

学位論文題名

The Effect of Clonidine on the Activity of Neurons in the Rat Dorsal Raphe Nucleus In Vitro

(ラット背側縫線核ニューロン活動に対するクロニジンの
抑制作用：脳幹スライス標本を用いて)

学位論文内容の要旨

背側縫線核は下部脳幹の正中線上にある縫線核群に属し、主としてセロトニン含有ニューロンにより構成されている。この核は、興奮性アミノ酸、セロトニン、ドパミン、ノルアドレナリンなどを含む様々な神経細胞から直接投射を受け、その上行性および下行性投射により侵害受容に対する調節に重要な役割を演じている。

中枢神経系のノルアドレナリン作動性神経系は心血管系の調節や痛みの伝達の制御などに重要な役割を果たしている。背側縫線核のセロトニン含有ニューロンの活動性は主として α アドレナリン受容体の活性化により修飾されていることが薬理的、生理学的に証明されており、ノルアドレナリンはラット背側縫線核において興奮性伝達物質として働いている。したがって、ノルアドレナリン神経終末からのノルアドレナリンの持続的放出により背側縫線核ニューロンの発射活動の維持に寄与している。

最近、 α_2 アドレナリン作動薬であるクロニジンが広く麻酔科領域で用いられ、特に鎮痛薬として使用されている。クロニジンの抗侵害刺激作用は主に α_2 アドレナリン受容体への作用によることが示されている。

本研究では抗侵害刺激作用に対するクロニジンの関与をさらに解明するため、背側縫線核ニューロン活動に対するノルアドレナリンの影響を明らかにするとともに、クロニジンがその発射活動にどのような影響を及ぼすかについて解析した。

実験方法

実験には体重20-30 gの幼若ラット40匹を用いた。動物を3%ハロタンで麻酔した後断頭し、迅速に脳を摘出した。氷温に冷却した人工脳脊髄液 (pH7.4, NaCl, 145; KCl, 4; NaH_2PO_4 , 1.25; MgCl_2 , 1.5; CaCl_2 , 2; glucose, 10; $\text{N}\cdot[2\text{-hydroxyethyl}]$ piperazine- $\text{N}'\cdot[2\text{-ethanesulfonic acid}]$, 6 (mM)) 中で、振動式スライサーにより厚さ400 μm の冠状断脳幹スライスを作製した。2または3枚のスライスを30℃に維持した記録槽に移し、酸素化した溶液を3ml/minで灌流した。

3mol/L NaClで満たしたガラス管微小電極を実体顕微鏡下に背側縫線核に刺入し、単一ニューロン活動を細胞外より導出し、オシロスコープに表示した。ウィンドウディスクリミネーターおよびパルスカウンターを用いニューロン活動の発射頻度ヒストグラムを作製した。背側縫線核ニューロンを同定するために興奮性アミノ酸であるN-メチル-D-アスパラギン酸 ($\text{N}\cdot\text{methyl-D-aspartate}$: NMDA) を使用し、安定した発射活動を示すNMDA感受性背側縫線核ニューロンを解析対象とした。3から5分間安定した発射活動を確認した後、試験薬を約3分間投与

し、その間の背側縫線核ニューロン活動を継続して記録した。記録した細胞の発射頻度が基準値の20%以上変化した場合、有為な効果と判定した。

結果

40匹のラットから74個の背側縫線核ニューロン活動を記録した。興奮性アミノ酸を加えなくても自発発射がみられたのは5個のみであった。自発発射の発射頻度は0.2から5スパイク/秒であった。

ノルアドレナリン50 $\mu\text{mol/L}$ の投与は74個のニューロンのうち68個のニューロン(92%)において発射活動を誘発した。これらのニューロンは薬物投与開始より15から30秒後から、0.2ないし10スパイク/秒で発射しはじめた。この発射活動はノルアドレナリン投与を中止した後も長く続いた。

この実験では20 $\mu\text{mol/L}$ のクロニジンを用いた。安定した自発発射活動のみられた全ての背側縫線核ニューロンにおいて、クロニジンは30秒以内に発射頻度を漸減し、その後完全に発射活動を抑制した。これら発射活動を停止したニューロンはノルアドレナリンの投与で再び発射活動を示した。

あらかじめノルアドレナリンで発射活動を誘発した背側縫線核ニューロンの発射頻度はクロニジンで減少し、あるものはクロニジン除去後22秒で回復した。一方いくつかのニューロンではクロニジンが記録槽から除去されてから発射活動の回復まで1分以上かかった。

考察

痛みのコントロールに関与する神経機構について上行性および下行性のセロトニン経路が示されている。鎮痛作用は、セロトニン作動系を介して前脳へ上行し、また脊髄へ下行する複雑な多シナプス経路によりもたらされる。背側縫線核の活動はそこに多数存在するセロトニンニューロンの活動性に依存する。背側縫線核のセロトニンニューロンの発射活動は α アドレナリン受容体作用薬、拮抗薬によって修飾されている。本研究では背側縫線核ニューロンの92%がノルアドレナリンの投与で発射活動を示した。このことはノルアドレナリンが背側縫線核ニューロンを直接興奮させることによってその発射活動を誘発することを示唆する。背側縫線核ニューロンの発射活動はノルアドレナリン性入力がアドレナリン受容体作用薬で減少または遮断されると失われる。

本研究ではクロニジン20 $\mu\text{mol/L}$ は、背側縫線核ニューロンにおいてノルアドレナリンで誘発された発射活動および自発発射活動を抑制した。クロニジン投与でみられた背側縫線核ニューロンの発射活動の減少は α_2 受容体を介した阻害によるものと考えられた。クロニジンはその α_2 作用によりノルアドレナリンの放出も阻害することが考えられた。

結語

- 1) クロニジンは背側縫線核ニューロンの活動を α_2 受容体を介して抑制する。
- 2) 背側縫線核中のノルアドレナリン神経終末から放出されるノルアドレナリンが背側縫線核ニューロンの活動性の維持に影響している。
- 3) クロニジンは背側縫線核ニューロンに対するノルアドレナリンの興奮作用を抑制した。
- 4) 以上の成績から、クロニジンは背側縫線核のセロトニンニューロンの発射活動を減少させ、背側縫線核と入出力関係をもつ異なる系において複合的反応をもたらし、侵害受容を修飾すると推定された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齋 藤 秀 哉
副 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 劔 物 修

学 位 論 文 題 名

The Effect of Clonidine on the Activity of Neurons in the Rat Dorsal Raphe Nucleus *In Vitro*

(ラット背側縫線核ニューロン活動に対するクロニジンの
抑制作用：脳幹スライス標本を用いて)

背側縫線核は、主としてセロトニン含有ニューロンにより構成され、その上行性および下行性投射により侵害受容調節に重要な役割を演じている。背側縫線核のセロトニン含有ニューロンの活動性は主として α アドレナリン受容体の活性化により修飾され、ノルアドレナリンはラット背側縫線核において興奮性伝達物質として働いている。最近、 $\alpha 2$ アドレナリン作動薬であるクロニジンが鎮痛薬として広く使用されているが、その機序として $\alpha 2$ アドレナリン受容体への作用によることが示されている。本研究では抗侵害刺激作用に対するクロニジンの関与を解明するため、背側縫線核ニューロン活動に対するノルアドレナリンの影響を明らかにするとともに、クロニジンがその発射活動にどのような影響を及ぼすかについて解析した。

実験には体重20-30 gの幼若ラット40匹を用いた。麻酔下に脳を摘出し、振動式スライサーにより厚さ400 μ mの冠状断脳幹スライスを作製した。スライスを30℃に維持した記録槽に移し、酸素化した人工脳脊髄液を3ml/minで灌流した。ガラス管微小電極を用い背側縫線核の単一ニューロン活動を細胞外より導出・記録した。背側縫線核ニューロンを同定するために興奮性アミノ酸であるN-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate: NMDA) を使用し、安定した発射活動を示すNMDA感受性背側縫線核ニューロンを解析対象とした。記録した細胞の発射頻度が基準値の20%以上変化した場合、有為な効果と判定した。

40匹のラットから74個の背側縫線核ニューロン活動を記録した。興奮性アミノ酸を加えなくても自発発射がみられたのは5個のみであった。自発発射の発射頻度は0.2から5スパイク/秒であった。ノルアドレナリン50 μ Mの投与は74個のニューロンのうち68個のニューロン (92%) において発射活動を誘発し、

その発射活動はノルアドレナリン投与を中止した後も長く続いた。安定した自発発射活動のみられた全ての背側縫線核ニューロンにおいて、クロニジン ($20 \mu\text{M}$) は30秒以内に発射頻度を漸減し、その後完全に発射活動を抑制した。これら発射活動を停止したニューロンはノルアドレナリンの投与で再び発射活動を示した。あらかじめノルアドレナリンで発射活動を誘発した背側縫線核ニューロンの発射頻度はクロニジンで減少し、あるものはクロニジン除去により回復した。

疼痛制御に関与する神経機構について上行性および下行性のセロトニン経路が示されている。鎮痛作用は、セロトニン作動系を介して前脳へ上行し、また脊髄へ下行する複雑な多シナプス経路によりもたらされると考えられている。背側縫線核の活動はそこに多数存在するセロトニンニューロンの活動性に依存しており、その発射活動は α アドレナリン受容体作用薬、拮抗薬によって修飾されている。本研究では背側縫線核ニューロンの92%がノルアドレナリンの投与で発射活動を示した。このことはノルアドレナリンが背側縫線核ニューロンを直接興奮させることによってその発射活動を誘発することを示唆する。背側縫線核ニューロンの発射活動はノルアドレナリン性入力がアドレナリン受容体作用薬で減少または遮断されると失われる。本研究ではクロニジン $20 \mu\text{mol/L}$ は、背側縫線核ニューロンにおいてノルアドレナリンで誘発した発射活動および自発発射活動を抑制した。クロニジン投与でみられた背側縫線核ニューロンの発射活動の減少は $\alpha 2$ 受容体を介した阻害によるものと考えられた。クロニジンはその $\alpha 2$ 作用によりノルアドレナリンの放出も阻害することが考えられた。

公開討議は約25名の中で行われ、発表の後討議が行われた。3名の審査員に共通した質問として、背側縫線核ニューロンに対するノルアドレナリンの興奮作用およびクロニジンの抑制作用における受容体機序について、特に $\alpha 1$ および $\alpha 2$ アドレナリン受容体、およびシナプス前およびシナプス後作用との関連性についての質問があった。副査の本間教授と主査の斉藤教授から幼若ラットにおける疼痛受容の完成度と成熟ラットとの差異について質問があった。本間教授より、本研究で解析した背側縫線核ニューロンがセロトニン作動性ニューロンである可能性、副査の劔物教授からは、*in vitro* 標本を用いたことの利点、ノルアドレナリンおよびクロニジンの濃度と背側縫線核ニューロンの活動性の関係について質問があった。さらに、斉藤教授からは侵害受容反応を修飾する上行路および下行路における背側縫線核の位置づけ、クロニジンの降圧作用に関与する中枢神経路についての質問などがあった。申請者はこれらの質問に対し、本実験データを踏まえ、これまでの研究成果および既知の実験事実を引用しながら適切な回答および考察を行った。

本研究は、既に臨床的には鎮痛効果が明らかにされているクロニジンについて、*in vitro* 標本を導入することにより背側縫線核ニューロンに対するクロニジンの抑制効果ならびにノルアドレナリンとの相互作用を解析し、これまで不明確であった背側縫線核の疼痛制御における関与を強く決定づけた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。