

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度

課題番号：21592022

研究課題名（和文）ニコチンによる術後鎮痛—インビボパッチクランプ法を用いた検討

研究課題名（英文）Analgesic actions of nicotine for postoperative acute pain
- Investigation by using in vivo patch-clamp recording.

研究代表者

森 隆 (MORI TAKASHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00336786

研究成果の概要（和文）：In vivoパッチクランプ法による脊髄後角シナプス応答記録を安定して行えるよう実験設備を整えた。ニコチン脊髄灌流により脊髄後角第 I 層神経細胞の抑制性シナプス電流（IPSCs）の頻度、電流量は濃度依存性に増加し、脊髄レベルでの鎮痛メカニズムを示すと考えられた。しかしニコチン全身投与（静脈内投与）ではIPSCsに影響を認めなかった。興奮性シナプス伝達、活動電位に対する作用、さらに急性痛（術後痛）モデルでの作用が残された課題である。

研究成果の概要（英文）：We have arranged experimental facility for in vivo patch-clamp method to record stable synaptic responses in rat spinal dorsal horn neurons. Spinal surface perfusion of nicotine dose-dependently increased the frequency and amplitude of inhibitory post-synaptic currents in rat dorsal horn neurons of spinal cord suggesting one of the nicotine's analgesic mechanisms in the spinal cord. However, intravenous administration of nicotine had no obvious effects on IPSCs. Actions of nicotine on excitatory post-synaptic currents, action potentials, and responses in acute pain model are yet to be determined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

最近の臨床研究で、ニコチンの経鼻スプレー投与、経皮投与（ニコチンパッチ）が術後の疼痛とオピオイド必要量を減らすことが報告された。投与方法が簡便で、副作用は軽度の嘔気のみであり、術後痛に対する鎮痛補助薬として注目されている。ニコチンの標的である神経 nAChRs は揮発性麻酔薬に対して

感受性が高く、特に $\alpha 4\beta 2$ 受容体は低濃度の揮発性麻酔薬により強く抑制され、この作用は全身麻酔メカニズムへの関与と同時に、低濃度の揮発性麻酔薬による痛覚過敏にも関与することが基礎実験で示されている。このことからニコチンによる鎮痛が、揮発性麻酔薬を用いた全身麻酔における覚醒後早期の術後痛に対して有効であると推測される。

ニコチンが術後痛に有効であるとする一方で、鎮痛効果ははっきりしなかったという報告もある。その理由の1つとしてニコチンの投与量(血中濃度の推移)が関係していると推察されている。ニコチンは $\alpha 4\beta 2$ 神経 nAChRs を刺激すると同時に、30 nM あたり(喫煙でのピーク血中濃度)の比較的低濃度からでも強力な脱感作を引き起こす。 $\alpha 4\beta 2$ 受容体の刺激、脱感作のプロセスの中で、どの段階が鎮痛機序を引き起こすのか、現時点ではわかっていない。いずれにしても、血中濃度の調整(投与量および投与方法)が重要であると考えられる。以上より、ニコチンの鎮痛メカニズム、そしてニコチン投与方法および投与量による効果について詳細に検討することが、今後の臨床での有効な使用方法にとって重要な情報となる。

近年開発された脊髄後角 in vivo パッチクランプ記録法は、より生理的条件下で神経活動の記録を可能とし、疼痛研究において in vitro の結果と行動実験や臨床研究での結果をつなぐ研究である。本法により脊髄後角の神経細胞のシナプス応答の詳細な解析が可能で、生理的な感覚刺激に対する応答を観察することができる。また術後痛のモデルとして、切開モデルが用いられている。切開モデルでは、切開の周囲に機械刺激に対する感受性増加が生じる。ラット切開モデルで脊髄後角 in vivo パッチクランプ記録法を行った研究では、触覚刺激や疼痛刺激という機械刺激に対するアロディニアや痛覚過敏が生じていることを示す反応が確認されている。本法を用いて、より臨床に近い状態でのニコチンの鎮痛作用を詳細に検討することが可能である。

2. 研究の目的

最近、ニコチンの経皮投与が術後鎮痛に有効と報告された。非侵襲的で、副作用も少ないことから鎮痛補助として注目されている。しかしながらニコチンの鎮痛機序は不明な点も多く、投与方法(投与量)についても検討の必要がある。今回の研究では、ラット術後痛モデル(切開モデル)を作製し、in vivo パッチクランプ記録法を用いて実験を行う。この方法を用いて、脊髄後角神経細胞におけるシナプス応答を記録・解析し、術後痛に対するニコチンの鎮痛メカニズムを明らかにすると同時に至適投与量および投与方法に関する有益な情報を得ることが目的である。

3. 研究の方法

本研究では、(1) in vivo 標本作成、(2) in vivo パッチクランプ法による脊髄後角神経細胞シナプス応答の記録、(3) ニコチンの脊髄後角神経細胞シナプス応答への作用およびメカニズム、を行い、最終的に(4) ラット術後痛モデル(切開モデル)を作製し、ニコチン

による術後痛制御機構の解明を行なう。さらに(5) 臨床に近いイソフルラン麻酔またはプロポフォール麻酔でのニコチンの作用を調べる。

(1) In vivo 標本の作製

実験には4-7週齢の Sprague-Dawley ラットを用いる。ラットにウレタンを腹腔内投与(1.2-1.5 mg/kg)して全身麻酔を行う。外頸静脈にカニューレを挿入して、輸液・薬剤投与に用いる。実験中は、自発呼吸で管理し、直腸温をモニターする。次に、第12胸椎から第2腰椎まで椎弓切除を行ない、第3-5腰椎レベルの脊髄を露出する。脊髄および神経の損傷を起こさないように丁寧かつすみやかに行う。ラットの頭部、脊椎をそれぞれ ear bar、専用固定具を用いて固定装置にしっかりと留める。硬膜を開窓し、記録用のガラス電極を進める部分の脊髄表面を露出する。露出した脊髄表面のくも膜、軟膜に約2mmの電極刺入用の窓を開ける。脊髄表面を、95% O_2 -5% CO_2 でバブリングした Krebs 液(組成は NaCl, 117 mM; KCl, 3.6 mM; $CaCl_2$, 2.5 mM; $MgCl_2$, 1.2 mM; NaH_2PO_4 , 1.2 mM; glucose, 11 mM; $NaHCO_3$, 25 mM)を37°Cに温めて還流する。灌流恒温槽を用いて温めたパッドを動物の腹側に置き、体温低下を予防する。

(2) In vivo パッチクランプ記録法

脊髄後角第I、II層の神経細胞を目標に in vivo パッチクランプ法を行ない、興奮性シナプス伝達(EPSCs)、抑制性シナプス伝達(IPSCs)を記録する。IPSCsの記録を行う場合は、電極ピペット内溶液の組成を $CsSO_4$, 110 mM; tetraethylammonium(TAE)-Cl, 5 mM; $CaCl_2$, 0.5 mM; $MgCl_2$, 2 mM; EGTA, 5 mM; ATP-Mg, 5 mM; Hepes- $CsOH$ 5 (pH 7.2) とする。EPSCsの記録を行う場合は、電極ピペット内溶液の組成を変え行う。パッチクランプアンプ(Axopatch 200B)のヘッドステージに電気抵抗5-10 G Ω のガラス電極を装着し、マイクロマンピュレーターを用いて脊髄内へ刺入する。5 mV ステップに対する応答電流の変化を指標にギガシールを形成後、ホールセル状態にする。膜電位を0 mVに固定してIPSCs、-70 mVに固定してEPSCsを、を記録する。

(3) ニコチンの作用

ニコチンを脊髄灌流投与もしくは全身投与(静脈内投与)し、シナプス応答に対する作用を調べる。EPSCs、IPSCsの頻度、振幅、decay phaseの解析を行う。脊髄灌流では、ニコチンを Krebs 液に溶解して投与し、EPSCs、IPSCs に対する作用を調べる。ニコチン濃度は100-300 nM, 1-100 μM で行う。静脈内投与では0.05, 0.1または0.5 mg/kgをボラス投与し、1, 5, 10分後に評価する。また0.5, 1 mg/kg/hrの持続投与量を行い、15, 30分後の評価を行う。神経 nAChR アンタゴニストである mecamlamine または $\alpha 7$ 神経 nAChR ア

ンタゴニストの α -bungarotoxin による前処置およびニコチンとの同時投与を行い、ニコチンの作用にサブタイプ依存性の有無を調べる。またオピオイド拮抗薬（ナロキソン）、 α_2 受容体アンタゴニスト (yohimbine) を用いて、メカニズムの検討を行う。

(4) 切開モデルの作製とニコチンの作用

術後痛モデルとして、ラット皮膚切開モデルの作成を行う。大腿後面を剃毛し、記録している神経の機械刺激に対する皮膚受容野を、paintbrush を用いて確認し、マークする。ホールセルクランプ形成後、その部にメスで約 1 cm の切開をし、筋膜と筋に深さ 3-5 mm の切開を加え、その後ステイプラーで閉創する。

切開前後および切開後のニコチン投与前後に、自発活動の EPSCs, IPSCs の記録、切開予定マークから 1-2 mm 離れた皮膚に疼痛刺激を与え EPSCs, IPSCs の反応を記録する。疼痛刺激は有鉤鑷子をマグネットスタンドに固定し、一定の重りをのせて行う。

(5) イソフルラン麻酔またはプロポフォール麻酔でのニコチンの作用

臨床に近い麻酔状態でのニコチンの作用を調べる。麻酔にウレタンは使用せず、イソフルランで麻酔を導入・維持して in vivo 標本の作製を行う。イソフルランを用いる場合は、ラットを気管切開しカニューラを挿入、人工呼吸を行う。(1) - (4) の方法を用いる。イソフルラン 0.5, 1 MAC (minimum alveolar concentration) での、それぞれの麻酔深度でニコチンの作用を評価する。プロポフォール麻酔下での検討では、イソフルランで麻酔を導入・維持して in vivo 標本の作製を行い、その後麻酔をプロポフォールに切り替える。プロポフォールは 5, 10 mg/kg/hr の投与で麻酔維持し、それぞれの麻酔深度でニコチンの作用を評価する。

4. 研究成果

(1) in vivo パッチクランプ記録の確立

1. 実験環境の整備

空気ばね式除振装置 (ADZ-A1007, 明立精機) の除振台上に動物固定装置、マイクروسコープ、ファイバー光源を設置した。パッチクランプアンプ (Axopatch 200B) のヘッドステージは1次元水圧マイクロマニピュレーターに装着した。ファラデーケージを作製し、セットアップ全体をシールドし、記録に電氣的ノイズの混入が少ない環境を作った。薬剤投与の灌流システムを作成した。学外の研究者の指導も受けながら、セットアップを整備した。

2. In vivo 標本の作製および記録の技術

九州大学生理学教室での見学、当教室大学院生が自然科学研究機構生理学研究所へ研修および短期留学等により、特殊で高度な技術

を要する in vivo パッチクランプ法を学び、実施可能となった。より短時間で低侵襲な操作を目標に手技のレベルアップを図り、記録成功率が上昇し、安定した記録をできる体制を整えることができた。

(2) ニコチンの作用

まず抑制性シナプス電流 (IPSCs) に対するニコチンの作用を記録した。脊髄後角第 I 層神経細胞で IPSCs を記録した。ニコチンの脊髄灌流では (10 μ M, 100 μ M)、IPSCs の頻度および電流振幅ともに濃度依存性に増加した (図 1)。電流振幅は、ニコチン 10 μ M によりコントロールの 153%、100 μ M で 180% まで増加した。この結果は脊髄スライスでの報告と一致する結果で、ニコチンの鎮痛効果の脊髄レベルでのメカニズムを示す 1 つと考えられた。このことより脊髄後角で GABA 作動性神経に存在する神経ニコチン性アセチルコリン受容体をニコチンが刺激することが示唆された。しかしニコチンの静脈内投与では、低用量 (0.75 μ g) では明らかな影響を認めず、中等-高用量 (7.5, 15, 30 μ g) では、一時的に数分間のみ IPSCs の頻度および電流振幅が抑制された後に、投与前に回復するという結果が得られた (図 2)。つまりニコチンの全身投与は、脊髄後角神経細胞の IPSCs に明らかな影響を認めなかった。

図 1. ニコチン脊髄灌流による IPSCs 増加

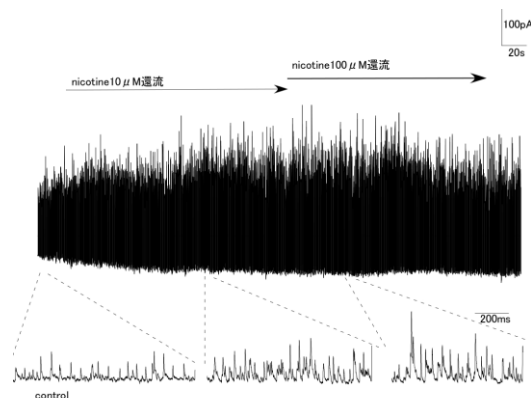
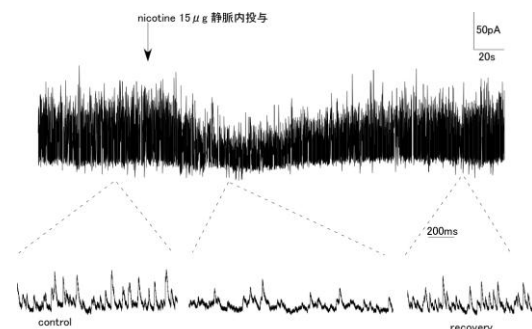


図 2. ニコチン静脈内投与の IPSCs への作用



(3) 今後の方策

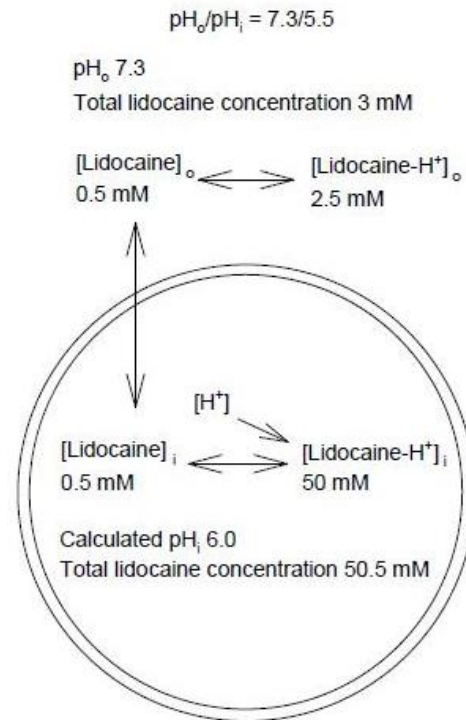
現在までに得られた結果は以上であり、達成度としては当初の計画より遅れている。その理由として、*in vivo* パッチクランプ法による脊髄後角シナプス活動記録の安定性を高めるため、実験設備の整備、*in vivo* 標本作成および記録手技の習得に、予想外の時間を要したためである。またデクスメドミジンをを用いた研究、本研究計画以前から取り組んでいたミクログリアでの研究において意義深い結果を得ており、その検討実施にも研究期間の時間を費やし、遅れた原因の1つである。興奮性シナプス伝達、活動電位に対する作用、さらに急性痛（術後痛）モデルでの作用が残された課題である。今後の研究の推進方策としては、興奮性シナプス電流（EPSCs）および活動電位発生に対する影響、急性痛刺激に対する反応への影響についての検討を行う。ニコチン受容体サブタイプα4β2の選択性が低いため、生体内での作用点が多い。そのため全身投与の影響を評価・解析することが困難となっている可能性があるため、鎮痛に関わりの深いニコチン受容体サブタイプα4β2受容体に選択性の高い化合物も用いて検討を行う。他の麻酔薬、鎮痛薬、鎮静薬の脊髄レベルでの作用も不明な点が多いため、同じ実験系を用いた検討を考えている。

(4) その他

また同じ実験系を用い、低用量の選択的α2アゴニストであるデクスメドミジン、μアゴニストと抗うつ作用を併せ持ったオピオイド鎮痛剤であるトラマドールを静脈内投与すると、IPSCs 増強作用を認めたため、現在そのメカニズムについて詳細な検討を行っている。

本研究計画以前から取り組んでいたパッチクランプ法を用いた研究テーマに関しても意義深い結果を得ていたため、実験および解析を行い、英文誌に報告した。電位依存性プロトンチャネルはミクログリアのような免疫細胞の食食機能において重要な働きを持つ。ミクログリアのプロトンチャネルに対する局所麻酔薬の抑制作用に関する研究では、弱塩基である局所麻酔薬が細胞内pHを上昇させることが抑制のメカニズムであることを明らかにし（図3）、またプロトンチャネルが局所麻酔薬の膜内外動態モニターとして有用であるところを示した（発表論文2）。神経障害性疼痛発症に重要であるミクログリアP2X₄受容体に関する研究では、全身麻酔薬の作用を調べた。全身麻酔薬の中で、プロポフォールのみ臨床濃度で作用し、P2X₄受容体を増強するという結果を得た（発表論文4）。

図3. リドカインによる細胞内pH上昇
(論文2より引用)



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4件)

- ① Megumi Hasaka, Takashi Mori, Tadashi Matsuura, Toshio Narahashi, Miyuki Kuno, Akira Asada, Kiyonobu Nishikawa. Effects of general anesthetics on P2X₄ receptors in a mouse microglial cell line. NeuroReport 査読有 2012 in press.
DOI: 10.1097/WNR.0b013e32835509db
- ② 西川精宣, 森 隆, 局所麻酔と免疫、臨床麻酔 査読無 2012、36巻、147-155
- ③ Tadashi Matsuura, Takashi Mori, Megumi Hasaka, Miyuki Kuno, Junko Kawawaki, Kiyonobu Nishikawa, Toshio Narahashi, Makoto Sawada, Akira Asada. Inhibition of voltage-gated proton channels by local anesthetics in GMI-R1 rat microglia. The Journal of Physiology 査読有2012: 590: 827-843.
DOI: 10.1113/jphysiol.2011.218149
- ④ Yoshihiro Yamama, Kiyonobu Nishikawa,

Tomoharu Funao, Takashi Mori, Akira Asada. Intrathecal gabapentin and clonidine synergistically inhibit allodynia in spinal nerve-ligated rats. Life Science 査読有 2010: 87; 565-571.
DOI: 10.1016/j.lfs.2010.09.017

[学会発表] (計 7 件)

- ① Kotaro Hori, Tadashi Matsuura, Megumi Hasaka, Takashi Mori, Miyuki Kuno, Kiyonobu Nishikawa. "Lipid sink" mechanism of lipid rescue evidenced by voltage-gated proton channels. 41st Critical Care Congress, Society of Critical Care Medicine. Feb 5, 2012. Houston, USA
- ② Yusuke Funai, Kiyonobu Nishikawa, Takashi Mori, Akira Asada, Keiji Imoto, Hidemasa Furue. Systemic injection of α -2 adrenergic agonist enhances inhibitory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn in vivo. Society for Neuroscience 41th Annual Meeting. Nov 16, 2011. Washington DC, USA
- ③ 松浦正, 森 隆, 羽阪めぐみ, 久野みゆき, 西川精宣, 浅田章. リドカインによるミクログリアプロトンチャンネル抑制機序についての検討. 日本麻酔科学会 第57回学術集会. 2010年6月4日 福岡
- ④ 羽阪めぐみ, 森 隆, 松浦正, 久野みゆき, 西川精宣, 浅田章. 全身麻酔薬がミクログリアP2X4受容体に及ぼす影響. 日本麻酔科学会 第57回学術集会. 2010年6月4日 福岡
- ⑤ Megumi Hasaka, Takashi Mori, Tadashi Matsuura, Kiyonobu Nishikawa, Miyuki Kuno, Akira Asada. Effects of general anesthetics on P2X4 receptors in microglia. International Anesthesia Research Society Annual Meeting. March 20, 2010. Honolulu, USA
- ⑥ 松浦正, 羽阪めぐみ, 森 隆, 久野みゆき, 西川精宣, 浅田章. リドカインによるミクログリアのプロトンチャンネル抑制作用. 日本麻酔科学会 第56回大会. 2009年8月15日 神戸
- ⑦ Tadashi Matsuura, Takashi Mori,

Miyuki Kuno, Megumi Hasaka, Kiyonobu Nishikawa, Makoto Sawada, Akira Asada. Lidocaine modulation of voltage-gated proton channels in rat microglia. 国際生理学会 IUPS2009. July 28, 2009. Kyoto, Japan

[図書] (計 3 件)

- ① 山田 徳洪, 森 隆, 浅田章. レボブピバカインの臨床薬理学—ほかの局所麻酔薬との相違点は何か—: 浅田章, 西川精宣編集, レボブピバカインの基礎と臨床, 2010年 p. 3-50. 克誠堂出版 東京
- ② 松浦正, 森 隆, 浅田章. 局所麻酔薬の中樞神経系に対する作用と胎盤通過性: 浅田章, 西川精宣編集, レボブピバカインの基礎と臨床, 2010年 p. 65-77. 克誠堂出版 東京
- ③ 森 隆, 浅田章. 気管挿管の確認法と食道挿管の鑑別. 麻酔科学レクチャー 2009年3巻 679-684

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 隆 (MORI TAKASHI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 00336786

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし