

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462440

研究課題名(和文) ケタミンの急性痛、慢性痛に対する異なる鎮痛作用機序の検討

研究課題名(英文) Analysis of different effects of ketamine on acute and chronic pain

研究代表者

山浦 健 (YAMAURA, KEN)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：70264041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの脊髄スライス標本やin vivo標本を用いて脊髄後角からのパッチクランプ記録を行った。まず、オピオイド誘発性痛覚過敏をパッチクランプ記録上で再現しようと試みたが、予想に反し、オピオイド製剤(アルチバ：remifentanil)が脊髄後角においてグリシン受容体を介して鎮痛効果を示すことが明らかとなった。次に脊髄スライス標本を用いたパッチクランプ記録によりケタミンの作用を解析した。ケタミンを脊髄に投与しても脊髄後角の膜電位や電流は変化しなかったが、シナプス前からのグルタミン酸の放出が増加した。すなわち、ケタミンがNMDAを抑制せず、むしろ疼痛を増強させる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We made patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal dorsal horn in vivo or in spinal cord slices. We revealed that intrathecal administration of Ultiva (remifentanil); to SG neurons hyperpolarized membrane potentials and depressed presynaptic glutamate release predominantly through the activation of glycine receptors. We also found that Ketamine increased presynaptic glutamate release. This result raises the possibility that Ketamine has pronociceptive effect in the spinal cord.

研究分野：麻酔科学

キーワード：疼痛管理学 慢性痛 ケタミン 電気生理学

1. 研究開始当初の背景

(1) ケタミンは鎮静作用と鎮痛作用を併せ持つ静脈麻酔薬である。手術侵襲による急性痛のみならず術後痛などの慢性痛に対しても鎮痛効果を発揮し、手術麻酔・ペインクリニック領域において有用な薬物である。ケタミンが作用する受容体、膜蛋白、細胞質蛋白に関する数多くの研究がなされてきた。ケタミンは NMDA 受容体拮抗作用を持つ PCP (フェンサイクリジン) 系麻酔薬として開発された経緯があり、NMDA 受容体拮抗薬として広く知られている。NMDA 受容体以外にもアセチルコリン受容体や イオンチャネル、トランスポーターなどの膜蛋白、細胞内情報伝達系蛋白などがケタミンの作用の標的となりうるということがわかっている。このように細胞レベルでの分子作用機序は明らかになっているものの、ケタミンの覚情報伝達路 (末梢神経 脊髄後角 視床 大脳皮質) における作用を体系的に調べた研究はなく、ケタミンの痛覚情報伝達路に対する効果の部位、さらに、その様式 (NMDA 受容体を介するかそれ以外の物質が関与するのか) に関しては不明な点が多い。

(2) 神経損傷による慢性痛においては脊髄の NMDA 受容体が関与していることを示唆する報告がすでになされている。研究申請者らは先行の予備実験として、インビボラットの脊髄後角からパッチクランプ記録を行い、足肢への痛み刺激応答が NMDA 受容体拮抗薬では抑制されない事を明らかにした。つまり、急性痛におけるケタミンの鎮痛作用は脊髄後角において NMDA 受容体以外の分子作用機序あるいは脊髄以外の部位への作用であることが予想される。したがって、急性痛と慢性痛に対してケタミンは異なる作用メカニズムによって鎮痛効果を発揮していることが示唆される。

2. 研究の目的

(1) 研究当初の目的は、インビボパッチクランプ法と脊髄スライス標本を用いたパッチクランプ法を用い、脊髄後角における急性痛と慢性痛に対するケタミンの異なる鎮痛作用機序を解明する事であった。すなわち、ケタミンの痛覚情報伝達路の作用部位と分子作用機序を急性痛、慢性痛に関して明らかにすることを目標とした。慢性痛には色々なモデルが存在する。そのため、どの様なモデルを使用するかがこの研究課題を円滑に行う上で重要と考えた。当施設では慢性痛モデルの作成は新たな試みであり、坐骨神経結紮ラットのような慢性痛モデル動物は実験に使用できるようになるまで時間を要することが予想された。

(2) そこで、比較的簡単に作成できる疼痛モデルとしてオピオイド誘発性の痛覚過敏モデル動物を採用し、研究を行う方針とした。

オピオイド誘発性痛覚過敏は NMDA 受容体の関与を示す報告が数多くなされている。そこで、ケタミンの鎮痛機序を探る前段階として、このオピオイド誘発性痛覚過敏モデル動物を作成し、NMDA 受容体の関与の有無を確認することとした。

(2-1) インビボパッチクランプ標本を用いたレミフェンタニル誘発性痛覚過敏の観察

オピオイド誘発性痛覚過敏を生じる代表的オピオイドとしてレミフェンタニルが知られている。このため、レミフェンタニル製剤であるアルチバ®による痛覚過敏状態を再現することを目標とした。具体的には脊髄後角からのインビボパッチクランプ標本を作成し、アルチバ®を脊髄灌流投与した際に痛覚過敏が生じるかどうかを確認することと、脊髄スライス標本を用いた作用機序の詳細に解析をまず最初に行うこととした。アルチバ®にはレミフェンタニルだけでなく、グリシンも含有されており、グリシンによる作用とレミフェンタニルの異なる作用に着目し、NMDA 受容体だけでなくグリシン受容体、 μ オピオイド受容体に対する作用も検討する方針とした。

(2-2) レミフェンタニルの痛覚過敏モデルを用いたケタミンの作用の評価

次に、レミフェンタニル誘発性痛覚過敏モデルに対してケタミンを投与することで痛覚過敏モデルに対するケタミンの作用を評価し、スライスパッチクランプ標本を用いて、グリシン受容体、 μ オピオイド受容体、NMDA 受容体に対するアルチバ®の作用を詳細に検討する方針とした。

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、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 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

陰圧にすることでホールセルパッチクランプ記録を行った。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、アルチバ®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) スライスパッチクランプ標本の作成・記録

ウレタン麻酔下のラットから上記の方法で脊髄を摘出した後、ラットを失血死させた。摘出した脊髄は冷却したクレブス液に浸した後、スライサーでスライス標本を作成した。37℃のクレブス液で還流したチャンパーに脊髄スライス標本を固定し、(2)の要領で脊髄膠様質(SG)細胞からパッチクランプ記録を行った。脊髄膠様質は過去の報告と同様、後角表層に特有の半透明の層として光源付き顕微鏡によって目視で確認した。

(5) スライス標本を用いたチャンネルの解析

パッチクランプ記録開始後、シナプス前からのグルタミン放出は1 μMのテトロドトキシン(TTX)存在下で微小興奮性シナプス後電流(mEPSCs)を記録することで観察した。さらに薬剤によって誘発される電流の電流電圧関係を計測するため、電位を-120 mVから-50 mV、-50 mVから-120 mVへ0.9秒間で変化させた。この電位変化を20秒毎に行った。薬剤投与前の電位変化に対する電流反応を薬剤投与中の電流反応から差し引いた後、電位変化とそれに対する電流の値をプロットしてグラフを作成し、さらに解析を行った。

4. 研究成果

(1) アルチバ®によるオピオイド誘発性痛覚過敏の検討

インビボ標本からのホールセルパッチクランプ記録の開始後、アルチバ®50 μM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、アルチバ®50 μM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アルチバ®50 μMの灌流投与によって減弱した。レミフェンタニル製剤であるアルチバ®は脊髄においてはこれまでの痛覚過敏の報告から、痛覚を増強するものと予想していたが、本研究により脊髄において鎮痛効果を有

することが明らかとなった。

(2) アルチバ®の鎮痛作用機序の検討

(1)の研究によりアルチバ®は予想とは正反対の結果であり、本来の研究目標からそれる形にはなったが、アルチバ®の鎮痛作用機序を検討するため脊髄スライス標本を用いた研究を行うこととした。アルチバ®50 μMを灌流投与するとインビボ標本での結果と同様電流固定法で静止膜電位を過分極させ、電流固定法で-70mVに電位を固定した場合、外向き電流が認められた。この外向き電流はμオピオイド受容体拮抗薬であるナロキソン(100 μM)によって抑制されなかった。一方、同じ細胞にグリシン受容体拮抗薬であるストリキニン(10 μM)を投与するとアルチバ®誘発性外向き電流は抑制された。さらにアルチバ®灌流投与により生じた電流の逆転電位は-60mV付近であった。したがってこの電流変化はNMDA受容体や興奮性のものでなく、μオピオイド受容体を介したものでなく、グリシン受容体を介した抑制性のものであることが明らかとなった。

(3) グリシンの脊髄後角SG細胞に及ぼす直接作用の検討

他施設の脊髄スライス標本を用いた研究ではアルチバ®50 μM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、本研究の結果と異なる結果を示していた。そこで今回、本研究においてもアルチバ®50 μMに含まれるグリシン3mMの灌流投与を行ない、その効果を検証することとした。グリシン3mMを脊髄灌流投与すると電流固定法で-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が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確認された。

(4) アルチバ®とグリシンのシナプス前性作用の検討

アルチバ®がシナプス前終末からのグルタミン酸放出を調節しているかどうかを検討するため、SG細胞でのmEPSCsを解析した。アルチバ®の灌流投与によってmEPSCsの発生頻度は有意に減少したが、振幅は変化しなかった。予想に反して、ナロキソンは全ての記録細胞でmEPSCsの発生頻度に対するアルチバ®の効果を抑制しなかった。しかしストリキニン(10 μM)はmEPSCsの頻度に対するアルチバ®の効果を抑制した。グリシン(2 mM)はmEPSCsの発生頻度を減少させたが振幅は減少させず、このグリシンによる変化は全ての記録細胞においてストリキニン(10 μM)で抑制された。これらの結果からアルチバ®に含まれるグリシンがグルタミン酸放出を減少させ、アルチバ®のシナプス前性作用はオ

ピオイド受容体よりもむしろグリシン受容体によって調節されることが示唆された。

以上の結果をまとめると、アルチバ®を脊髄灌流投与すると SG 細胞の膜電位を過分極し、足肢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、アルチバ®はシナプス前性に作用しグルタミン酸の放出を減少させることが明らかとなった。これらの作用はいずれもグリシン受容体を介したものであることが明らかとなった。アルチバ®は脊髄においてはオピオイド誘発性痛覚過敏を生じることが知られており、痛覚を増強すると予想していたが、本研究により脊髄において鎮痛効果を発揮することが示唆された。

(5) 脊髄後角スライス標本に対するケタミンの作用

本実験でオピオイド誘発性痛覚過敏モデルの作成を第一目標としていたが、(1)～(4)の結果が示す如く、アルチバ®では痛覚過敏自体が観察されず、鎮痛効果を発揮するという予想と正反対の結果となった。そのため、本来行う予定であった痛覚過敏モデルに対するケタミンの作用の検討は困難と判断した。そこで、急性痛に対するケタミンの脊髄に及ぼす影響を最終の研究とした。脊髄スライス標本を作成し、パッチクランプ記録開始後、ケタミンを灌流投与した。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ケタミンを灌流しても電流や電位に変化を認めなかった。しかし興奮性シナプス後電流の発生頻度が増加した。したがってケタミンを灌流投与しても NMDA 受容体は抑制せず、むしろ興奮性作用を及ぼす可能性が示唆された。ケタミンが脊髄において本当に興奮性作用をもち、疼痛を増強する可能性があるのかどうかは今後、インピボ標本を用いた実験系で検証したいと考えている。

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)

Makoto Sumie et al.

Direct Effect of Remifentanil and Glycine Contained in Ultiva® on Nociceptive Transmission in the Spinal Cord: In Vivo and Slice Patch Clamp Analyses.

PLoS One. 2016 Jan 15;11(1)、査読有

[学会発表](計 3 件)

住江誠

発表表題: Direct actions of Ultiva® on dorsal horn neurons in the rat spinal cord revealed by patch clamp analysis.

学会名: European Society of

Anesthesiology annual meeting,

Euroanaesthesia 2014

発表年月日: 平成 26 年 6 月 1 日

発表場所: スウェーデン、ストックホルム

住江誠

発表表題: ラットの脊髄後角に対するアルチバ®の直接作用の検討.

学会名: 日本麻酔科学会第 61 回学術集会

発表年月日: 平成 26 年 5 月 15 日

発表場所: 横浜、日本

塩川浩輝

発表表題: Evaluation of analgesic and hypnotic effects of remifentanil by in vivo patch clamp recordings.

学会名: European Society of Anesthesiology annual meeting, Euroanaesthesia 2013

発表年月日: 平成 25 年 6 月 3 日

発表場所: バルセロナ、スペイン

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山浦 健 (Yamura, Ken)

福岡大学・医学部医学科・教授

研究者番号: 70264041

(2) 研究分担者

塩川 浩輝 (Shiokawa, Hiroaki)

九州大学・病院麻酔科蘇生科・助教

研究者番号: 30572490

辛島 裕士 (Karashima, Yuji)

九州大学・大学院医学研究院・麻酔・蘇生学分野・准教授

研究者番号: 80380434

大庭由宇吾 (Oba, Yugo)

九州大学・別府病院麻酔科・助教

研究者番号: 30567368

(3) 連携研究者

吉村 恵 (Yoshimura, Megumu)

熊本保健科学大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号: 10140641

(4) 研究協力者

住江 誠 (Sumie, Makoto)

九州大学・大学院医学研究院麻酔・蘇生学分野・大学院生