

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16610

研究課題名（和文）脊髄後角ニューロンにおけるレミマゾラムの鎮痛効果およびその作用機序の解明

研究課題名（英文）Actions of remimazolam on inhibitory transmission of rat spinal dorsal horn neurons

研究代表者

出口 浩之（Deguchi, Hiroyuki）

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：30804562

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では脳の アミノ酪酸 (GABA) 受容体に作用し鎮静効果を示すレミマゾラムが、GABA受容体が多く発現する痛覚伝導路の脊髄後角に作用し、脊髄レベルで鎮痛効果を示すか検討した。行動学実験において、レミマゾラムの脊髄くも膜下投与により炎症性疼痛モデルラットの痛み閾値は改善し、免疫組織学実験では痛み刺激に対し発現するリン酸化extracellular signal-regulated kinase陽性細胞数の発現は減少した。脊髄後角でのin vitroパッチクランプから、レミマゾラムは脊髄後角のGABA受容体を介し、抑制性の作用を増強することで鎮痛効果を発揮することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レミマゾラムは静脈鎮静薬として世界に先駆けて初めて日本で臨床での使用が開始された。そのため、その作用機序に関しては十分な研究は行われていないのが現状である。当然のことながら、レミマゾラムの鎮痛効果について着目した研究はこれまでになく、本研究では鎮静薬であるレミマゾラムが、脊髄後角のGABA受容体に作用し鎮痛効果を発揮することを明らかにした世界で最初の研究といえる。さらに本研究ではin vitro脊髄標本による電気生理学実験を用いたが、この手法が行える施設は世界的にも非常に数が少なく、複合的な実験を組み合わせ検討した点において意義が高い研究と考える。

研究成果の概要（英文）：Remimazolam acts on the benzodiazepine site of γ -aminobutyric acid (GABA) receptors in the brain, inducing sedation. Although GABA receptors are also localized in the spinal dorsal horn which modulates pain transmission, no previous studies have reported the analgesic effects or investigated the cellular mechanisms of remimazolam on the spinal dorsal horn. Intrathecal injection of remimazolam produced behavioral analgesia in inflammatory pain-induced mechanical allodynia. Immunohistochemical staining revealed that remimazolam suppressed spinal phosphorylated extracellular signal-regulated kinase activation. In vitro whole-cell patch-clamp analysis demonstrated that remimazolam increased the frequency of GABAergic miniature inhibitory post-synaptic currents and prolonged decay time and enhanced GABA currents induced by exogenous GABA. This study suggests that remimazolam induces analgesia by enhancing GABAergic inhibitory transmission in the spinal dorsal horn.

研究分野：疼痛

キーワード：脊髄後角 炎症性疼痛 GABA 免疫組織学実験 電気生理学実験

1. 研究開始当初の背景

レミマゾラムは、既存のミダゾラムと同じベンゾジアゼピン系全身麻酔薬であり、拮抗薬であるフルマゼニルにより拮抗される。そのためレミマゾラムはミダゾラムと同様に脳内の γ アミノ酪酸 (GABA) 受容体のベンゾジアゼピン結合部位に作用することで鎮静作用を示すと考えられている。一方、この GABA 受容体は脳だけでなく、痛覚伝導路である脊髄後角の特に浅層に多く発現していることが知られている。つまり、レミマゾラムには鎮静作用の他に脊髄後角に作用することで鎮痛効果を発揮する可能性があるが、レミマゾラムの脊髄伝達への影響をシナプスレベルで検討した報告はない。本研究では有効かつ安全性の高い静脈鎮静薬として期待されているレミマゾラムが、痛覚伝導路である脊髄後角へ作用し鎮痛効果も発揮するのではないかと考え、多角的に検討した。

2. 研究の目的

静脈鎮静薬として臨床使用されているレミマゾラムが痛覚伝導路である脊髄後角にも作用し鎮痛効果を発揮するのか、またその作用機序について、行動学実験、免疫組織学実験および電気生理学実験により多角的に解析する。

3. 研究の方法

行動学実験

吸入麻酔下に炎症性疼痛モデルラットとして、左足底に Complete Freund's adjuvant を 100 μ l 注入し、その腰部からポリエチレンカテーテル (PE-10) をくも膜下腔に挿入し、留置したカテーテルよりレミマゾラムを投与する。von Frey 法による痛み閾値を測定し、レミマゾラム投与による痛み閾値の変化を観察する。

免疫組織学実験

ウレタン麻酔下に炎症性疼痛モデルラットから後根付き脊髄スライス標本を作成し、後根刺激を与えながらレミマゾラム 10 μ M をそれぞれ 10 分間還流投与する。その後、痛み刺激により発現することが知られているリン酸化 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 抗体を用いて免疫染色を行う。光学顕微鏡下に脊髄後角第 I-II 層におけるリン酸化 ERK 陽性細胞数を計測し、リン酸化 ERK 発現の変化を観察する。

in vitro 脊髄標本からのパッチクランプ記録

ウレタン麻酔下に脊髄横断スライス (L5) を作成し、ガラス微小電極を光学顕微鏡下にマニピュレーターを用いて脊髄後角第 II 層に誘導しホールセルパッチクランプ記録を行う。テトロドトキシン (TTX) 存在下における微小興奮性/抑制性シナプス後電流 (mEPSC/mIPSC) に対するレミマゾラム還流投与 10 μ M の反応を記録する。これらの反

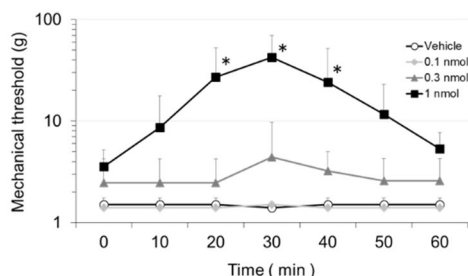
応が GABA 受容体およびグリシン受容体拮抗薬であるピククリン及びストリキニン存在下ではどのように変化するのか記録する。また GABA およびグリシンの投与による誘発電流に対するレミゾラム還流投与の反応を記録する。さらに A δ および C 線維の後根刺激により誘発される単シナプス性 EPSC に対するレミゾラム灌流投与の反応を記録し、一次求心性線維に対する作用を検討する。

4. 研究成果

レミゾラムのくも膜下投与は痛み閾値を改善する。

炎症性疼痛モデルラットにおいて、レミゾラム 1 nmol のくも膜下投与により *von Frey* 法における疼痛閾値は有意に増加した ($n = 6/\text{each dose}$, $*p < 0.05$)。

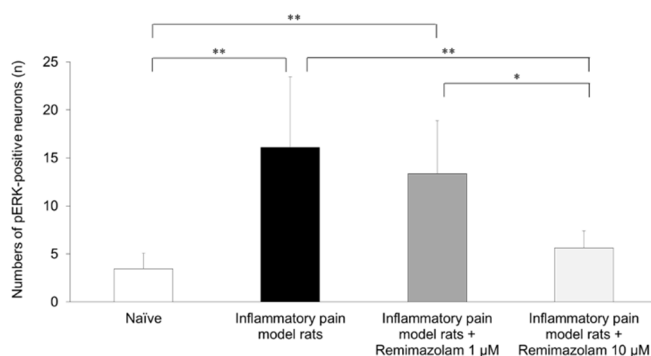
図 1: 疼痛閾値



脊髄後角I-II層では炎症性疼痛により発現したリン酸化 ERK 陽性細胞数はレミゾラムの投与により発現が減少する。

脊髄後角第I-II層における ERK 陽性細胞数は、naïve と比較し炎症性疼痛モデルラットで有意に増加した ($n = 5/\text{each group}$, $**p < 0.01$)。一方、レミゾラム 10 μM の還流投与によりその発現は優位に減少した ($n = 5$, $**p < 0.01$)。

図 2: リン酸化 ERK 陽性細胞数

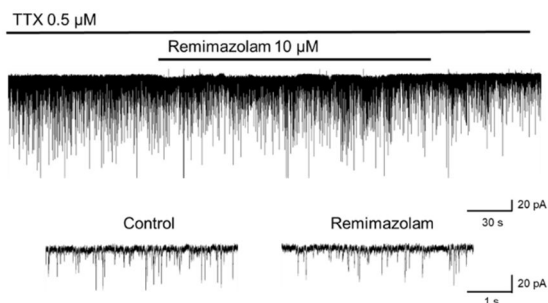


レミゾラムは mEPSC に影響を与えない。

脊髄後角第II層におけるパッチクランプ記録において、レミゾラムは mEPSC の振幅、頻度に影響を与えなかった。このことにより、レミゾラムは脊髄における興奮性シナ

ブス伝達には直接影響を与えないことが明らかとなった。

図 3 : *in vitro* パッチクランプ記録における mEPSC



レミマゾラムはmIPSCの頻度を増加させ、減衰時間は延長させる。またその反応は、GABA 受容体を介して行われる。

脊髄後角第II層におけるパッチクランプ記録において、レミマゾラム 10 μM は mIPSC の頻度を増加させ、減衰時間を延長した。また、この反応は GABA_A 受容体の拮抗薬であるピククリン存在下では生じなかった。さらにレミマゾラム 10 μM は GABA 誘発電流の振幅と面積を増加した。これにより、レミマゾラム 10 μM は脊髄後角の GABA 受容体を介することで抑制性の作用を増強することが明らかとなった。

図 4 : *in vitro* パッチクランプ記録における mIPSC

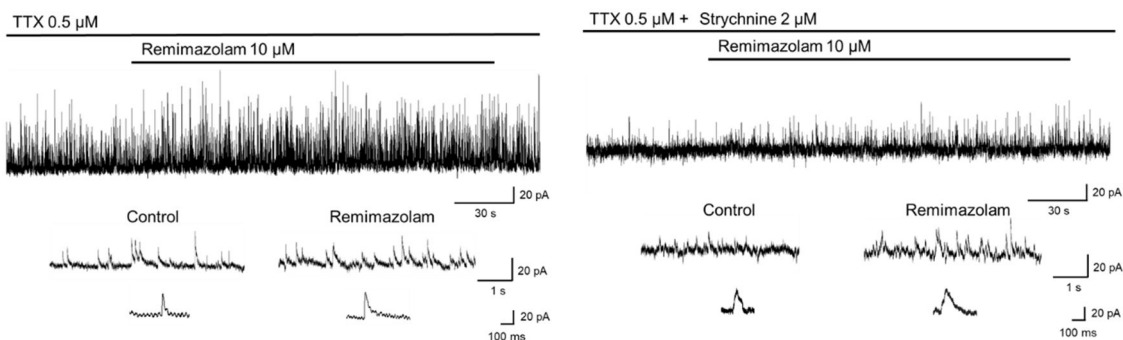
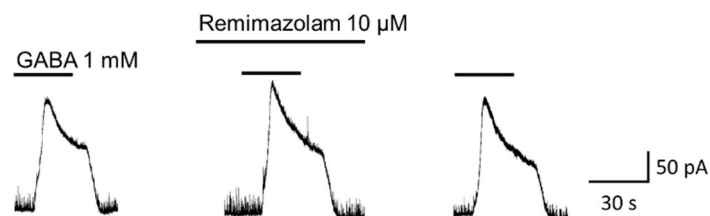


図 5 : GABA 誘発電流

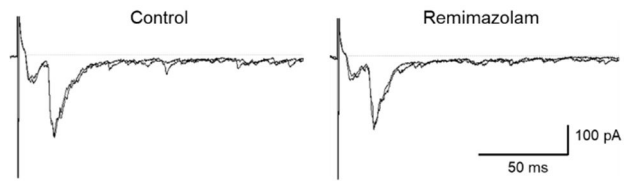


レミマゾラムは一次求心性神経終末に関与しない。

後根付き脊髄横断スライスにおける脊髄後角第II層におけるパッチクランプ記録において、レミマゾラム 10 μM は、A δ ・C 線維刺激によって誘発される単シナプス性 EPSC の

振幅に影響を与えなかった。つまりレミマゾラムは一次求心性神経終末に影響を与えないことが明らかになった。

図 6: 単シナプス性 EPSC



以上の結果より、レミマゾラムは脊髄後角における GABA 受容体を介して、抑制性の作用を増強することにより鎮痛効果を発揮させることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hoshino Rintaro, Ohashi Nobuko, Uta Daisuke, Ohashi Masayuki, Deguchi Hiroyuki, Baba Hiroshi	4. 巻 155
2. 論文標題 Actions of remimazolam on inhibitory transmission of rat spinal dorsal horn neurons	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 63 ~ 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2024.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星野林太郎、出口浩之、大橋宣子、馬場洋
2. 発表標題 レミゾラムの脊髄後角ニューロンにおける作用機序の解明
3. 学会等名 日本麻酔科学会第70回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星野林太郎、出口浩之、大橋宣子、馬場洋
2. 発表標題 レミゾラムは脊髄後角の抑制性ニューロンにおけるGABA受容体に作用し鎮痛効果を発揮する
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第71回学術集会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------