

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：19K18265

研究課題名（和文）下行性抑制系のセロトニン経路に対するガバペンチンの作用の解明

研究課題名（英文）Effect on the descending pain inhibitory serotonergic pathway in the analgesic effect of gabapentin on neuropathic pain model rats.

研究代表者

柳村 春江 (Yanagimura, Harue)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：80814897

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ガバペンチン（GBP）が下行性疼痛抑制系のセロトニン経路に対して与える影響について、神経障害性モデルラットを用いて検討した。モデルラットにGBPを投与すると、痛み刺激に対する逃避閾値の改善が認められたが、その効果はセロトニン受容体拮抗薬の投与により拮抗された。しかし、セロトニンを枯渇させたモデルラットでもGBPの鎮痛効果は認められ、セロトニン受容体拮抗薬を投与しても変化は見られなかった。GBPはセロトニン系に影響を与える可能性はあるものの、その効果は限定的であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガバペンチン（GBP）は神経障害性疼痛に対してだけでなく、術後鎮痛や、オピオイドを減らすための薬剤としても処方数が増加している薬である。その作用機序の一端を明らかにすることにより、さらなる作用機序の解明や、今後のGBPの有効処方や、処方の組み合わせによる合併症予防などに寄与できると考える。

研究成果の概要（英文）：The effects of gabapentin (GBP) on the serotonin pathway of the descending pain suppression system were investigated in a neuropathic rat model. Administration of GBP to model rats improved escape thresholds to pain stimuli, but this effect was antagonized by administration of a serotonin receptor antagonist. However, the analgesic effects of GBP were also observed in model rats depleted of serotonin and were not altered by administration of a serotonin receptor antagonist, suggesting that although GBP may affect the serotonergic system, its effects are limited.

研究分野：麻酔

キーワード：ガバペンチン 下行性疼痛抑制系 セロトニン 神経障害性疼痛 免疫染色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は、末梢神経から中枢神経に至るまでの刺激伝導系の途中に何らかの障害が加わることで生じる難治性の疼痛であり、効果のある薬物が限られていて治療に難渋することが多い。ガバペンチンやプレガバリンなどのガバペンチノイドは、抑制性神経伝達物質 GABA の誘導体であり、当初抗痙攣薬として使用されていたが、神経障害性疼痛に対して有効であることが知られるようになり、現在では帯状疱疹後神経痛や糖尿病性ニューロパチーなどの治療に広く用いられている^{1) 2) 3)}。

ガバペンチノイドは、電位依存性カルシウムチャネルの₂サブユニットに対して高い親和性を持ち、シナプス前膜のカルシウムチャネルを抑制することにより、興奮性伝達物質の放出を抑制することで、痛みの神経伝達を遮断すると考えられていた。しかし、近年、内因性疼痛抑制機構である下行性疼痛抑制系を活性化することで鎮痛作用を発揮するという報告が相次いでいる^{4) 5)}。下行性抑制系にはノルアドレナリン系とセロトニン系があるが、これらの報告はノルアドレナリン系についてのものがほとんどであり、セロトニン系については検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、下行性抑制系のセロトニン系に対するガバペンチンの影響、脊髄におけるセロトニンの動向に与える影響について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

神経障害性疼痛のモデルとして、脊髄神経結紮 (SNL) モデルラットを使用し、行動学的実験と免疫組織学的実験をおこなった。

(1) 行動実験

雄性 Sprague-Dawley ラット (240-420g) を用いて実施した。イソフルラン麻酔下に、左 L5 脊髄神経を結紮した⁶⁾。脊髄くも膜下腔に薬剤を投与する実験では、SNL 術後 7~10 日目に薬物投与用のくも膜下カテーテル (PE-10) を第 4・5 腰椎間に留置した⁷⁾。カテーテル留置後、実験までに 4~7 日の回復期間を設けた。セロトニン合成酵素阻害薬であるパラクロロフェニルアラニン (PCPA) を投与する実験では、SNL 手術 7 日目に PCPA を 150 mg/kg/day で投与できるように調製した PCPA 溶液を充填した Alzet[®] 浸透圧ポンプを後頸部に 7 日間留置した。SNL 手術後、14~21 日のラットの後肢の機械的刺激に対する過敏性を測定した。auto von Frey 装置 (Ugo Basile 社製) を用いて、後肢足底をプローブにより 50g の圧力に相当する力で 20 秒間上昇させ、ラットが逃避行動を起こした圧力を測定した。5 回刺激を行い、最小値と最大値を除いた 3 回の値の平均を逃避閾値とした。測定後、GBP 100 mg/kg を腹腔内投与し、GBP 投与 60 分後に上記の方法で逃避閾値を測定した。また、GBP 投与 90 分後逃避閾値測定後、セロトニンおよびアドレナリン受容体拮抗薬 180 分まで 60 分毎に逃避閾値を測定した。SNL ラットに対するケタンセリン、オンダンセトロン単独の髄腔内投与も実施した。各拮抗薬は過去の研究を参考に、カテーテルを通じて 30 µg 投与した。ノルアドレナリンを枯渇させる実験では、SNL 手術 7 日後にノルアドレナリンニューロンに対する神経毒である N-(2-chloroethyl) N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) を 50 mg/kg 腹腔内投与し、その 14 日後に実験を行った。

(2) 免疫組織学的実験

脊髄におけるセロトニンの発現量の変化やノルアドレナリン合成酵素である dopamin-hydroxylase (D H) の染色性を調べるために、免疫染色を実施した。GBP 投与ラットの組織評価は、投与後 90 分後に行った。ラットを深麻酔下に生食で灌流し、4% パラホルムアルデヒドで灌流固定した。組織を採取し、後固定、脱水した後、OCT コンパウンドに包埋して凍結ブロックを作り、16 µm に薄切してスライドガラスに載せた。組織を染色する抗体は、ウサギ抗 5-HT IgG 抗体、マウスモノクローナル抗 D H 抗体、Cy3-conjugated ヤギ抗ウサギ IgG 抗体および Fluorescein conjugated ロバ抗マウス IgG 抗体を使用した。観察は、デジタルカメラシステムを搭載した蛍光顕微鏡 (BX53、オリンパス) またはオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X810、キーエンス) を使用した。

(3) 統計解析

サンプルサイズは、行動学的および免疫組織学的解析に関する先行研究に基づいて決定し、統計的検出力の算出は行わなかった。データは平均値 ± 平均値の標準誤差で示した。Shapiro-Wilk 検定による正規性の検定後、行動データに対して反復測定一元配置分散分析または反復測定二元配置分散分析を使用し、Bonferroni 検定を用いて多重比較を実施した。統計的有意差は p < 0.05 とした。

4. 研究成果

(1) 行動実験

GBP 投与

GBP 投与前後の naïve ラットの試験では、後肢への機械的刺激に対する逃避閾値(PWT : paw withdrawal threshold)に変化はなかった($t = 0.3892$, $df = 7$, $p = 0.79$, 対応のある t 検定)。術後 2 週間経過した SNL ラットは、障害側後肢の PWT が対側より低く、痛みに敏感な状態であった。GBP(100 mg/kg)の腹腔内投与により、投与 60~240 分後に PWT の改善を認めた(各群 $n=8$, Time: $F(2.470, 34.57) = 9.350$, $p = 0.0003$; Side: $F(1, 14) = 43.42$, $p < 0.0001$; Side * Time: $F(5, 70) = 7.957$, $p < 0.0001$, 反復測定二元配置分散分析、図 1)。

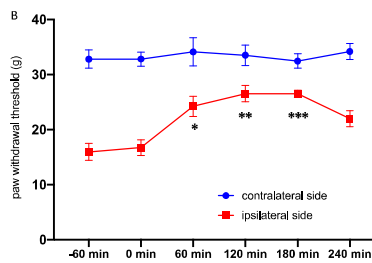


図 1

GBP+受容体拮抗薬投与

SNL ラットに GBP を投与し、90 分後に PWT を測定し、アドレナリン受容体遮断薬であるプラゾシン、イダゾキサンをくも膜下カテーテルから投与した。プラゾシンは障害側の GBP の鎮痛効果に有意な影響を与えなかったが(各群 $n=8$, Time: $F(2.491, 34.87) = 2.443$, $p = 0.0905$; Side: $F(1, 14) = 16.65$, $p = 0.0011$; Side * Time: $F(3, 42) = 9.519$, $p < 0.0001$, 反復測定二元配置分散分析、図 2A)。

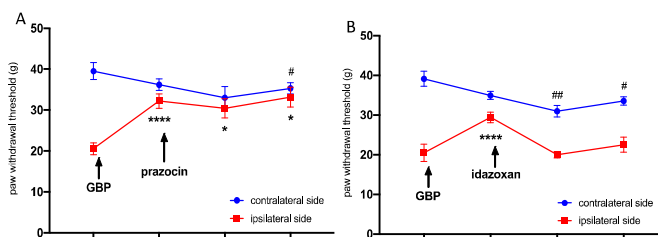


図 2

イダゾキサンは投与後 180 分にわたり、GBP で改善させた障害側後肢の PWT を低下させた(各群 $n=6$, Time: $F(2.294, 22.94) = 9.680$, $p = 0.0006$; Side: $F(1, 10) = 60.06$, $p < 0.0001$; Side * Time: $F(3, 30) = 8.843$, $p = 0.0002$, 反復測定二元配置分散分析、図 2B)。同様に、セロトニン受容体拮抗薬(メチセルジド; 非選択的 5-HT、ケタンセリン; 5-HT_{2A/2C}、オンドанセトロン; 5-HT₃)をくも膜下カテーテルから投与した場合の効果を検討した。上記 3 種類の薬剤は、投与後 180 分間障害側の GBP の鎮痛効果を有意に低下させた(メチセルジド; $n=6$, Time: $F(2.313, 23.13) = 26.06$, $p < 0.0001$; Side: $F(1, 10) = 32.00$, $p = 0.0002$; Side * Time: $F(3, 30) = 9.244$, $p = 0.0002$, ケタンセリン; $n=8$, Time: $F(2.862, 40.07) = 10.29$, $p < 0.0001$; Side: $F(1, 14) = 41.30$, $p < 0.0001$; Side * Time: $F(3, 42) = 9.212$, $p < 0.0001$, オンドанセトロン; $n=7$, Time: $F(2.451, 29.41) = 6.202$, $p = 0.050$; Side: $F(1, 12) = 20.96$, $p = 0.0003$; Side * Time: $F(3, 36) = 6.202$, $p = 0.0017$, 反復測定二元配置分散分析、図 3)。ケタンセリンおよびオンドанセトロン単独の投与は、SNL ラットの障害側後肢において抗疼痛効果を示さなかった(ケタンセリン; $n=5$, $F(1.623, 6.49) = 21.23$, $p = 0.0018$, オンドанセトロン; $n=6$, $F(2.4, 12) = 70.36$, $p < 0.0001$, 反復測定一元配置分散分析)。

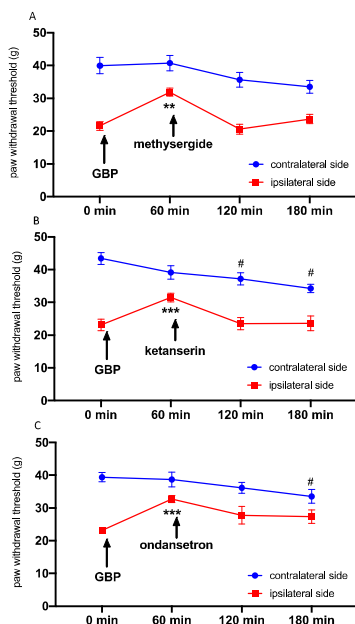


図 3

ノルアドレナリンニューロン障害状態での評価

ノルアドレナリンニューロンの神経毒である DSP-4 で前処置したラットに GBP を投与すると、障害側後肢に対する PWT の改善効果は認められなかった($n=6$, Time: $F(1, 10) = 25.94$, $p = 2.443$; Side: $F(1, 10) = 52.65$, $p < 0.0001$; Side * Time: $F(1, 10) = 4.166$, $p = 0.3765$, 反復測定二元配置分散分析、図 4)。

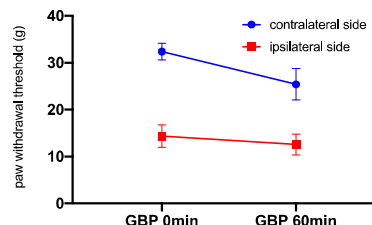


図 4

セロトニン欠乏状態での評価

セロトニンの合成を阻害する PCPA で前処置したラットに GBP を投与すると、投与後 60 分で GBP による鎮痛効果が認められた。鎮痛効果を確認した後、メチセルジドをくも膜下カテーテルから投与すると、鎮痛効果の消失は認めず、PWT は上がったままだった($n=4$, Time: $F(1.883, 11.30) = 7.220$, $p = 0.0103$; Side: $F(1, 6) = 17.19$, $p = 0.006$; Side * Time: $F(2, 12) = 3.259$, $p = 0.074$, 反復測定二元配置分散分析、図 5)。

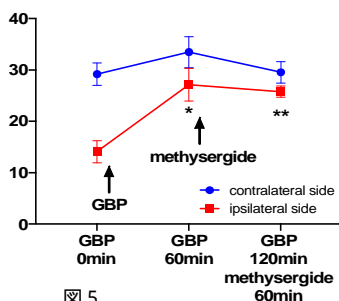


図 5

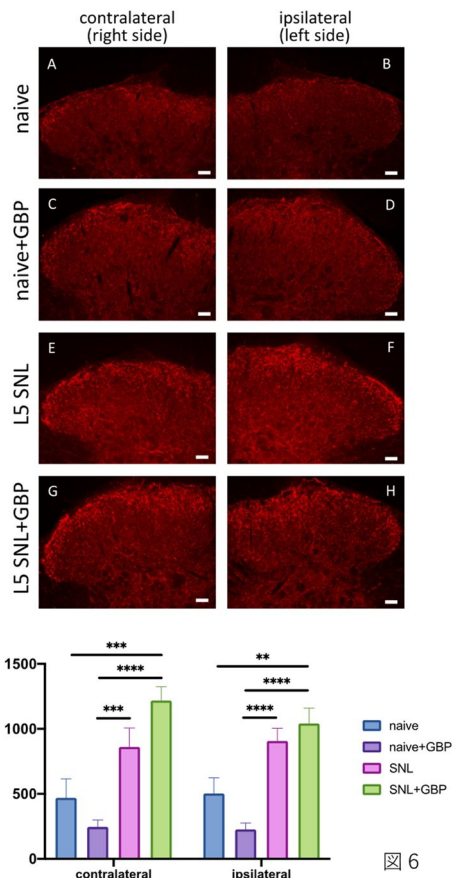


図 6

(2) 免疫組織学的実験：脊髄後角における 5-HT 染色の定量的解析 (図 6)

Naive、naive+GBP、SNL、SNL+GBP ラットの脊髄後角の 5-HT 染色を行った。SNL ラットでは naive ラットと比較し、5-HT が増加した。5-HT で染色された箇所を数え、二元配置分散分析を用いて比較した。GBP 投与により naive ラットの画像上の 5-HT 染色は減少し、SNL ラットでは 5-HT 染色が増加したが、この差は統計的に有意ではなかった (Side: $F(1,46) = 0.1531$, $p = 0.6974$, Group: $F(3,46) = 29.38$, $p < 0.0001$, Interaction: $F(3,46) = 0.4317$, $p = 0.7313$, 二元配置分散分析)。

本研究において、GBP の投与により、naive ラットや SNL ラットの障害側における機械的刺激に対する過敏性が改善したことは、これまでの報告と同様であった。GBP の効果は、 α_2 -アドレナリン受容体拮抗薬と同様に、5-HT₁、5-HT₂、5-HT₃ 受容体拮抗薬を脊髄くも膜下投与することで拮抗されたが、 α_1 -アドレナリン受容体拮抗薬では拮抗されなかった。このことから、GBP の鎮痛作用の一部に 5-HT が関与していることが示唆された。Venkatesha らは、マウスに GBP を投与すると、用量依存的に血漿セロトニンが増加することを示した⁸⁾。臨床的には、GBP を投与した健常者において血中セロトニン濃度が上昇すること⁹⁾や、トラマドールと GBP を併用するとセロトニン症候群を引き起こすことが報告されており¹⁰⁾、GBP がセロトニン分泌やセロトニン神経伝達を促進することが示唆されている。

一方で、5-HT を枯渇させた状態では GBP の作用は影響を受けずに鎮痛作用が認められ、ノルアドレナリンニューロンを障害して生じたノルアドレナリン枯渇状態では GBP の鎮痛作用が認められなかった。免疫染色の結果からは、GBP 投与により SNL ラットの脊髄の 5-HT が増加する傾向が見られたが統計学的に有意ではなかった。

以上の結果より、GBP の効果にセロトニンが関与している可能性は示唆されたものの、ノルアドレナリン系が優位に働き、セロトニン系の効果は限定的であると考えられた。

< 参考文献 >

- 1) Bates D. , Schultheis B. C. , Hanes M. C. , Jolly S. M. , Chakravarthy K. V. , Deer T. R. , Levy R. M. , Hunter C. W.: A Comprehensive Algorithm for Management of Neuropathic Pain. *Pain Med* 20: S2-S12, 2019.
- 2) Tick H. , Nielsen A.: Academic Consortium for Integrative Medicine & Health Commentary to Health and Human Services (HHS) on Inter-agency Task Force Pain Management Best Practices Draft Report. *Glob Adv Health Med* 8: 2164956119857656, 2019.
- 3) Wiffen P. , Collins S. , McQuay H. , Carroll D. , Jadad A. , Moore A.: Anticonvulsant drugs for acute and chronic pain. *Cochrane Database Syst Rev*: Cd001133, 2005.
- 4) Hayashida K. , Obata H. , Nakajima K. , Eisenach J. C.: Gabapentin acts within the locus coeruleus to alleviate neuropathic pain. *Anesthesiology* 109: 1077-1084, 2008.
- 5) Yoshizumi M. , Parker R. A. , Eisenach J. C. , Hayashida K.: Gabapentin inhibits γ -amino butyric acid release in the locus coeruleus but not in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury in rats. *Anesthesiology* 116: 1347-1353, 2012.
- 6) Ho Kim S. , Mo Chung J.: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-363, 1992.

- 7) Pogatzki E. M. , Zahn P. K. , Brennan T. J.: Lumbar catheterization of the subarachnoid space with a 32-gauge polyurethane catheter in the rat. *Eur J Pain* 4: 111-113, 2000.
- 8) G. Venkatesh C. Kalaiyarasi and M. Ramanathan: Antidepressant like Effect of Gabapentin Decreases the Immobility Time in Despair Animal Models in Mice- Role of Serotonergic System in it. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 4: 1702-1706, 2011.
- 9) Rao M. L. , Clarenbach P. , Vahlensieck M. , Krätzschar S.: Gabapentin augments whole blood serotonin in healthy young men. *J Neural Transm* 73: 129-134, 1988.
- 10) Eksi M. S. , Turgut V. U. , Ozcan-Eksi E. E. , Gungor A. , Tukul Turgut F. N. , Pamir M. N.: Serotonin Syndrome Following Tramadol and Gabapentin Use After Spine Surgery. *World Neurosurg* 126: 261-263, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------