

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592277

研究課題名(和文) プレガバリン・ガバペンチンの本当の作用機序

研究課題名(英文) Analgesic mechanisms of gabapentinoids in spinal cord dorsal horn

研究代表者

馬場 洋 (Baba, Hiroshi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00262436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：成熟ラットから後根付き脊髄スライスを作成し、脊髄後角細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。そして、後根の電気刺激で誘発される単シナプス性興奮性シナプス後電流に対するプレガバリンやガバペンチンの作用を検証した。これらの薬物は単シナプス性興奮性シナプス後電流の大きさを減少させなかった。これらの結果から、プレガバリンやガバペンチンは臨床濃度において一次求心性線維終末からのグルタミン酸放出に影響しないことが明らかとなり、これらの薬物の鎮痛作用は従来言われていたような一次求心性線維終末の電位依存性カルシウムチャンネルの抑制によるシナプス前抑制ではないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of gabapentinoids (pregabalin and gabapentin) on glutamatergic synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn. Whole cell patch clamp recordings were made from superficial dorsal horn neurons of spinal cord slice with attached dorsal root. Gabapentinoids did not decrease the amplitude of monosynaptic excitatory synaptic currents evoked by dorsal root stimulations. These results suggest that gabapentinoids do not inhibit glutamate release from primary afferent terminals. The inhibition of voltage-gated calcium channels may not be a main analgesic mechanism of these gabapentinoid drugs.

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：プレガバリン ガバペンチン 一次求心性線維 グルタミン酸 電位依存性カルシウムチャンネル シナプス前抑制 脊髄スライス カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

ガバペンチンやプレギャバリンは国際疼痛学会が神経障害性疼痛に対する第一選択薬と位置づけている薬剤であり、電位依存性Caチャンネルの2サブユニットに選択的に結合し、神経伝達物質の放出を抑制することによって鎮痛作用を発揮すると推定されていたが、この作用機序に関して直接的な証拠はなかった。一方、我々は以前、脊髄スライス標本を用いて脊髄後角浅層部細胞からパッチクランプ記録を行い、後根電気刺激で誘発される単シナプス性シナプス後電流(EPSC)はガバペンチンで抑制されないことを証明した。これに対し、炎症性疼痛モデルや神経障害性疼痛モデル動物の脊髄組織においてのみ、ガバペンチンやプレギャバリンは神経伝達物質の放出を抑制するという考えがあった。しかし、これも単なる推測に過ぎず、実際に神経障害性疼痛モデル動物の脊髄後角一次求心性線維終末のシナプス前終末からの神経伝達物質の放出を抑制するかどうか、単一シナプスレベルで検証する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、ガバペンチンやプレギャバリン等のガバペンチノイドが脊髄後角一次求心性線維終末の電位依存性Caチャンネルを抑制することによって、神経終末からのグルタミン酸放出を抑制する作用があるかどうか、正常動物と神経障害性疼痛モデル動物の両方で検証することを目的とする。さらに、人間でも動物でもこれらの薬物の内服により、速やかに血中および脳脊髄組織中の濃度が上昇することから、灌流投与により脊髄レベルで急性の鎮痛効果を持つかどうかを検証することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では電気生理学的方法を用いて、一次求心性線維終末からのグルタミン酸の放出に対するガバペンチンやプレギャバリンの影響を調べた。また、細胞内Caは神経の興奮(活動電位の発生)とほぼ同様の変動を示すことから、脊髄後角細胞の興奮性の指標として、脊髄スライスからの細胞内Caイメージングを行った。実験動物は週齢10週以上のWistar系完全成熟雄

性ラットを用いた。臨床において、これらのガバペンチノイドは糖尿病性神経障害性痛患者によく用いられるため、神経障害性疼痛モデル動物としては糖尿病性神経障害性痛モデルを用いた。

(1) 後根付き脊髄スライスの作成

ウレタンの腹腔内投与によりラットを麻酔し、下部胸椎から下部腰椎まで椎弓切除を行った。腰仙部脊髄を摘出し、約4に冷却した人工脳脊髄液(クレブス液)中でL5レベルの後根付き脊髄横断スライス標本を、マイクロスライサーを用いて作成した。このスライスを約37に加温し95%O₂、5%CO₂ガスで酸素化したクレブス液で灌流した。

(2) 電気生理学的記録

このスライス標本からガラス微小電極を用いて、後角第2層細胞からブラインド法によるホールセルパッチクランプ記録を行った。吸引電極を用いてスライスに付した後根の電気刺激を行い、A及びC線維を介する単シナプス性興奮性シナプス後電流(excitatory postsynaptic current: EPSC)を記録細胞に誘発した。薬剤の投与は薬剤を含んだクレブス液でスライスを灌流することによって行い、単シナプス性EPSCの振幅に対するプレギャバリンおよびガバペンチンの作用を調べた。薬物の濃度は両薬剤とも3、10、30、100μMを用いた。

(3) 糖尿病性神経障害性痛モデルの作成

糖尿病の作成は膵臓のベータ細胞を破壊するストレプトゾトシン(60mg/kg体重)の腹腔内投与によって行った。血糖値の明らかな持続的上昇を確認後、1週間ごとに後肢足底への機械的刺激に対する逃避閾値が経時的に低下していくことを確認した。また、逃避閾値が低下するだけでなく、刺激した後肢をなめる・振り回すなどの異常な逃避行動が認められるようになった。糖尿病作成から4週間後に腰部脊髄を取り出して脊髄スライスを作成した。

(4) 細胞内Caイメージング

脊髄スライスからの細胞内Caイメージングシステムは最短で0.6ミリ秒間隔で測定できる高速画像解析装置(MICAMO2)を用いた。Ca指示薬としてはRhod-2を用い、室温で約90分脊髄スライスを染色し、その後は電気生理実験と同様に酸素化して37に加温した人工脳脊髄液で灌流した。

後根刺激は吸引電極によって行い、20秒間隔で32回刺激して加算平均を行った。薬物投与は刺激の10分前から灌流投与によって行い、刺激中も薬物投与を続けた。薬物の濃度は両薬剤とも3、10、30、100 μ M を用いた。

4. 研究成果

平成23・24年度は主に電気生理学的実験を行った。細胞の膜電位を-70mVに固定し、後根を電気刺激すると記録したすべての細胞でA線維による単シナプス性または多シナプス性のEPSCが記録された。また、刺激強度を十分に強くするとC線維による単シナプス性または多シナプス性のEPSCが記録された。本研究は一次求心性線維終末に対する影響を調べるのが目的のため、多シナプス性反応はすべて研究から除外し、AまたはC線維による単シナプス性EPSCに対する薬物の影響のみを調べた。

ガバペンチンは正常ラットにおいてA・C線維による単シナプス性EPSCの振幅に影響を与えなかった。一方、糖尿病性神経障害性痛モデルラットにおいても、使用したすべての濃度で単シナプス性EPSCの振幅に影響を与えなかった。プレギャバリンの電位依存性Caチャンネルの2サブユニットに対する親和性はガバペンチンの6倍と言われている。しかしながら、プレギャバリンもガバペンチンと同様に正常動物ではA・C線維による単シナプス性EPSCの振幅に影響を与えなかった。また、糖尿病性神経障害性痛モデルラットにおいても抑制作用は認められなかった。従って、両薬剤とも正常・神経障害性モデル動物の両方において、一次求心性線維終末からのグルタミン酸放出に影響を与えないことが明らかとなった。

最終年度である平成25年度は正常ラットおよび糖尿病性神経障害性痛モデルラットの脊髄スライスから後根刺激により誘発される細胞内Caイメージングを行い、脊髄後角細胞全体の興奮性に対するプレギャバリンおよびガバペンチンの作用を検証した。後根をAおよびC線維が刺激される刺激強度で電気刺激すると脊髄後角浅層部に一致して変化率2.0~2.5%程度の細胞内Ca濃度の上昇が認められた。この上昇反応は糖尿病性神経障害性痛モデルラットの脊髄において有意に大きく、細胞内Caが上昇する

面積も有意に広がった。これまでの電気生理学的実験から、このCa濃度上昇反応は末梢組織に対する痛覚刺激に対する脊髄後角細胞の興奮と同等のものと考えられ、糖尿病性神経障害性痛モデルラットでは脊髄後角細胞の興奮性が高まっていることが示唆された。しかし、正常および神経障害性痛モデルの両方において、少なくとも臨床濃度においてプレギャバリン・ガバペンチンは共に有意な抑制作用を示さなかった。また、糖尿病性神経障害性痛モデル動物の脊髄でも同様に抑制効果を示さなかったことから、神経障害性痛の状態でのみ、これらの薬剤が鎮痛効果を発揮するという仮説も否定的となった。これらの観察はプレギャバリン内服後、約1時間で血中濃度は最高になり、8時間以内で脳脊髄濃度も最高になるにもかかわらず、鎮痛効果が発現するまでは数日を要するという臨床経験と一致する。

本研究ではガバペンチンやプレギャバリンの正確な作用機序を解明するには至らなかったが、少なくともこれらの薬剤の主たる鎮痛作用機序は一次求心性線維終末の電位依存性Caチャンネルに対する急性抑制作用ではなく、おそらくタンパクの発現やその輸送過程等、ある程度時間のかかる過程に作用して鎮痛作用を発揮する可能性が高いことが強く示唆された。

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4件)

1. Yoshida T, Fujiwara T, Furutani K, Ohashi N, Baba H, Effects of ropivacaine concentration on the spread of sensory block produced by continuous thoracic paravertebral block: a prospective, randomised, controlled, double-blind study, *Anaesthesia*, 査読有、69、2014、231-9
2. Petrenko AB, Yamakura T, Sakimura K, Baba H, Defining the role of NMDA receptors in anesthesia: Are we there yet?, *Eur J Pharmacol*, 査読有、723、2014、29-37
3. 大橋宣子、清水大喜、生駒美穂、岡本学、河野達郎、馬場洋、神経障害性痛患者に対するプレガバリンの鎮痛効果と副作用

-ガバペンチンから変更した症例-、日本ペインクリニック学会誌、日本ペインクリニック学会誌、査読有、20、2013、111-3

- Petrenko AB、Yamakura T、Kohno T、Sakimura K、Baba H、Increased brain monoaminergic tone after the NMDA receptor GluN2A subunit gene knockout is responsible for resistance to the hypnotic effect of nitrous oxide、Eur J Pharmacol、査読有、698、2013、200-5

〔学会発表〕(計 5 件)

- 馬場洋、脊髄スライスを用いて行ってきた基礎研究、第 30 回愛媛麻酔科集談会総会、2014.3.8、松山市
- Yoshida T、Fujiwara T、Furutani K、Ohashi N、Baba H、Effects of Ropivacaine Concentration on the Spread of Sensory Block Produced by Continuous Paravertebral Block、American Society of Anesthesiologists 2013 Annual Meeting、2013.10.13、San Francisco、USA
- 渡部達範、駒形成司、塚野浩明、菱田竜一、河野達郎、馬場洋、澁木克栄、血流遮断によるしびれの脊髄メカニズム、第 36 回日本神経科学大会、2013.6.22、京都
- 馬場洋、高松美砂子、生駒美穂、渡部達範、臨床濃度のプレガバリン・ガバペンチンは糖尿病性神経障害性痛動物モデルにおいて一次求心性終末からのグルタミン酸の放出を抑制しない、日本麻酔科学会第 60 回学術集会、2013.5.23、札幌
- 山本豪、生駒美穂、紙谷義孝、河野達郎、馬場洋、DHEAS の脊髄後角における痛覚伝達への作用、第 35 回脊髄機能診断研究会、2013.2.1、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/ane/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

馬場 洋 (Baba Hiroshi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：00262436

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：