Characterization of Adenosine Receptors Mediating Spinal Sensory Transmission Related to Nociceptive Information in the Rat

(ラットの脊髄内侵害情報伝達に關与するアデノシン受容体の特定)

学位論文内容の要旨

背景：アデノシンは脊髄内において侵害情報の修飾に重要な役割を果たしていることが知られている。動物実験ではクモ膜下腔にアデノシンまたはその誘導体を投与することにより鎮痛作用が発現する。中枢神経系のアデノシン受容体はA₁及びA₂二つのサブタイプに分けられており、両者とも脊髄内に同定されている。しかし、どちらのアデノシン受容体が鎮痛作用に關与しているのかについては明らかとはいえない。さらに、最近の研究では、A₃受容体の存在とA₂受容体のサブクラス(A_{2a}とA_{2b})の存在が確認され、アデノシン受容体の分類が一層複雑化している。

本研究では新生仔ラットの遊離脊髄標本を用い、後根の電気刺激により前根から得られる単シナプス反射(monsynaptic reflex; MSR)とslow ventral root potential (slow VRP)及び隣接する後根から得られるdorsal root potential (DRP)を記録し、これらの誘発電位に対するアデノシンアゴニストとアンタゴニストの作用を調べた。MSRは一次求心性線維と α 運動ニューロンの直接的シナプス伝達であり、姿勢保持やlocomotionなどの運動機能を反映している。slow VRPは一次求心性C線維の興奮が興奮性アミノ酸およびsubstance Pなどによりインターニューロンを介して運動ニューロンに伝達される興奮性反応であり、侵害反応を反映している。DRPはGABA_A受容体によって一次求心性神経終末に誘発されるシナプス前抑制の指標であり、鎮痛に關与している。

方法：ハロセン麻酔下に新生仔ラットを断頭し、速やかに脊柱管をとりだした。顕微鏡下に脊髄及び神経根を遊離し、人工脳脊髄液を灌流させた記録チャンバーに固定した。ガラス吸引電極を腰髄後根に設置し0.2 msecの矩形波を用いて各誘発電位の最大波形が得

られる刺激強度にて電気刺激した。同側の腰髄前根及び隣接する腰髄後根から得られた各電位をコンピューターに記録した。安定したコントロール値を得た後に薬物を人工脳脊髄液に希釈して脊髄を灌流し、各電位の変化を計測した。

MSRとDRPは陽性波形の最大電圧を、slowVRPは基線と波形で囲まれる面積を測定した。各薬物の容量反応曲線を求め、Hillプロット法にてIC₅₀を算出した。アンタゴニストの解離定数(KD)はSchildプロットにより算出した。

結果：1) アデノシンアゴニストのMSRとslowVRPに対する作用

選択的 A₁ アゴニストである N6-cyclohexyladenosine (CHA) 及び N6-(R)-phenylisopropyladenosine (R-PIA)、非選択的 A₁/A₂ アゴニストである 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) は容量依存性に MSR と slow VRP を抑制した。これらのアゴニストはすべて MSR より slow VRP をより強く (5-8倍) 抑制した。一方、選択的 A₂ アゴニストである CGS21680 は slow VRP を僅かに抑制したが、MSR には 10 μM まで何らの作用も示さなかった。IC₅₀ から求めた効力順位は MSR、slow VRP とも CHA = R-PIA > NECA >> CGS21680 であった。これら薬物の抑制作用はテオフィリン 25 μM 投与により速やかに消失した。

2) アデノシンアンタゴニストのMSRとslowVRPに対する作用

選択的 A₁アンタゴニストである 8-cyclopentyltheophylline (CPT) はそれ自体では 10 μM まで MSR と slow VRP に対して有意な作用を示さなかったが、10 nM, 30 nM, 100nM にて NECA の容量反応曲線を容量依存性に右方に平行移動させた。Schild プロットは傾きがほぼ 1 (MSR: 1.045 ± 0.066, slow VRP: 0.948 ± 0.018) の直線 (MSR: r = 0.998, slow VRP: r = 0.999) となり、横軸切片から求めた pA₂ 値は 8.26 と 8.37 であり、KD 値は 5.5 nM (MSR)、4.3 nM (slow VRP) と計算された。

3) アデノシンアゴニストのDRPに対する作用

GABA_A受容体を介するシナプス前抑制にアデノシン受容体が関与しているか否かを調べるために、CHA、NECA 及び CGS21680 の DRP に対する作用を調べた。CHA 及び NECA は容量依存性に DRP を抑制した (IC₅₀ = 48.5 ± 7.1 nM, 199 ± 16 nM) が、CGS21680 は 1 nM から 3 μM まで有意な作用を示さなかった。DRP に対する増強作用はどの濃度でも認められなかった。効力順位は CHA > NECA >> CGS21680 であった。CPT 100 nM は CHA の容量反応曲線を右方に平行移動させた。CPT 存在下での CHA の IC₅₀ は 2232 ± 799 nM であった。

結論：以上の結果からアデノシンゴニストが脊髄レベルで侵害反応に関与する神経伝達を強く抑制することが示された。しかし、高濃度では運動機能に関連した神経伝達や GAGAA 受容体を介するシナプス前抑制をも抑制することが明らかとなった。さらに、アゴニストの効力順位とアンタゴニストの解離定数はこれらの作用がすべて A1 受容体を介するものであることを強く示唆した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菅 野 盛 夫

副 査 教 授 本 間 研 一

副 査 教 授 劔 物 修

学 位 論 文 題 名

Characterization of Adenosine Receptors Mediating Spinal Sensory Transmission Related to Nociceptive Information in the Rat

(ラットの脊髄内侵害情報伝達に關与するアデノシン受容体の特定)

実験動物のクモ膜下腔に投与されたアデノシンまたはその誘導体が鎮痛作用を発現することから、アデノシンは脊髄内において生体に加えられた侵害情報の修飾に重要な役割を果たしていることが推測されている。最近、脊髄のアデノシン受容体として A₁ 及び A₂ 二つのサブタイプが存在することが明らかにされた。

本研究は、新生仔ラットの遊離脊髄標本を用い、後根の電気刺激により前根から記録される monosynaptic reflex (MSR) と slow ventral root potential (sVRP) 及び隣接する後根から得られる dorsal root potential (DRP) を指標に、侵害刺激脊髄内伝達の修飾に關与する脊髄内アデノシン受容体のサブタイプを薬理的解析によって明らかにすることを目的に行われたものである。後根刺激によって誘発される MSR、sVRP および DRP の生理学的意義は既に明らかにされていて、鎮痛作用との関連性が高いのは sVRP および DRP であり、MSR は姿勢保持や運動機能への影響を反映していると理解されている。実験に用いたラット新生仔遊離脊髄標本は確立された実験手法である。指標として記録した MSR、sVRP および DRP をコンピューター処理を行って測定値は信頼できる。さらに、薬理的解析には、十分な実験例に基づいて確立された手法 (Hill プロットおよび Schild プロット) を用いている。したがって、実験データに対する信頼性は高いと評価される。得られた結果は次のように要約される。

1) 選択的 A₁ アゴニストである N⁶-cyclohexyladenosine (CHA) 及び N⁶-(R)-phenylisopropyladenosine (R-PIA)、非選択的 A₁/A₂ アゴニストである 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) は濃度依存性に MSR と slow VRP を抑制した。一方、選択的 A₂ アゴニストである CGS21680 は slow VRP を僅かに抑制したが、MSR には何らの作用も示さなかった。IC₅₀ から求めた効力順位は MSR、slow VRP と

も $CHA = R-PIA > NECA \gg CGS21680$ であった。これら薬物の抑制作用はテオフィリン投与により速やかに消失した。2) 選択的 A_1 アンタゴニストである 8-cyclopentyltheophylline (CPT) は NECA の濃度反応曲線を右方に平行移動させた。Schild プロットから求めた pA_2 値は 8.26 と 8.37 であり、 K_D 値は 5.5 nM (MSR)、4.3 nM (slow VRP) と計算された。3) CHA 及び NECA は濃度依存性に DRP を抑制したが、CGS21680 は有意な作用を示さなかった。効力順位は $CHA > NECA \gg CGS21680$ であった。CPT は CHA の濃度反応曲線を右方に平行移動させた。以上の結果から申請者は、脊髄レベルで侵害反応に関与する神経伝達を強く抑制するアデノシンアゴニストは、アゴニストの効力順位とアンタゴニストの解離定数からこれらの作用がすべて A_1 受容体を介するものであると結論している。学位論文の公開発表に際して、副査の劔物教授より、使用したアデノシン受容拮抗薬の的確性、アゴニストの作用が washout では消失しない理由、 A_2 及び A_3 受容体の中枢神経系における役割について、副査の本間教授から、slow VRP の生理的意義、アデノシン受容体のクローニング、幼若ラットの脊髄における神経支配、内因性アデノシンの役割について、主査の菅野教授からは本研究で得られた成果の臨床的意義などについて質問があったが、学位申請者は自己データや文献的知識に基づいて概ね妥当な回答を行った。

本研究は、脊髄における侵害刺激伝達の修飾に関与するアデノシンおよびアデノシン受容体アゴニストが作用するのはアデノシン受容体 A_1 サブタイプであることを薬理的に明確にしたものであって、臨床における疼痛管理の薬物療法に新たな視点を与えるものと審査員一同は高く評価した。加えて、医学及び専門領域における申請者の深い学識を認め、申請者が博士(医学)を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。