

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 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：23592279

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛にケタミンが効く機序の解明

研究課題名(英文) analgesic mechanisms of ketamine on neuropathic pain

研究代表者

高松 美砂子 (Takamatsu, Misako)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：80432087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛の治療において少量のケタミン投与でも効果が見られることの機序について、神経障害性疼痛モデルラットを作製し電気生理学的手法を用いて検討した。脊髄スライス標本からのwhole-cell patch clamp記録では、坐骨神経損傷ラットでは正常ラットとは異なり、後根刺激により誘起される興奮性シナプス後電流(EPSC)はほとんどが多シナプス性であった。また、この多シナプス性EPSCはケタミンにより抑制された。生体標本を用いた検討でも同様の結果が得られ、神経障害性疼痛ではシナプス応答においてNMDA受容体の関与が増大していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In clinically, very low dose ketamine intravenous infusion reduced the pain dramatically some of the neuropathic pain cases. We investigated the effects of NMDA receptor antagonist, ketamine, on noxious synaptic transmission in the substantia gelatinosa (SG) with the whole cell patch-clamp technique. In the neuropathic pain model rat spinal cord, percentage of neurons with polysynaptic A-delta fiber EPSCs increased to over 90 % of the sampled population. Moreover, this polysynaptic EPSC was inhibited by ketamine. A similar result was provided in the in-vivo patch clamp recordings. Therefore, it was revealed that the NMDA receptor strongly participated in alternation of synaptic response on the neuropathic pain model rat spinal cord.

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：神経障害性疼痛 ケタミン 脊髄後角

1. 研究開始当初の背景

ペインクリニックにおいて治療に難渋する慢性疼痛の多くを神経障害性疼痛が占めている。神経障害性疼痛は未だ難治性であり、病態の解明と効果的な治療法の確立が待たれている。

NMDA受容体拮抗薬であるケタミンの少量投与が神経障害性疼痛に劇的な効果を表すことが注目されている。また最近の知見として、ケタミンにはオピオイド耐性・依存性の抑制効果、神経保護作用なども認められ、その投与方法を工夫することで補助鎮痛薬としての存在意義も見直されつつある薬物である。

神経障害性疼痛の発生機序の一部は脊髄における解剖学的・機能的な可塑性変化であり、それにはNMDA受容体も関与すると言われている。私たちの研究グループでは以前より、神経障害性疼痛モデルラットを作成し、in vitro 脊髄パッチクランプ法を用いて電気生理学的解析を行ってきた。その結果、神経障害性疼痛状態にある脊髄後角の神経回路網に変化が生じていることがわかった。つまり神経障害性疼痛患者においては、非競合性NMDA受容体拮抗薬であるケタミンの脊髄後角細胞に対する作用にも何らかの変化が生じていることが強く推測される。

しかし、ケタミンはその鎮痛機序に関しては基礎的研究の裏付けがないままペインクリニック領域で用いられているのが現状である。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛にケタミンの少量投与が効く機序の解明は臨床的に意味のあることである。

本研究では、神経障害性疼痛モデルラットの脊髄を用いた電気生理学的実験により、神経障害性疼痛モデルラットの脊髄ではケタミンの作用に変化が生じていることを明らかにし、鎮痛作用の機序を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

実験動物は週令6週のWistar系成熟雄性ラットを使用した。神経障害性疼痛モデルラットを作成し、脊髄スライス標本を用いて脊髄後角第2層ニューロンから電気生理学的記録を行った。正常ラットの記録と比較して、脊髄に可塑性変化が生じているかを調べた。

さらに、神経障害性疼痛モデルラットと正常ラットの脊髄スライス標本にケタミンを灌流投与し、後根をC線維およびA線維の刺激強度で刺激した時に誘発されるシナプス後電流(EPSC: excitatory postsynaptic current)への影響を調べた。

また、後根刺激で誘起されたEPSCに体するケタミンの影響が正常ラットと神経障害性疼痛モデルラットで異なる場合には、in-vivo patch clamp法による電気生理学的検討を行い、ケタミン静脈投与によるEPSC

の変化を記録した。

(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、下部腰椎の椎弓切除を行った。腰部脊髄を摘出して約4℃に冷却した人工脳脊髄液(クレブス液)中でL4レベルの後根付き脊髄スライス標本をマイクロスライサーを用いて作成した。スライスは約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)神経障害性疼痛モデルラット作成

今回、使用した動物モデル(spared nerve injury model; SNI model)はDecosteredらが開発した動物モデルで、機械的アロディニア(触刺激が痛みとして感じる)が強く、温度刺激への閾値は不変であるが逃避閾値を越えた刺激への反応が強いという点で人の神経障害性疼痛の症状をよく再現しているとされている。

4週齢のWistar系雄性ラットを酸素-セボフルレン(2.5-3.0%)吸入による全身麻酔下に左坐骨神経を露出した。坐骨神経の3本の枝のうち、tibial nerveとcommon peroneal nerveをそれぞれ5-0 silk糸にて結紮し、その遠位を切離した。Sural nerveは損傷しないように温存した。神経損傷手術後2-3週間は創の治癒を待ち、電気生理学的実験を行った。

(3)in vitro patch clamp 記録

スライス標本の後角第2層細胞からガラス微小電極を用いてブラインド法によるpatch clamp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およびC線維を介したEPSCを誘発した。ケタミンおよび競合性NMDA受容体拮抗薬のAP5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、EPSCの最大振幅、EPSC波形と基線で囲まれる面積で薬剤の効果を評価した。多シナプス性EPSCの最大振幅は刺激毎に違うため、10秒間隔で5回刺激し、その平均トレースの最大振幅及び面積(総電流量: pA・s)を測定した。

(4)in vivo patch clamp 記録

週齢6週以上のWistar系成熟ラットまたはSNI modelラットをウレタンで麻酔し、大腿静脈から薬剤投与用の静脈カテーテルを、大腿動脈から血圧測定用のカテーテルを挿入した。気管切開を施行し、酸素投与を行った。腰部脊柱の椎弓切除を施行し脊髄を露出した後、呼吸性及び心拍動による動揺を最小限にするために脊柱をフレームに固定(計4か所)した。L3-5レベルに相当する髄節の硬膜、くも膜に電極刺入のための1mm程度の穴を開け、記録電極を刺入しホールセル記録を行った。脊髄表面はクレブス液で灌流した。

4. 研究成果

平成23年、24年はスライス標本を用いた電気生理記録の解析により、脊髄後角第2層細胞に対するケタミンの直接作用について検

討した。

(1)SNI model ラット脊髄後角での変化:後根刺激によって脊髄膠様質から記録されたEPSC はグルタミン酸作動性の単シナプス性または多シナプス性 EPSC であったが、正常ラットに比べ神経障害性疼痛モデルラット(SNI ラット)では A 線維誘起の多シナプス性 EPSC が増えており、実に記録細胞の 93% が A 線維誘起の多シナプス応答のみを示した。SNI ラットでは C 線維刺激を行っても約 7% にしか反応がみられなかったため、A 線維誘起の多シナプス性 EPSC に対するケタミンの作用について解析した。

(2)in-vitro patch clamp 記録によるケタミン投与の影響の検討:正常ラット、SNI ラットの記録細胞において、ケタミン 50 μ mol/L を灌流投与したところ、いずれの細胞においても EPSC の振幅、面積ともに有意に抑制された。神経障害性疼痛モデルラット SNI ラットの記録細胞では振幅が約 60% に、面積が約 54% に抑制され、正常ラットの記録細胞での抑制率より有意に抑制度が高かった。非競合性 NMDA 受容体拮抗薬の AP5 の投与においても同様の結果が得られたこと、本実験のケタミン濃度(50 μ mol/L)では NMDA 受容体以外にはほとんど作用しないことから、多シナプス性 EPSC の抑制は NMDA 受容体の阻害によるものであると考えられた。さらに、SNI ラット脊髄においては正常ラットよりも抑制作用がより強く認められたことから、脊髄後角の痛覚情報伝達に NMDA 受容体がより大きく関与してくるような可塑性変化が生じていることが示唆された。

平成 25 年度は in vivo 標本を用いた電気生理学的検討を行った。

(1)SNI ラット脊髄からの in vivo patch clamp 記録: pinch している間中、EPSC の頻度・振幅ともに増加した。誘発される EPSC は、正常細胞に比べて SNI ラットで有意に増加していた。

(2)ケタミン投与の影響の検討: pinch 刺激により誘発された EPSC はケタミン 0.08 mg 静脈投与により著明に抑制された。また、神経障害手術をしなかった側の後肢に pinch 刺激して誘起された EPSC は 0.08 mg のケタミン静脈投与によりほとんど抑制されず、0.24 mg ケタミン静脈投与では約 50% に抑制された。手術側の Pinch 刺激誘起の EPSC は 0.08 mg ケタミン静脈投与により約 30% に抑制されており、神経障害が感覚入力が行われる脊髄後角第 1 層細胞の応答の可塑的变化に影響を与えていることが示唆された。神経障害によって生じた可塑的变化により、神経障害側の脊髄後角第 1 層の細胞応答には特に NMDA 受容体が強く関与していることが明らかになった。

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 1 件)

1. 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、査読有、20、2013、111-3

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 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、日本ペインクリニック学会誌、第 35 回脊髄機能診断研究会、2014.2.1、東京
2. 喜多学之、高松美砂子、渋谷智栄子、アナフィラキシーショックを 2 度発症しその原因に腹腔鏡手術の関与が強く疑われた症例、日本麻酔科学会関東甲信越・東京支部第 53 回合同学術集会、2013.9.7、東京
3. 生駒美穂、川島寛之、石川卓、小野信、澁澤祥子、緩和ケアチームが関与した婦人科悪性腫瘍患者の現状、第 18 回日本緩和医療学会学術大会、2013.6.21、横浜
4. 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

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高松 美砂子 (Takamatsu Misako)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：80432087

(2) 研究分担者

生駒 美穂 (Ikoma Miho)
新潟大学・医歯学系・特任准教授
研究者番号：30432082

(3) 連携研究者

()

研究者番号：