

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006 年～2008 年

課題番号：18791072

研究課題名 (和文) 糖尿病ラット脊髄後角細胞の可塑性変化の電気生理学的解析

研究課題名 (英文) The analysis of the changes of neurotransmission in the dorsal horn of diabetic rats

研究代表者 若井 綾子 (WAKAI AYAKO)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：70419331

研究成果の概要：糖尿病末梢神経障害モデルラットの脊髄後角細胞第Ⅱ層からホールセルパッチクランプ記録を行い、電気生理学的解析をした。その結果抑制性のシナプス伝達に有意差はなかったが、モデルラットではコントロールに比べてシナプス前終末からのグルタミン酸の放出が増え、興奮性が増していた。近年神経因性疼痛の治療に使用されているガバペンチンを灌流投与したところ、コントロール群では変化はないが、糖尿病群では一次求心性神経終末に作用し、興奮性神経伝達物質の放出増強を抑制することがわかった。これがガバペンチンの鎮痛作用機序の一つであると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	900,000	0	900,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

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：麻酔学

1. 研究開始当初の背景

有痛性糖尿病末梢神経障害の罹患率が高いが、その治療は困難であり、発症機序もいまだ解明されていない。ストレプトゾトシンを用いた糖尿病モデルラットを用いて、1992 年には Ahlgren らが、1985 年には Burchiel らが C-fiber の自発的興奮の増強や過敏性を報告した。その後様々なサブタイプの Na チャネルが発現し、一次求心性線維の興奮性が高まり、後根神経節細胞での活動電位

の発火頻度が増すことが報告された。その一方で糖尿病モデルラットにおける、薬物の髄腔内投与による行動学的変化や、脊髄での様々な受容体の発現変化など形態学的変化も報告されてきた。つまり他の神経因性疼痛と同様、糖尿病でも一次求心性線維が入力する脊髄後角やその入力を受ける脳にも様々な可塑性変化が生じていることが示唆された。様々なモデルラットで脊髄レベルでの変化が研究されており、抑制性神経伝達

物質である GABA の減少や、トランスポーターの発現変化による GABA 抑制性の減少、マイクログリアの活性化や、受容体発現の変化など様々な報告がなされている。しかしモデルによって結果は異なり、神経因性疼痛発症機序の複雑さが窺える。糖尿病モデルラットでは脊髄後角で実際の神経伝達機構がどのように変化するのか詳細な検討は行われていなかった。

また実際の臨床で、非選択的 Na チャネル阻害薬であるリドカインの他、抗鬱剤や抗痙攣薬も治療薬として使用されている。しかしそれらの作用機序も十分には解明されていない。ガバペンチンは難治性てんかんの治療薬ではあるが、痛覚過敏やアロディニアを抑制するなど神経因性疼痛に有効であるとして近年使用されるようになってきた。電位依存性 Ca チャネルの $\alpha 2\delta$ サブユニットに親和性が高いことが知られているが、実際の鎮痛作用機序との関連も明らかにされていない。

2. 研究の目的

有痛性糖尿病性末梢神経障害は非常に治療に難渋し、その発症機序も明らかになっていない。一次求心性線維の傷害をトリガーに、脊髄や脳に可塑性変化が生じていると考えられている。糖尿病モデルラットを用いて、痛み刺激が脊髄に入力し、最初に修飾を受ける場である脊髄後角第 II 層細胞より、パッチクランプ記録を行う。これによって脊髄後角における神経伝達機構の変化を解析する。また、詳細な作用機序は明らかになっていないが、有痛性糖尿病性末梢神経障害に有効であるとされ、臨床使用されている薬の脊髄後角における作用を調べる。それによって新たな治療ターゲットが見つかるかもしれない。本研究では日本では保険適応が認められていないが、臨床使用され始めたガバペンチンについて検討した。

3. 研究の方法

①糖尿病モデルラットの作成

Wistar 系成熟雄性ラットの腹腔内にストレプトゾトシン (50mg/kg) を投与し、Hot plate test, von Frey test を行い 3 週間後までに痛覚過敏になっていることを確認し、糖尿病モデル群とした。コントロール群には生食を腹腔内投与した。

②脊髄後角細胞の電気生理学的解析

ラットをウレタン麻酔下に腰膨大部を摘出し、冷却クレブス液中でマイクロライサー(堂阪)を用い、暑さ 600 μ m の後根を付した脊髄横断スライス標本を作成する。このスライス標本を記録用チャンバーに移して、酸素化し、37 度に暖めたクレブス液で灌流する。顕微鏡下にマニピレーターを用いて電極抵抗 10M Ω のガラス微笑電極を脊髄後角第 II 層に進める。軽い陰圧によってギガオームシールを形成させた後、強い陰圧をかけて細胞膜を破りホールセルパッチクランプ記録を行った。得られた電流はパッチクランプ増幅器: Axopatch 200B(Axon Instruments)により増幅し、コンピューターに記録後、データ解析用ソフト: pCLAMP(Axon Instruments)を用いて解析した。膜電位を -70mV に固定して興奮性シナプス後電流(EPSC)、0mV 固定下で抑制性シナプス後電流(IPSC)を記録した。また、膜電位を -70mV 固定下に、後根を吸引電極で刺激したときに記録される evoked EPSC の解析も行った。この際刺激閾値と潜時から A δ 、C ファイバー誘起のものに分類できる。さらに高頻度刺激しても潜時が一定で脱落がない、monosynaptic evoked EPSC を記録し解析した。

ガバペンチンは酸素化したクレブス液に 100 μ M の濃度に溶かし、灌流投与した。

4. 研究成果

脊髄後角第 II 層からパッチクランプ記録を行った。静止膜電位はコントロール群 (-68.7 \pm 3.1mV) より糖尿病ラット群 (-63.9 \pm 1.6mV) で浅くなる傾向は見られたが有意差はなかった。

テトロドトキシン灌流投与下に静止膜電位を -70mV に固定したときに見られる miniature EPSC (mEPSC) を記録した。その結果、振幅の変化はなかったが、コントロール群に比べ糖尿病群では有意に頻度が増加していた。

一方、テトロドトキシン灌流投与下に静止膜電位を 0mV に固定したときに見られる miniature IPSC (mIPSC) を記録したところ、糖尿病群で頻度が減少する傾向が見られたが両群間で有意差は見られなかった。つまり糖尿病ラット脊髄後角では、神経終末からの興奮性伝達物質放出が増えることによって興奮性が高まっていることがわかった。近年糖尿病モデルラットでは GABA による抑制性伝達が減少するとの報告もされてきたが本研究では減少する傾向は認められたが有意差は認められなかった。有痛性糖尿病末梢神経障害の発症機序は複雑で、GABA 系の減少のみでなくその他のなんらかの変化によっても脊

髄後角の興奮性が高まっていると考えられた。

また、ガバペンチンは近年神経因性疼痛の治療薬として臨床使用されているが、その詳細な作用機序はわかっていない。ガバペンチンは抑制性伝達物質の GABA と類似した構造であるにもかかわらず、臨床濃度では GABA 受容体には作用せず、むしろ電位依存性 Ca チャネル $\alpha 2 \delta - 1$ サブユニットに強い親和性を示す。Ca チャネルと鎮痛作用の関係は疑問視されていたが、1990 年代に髄腔内に N type Ca チャネル阻害薬を投与すると鎮痛作用を示すことが報告され、Ca チャネルも鎮痛作用の効果部位として注目されている。そこでガバペンチンを糖尿病モデルラットに灌流投与したときの変化を検討してみた。

膜電位を -70mV に固定し、後根を吸引電極で刺激したときに記録される evoked EPSC のうち、高頻度刺激をしても潜時が一定で脱落がないもの (monosynaptic evoked EPSC) を記録した。コントロール群ではガバペンチンを灌流投与しても monosynaptic evoked EPSC に変化はなかったが、糖尿病群では有意に振幅が低下した。つまりガバペンチンは糖尿病モデルラットにおいて、一次求心性線維から脊髄への興奮入力を抑制することがわかった。このことから、ガバペンチンは脳を介さずに脊髄レベルでも鎮痛作用があることが確認された。

次に、ガバペンチンがシナプス前終末、あるいはシナプス後膜に作用しているのかを調べるために mEPSC を記録した。コントロール群では変化は見られなかったが、糖尿病群ではガバペンチンは mEPSC の頻度増加を抑制した。振幅には影響がなかったことからシナプス後膜ではなく、シナプス前終末からの神経伝達物質放出を抑制することがわかった。つまりガバペンチンは糖尿病モデルラットの一次求心性線維終末から興奮性神経伝達物質放出を抑制し、脊髄への痛み刺激の入力を抑制していることがわかった。また、コントロール群ではガバペンチン投与で変化が見られないことから、糖尿病モデルラットではガバペンチンに感受性を持つような何らかの変化が生じていると考えられる。

近年神経因性疼痛モデルの脊髄後角及び、後根神経節において電位依存性 Ca チャネルの $\alpha 2 \delta - 1$ サブユニットの発現が増えることが報告された。また、神経障害後に後根神経節から $\alpha 2 \delta - 1$ サブユニットがトラフィックしてくるという報告もされた。糖尿病モデルラットの一次求心性線維終末では $\alpha 2 \delta - 1$ サブユニットの発現が増えており、このため興奮性神経伝達物質の放出が増加していると考えられる。またガバペンチンは一次求心性線維終末で増加した $\alpha 2 \delta - 1$ サブユニットに結合し、これを抑制する。それ

によって増加していた興奮性神経伝達物質の放出を抑制する。これがガバペンチンの鎮痛機序の一部であると推測された。現在日本ではガバペンチンは神経因性疼痛に対して保険適応はないが、臨床使用され始めている。しかし眠気、ふらつきといった副作用が強く、なかなか内服できない人が多い。近年動物実験で、ガバペンチンを硬膜外投与したが神経毒性は認められなかったという報告もなされた。人でガバペンチンの硬膜外、髄腔内投与の安全性が証明されれば、血中濃度が上がらず、つまり眠気などの副作用のない、新たな治療法となるかもしれない。

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)

若井綾子、岡本学、馬場洋、術後神経障害をきたした 10 症例の検討、ペインクリニック、査読あり、29、2008、1653-9

〔学会発表〕(計 1 件)

若井綾子、岡本学、馬場洋、術後神経障害をきたした 10 症例の検討、第 28 回日本臨床麻酔学会、京都、2008.11.22

〔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