

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791068
 研究課題名(和文)神経因性疼痛にミクログリアの活性酸素生成能・貪食はどうかかわるのか

研究課題名(英文)The influence of analgesic adjuvants on the oxidative burst and phagocytosis of microglial cells

研究代表者

野田 祐紀子 (NODA YUKIKO)
 九州大学・大学病院・助教
 研究者番号：10404021

研究成果の概要：

神経障害性疼痛に有効とされている鎮痛補助薬(三環系抗うつ薬、抗けいれん薬、NMDA 受容体拮抗薬)が、マクロファージの貪食と活性酸素生成に与える影響を調べた。マウスマクロファージ細胞において、アミトリプチリン、イミプラミンは、活性酸素生成を著明に抑制し、高濃度では貪食も抑制した。ガバペンチンは、貪食能は抑制しないが、活性酸素生成を抑制した。MK-801 は、貪食抑制はわずかであるが、高濃度で活性酸素生成を著明に抑制した。ミクログリアはマクロファージ由来細胞と考えられており、鎮痛補助薬の作用機序として障害をうけた神経細胞周囲でのミクログリアによる貪食と活性酸素産生を抑制し、その結果神経障害性疼痛を軽減させている可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	450,000	3,350,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：神経因性疼痛、ミクログリア、活性酸素、貪食

1. 研究開始当初の背景

神経に障害がおこった場合、「アロディニア(異痛症)」と呼ばれる、通常は痛みとは感じられないような刺激(手で軽く触れる、洋服がすれる)が、痛みとして感じられる症状が現れることがある。

近年、ミクログリアという中枢神経系に存在するグリア細胞に発現する ATP 受容体(P2X₄ 受容体)を阻害することでアロディニアが改善されることが報告されている。

ミクログリアはニューロンに異常が起こる

と、ニューロンの修復を促進する成長因子を放出する。また、死んでしまったニューロンなどを貪食して、脳内を清掃する役目もある。

しかし、免疫細胞としてのミクログリアの働きは諸刃の剣でもある。腫瘍細胞や細菌を殺すためのサイトカインやタンパク分解酵素、活性酸素種は時として、正常なニューロンに障害を与えてしまうこともある。

アルツハイマー病の患者では、原因物質とされるアミロイド蛋白質(A β)の沈着をミクログリアが除去しているが、一方ミクログリアが活性化しすぎることにより、周囲の

神経細胞を障害し認知症を引き起こしているという説もある。

ミクログリアはマクロファージ由来の細胞と考えられており、貪食能や活性酸素生成能を有する。

今回は、神経因性疼痛に有効とされる各種鎮痛補助薬が、マクロファージの貪食能および活性酸素生成能にどう影響するのかを調べた。

2. 研究の目的

今回私は、神経因性疼痛に有効とされる各種鎮痛補助薬が、マクロファージの貪食能および活性酸素生成能にどう影響するのかを調べた。我々麻酔科ペインクリニックの視点から、硬膜外腔に投与することでミクログリアの活性化を抑制し、アロディニアの予防・治療ができる薬物を明らかにすることが目的である。ミクログリアの活性化を抑制する薬剤が明らかになれば、その薬剤を用いて神経ブロックを施行することで障害を受けた神経に最も近い部位に薬を投与することができる。選択的に神経の近くに薬物を投与することで、効果を最大限にし、副作用を最小限に抑えることができる。

3. 研究の方法

当初はミクログリア細胞を用いて実験を行う予定であったが、いろいろと条件を工夫してみたものの購入したミクログリア細胞の培養がうまくいかなかった。ミクログリアはマクロファージ由来細胞と考えられるため、代替として RAW 276.4 (マウスマクロファージ培養細胞) を使用した。

各種鎮痛補助薬で前処理した RAW 276.4 細胞で貪食能および活性酸素生成能の変化を調べた。鎮痛補助薬は、以下の4種類を使用した。

- MK-801 (NMDA 受容体拮抗薬)
- ガバペンチン (抗けいれん薬)
- アミトリプチリン (三環系抗うつ薬)
- イミプラミン (三環系抗うつ薬)

(1) 貪食および活性酸素産生能の評価

食細胞機能検査用マイクロビーズ®(鎌倉テクノサイエンス社) を使用した。

このマイクロビーズはルミノールを結合したアクリル系ポリマー微粒子であり、食細胞に貪食されたのち、細胞内の活性酸素と反応し化学発光する。

RAW 細胞 2×10^5 cells に各種鎮痛補助薬 (10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M) を加えたのちマイクロビーズ液 5 μ l を加えて混合し、ルミノメーターで発光強度をカウントし、発行強度を比較した。

(2) 貪食能のみの評価

食作用を定量するため、Molecular probes社のVybrant®ファゴサイトーシスアッセイキットを使用した。

食細胞を各種鎮痛補助薬 (10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M) と共に2時間インキュベートしたのち、緑色蛍光BioParticles®と共に2時間インキュベートした。取り込まれなかったBioParticles®の蛍光をトリバンプルーを添加して消光した後に、細胞内に取り込まれたBioParticles®の蛍光をマイクロプレートリーダーで測定し比較した。

4. 研究成果

マウスマクロファージ細胞において、アミトリプチリン、イミプラミンは、活性酸素生成を著明に抑制し、100 μ M 以上では貪食も抑制した。ガバペンチンは、貪食能は抑制しないが、活性酸素生成を抑制した。

MK-801 は、貪食抑制はわずかであるが、高濃度で活性酸素生成を著明に抑制した。(次頁グラフ 1, 2 参照)

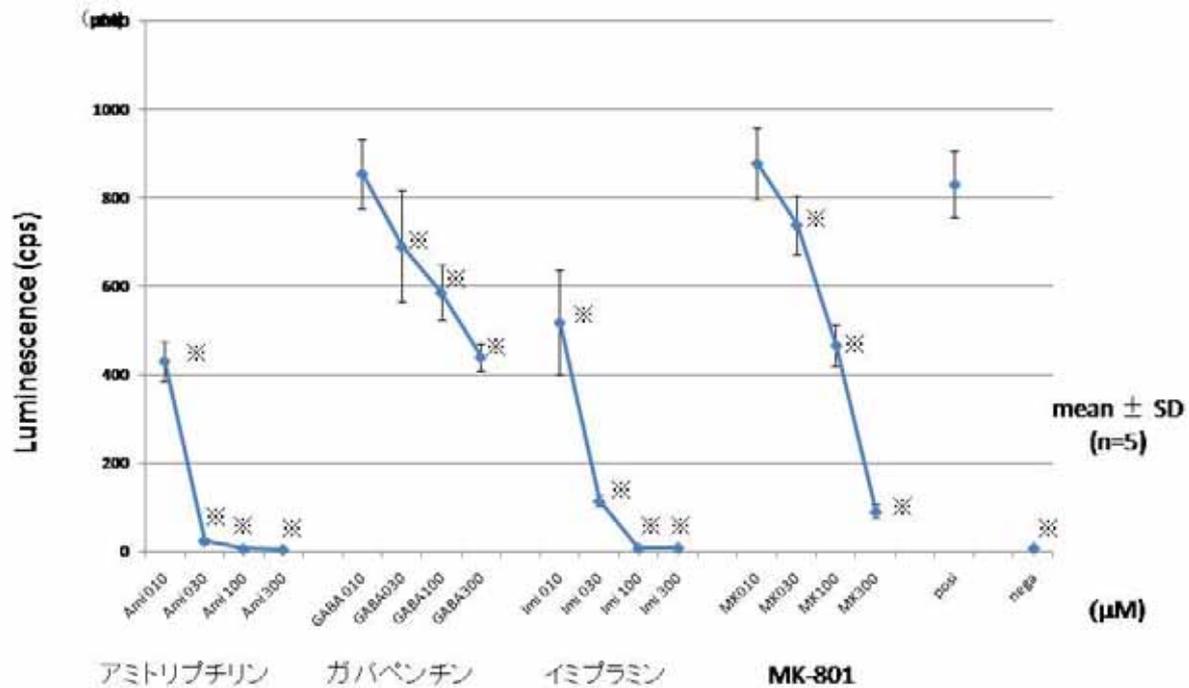
従来 NMDA 受容体拮抗薬の作用機序は興奮性シナプス伝達の遮断と考えられており、三環系抗うつ薬の作用機序はセロトニンやノルアドレナリンの再取り込み阻害による下行性抑制経路の賦活と考えられている。今回、鎮痛補助薬にマクロファージの貪食、活性酸素産生を抑制する効果があることが示唆された。

ミクログリアはマクロファージ由来細胞と考えられており、障害をうけた神経細胞周囲でのミクログリアによる貪食、活性酸素産生が鎮痛補助薬により抑制され、その結果神経障害性疼痛を軽減させるという機序が働いている可能性が考えられた。

またうつ病では炎症反応が促進され、CRP や炎症性サイトカイン (IL-6, TNF-) の産生が亢進する。抗うつ薬はこのような炎症反応を抑制するといわれている。今回の結果より、抗うつ薬 (アミトリプチリン、イミプラミン) は、マクロファージの貪食能および活性酸素生成能を抑制することにより、抗炎症効果を示す可能性が示唆された。今回の結果は、三環系抗うつ薬の抗炎症作用のあらたなメカニズム解明という点からも非常に重要な意味を持つと思われる。

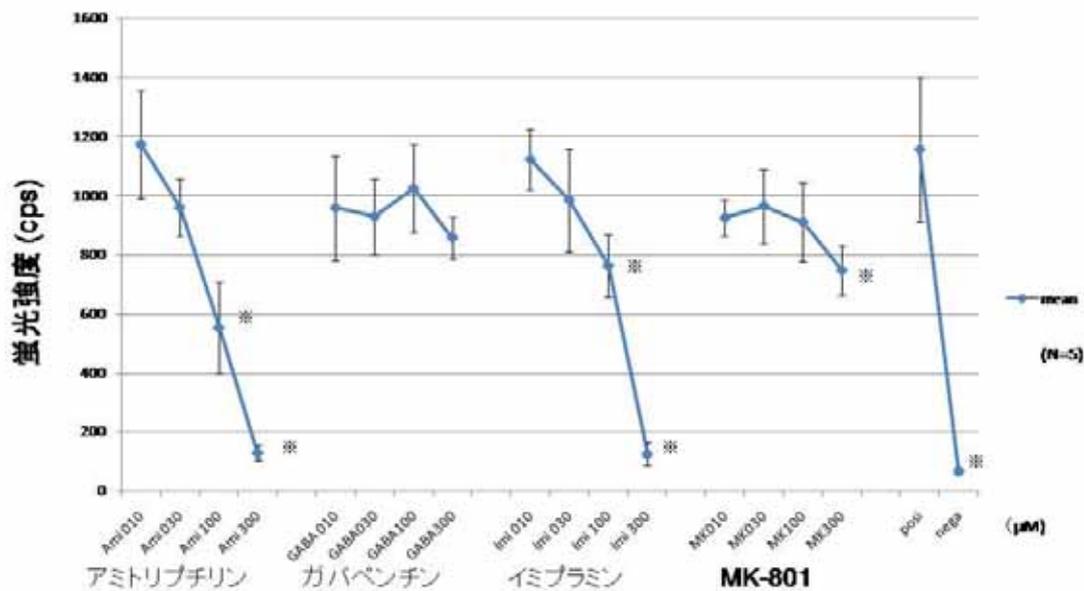
鎮痛補助薬がマクロファージの貪食能および活性酸素生成能を抑制するという今回の結果は、国内外でも初めてのデータでありインパクトのあるものであると思われる。

グラフ1 貪食および活性酸素産生能



※ Positive controlと有意差あり (p値<0.05)

グラフ2 貪食能



※ Positive controlと有意差あり (p値<0.05)

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)

[学会発表](計1件)

野田祐紀子、安田哲二郎、外須美夫. マクロファージの活性酸素産生に対する鎮痛補助薬の影響. 日本麻酔科学会第56回学術集会. 神戸. 2009年5月.

6. 研究組織

(1)研究代表者

野田 祐紀子 (NODA YUKIKO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 10404021

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし