

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19591777

研究課題名（和文） 急性ストレス時の鎮痛反応におけるニューロステロイドの役割

研究課題名（英文） Effects of Neurosteroids on Stress induced Analgesia

研究代表者

福田 妙子（FUKUDA TAEKO）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：40228911

研究成果の概要：

急性ストレス後に生ずる鎮痛作用は、Stress induced Analgesia (SIA)として以前から知られているが、メカニズムは解明されていない。本研究の目的は、このメカニズムにニューロステロイドが関与するか調査することと、その鎮痛作用を今後臨床応用できるか検討することである。出血性ショックから回復させたラットの脳脊髄神経を免疫染色したところ、中脳より上の上位中枢でニューロステロイド産生細胞の活動が活発化していることが判明した。アロプレグナロン（ニューロステロイドの1種）をラットに投与すると鎮痛作用を示したが、この作用における副腎皮質ホルモン増減の影響は少なかった。以上まとめると、SIAにニューロステロイドが関与している可能性はあるが、単独使用での鎮痛作用は十分とは言えず古典的ステロイドホルモンの影響も少なかったため、今後鎮静薬併用などの研究が必要と考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：疼痛治療学

1. 研究開始当初の背景

我々は急性ストレスの1つとして出血性ショックのモデルをラットで作成し、ショック後の疼痛反応の変化とその影響因子について検討してきた。その結果、出血性ショックにな

った場合、輸血によってショックから回復しても疼痛反応はしばらく低下することが判明した (Fukuda et al. Anesth & Analg 93:424-429, 2001)。またこの疼痛反応の低下はナ

ロキソンの前投与では変化しないことから、内因性のオピオイドの影響は少ないことが分かった (Fukuda et al. *Reg Anesth Pain Med* 30:339-343, 2005)。さらに、あらかじめ副腎を片方破壊しておく副腎皮質ホルモンの分泌反応の低下が起こり同時にショック後の疼痛反応の変化が消失することから、この現象と副腎皮質ホルモンとの関連が強く示唆された。

一方、1999年 Baulieu (*Contemporary Endocrinology* pp1-377) や Mensah-Nyagan ら (*Pharmacol Rev* 51:63-81, 1999) の発表以降ステロイドホルモンは末梢の内分泌腺ばかりではなく脊椎動物の神経組織でも合成されることが明らかとなり、末梢内分泌腺の産生する従来の「古典的ステロイド (classical steroids)」とは異なるこの「ニューロステロイド (neurosteroids)」の働きが注目されるようになってきた。このニューロステロイドは、神経細胞とグリア細胞の両方で産生され、現在までのところ神経細胞の発達期にはゲノミック作用を示すが、その後はシナプス情報伝達の調節など非ゲノミック作用を示すことが明らかにされつつある (King et al. *J Neurosci* 22:10613-620, 2002)。おそらく、ニューロステロイドは、認識能力・学習・記憶・性行動など多岐にわたる中枢神経機能に関与し、その障害は痴呆・てんかん・うつなど様々な病態と結びつくものと推測されている。ただし、ニューロステロイドの最も重要な合成酵素 (チトクロームP450 side chain cleavage:チトクロームP450 scc) は知覚神経の伝達経路に多く分布しているため疼痛コントロールにも深く関与しているものと考えられる (Patte-Mensah et al. *J Neurochem* 86:1233-1246, 2003)

2. 研究の目的

本研究の目的は、急性ストレス時に変化す

る生体の疼痛反応に対してニューロステロイドがどのような関わりをもつのか調査し、急性痛一般の治療に応用可能かどうか検討することである。

今回我々は、前述の出血性ショックモデルにおいてニューロステロイドの合成が高まっているかどうかを、抗チトクロームP450 scc抗体と抗c-fos抗体を使用した二重免疫染色法で調べる。また、副腎皮質で産生される古典的ステロイドホルモンがニューロステロイドの産生に影響するかどうかを検討する目的で、予め副腎を破壊したラットで出血性ショックがニューロステロイドの合成を高めるか検討する。さらに、これらの実験で古典的ステロイドホルモンがニューロステロイドの産生に関与することが判明した場合には、出血性ショックなどの特別なストレスがかからない通常の状態においてもストレス時に発揮されるような鎮痛機構を稼働させることが可能かを検討する目的で以下の実験を行う。すなわち過去に行われたニューロステロイドの鎮痛反応の実験を追試するとともに、ニューロステロイドとコルチコステロンの同時投与あるいは副腎破壊前処置を行ったラットにニューロステロイドを投与して同様の追試を行う。

3. 研究の方法

(平成19年度)

(1) 出血性ショックモデルにおいてニューロステロイドを持つ神経あるいはグリア細胞の活動上昇が見られるかどうかを確認する。

① 免疫組織染色の条件確立

対象：9週齢雄のSprague-Dawley ラット12匹 (無操作対照群、ホルマリン・テスト群)

ラットの後肢に10%ホルマリン溶液0.1mlを注射し、2時間後に脳脊髄神経を採取。

パラフィン切片を作成し、最適なc-fosとチトクロームP450_{scc}抗体の選択と染色条件を確立する

② ニューロステロイド産生細胞の活動性の検討

対象：9週齢雄のSprague-Dawley ラット12匹（対照群、出血性ショック群）

出血性ショックモデルの作成：

麻酔下に、大腿動脈にカテーテルを留置し保護用ワイヤーとともに頭部に固定する。24時間後、出血性ショック群ではカテーテルから脱血して平均血圧を60mmHgに30分間保った後、保存しておいた血液を戻す。対照群では脱血は行わず同じ時刻に血圧と心拍数の測定のみを行う。

二重免疫組織染色：

対照群、出血性ショック群ともに安楽死させ、開胸して左室から大動脈にカテーテルを入れる。コルチコステロン濃度測定用の血液4ccを採血後、全身を灌流固定し脳脊髄神経を採取。チトクロームP450_{scc}とc-fosの抗体を用いてABC method で免疫組織染色を行う。脊髄後角、赤核、背側赤核、視床、大脳皮質感覚野などで、チトクロームP450_{scc}陽性細胞とc-fos陽性細胞数を測定して陽性率すなわちニューロステロイド産生細胞の活動性を比較する。

(2) コルチコステロン濃度の低下が、ニューロステロイドの合成に影響を与えるか検討する。

対象：9週齢雄のSprague-Dawley ラット24匹（対照群、出血性ショック群、副腎破壊対照群、副腎破壊出血性ショック群）

副腎破壊モデルと出血性ショックモデルの作成：

麻酔下に全てのラットの大腿動脈にカテーテルを留置し保護用ワイヤーとともに頭部に固

定する。副腎破壊群ラットでは、後腹膜アプローチで副腎を露出し、片側の副腎を電気メスで焼却処理する。非副腎破壊群では、背部に皮膚の切開のみをおこなう。麻酔回復から24時間後、出血性ショック群ではカテーテルから脱血して平均血圧を60mmHgに30分間保った後、ヘパリンを加えて保存しておいた血液を戻す。非ショック群では脱血は行わず同じ時刻に血圧と心拍数の測定のみを行う。

ニューロステロイド産生細胞の活動性の検討：

全てのラットを安楽死させ、開胸して左室から大動脈にカテーテルを入れる。

コルチコステロン濃度測定用の血液4ccを採血後、全身を灌流固定する。脳脊髄神経を取り出し、パラフィン切片を作成する。チトクロームP450_{scc}とc-fosの抗体を用いてABC method で二重免疫組織染色を行う。脊髄後角、赤核、背側赤核、視床、大脳皮質感覚野など各領域で、チトクロームP450_{scc}陽性細胞とc-fos陽性細胞数を測定して陽性率すなわちニューロステロイド産生細胞の活動性を比較する

(平成20年度)

非ストレス時にもストレス時と同様の鎮痛機構を起動させることが可能かどうかを検討する。

(1) 過去に行われたニューロステロイドの鎮痛反応の実験の追試

追試対象論文：Nadeson R. et al. Pain 2000, 88:31-39

対象：9週齢雄のSprague-Dawley ラット24匹（対照群、Alphadolone投与群）。

尾におけるElectrical current threshold test (ECT) tail flick latency test (TFL)の測定を5分毎に3回行う。生理食塩水あるいは、Alphadolone 0.6、6、60mg/kg を腹腔内投与する。30分後から5分毎にECT とTFLの測定を10回行う。

(2) ニューロステロイドの鎮痛効果に対する副腎破壊前処置の検討

対象：9週齢雄のSprague-Dawley ラット24匹。(生食・副腎非破壊群、Alphadolone投・副腎非破壊群、生食・副腎破壊群、Alphadolone・副腎破壊群)

ペントバルビタール麻酔下に背部から後腹膜アプローチで副腎を露出し、片側の副腎を電気メスで焼却処理する。非副腎破壊群では、背部に皮膚の切開のみをおこなう。24時間後、尾におけるElectrical current threshold test (ECT) TFLの測定を5分毎に3回行う。Alphadolone投与群のラットには、実験[1]で求めた適当量のAlphadoloneを腹腔内投与する。30分後から5分毎にECTの測定を10回行う。

(3) ニューロステロイドの鎮痛効果に対するコルチコステロン投与の検討

対象：9週齢雄のSprague-Dawley ラット18匹(対照群とコルチコステロン少量投与群、大量投与群)。尾におけるElectrical current threshold test (ECT) TFLの測定を5分毎に3回行う。生理食塩水またはコルチコステロンと実験(1)で求めた適当量のAlphadoloneを腹腔内投与する。30分後から5分毎にECT TFLの測定を10回行う。

4. 研究成果
(平成19年度)

出血性ショック後には、後根神経節・脊髄後角あるいは延髄・中脳の疼痛抑制系神経細胞よりも、海馬・分界条床核・室傍核など上位

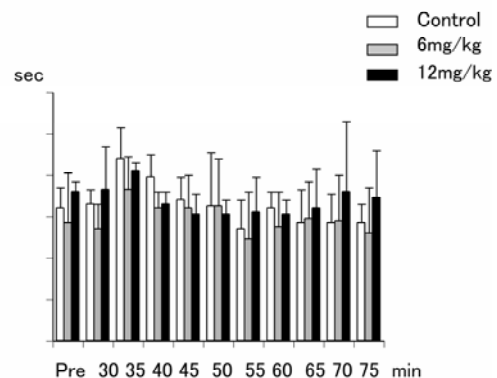
中枢において大きな活動性の変化が生じていた。また、活動の確認された神経細胞の多くはニューロステロイド産生細胞であることから、出血性ショックにおいては脳内においてもステロイドホルモン産生が亢進することが推測された。一方、今回の結果のみでは、片側の副腎破壊による影響は明確ではなかった。

(平成20年度)

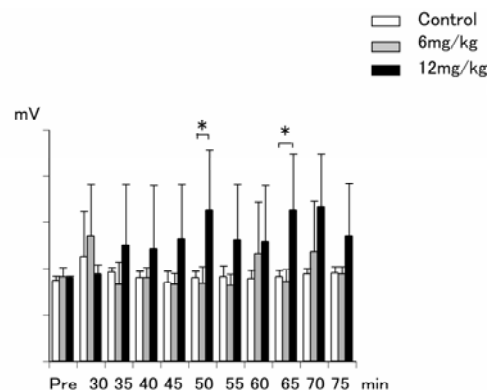
Alphadolone は、販売中止で入手困難であったため、Alopregnanolone を使用して実験を行った。

(1) 過去に行われたニューロステロイドの鎮痛反応の実験の追試

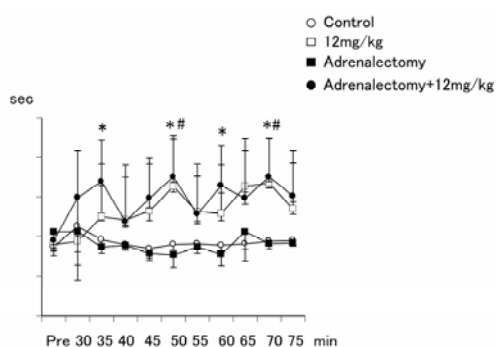
下図は熱刺激に対する反応(TFL)の結果である。いずれの時点でも有意差は無かった。



一方、電気刺激に対する反応(ECT)は12mg/kg群で有意に延長したので、以後の実験(2)(3)ではAlopregnanolone 12mg/kgを使用した。

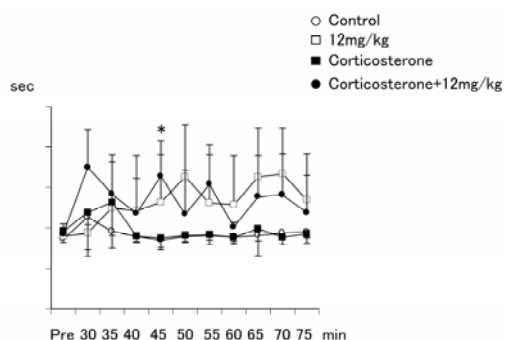


(2) ニューロステロイドの鎮痛効果に対する副腎破壊前処置の検討



図は電気刺激に対する反応速度である。
Alopregnanolone 12mg/kg の投与は反応速度を延長しているが、片側の副腎破壊前処置の影響は受けていない。

(3) ニューロステロイドの鎮痛効果に対するコルチコステロン投与の検討



図は電気刺激に対する反応速度である。
Alopregnanolone 12mg/kg の投与は反応速度を延長しているが、副腎皮質ホルモンの同時投与の影響は受けていない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 妙子 (FUKUDA TAEKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：40228911

(2) 研究分担者

久野 節二 (HISANO SETZUJI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：70136216

(3) 連携研究者

なし