

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791095

研究課題名 (和文) 下行性痛覚抑制経路における D 体アミノ酸の作用に関する研究

研究課題名 (英文) The effect of D-amino acid on the descending antinociceptive pathway

研究代表者

松田 光正 (MATSUDA MITSUMASA)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：10384918

研究成果の概要 (和文)：ホルマリンテストにおいてラット脳室内に D セリンをした結果、第一期、第二期の双方で有意に鎮痛効果が現れた。また、D-セリン結合部位の選択的アンタゴニスト L-701,324 によってこれらの効果が拮抗された。これらの結果は、脳内の N-メチル-L-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体グリシン結合部位の亢進は急性痛および慢性痛に対する鎮痛効果があることを示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Intracerebroventricular administration of D-serine significantly and dose-dependently decreased the number of flinches in both the early and late phases of the formalin test. These antinociceptive effects were antagonized by intracerebroventricular administration of L-701,324, a selective antagonist for the glycine site of the NMDA receptors. The present data suggest that the activation of NMDA receptors *via* the glycine site at the supraspinal level could potentiate the antinociceptive effects on both acute and tonic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,600,000

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：疼痛管理学

1. 研究開始当初の背景

生体を構成するアミノ酸はL体であり、鏡像異性体のD体は細菌ペプチドグリカンの構成成分など極めて限られた生体成分である、と長年考えられてきた。しかし、哺乳類を含む高等動物において種々のD体アミノ酸が存在し、多様な生理機能を有していることが明らかとなってきた。遊離Dセリン(以下Dセリン)は哺乳類脳内に大量に存在し、興奮性神経伝達物質グルタミン酸の受容体であるN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体の内在性リガンドとして作用する。すなわち、Dセリンはグルタミン酸によるNMDA受容体の活性化を増強する(コアゴニスト)。これまでに下行性疼痛抑制経路においてグルタミン酸作動性神経が関与することを示唆する知見があったが、NMDA受容体が関与するのか、Dセリンは関与するのか、そのDセリンは神経細胞由来なのかグリア細胞由来なのか、などの詳細は明らかにされていなかった。申請者らは、代表的な鎮痛薬のモルヒネが鎮痛作用を発揮する際にDセリン代謝関連酵素の遺伝子発現がどのように変化するかに興味を持った。そこで、モルヒネ急性投与後にラット脳内におけるDセリン合成酵素のセリンラセマーゼ(Srr)およびDセリン分解酵素のDアミノ酸酸化酵素(DAO)の遺伝子発現変化を解析した。また、下行性疼痛抑制経路におけるオピオイド受容体、NMDA受容体、ベンゾジアゼピン受容体との相互関係を明らかにする目的として、モルヒネ(オピオイド受容体アゴニスト)、Dセリン(NMDA受容体アゴニスト)、ミダゾラム(ベンゾジアゼピン受容体アゴニスト)、フルマゼニル(ベンゾジアゼピン受容体アンタゴニスト)を用いて、モルヒネおよびDセリンの鎮痛

作用に対するミダゾラムの作用を検討した。さらに、Dセリンが神経細胞由来であるのか、あるいはグリア細胞由来であるのかについて明らかにする目的で、ラット神経およびアストログリア初代培養細胞、並びにラット脳組織切片を用いて *in situ hybridization* 法により、Dセリン合成酵素 Srr mRNA の局在を詳細に検討した。

その結果、

1. モルヒネ(10, 20, 40mg/kg)の腹腔内投与により、Srr mRNA および DAO mRNA 発現量がいずれも増加した。その発現のピークは投与後4時間目であること
2. 初代培養細胞ならびにラット脳組織を用いた *in situ hybridization* 法によってDセリン合成酵素の Srr mRNA は神経細胞で主に発現していること
3. Dセリンは脳室内投与により鎮痛作用を有すること、モルヒネの鎮痛効果を増強すること
4. ミダゾラムは、モルヒネおよびDセリンの鎮痛作用を減弱すること、などが明らかとなった。

以上の結果より、神経細胞由来のDセリンがAutocrineによりNMDA受容体活性を亢進し、下行性疼痛抑制経路において鎮痛効果を増強すること、モルヒネの急性投与時にDセリン代謝関連遺伝子の発現量が増加すること、またDセリンの鎮痛効果はベンゾジアゼピン受容体ならびにオピオイド受容体と協調し、調節することが示唆された。

2. 研究の目的

D体アミノ酸のうち、Dセリンはグルタミン酸受容体の1つのNMDA受容体の内因

性リガンドであることが明らかにされてきた。これまでに鎮痛効果の下行性疼痛抑制経路においてグルタミン酸が関与することを示唆する知見があるが、Dセリンの関与に関する知見は得られていない。下行性疼痛抑制経路におけるDセリンの作用を明らかにする目的として、疼痛モデルラット(ホルマリン法)などを用いてDセリンの鎮痛効果について検討した。

3. 研究の方法

炎症疼痛モデルラットの作成

ラット足蹠に5%ホルムアルデヒドを注射し、注入した足側のラットの逃避反応を測定する。

術後疼痛モデルラットの作成

ラットの後肢足底に1cmの長さで筋膜まで切開、筋肉を剥離し、皮膚を5-0ナイロン糸にて2カ所マットレス縫合を行う。手術後経時的に7日目まで熱刺激による鎮痛試験、Von Frey test、重心比重試験を行う。

疼痛の測定

(1) **熱刺激**: ラット後肢足底(1足は手術足、他方はShamあるいは無処置足)に熱刺激を与え、逃避するまでの時間を測定する。

(2) **Von Frey test**: Von Frey Filamentsを用いて両後肢足底に加重をかけ、アロディニアの程度を検査する。

(3) **重心比重試験**: ラットを鎮痛評価装置 Incapacitance Tester の加重板にのせ、両後肢の加重を測定する。

脊髄および脳7部位のサンプリング

モデルラットに薬物(Dセリン、モルヒネなど)を投与した後に、脊髄および脳(線条体、海馬、大脳、間脳、中脳、小脳、橋延髄の7部位)をサンプリングし、以下の実験に供試

する。

Srr および DAO mRNA 量の定量

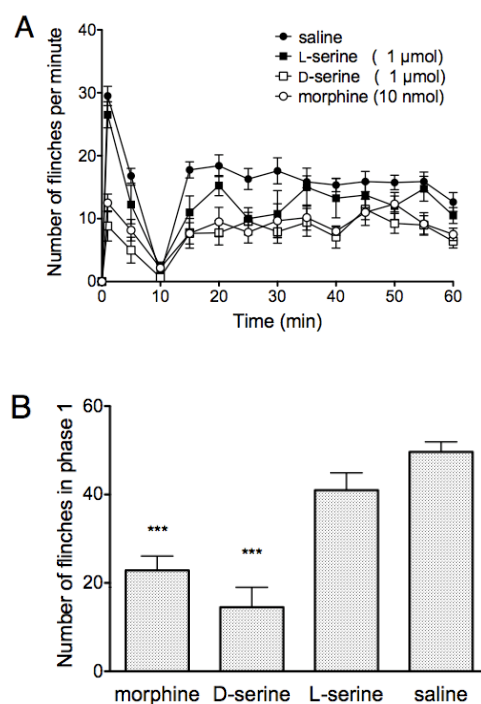
定量的リアルタイム RT-PCR 法により、Srr および DAO mRNA の発現量の解析を行う。リアルタイム PCR は、DyNAmo SYBER Green qPCR Kit (Finnzyme 社)を用い、DNA Engine Opticon 2 System (BioRad 社)で行う。各遺伝子に特異的なプライマーの配列および PCR の増幅条件は予備実験により決定済みである。

4. 研究成果

下行性疼痛抑制経路におけるDセリンの作用を明らかにする目的として、疼痛モデルラット(ホルマリン法)を用いてDセリンの鎮痛効果について検討した。

(1) ラット脳室内にDセリンを投与した結果急性痛(ホルマリンによる刺激)と炎症性疼痛(ホルマリン投与後10分目以降に現れる)のいずれの疼痛に対しても有意に鎮痛効果を現した(Fig. 1, Fig. 2)。

Fig. 1



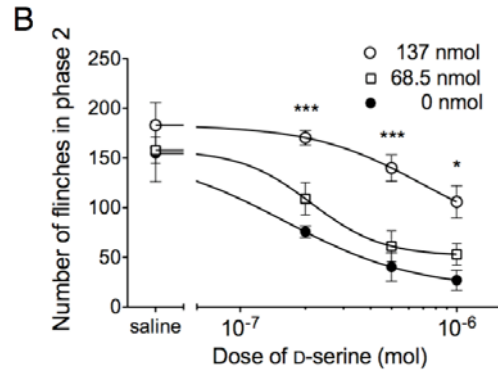
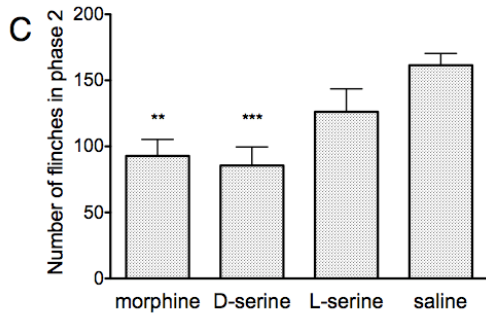
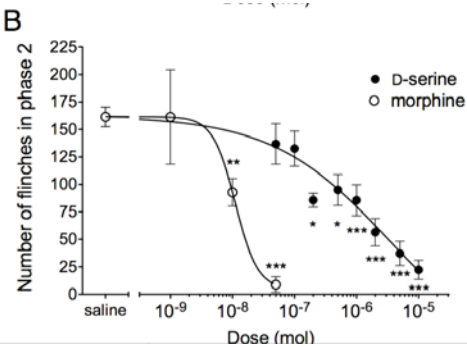
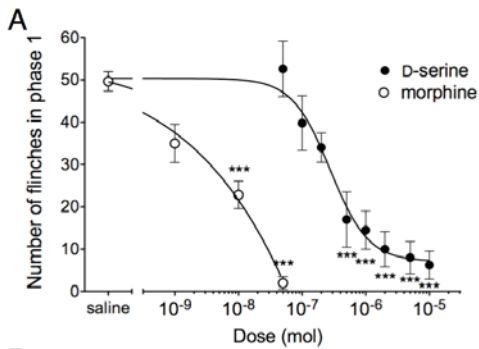
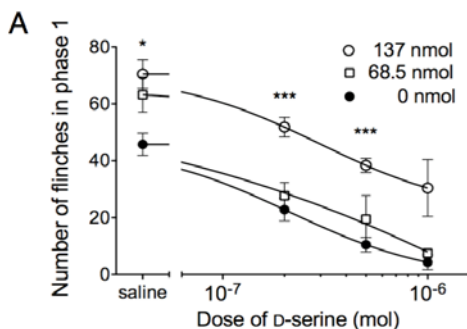


Fig. 2



(2) D セリンによる鎮痛作用は用量依存的であり、NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬(L-701, 324) およびオピオイド受容体拮抗薬(ナロキソン)によって拮抗された (Fig. 3)。

Fig. 3



以上の結果から

D セリン脳室内投与は急性痛および炎症性疼痛に対して鎮痛効果を有することが明らかとなった。また、D セリンの鎮痛効果はオピオイド受容体と関連していることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①松田光正、吉川正信、前田美保、伊藤健二、鈴木利保 ホルマリンテストでの D-セリンの鎮痛効果 日本麻酔科学会第 55 回学術集会 2008 年 6 月 13 日パシフィコ横浜(横浜)

②前田美保、松田光正、鈴木利保、吉川正信、橋本篤司 ラットの脳室内および髄腔内投与による L-701, 324 の鎮痛効果に対する作用 日本麻酔科学会第 55 回学術集会 2008 年 6 月 13 日パシフィコ横浜(横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田光正 (MATSUDA MITSUMASA)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：10384918

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：