

論文内容の要旨

論文題目：

Effect of AP5 on Hyperventilation-induced Suppression of
Spinal Dorsal Horn Neurons

和訳：

過換気誘発性脊髄後角細胞抑制効果に対するAP5の効果

指導教官： 花岡 一雄 教授

東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻

平成9年4月入学

医学博士課程 学生証番号：77516

氏名：王 金枝

〔はじめに〕

人体の組織には多くの受容体が存在し、受容体選択性の薬剤が開発されるにつれ臨床的にも重要性を増しつつある。L-グルタミン酸、L-アスパルギン酸等は哺乳類の中樞神経系において興奮性神経伝達物質として重要な役割を果たしていることが解明されつつある。グルタミン酸受容体は、N-methyl-D-aspartate(NMDA), kainite(Kain), ((S)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid(AMPA)の3種の作動薬によって細分することができる。AMPAとKainの薬理学的特性ははっきりしていないが、NMDA受容体についてはD-2-amino-5-phosphonovalerate (AP5)等に対する感受性を用いて働きが解明されつつある。興奮性アミノ酸は脊髄後角での侵害情報伝達に関与し、脊髄レベルでの中枢性痛覚過敏はおそらくNMDA受容体に調節されていると考えられている。脊髄後角の侵害受容ニューロンは2種類に分類することができる。即ち、弱い刺激に反応し刺激が侵害的になるまで発射を増加させるものと、侵害刺激のみに反応するものの2種類に、である。前者のニューロンは様々な刺激に反応し、その反応は刺激の強さに依存しているため、広い範囲の刺激に反応する特性をもっているということで“Wide Dynamic Range cells(WDR cells)”と呼ばれている。臨床において、過換気により正常換気下より低い濃度の麻酔薬とより少ない量の筋弛緩薬で麻酔を維持することができた、あるいは鎮痛効果が見られたという報告がある。今回我々は過換気の鎮痛機構とNMDA受容体の関係について競合的拮抗薬であるAP5を用いて検討した。

〔方法〕

300～400gのSprague-Dawley系ラットを用いて実験を行った。ハロセン麻酔下に気管切開、動静脈のカニューレーションを行った。気管切開後、人工呼吸器にて呼吸を維持した。T12～L2の椎弓切除術を行い、立体固定装置に固定した。ハロセン浅麻酔下に実験を行った。脊髄後角細胞活動の測定は、先端部1～2 μ mの露出したタングステン微小電極を用いた細胞外微小電極誘導法により行った。WDR cellの確認は非侵害及び侵害刺激に対する反応により行い、電極先端の深さがマイクロドライバーを用いて脊髄表面から350～850 μ mの深層の細胞を対象とした。実験刺激としては日本光電社製の定量ピンチ刺激装置を用いたピンチを用い、1秒の刺激を加え記録した。反応は、オシロスコープにて持続的に観察を行い、記録はアナログ/デジタルインターフェイス (PowerLab, ADInstrument社製) を介してパソコン (ThinkPad 380, 日本IBM社製) に入力した。刺激開始後5秒間の反応を誘発発射数とした。正常換気下に刺激を行い3回の平均値を対照とした。刺激間隔は5分間とした。その後、前処置群と後処置群として以下のとおりに実験を行った。

(a) 「過換気群」

対照値測定後、 $Paco_2$ が20～25mmHgになるよう換気回数2倍、一回換気量1.5倍の過換気(以後過換気)とした。過換気開始後5分、10分、以後10分間隔で60分間測定を行った。正常換気に戻し発射数が回復するまで測定を行った。

(b) 「AP5群」

対照値測定後、AP5 0.16 μ molを生理的食塩水50 μ lに溶解し脊髄に直接投与

し（以後 AP5 投与）た。投与後 20 分間は 5 分ごと、それ以後は 10 分間隔で 90 分間測定を続けた。

(C)「前処置群」

対照値測定後、AP5 投与を行った。5 分、10 分と測定を行ないその後過換気とした。過換気開始後 5 分、10 分、以後 10 分間隔で 60 分間測定を行った。正常換気に戻し発射数が回復するまで測定を行った。

(d)「後処置群」

対照値測定後、過換気とした。過換気開始後 5 分、10 分、以後 10 分間隔で 50 分間測定を行った。AP5 投与を行ない、5 分、10 分と測定を行なった。正常換気に戻し発射数が回復するまで測定を行った。また、AP5 の有効時間を測定するため、一部の動物では、AP5 投与後 5 分間隔で 30 分間測定を行った。

結果の統計的検討は、まず群内変動について分散分析を行い、有意差が認められた場合に対照値との比較はダネットの多重比較を用いた。群間の比較についてはボンフェローニの多重比較により検討を行った。統計的検討にはスタットビュー ver.5.0（日本語版）を用いた。

[結果]

(a)「過換気群」

分散分析により有意差が認められた。過換気と共に自発及び誘発発射数共に抑制され、40 分で発射数は対照値の 60% 程度になり安定した。自発発射数は過換気後 10 分、誘発発射数は過換気後 5 分で有意差が生じた。正常換気後 20 分で発射数は対照値まで回復した。

(b)「AP5 群」

分散分析により有意差が認められなかった。

(C)「前処置群」

分散分析により有意差が認められた。AP5 投与では変化がみられなかった。過換気開始後 10 分で自発及び誘発発射数共に有意な抑制を示した。発射数は過換気開始後 40 分で対照値の 60% で安定した。正常換気後 20 分で発射数は対照値まで回復した。

(d)「後処置群」

分散分析により有意差が認められた。過換気開始後 10 分で自発及び誘発発射数共に有意な抑制が生じ、40 分で対照値の 60% で安定した。AP5 投与後 10 分で発射数は対照値の約 40% となり、AP5 投与前後で有意な変化がみられた。

なお、時間経過について言えば、有意な変化は AP5 投与後 15 分で、投与後 30 分には投与前値に回復した。

[考察]

AP5 の髄腔内投与単独では WDR 細胞活動に変化はみられなかったが、過換気開始後の AP5 投与は過換気の抑制効果を増強した。特異的 NMDA 受容体拮抗薬 AP5 が過換気の抑制効果を増強することが示された。過換気は臨床的にも鎮痛効果があることが知られている。過換気は、呼吸性の反射活動よりむしろ

低炭酸ガス血症の脊髄反射弓への影響によって、ネコの脊髄反射を亢進することが報告されている。また、ネコの脊髄後角第 V 層細胞の自発活動を過換気が選択的に抑制することが報告されている。第 V 層細胞は深部知覚、体性侵害入力、内臓性入力情報を受けると考えられていた。体性及び内臓性侵害入力に反応する脊髄後角層の選択的抑制が脊髄レベルでの過換気の鎮痛効果に貢献しているのかもしれない。また、WDR ニューロンは脊髄視床路の始まりの細胞と同定されていて、上記のような作用は求心性痛覚情報の中枢への伝達を阻害しているのかもしれない。過換気の WDR ニューロン活動への抑制効果と、その抑制効果がそれぞれナロキソンとフェントラミンにより拮抗されたので過換気の抑制効果のメカニズムは内因性オピオイドによる疼痛制御機構とアドレナリン作動性疼痛制御機構と関連していると報告されている。

今回の結果のとおり AP5 が過換気の抑制効果を増強したことから、過換気による生理学的変化が NMDA 受容体の活動に影響を及ぼしていると考えられる。今回我々は、過換気に関連した侵害性ピンチ刺激への反応における脊髄 NMDA 受容体の役割について AP5 を用いて検討した。AP5 は *in vivo* の実験で視床腹側基底部のニューロンの NMDA 誘発性興奮を 50 mM の量で拮抗したり、*in vitro* の実験では 10~250 μ M で NMDA 誘発性の脊髄後角ニューロンの脱分極を抑制するなど、競合的拮抗薬と考えられている。AP5 とケタミン溶液による脊髄の灌流は低濃度で虚血中の後角ニューロンの発射率を大幅に抑制した。AP5 とケタミンの結果は、ラット脊髄の NMDA 受容体が侵害刺激の求心性伝達に関与しこの受容体への拮抗薬は末梢への侵害刺激への後角広域作動性ニューロンの反応を抑制するという仮説を支持するものである。

今回の結果である AP5 の脊髄への投与のみでは WDR ニューロンの活動に有意な変化をもたらさなかったということは、AP5 により後角神経細胞の受容野への侵害ピンチ刺激への反応に変化をもたらさなかったという報告や、条件付け刺激のない状態で AP5 もケタミンも求心性入力に影響を及ぼさなかったという報告と一致している。今回の AP5 の脊髄への投与実験において、過換気の後角細胞活動抑制効果は大幅に増強された。このことは過換気によりもたらされる生理学的変化が NMDA 受容体の活動に影響を及ぼしていることを示している。低炭酸ガス血症がラットの脳におけるグルタミン酸濃度の上昇させたという報告がいくつかある。興奮性アミノ酸(EAA)である L-グルタミン酸と L-アスパルギン酸も知覚求心路において神経伝達物質としてはたらいっているかもしれない。脊髄後角において高濃度の EAA 結合部位と L-グルタミン酸が発見されていて、EAA 作動薬のクモ膜下投与は侵害刺激への反応と同様の特性の行動を容量依存的にもたらしたが、特異的 NMDA 受容体拮抗薬のクモ膜下投与は電気刺激からの回避反応を抑制したと報告されている。

NMDA 受容体拮抗薬の AP5 は過換気後のグルタミン酸の増加効果を阻害したため、過換気の抑制効果を増強したと考えられるが、抑制効果そのものについてはまだ多くの研究すべき点がある。今回の結果は、低炭酸ガス血症が EAA の濃度の生理学的変化をもたらすと共に、NMDA 受容体は病的状態のみならず、生理学的状況においても神経伝達でその役割を果たしていることを示していると考えられた。