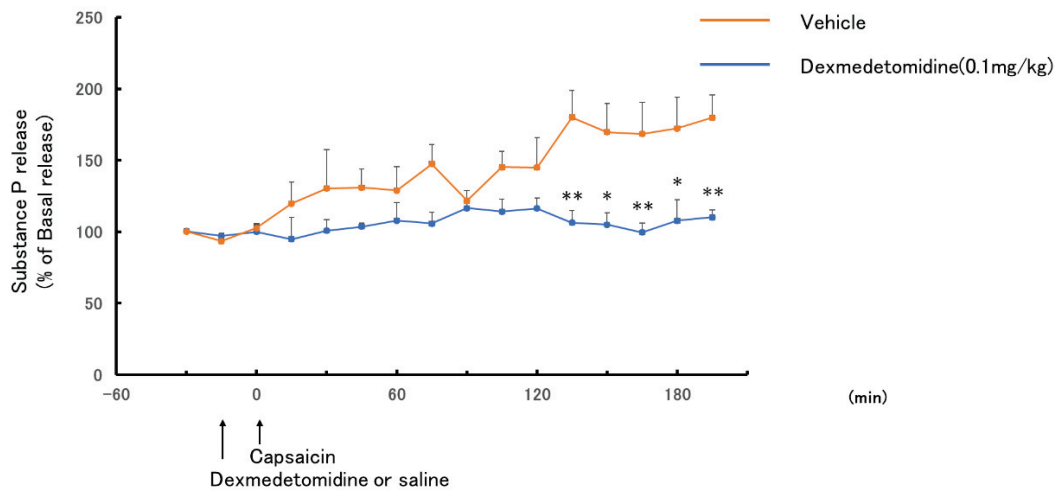
【A】モルヒネ皮下注射後の flinching 回数の変化を示す。

【B】モルヒネ皮下注射後の脊髄後角における SP 遊離量の変化を示す。

A



B



【図 15】 In vivo マイクロダイアリス下 1% capsaicin 皮下注射による脊髄後角からのサブスタンス P (SP) 遊離量に及ぼすデクスメドトミジン (0.1 mg/kg) の影響

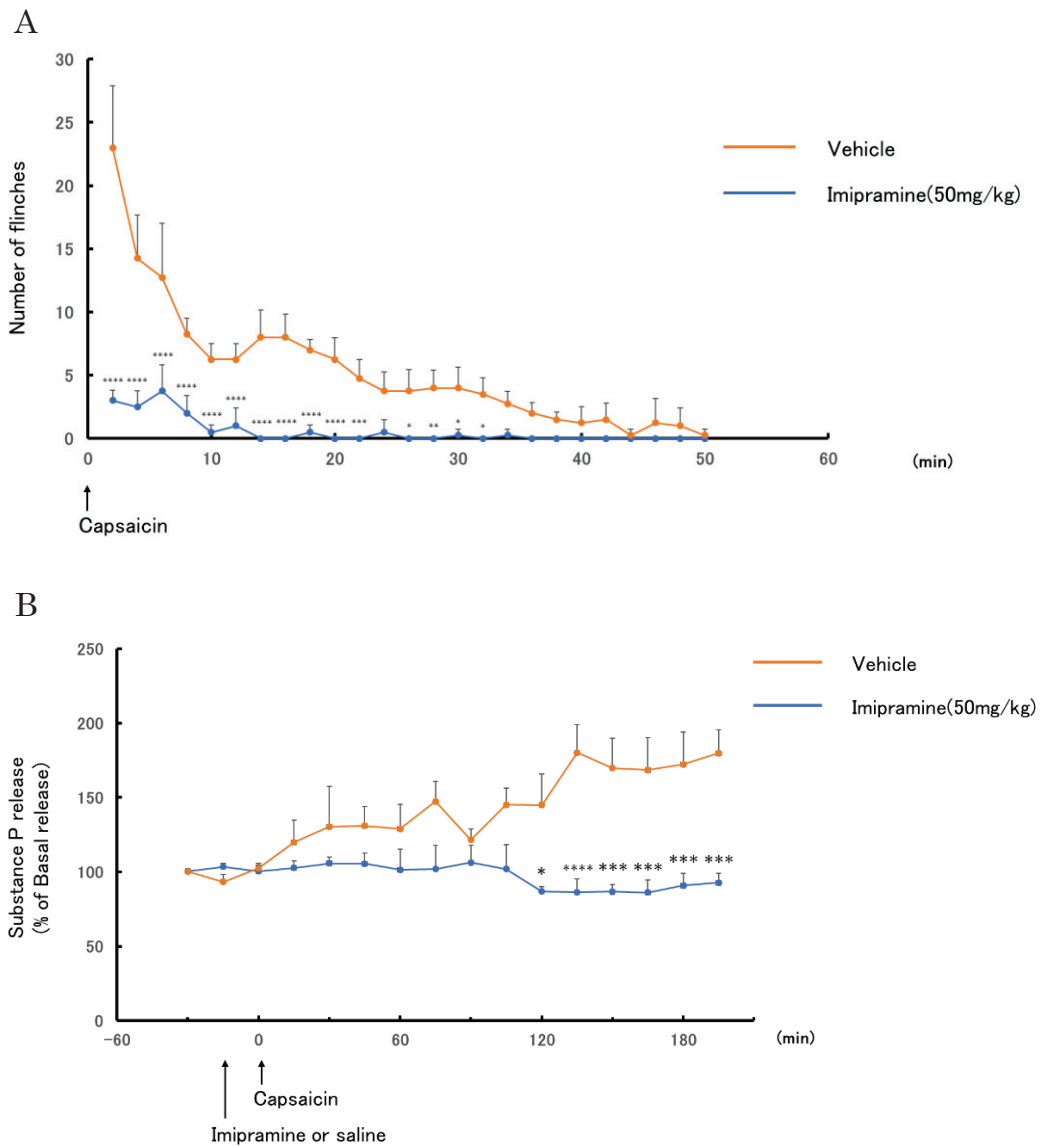
デクスメドトミジンは capsaicin 投与後 24 分間と 28-32 分間で vehicle 投与群と比較し有意に flinching 回数を抑制し, SP 遊離量も capsaicin 投与後 135 分以降有意に抑制した. 各点は, 平均値±標準誤差を示す (n = 4. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.005,



\*\*\*\*  $p < 0.001$ , Two-way Factorial ANOVA with post-hoc by Bonferroni test).

【A】デクスメデトミジン腹腔内注射後の flinching 回数の変化を示す.

【B】デクスメデトミジン腹腔内注射後の脊髄後角における SP 遊離量の変化を示す.



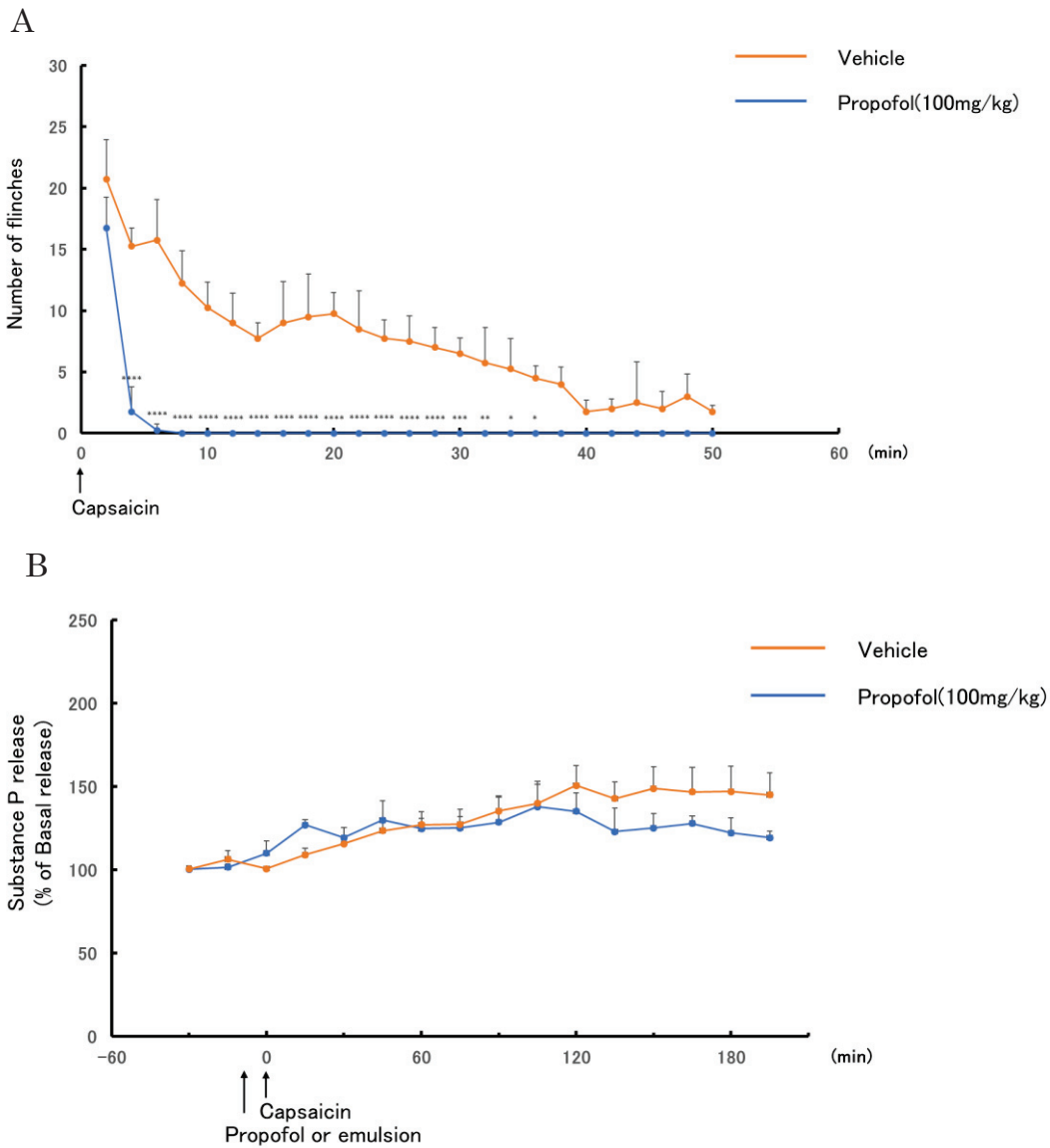
【図 16】 In vivo マイクロダイアリシス下 1% capsaicin 皮下注射による脊髄後角からのサブスタンス P (SP) 遊離量に及ぼすイミプラミン (50 mg/kg) の影響

イミプラミンは capsaicin 投与後 vehicle 投与群と比較し 32 分間有意に flinching 回数を抑制し, SP 遊離量も capsaicin 投与後 120 分以降で有意に抑制した. 各点は, 平均値 ± 標準誤差を示す (n = 4. \* p < 0.05, \*\*

$p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*\*  $p < 0.001$ , Two-way Factorial ANOVA with post-hoc by Bonferroni test).

【A】イミプラミン腹腔内注射後の flinching 回数の変化を示す.

【B】イミプラミン腹腔内注射後の脊髄後角における SP 遊離量の変化を示す.



【図 17】 In vivo マイクロダイアリシス下 1% capsaicin 皮下注射による脊髄後角からのサブスタンス P (SP) 遊離量に及ぼすプロポフォール (100 mg/kg) の影響

プロポフォールは capsaicin 投与直後 2 分間 vehicle 投与群と比較し flinching 回数を変化させなかったが、4 分後以降は有意に抑制した。一方、SP 遊離量は全く抑制しなかった。各点は、平均値 ± 標準誤差を示す (n =

4. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ , \*  
\*\*\*  $p < 0.001$ , Two-way Factorial ANOVA with  
post-hoc by Bonferroni test).

【A】プロポフォール腹腔内注射後の flinching 回数  
の変化を示す.

【B】プロポフォール腹腔内注射後の脊髄後角における  
SP 遊離量の変化を示す.