

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25年 5月 19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591736

研究課題名（和文）インビボパッチクランプによる麻酔薬の脊髄膠様質抑制性、興奮性神経細胞に対する作用

研究課題名（英文）Effect of anesthetic agents on inhibitory or excitatory transmission in the substantia gelatinosa revealed by in vivo patch clamp recordings

研究代表者

山浦 健 (Yamaura Ken)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：70264041

研究成果の概要（和文）：パッチクランプは電気生理学的手法の一種で、単一細胞レベルの細胞膜上のイオンチャネルを介した電流や電位の変化が観察できる。神経細胞からのパッチクランプ法を行うと詳細なシナプス応答が可能となる。本研究では生体ラットの脊髄からパッチクランプ記録を行い、脊髄において痛覚情報伝達がどのように行われるのかを観察した。さらに、麻薬性鎮痛薬であるレミフェンタニルが痛覚情報伝達に対しどのような影響を与えるのかを詳細に解析した。

研究成果の概要（英文）：The patch clamp technique is a laboratory technique in electrophysiology that allows the study of single or multiple ion channels in cells. Using this method, transmission between neurons can be analyzed in detail. In this project, we observed the responses evoked by tactile stimulation in the spinal cord and analyzed the effect of remifentanyl which is known as opioid on nociceptive transmission by in vivo patch clamp recordings.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：疼痛管理学

1. 研究開始当初の背景

現代の手術に必要な不可欠な麻酔法の一つとして脊髄麻酔がある。この脊髄麻酔の主要な麻酔薬として局所麻酔薬が大半を占めている。しかし、局所麻酔薬中毒や交感神経ブロック作用による血圧低下などが問題となることがある。痛み情報の伝達及び修飾に重

要な部位である脊髄膠様質(SG)には、抑制性伝達物質である GABA やグリシンの受容体が多く存在する。例えばベンゾジアゼピン系の鎮静薬であるミダゾラムなどは GABA_A 受容体の作用を増強する。GABA_A 受容体の活性化により塩素イオンの細胞内流入が増し、脊髄後角神経細胞の興奮が抑制されることで痛覚情

報伝達が抑制される。その結果、鎮痛効果が生じると考えられる。実際 GABA_A 受容体に作用する麻酔薬を脊髄に投与すると鎮痛効果が得られる事が臨床的にも実証されている。このように抑制性伝達物質をターゲットにした副作用の少ない新たな麻酔薬の開発と臨床応用が期待されている。

2. 研究の目的

GABA やグリシンなどの抑制性伝達物質に対し各種麻酔薬がどのように作用するかを詳細に検討し、そのメカニズムを解明する。

(1) レミフェンタニル (アルチバ®) のグリシン受容体、NMDA 受容体に及ぼす影響に関する研究

実験計画立案当初は神経伝達物質の中でも抑制性伝達物質である GABA に着目し、GABA_A 受容体の作用を増強するミダゾラムを対象とした研究を計画していた。しかし、ミダゾラムと GABA_A 受容体の関係に関しては既に多くのことが明らかにされつつあるため、本研究では抑制性伝達物質であるグリシン受容体と興奮性伝達物質グルタミン酸の受容体である NMDA 受容体にターゲットを絞った。

グリシン受容体は GABA_A 受容体と同様、活性化すると塩素イオンチャンネルを開口させ、塩素イオンが流入し細胞の興奮性を抑制する事が知られている。近年オピオイド鎮痛薬であるレミフェンタニル (アルチバ®) 投与後の痛覚過敏のメカニズムとして含有されるグリシンの影響が知られている。脊髄スライス標本を用いた電気生理学的実験でグリシンがグルタミン酸の受容体である NMDA 受容体を直接的に活性化させ、脊髄後角神経細胞を興奮させること示した論文も報告されている。しかしながら、大量グリシンは同時にグリシン受容体に作用し、強力な塩素イオンの流入が起こる可能性があり、全く逆の作用を認める可能性がある。以上のことから、

①レミフェンタニル (アルチバ®) に含まれるグリシンが、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体を活性化し痛覚情報伝達を増強するのか

②レミフェンタニルに含まれるグリシンがグリシン受容体を介して痛覚情報伝達を抑制するのか

③レミフェンタニル (アルチバ®) そのものが μ オピオイド 受容体アゴニストとしてオピオイド受容体を活性化させて痛覚情報を抑制するのか

の3つの可能性を考えた。そのうちいずれが主な作用であるのかを知るため、実際にレミフェンタニル (アルチバ®) を脊髄投与した際に痛覚情報伝達がどの

ような影響を受けるのか (痛みを増すのか痛みを抑えるのか) を *in vivo* パッチクランプを用いて明らかにすることを第一の目的とした。

(2) 急性痛に対する NMDA の役割の研究
次に、興奮性伝達物質グルタミン酸の受容体である NMDA 受容体が急性痛の発生にどのように関与しているのかを調べる研究を行うこととした。

NMDA 受容体はグルタミン酸の受容体で細胞の興奮性を増加させ、痛覚過敏やアロディニアなどの慢性痛に関与することが報告されている。

一方 NMDA 受容体の抑制作用のある麻酔薬のケタミンは急性痛を抑制することが報告されている。目的 (1) のようにレミフェンタニルと NMDA 受容体との関連も報告されている。そこで NMDA 受容体が急性痛の発生に関与しているのかを調べることを第2の目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* ラット脊髄標本の作成

5-6 週齢の成熟ラットの腹腔内にウレタンを投与し鎮静を得た後 (ウレタンには鎮痛効果はないとされている)、背面の皮膚に十分な局所麻酔を施した後、正中縦切開を加え、傍脊柱筋を剥離し、椎弓を露出させた。さらに椎弓を切除し、脊髄を露出させた。その後、脊椎固定具にラットを装着し、脊髄露出部を人工脳脊髄液 (クレブス液) で還流する。クレブス液は酸素 95% 二酸化炭素 5% の混合ガスボンベを使用して、このガスを飽和させたものを使用した。実験中はラットに酸素を投与した。

(2) *in vivo* パッチクランプ記録

パッチクランプは三次元式空気ばね式防震台上で行い、シールドケージで囲み電氣的ノイズを最小限まで除去した。パッチクランプ様電極は電気抵抗が 5-1M Ω になるようにマイクロピペット・プラーにて作成した。In vivo パッチクランプは倒立顕微鏡を使用しマイクロマニピュレーターでパッチ電極を進める。組織に接触してからの深さによって脊髄膠様質の位置を確認し、ギガオームシールの電極抵抗を得たあとに電極内を急激に陰圧にすることで Whole-cell patch clamp 記録を行った。電位固定法あるいは電流固定法により単一記録細胞に流れる電流、電位変化を観察した。これらの記録は A/D 変換装置でデジタル信号として、解析用コンピュータ内のデータ取得解析用ソフトウェアを使用し保存、解析を行った。

(3) 痛み刺激応答の観察

脊髄後角からのパッチクランプ記録開始後直ちにラットの記録電極と同側の後肢を鉤付きピンセットで摘み、痛み刺激を加えた。電位固定法、電流固定法による痛み刺激応答を観察した。痛み刺激応答を記録した後、レミフェンタニルやグリシン、NMDA 受容体のアンタゴニストなどの薬物を脊髄灌流投与し、上述の痛み刺激応答に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

(1) レミフェンタニル (アルチバ®) のグリシン受容体、NMDA 受容体に及ぼす影響に関する研究

Whole-cell patch clamp 記録の開始後、レミフェンタニル (アルチバ®) 50 μ M を灌流投与すると、電位固定法で-70mV に電位を固定して観察している場合、外向き電流を観察した。電流固定法で静止電位を観察している場合、レミフェンタニル (アルチバ®) 50 μ M の灌流投与によって膜電位は過分極した。足趾への痛み刺激応答はレミフェンタニル (アルチバ®) 50 μ M の灌流投与によって減弱した。レミフェンタニル (アルチバ®) は脊髄においては痛覚を増強すると考えられてきたが、本研究により、脊髄においても鎮痛効果を発揮していることが明らかとなった。他施設の脊髄スライス標本を用いた研究ではレミフェンタニル (アルチバ®) 50 μ M に含まれるグリシン 3mM を単独で灌流投与すると細胞が興奮することを報告しており、今回の研究でこの実験を検証するため、レミフェンタニル (アルチバ®) 50 μ M に含まれるグリシン 3mM の灌流投与を行なった。グリシン 3mM を脊髄灌流投与すると電流固定法で静止膜電位を観察している場合、大きな電位の変化は認めなかったものの、電流固定法で-70mV に電位を固定した場合、外向き電流を認めた。この電流の逆転電位は-60mV 付近であった。したがってこの電流変化は NMDA 受容体を介した興奮性のものでなく、グリシン受容体を介した抑制性のものであることが示唆された。この電流はレミフェンタニル (アルチバ®) 50 μ M を灌流投与した場合には認められない現象であり、レミフェンタニル (アルチバ®) にはグリシンは大量に含有されているが、NMDA 受容体やグリシン受容体には作用していないと考えられた。

さらに、電極内に使用する記録内液をグルコン酸カリウム含有のものからセシウム含有のものに変更した場合、電位固定法で観察されるレミフェンタニル (アルチバ®) 50 μ M 投与による電流変化は認めなくなった。セシウムはカリウムチャンネルを抑制する作用があり、この結果よりレミフェンタニル (アルチバ®) 50 μ M の脊髄灌流投与後に認められる鎮痛作用機序には K チャンネルの関与が示唆される。 μ オピオイド受容体もカリウムチャンネルを活性化することが明らかとなっており、今回のレミフェンタニル (アルチバ®) の鎮痛作用機序には μ オピオイド受容体の関与が考えられる。

以上の結果をまとめると、レミフェンタニル (アルチバ®) 脊髄灌流投与すると細胞の膜電位を過分極し、足趾への痛覚刺激応答を抑制することが明らかとなった。さらに、レミフェンタニルの細胞の過分極作用はオピオイド受容体を介したものであることが推察された。レミフェンタニルは脊髄においては痛覚を増強すると考えられてきたが、本研究により脊髄においても鎮痛効果を発揮していることが示唆された。さらに、レミフェンタニル (アルチバ®) が GABA やグリシンなどの抑制性入力に影響を与えないことを明らかとなった。

(2) 急性痛に対する NMDA の役割の研究

Whole-cell patch clamp 記録の開始後、NMDA 受容体のアンタゴニストである AP-5 を灌流投与すると、電位固定法で-70mV に電位を固定して観察している場合と電流固定法で静止電位を観察している場合のいずれにおいても電流や電位に変化は認めなかった。さらに、後肢への痛み刺激応答も AP-5 灌流投与によって抑制されなかった。以上の結果から急性痛に関しては脊髄の NMDA 受容体は関与していない可能性が示唆された。

(2) 急性痛に対する NMDA の役割の研究

临床上 NMDA 受容体を抑制するケタミンは急性痛に対する鎮痛薬として临床上使用されている。そこでケタミンの脊髄灌流投与を行うこととした。現在のところ痛覚応答に対する変化は示されていない。これは濃度の問題であるのか直接的灌流投与方法に問題があるのかは現在のところ不明である。ケタミンが NMDA 受容体ではなく、他のメカニズムによって脊髄後角で鎮痛効果を発揮する可能性や脊髄ではなく他の部位の NMDA 受容体に作用することで鎮痛効果を発揮する可能性が考えられる。

ケタミンに関する研究は平成 25 年度に新たに助成金を取得しているので、新たな研究として実験をスタートしたい。ケタミンの作用として NMDA 受容体拮抗作用以外の作用機序にも焦点を当て、脊髄スライス標本を用いたパッチクランプ記録も併用し、詳細な検討を行なっていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

①塩川 浩輝、Chi-Kun Tong、外 須美夫、
Amy B. MacDermott
発表表題：Differential NR2 Subunit
Composition of NMDA receptors between
Inhibitory and Excitatory Interneurons of
the Mouse Spinal Dorsal Horn.
学会名：Annual Meeting of the American
Society of Anesthesiologists
発表年月日：平成22年10月17日
発表場所：米国、サンディエゴ

②塩川 浩輝、古賀 公平、山浦 健、辛島
裕士、外 須美夫
発表表題：Analysis of analgesic effect of
propofol by in-vivo patch clamp recordings
from the somatosensory cortex of rats
学会名：European Society of Anesthesiology
annual meeting, Euroanaesthesia 2012
発表年月日：平成24年6月10日
発表場所：フランス、パリ

③塩川 浩輝、山浦 健、辛島 裕士、外
須美夫
発表表題：Analysis of analgesic effect of
propofol by in-vivo patch clamp recordings
from the somatosensory cortex of rats
学会名：Annual Meeting of the American
Society of Anesthesiologists
発表年月日：平成24年10月14日
発表場所：米国、ワシントンD.C.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山浦 健 (Yamaura Ken)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：70264041

(2) 研究分担者

吉村 恵 (Yoshimura Megumu)
熊本保健科学大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：10140641

塩川 浩輝 (Shiokawa Hiroaki)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：30572490

辛島 裕士 (Karashima Yuji)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：80380434