

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月14日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658231

研究課題名（和文） 痛覚情報伝達における動物種差の解析

研究課題名（英文） Species differences in nociceptive transmissions

研究代表者

伊藤 茂男（ITO SHIGEO）

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：40109509

研究成果の概要（和文）：痛覚伝達経路における動物種差を検討するために、ラットとマウスを用いた脊髄侵害受容経路と知覚神経に対する発痛及び鎮痛作用を有する薬物の作用を検討した。ラット知覚神経細胞は発痛物質であるカプサイシンやマスタードオイルが TRP チャネルを介して活性化することが示された。脊髄侵害受容経路の反射電位の電気生理学的性質やモルヒネに対する感受性はラットとマウスで類似していたが、生体アミンによる抑制効果には種差が認められ、下降性抑制経路による脊髄痛覚抑制機構に動物種差がある可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The effects of algescic and analgesic agents on the sensory neurons and spinal nociceptive pathways were examined to reveal the species differences in pain transmission. In the rat sensory neurons, the algescic agents, capsaicin and mustard oil, activated TRP channels. The electrophysiological features of spinal nociceptive reflex potentials and the effects of morphine in mice were similar to those in rats. Some differences in the effects of biogenic amines between rats and mice were observed, suggesting that there are species differences in pain control mechanisms by descending inhibitory neuronal pathways in the spinal cord.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：神経科学，脊髄，侵害受容経路，反射電位，知覚神経，内因性アミン，ドパミン，5-HT

1. 研究開始当初の背景

獣医療で多用されるキシラジンは α_2 アドレナリン受容体作動性の鎮痛・鎮静薬であるが、その力価には著しい種差が存在する。キシラジンの体内動態や受容体との親和性に動物種差は認められず、種差の原因は不明のままである。薬物効果の種差は獣医療において極めて重要な問題であり、その種差の原因を明らかにすることができれば、動物の痛み

の新薬の開発に大きく寄与することになる。

2. 研究の目的

（1）末梢から中枢へ痛み刺激を伝達する知覚ニューロンを分離培養し、発痛物質及び鎮痛薬の作用を検討する。知覚神経における痛覚情報の受容に関与する受容体やチャネルを明らかにするとともに、その動物種差を明らかにする。

(2) 鎮痛薬の主要な作用部位である脊髄の侵害受容経路の神経活動の電気生理学的特徴と鎮痛薬及び内因性の抑制性伝達物質の作用を検討する。知覚神経から脊髄に伝えられた痛覚情報の伝達とそれに対する鎮痛薬や内因性伝達物質の作用機序及びその動物種差を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 知覚神経細胞を用いた検討

①ラットより脊髄後根神経節を分離し、酵素処理により知覚神経細胞を得た。Poly-D-lysine でコーティングした培養デッシュ又はカバーガラスに細胞を播種し、CO₂ インキュベーターで 12-24 時間培養した後に実験に供した。

②知覚神経細胞にカルシウム蛍光指示薬である fura-2 を負荷し、蛍光倒立顕微鏡のステージ上の実験槽内に設置した。Ca²⁺ イメージングシステムを用いて、320 nm と 380 nm の励起光に対する 500 nm の蛍光を測定し、その蛍光比 (F340/F380) から細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) を算出した。

③ホールセルボルテージクランプ法により、知覚神経細胞の膜電流反応を測定した。倒立顕微鏡のステージ上の実験層に細胞を設置し、灌流液中に薬物を添加し、細胞に適用した。細胞内液として Cs 溶液を使用し、保持電位 -80 mV で測定した。

④知覚神経細胞における生体アミン (ドパミン) 受容体の発現を、RT-PCR 法により検討した。後根神経節細胞より mRNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作成した後に、PCR によって増幅した。アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロミドで染色した後に、UV でバンドを検出した。

(2) 摘出脊髄を用いた検討

①生後 1 週間以内の新生ラットまたはマウスより脊髄を摘出し、脊髄半裁標本を作製した。酸素 (95%) + 二酸化炭素 (5%) で通気した人工脳脊髄液で灌流した実験槽内 (27°C) に脊髄標本を設置し、脊髄後根と前根にそれぞれ刺激及び記録吸引電極を取り付けた。脊髄後根を電気刺激し、対応する前根から脊髄反射電位を記録した。反射電位として、単シナプス反射電位 (MSR) と遅発性前根電位 (sVRP) を測定した (図 1)。

②脊髄からの伝達物質放出は、高速液体クロマトグラフ法により測定した。摘出脊髄を断

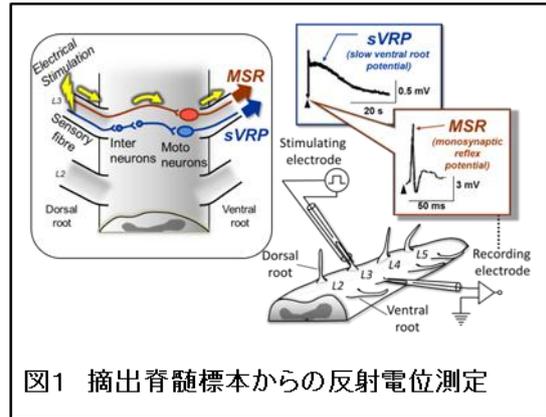


図1 摘出脊髄標本からの反射電位測定

片化したのち、人工脳脊髄液中 (37°C) で一定時間インキュベーションした。溶液中に放出された生体アミン (ノルアドレナリン, 5-HT, ドパミン) 量を電気化学的検出器で測定した。ドパミンはアルミナ法によりサンプルを濃縮した後に測定を行った。

③脊髄における生体アミン (ドパミン) 受容体の発現は、知覚神経細胞の場合と同様に、脊髄から mRNA を抽出した後に、RT-PCR 法によって検討した。

4. 研究成果

(1) 知覚神経細胞における発痛物質の作用

①培養ラット知覚神経細胞に発痛物質であるカプサイシンまたはマスタードオイルを適用すると、高濃度 KCl に反応する神経細胞のうち、それぞれ約 70% 及び 25% の細胞が [Ca²⁺]_i 増加反応を引き起こした (図 2)。

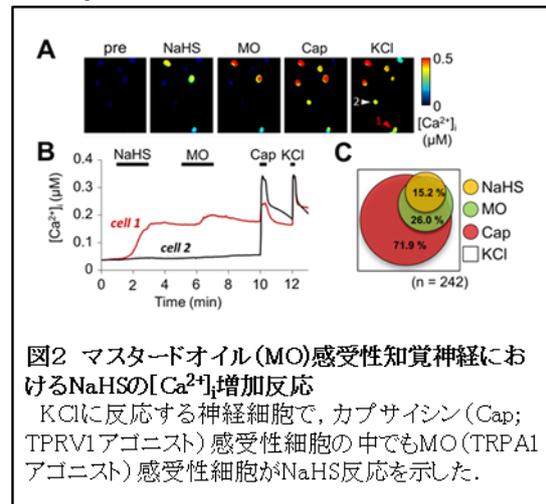


図2 マスタードオイル (MO) 感受性知覚神経における NaHS の [Ca²⁺]_i 増加反応

KCl に反応する神経細胞で、カプサイシン (Cap; TRPV1 アゴニスト) 感受性細胞の中でも MO (TRPA1 アゴニスト) 感受性細胞が NaHS 反応を示した。

②マスタードオイル感受性細胞のほとんどはカプサイシンに対しても感受性を有していた。カプサイシンとマスタードオイルによる反応はそれぞれ TRPV1 及び TRPA1 チャネル阻害薬により抑制された。

③カプサイシンを小型から中型のラット知覚神経細胞)に適用すると、ほとんど全ての細胞(14細胞中13細胞)で内向き電流反応が生じた。一方、マスタードオイル適用では、15細胞中6細胞で内向き電流反応が観察された。

④カプサイシンとマスタードオイルは、それぞれ特異的なTRPチャンネルを活性化し、ラットの知覚神経に作用していることが示された。これらの反応の性質はマウスでの報告と類似しており、末梢知覚神経における痛みの伝達においては、ラットとマウスで大きな種差は認められなかった。末梢痛覚受容機構は、動物種間で保存されているのかもしれない。

(2) 摘出脊髄における薬物の作用

①ラット及びマウスの脊髄反射電位の特徴を検討したところ、脊髄後根の電気刺激により対応する前根から記録されるMSRとsVRPの波形は類似していた。ラットと比べてマウスの方がより弱い刺激強度で反射電位が生じ最大に達したが、反応の振幅と潜時に差はなく、ラットとマウスの反射電位はほぼ同じ電気生理学的性質を有していることが示された(図3)。

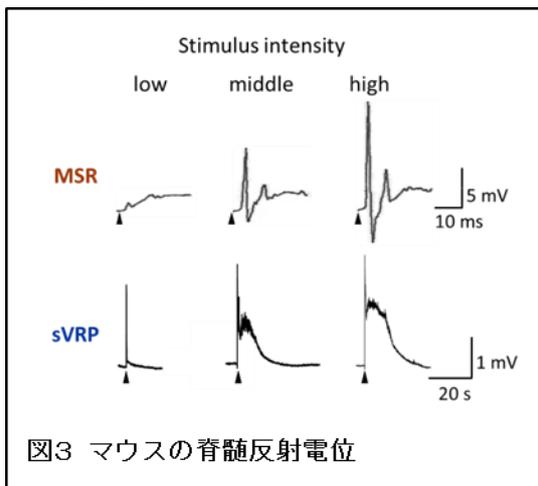


図3 マウスの脊髄反射電位

②鎮痛薬であるモルヒネは、ラット及びマウスのMSRには影響を与えずに、sVRPのみを濃度依存性に抑制した。モルヒネのsVRP抑制効果の力価はラットとマウスで大きな差はなく、どちらの抑制反応もオピオイド受容体拮抗薬ナロキソンで回復した。

③5-HTはラット及びマウスのMSRとsVRPを濃度依存性に抑制し、MSRよりもsVRPをより強く抑制した(図4)。5-HTの抑制効果の力価は、ラットの方がマウスよりも強かった。ラットにおける5-HTのMSR及びsVRP抑制効果は5-HT_{2A}受容体拮抗薬ケタンセリンで減弱した。

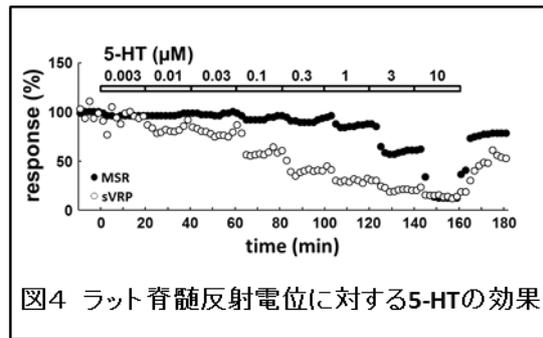


図4 ラット脊髄反射電位に対する5-HTの効果

④ドパミンはラットのsVRPを濃度依存性に抑制したが、その濃度-反応関係は二相性を示した。一方、MSRは高濃度のドパミンによってわずかに抑制されるだけであった(図5)。ドパミンのマウス反射電位に対する抑制効果は極めて弱かった。ラットにおけるドパミンのsVRP抑制効果はドパミンD1受容体拮抗薬SCH23390で減弱した。

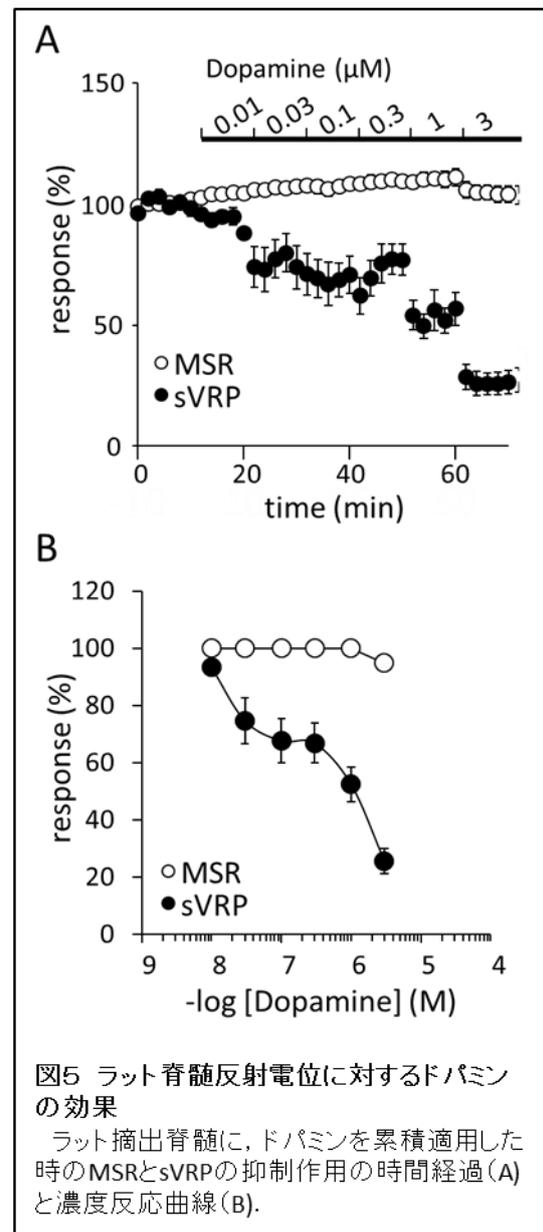


図5 ラット脊髄反射電位に対するドパミンの効果

ラット摘出脊髄に、ドパミンを累積適用した時のMSRとsVRPの抑制作用の時間経過(A)と濃度反応曲線(B)。

⑤内因性ドパミン放出薬であるメタンフェタミンは、ラット及びマウスの脊髄反射電位を濃度依存性に抑制した。メタンフェタミンはラットの sVRP と MSR をほぼ同程度抑制したが (図 6), マウスでは sVRP よりも MSR を強く抑制した。ラットにおけるメタンフェタミンの sVRP 抑制効果は, SCH23390 で減弱した。一方, MSR 抑制効果はケタンセリンで減弱した。またメタンフェタミンによる反射電位抑制効果は, 内因性アミンを枯渇させるレセルピンの処置により減弱した。

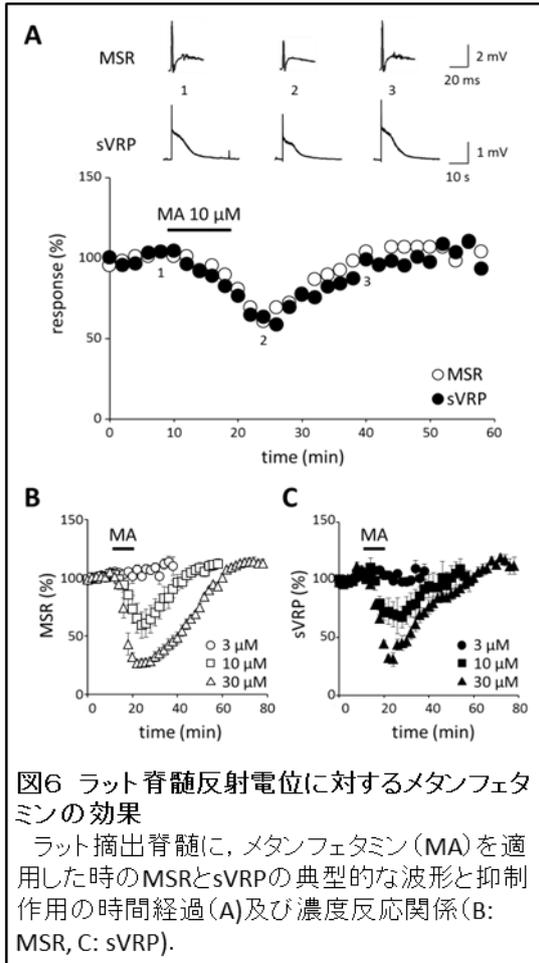


図6 ラット脊髄反射電位に対するメタンフェタミンの効果
ラット摘出脊髄に, メタンフェタミン (MA) を適用した時の MSR と sVRP の典型的な波形と抑制作用の時間経過 (A) 及び濃度反応関係 (B: MSR, C: sVRP)。

⑥内因性 5-HT 放出薬であるパラクロロアンフェタミンは、ラット及びマウスの脊髄反射電位を濃度依存性に抑制した。パラクロロアンフェタミンはラットでは sVRP よりも MSR を強く抑制し (図 7), マウスでは sVRP の抑制はほとんど見られなかった。ラットにおけるパラクロロアンフェタミンの MSR 及び sVRP 抑制効果は, ケタンセリンで減弱した。

⑦ α_2 作動性鎮静・鎮痛薬であるキシラジンとデクスedetミジンは、マウスの脊髄反射電位を濃度依存性に抑制した (図 8)。 α_2 作動薬は MSR よりも sVRP を強く抑制した。デクスedetミジンの力価はキシラジンと比

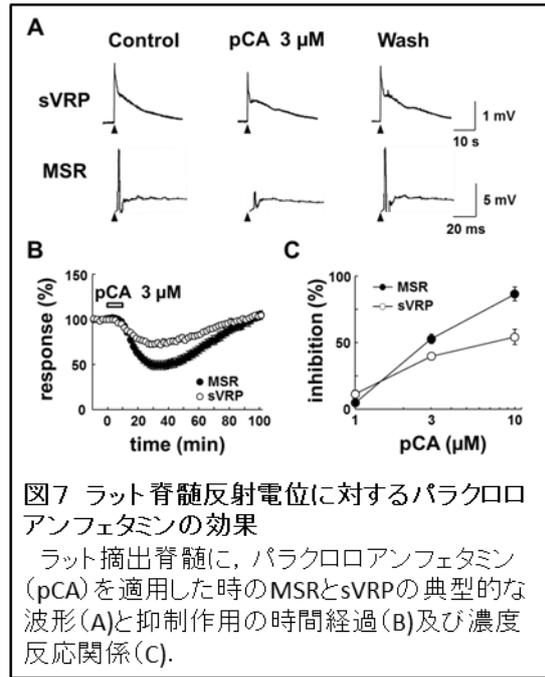


図7 ラット脊髄反射電位に対するパラクロロアンフェタミンの効果
ラット摘出脊髄に, パラクロロアンフェタミン (pCA) を適用した時の MSR と sVRP の典型的な波形 (A) と抑制作用の時間経過 (B) 及び濃度反応関係 (C)。

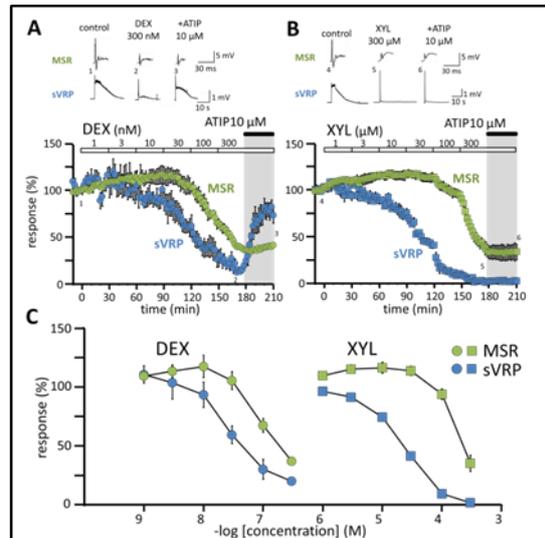


図8 ラット脊髄反射電位に対する α_2 作動薬の効果
ラット摘出脊髄に, α_2 作動薬のデクスedetミジン (DEX) 及びキシラジン (XYL) を適用した後に α_2 受容体拮抗薬アチパメゾール (ATIP) を適用した時の MSR と sVRP の典型的な波形と抑制作用の時間経過 (A: DEX, B: XYL) 及び濃度反応関係 (C)。

較して約 1000 倍強かった。デクスedetミジンによる sVRP 抑制は, α_2 受容体拮抗薬アチパメゾールで回復したが, MSR 抑制は回復しなかった。また, キシラジンによる MSR と sVRP 抑制効果は, どちらもアチパメゾールでは回復しなかった。マウスで見られた α_2 作動薬の脊髄反射電位抑制効果は, ラットでの効果とほぼ同じであった。

⑧ラットでの脊髄反射電位測定実験は、数多く行われていたが、本実験からマウスにおいても脊髄反射電位を測定できることが示された。マウスの sVRP は、電気生理学的性質や鎮痛・鎮静薬であるモルヒネや α_2 受容体作動薬に対する感受性などの薬理的性質もラットの sVRP と類似しており、痛覚伝達の指標となると考えられる。一方、生体アミンに対する反応は、ラットとマウスでいくつかの種差が確認された。アミン含量や受容体、トランスポーターの発現量や発現部位の違いが原因と考えられ、ラットとマウスで下降性抑制性神経による痛覚抑制機構に動物種差がある可能性が示唆された。

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 3 件)

①Iwasaki T, Otsuguro K, Kobayashi T, Ohta T, Ito S. Endogenously released 5-HT inhibits A and C fiber-evoked synaptic transmission in the rat spinal cord by the facilitation of GABA/glycine and 5-HT release via 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors. Eur. J. Pharmacol. (2013) 702, 149-157. 査読有

②Kawamoto K, Otsuguro K, Ishizuka M, Ito S. Inhibitory effects of dopamine on spinal synaptic transmission via dopamine D1-like receptors in neonatal rats. Br. J. Pharmacol. (2012) 166, 788-800. 査読有

③Miyamoto R, Otsuguro K, Ito S. Time- and concentration-dependent activation of TRPA1 by hydrogen sulfide in rat DRG neurons. Neurosci. Lett. (2011) 499, 137-142. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①小林武志, α_2 アドレナリン作動薬の脊髄反射電位抑制効果における α_{2A} 受容体の関与について, 第 86 回日本薬理学会年会, 平成 25 年 3 月 23 日, 福岡国際会議場 (福岡市)

②小林武志, マウス摘出脊髄における反射電位の電気生理学的及び薬理的解析, 第 154 回日本獣医学会学術集会, 平成 24 年 9 月 16 日, 岩手大学 (盛岡市)

③Otsuguro K, Effects of adenosine on spinal neuronal activities; its contribution to hypercapnia-evoked depression, The 14th Seoul National University-Hokkaido University Joint Symposium, November 18, 2011, Seoul National University (Seoul), South Korea.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究室ホームページ:

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/pharmacol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 茂男 (ITO SHIGEO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号: 40109509

(2) 連携研究者

乙黒 兼一 (OTSUGURO KENICHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号: 40344494