

学位論文題名

アセチルコリン受容体作動薬および
ノルアドレナリンの大縫線核ニューロンに対する作用

—ラット脳幹スライスを用いて

学位論文内容の要旨

「緒言」生体には侵害受容を内部から調節し、痛みを軽減する内因性鎮痛機構が存在する。大縫線核はこの内因性鎮痛機構である下行性疼痛抑制系を構成する重要な神経核の一つである。大縫線核は非選択的コリン受容体作動薬であるカルバコールやニコチン型コリン受容体作動薬であるエピバチジンの鎮痛作用の作用部位の一つと考えられるが、これらコリン受容体作動薬が大縫線核ニューロンの発射活動をどの様に修飾しているか十分には明らかにされていない。また、大縫線核において鎮痛に関与していると考えられているノルアドレナリンとコリン受容体作動薬の関与も検討されていない。ラットのスライス標本において、自発発射がみられない大縫線核ニューロン(サイレントニューロン)にはセロトニン作動性ニューロンが多く含まれ、自発発射のみられるニューロン(自発発射ニューロン)の多くは非セロトニン作動性ニューロンである。

本研究では、スライス標本をもちいて、1、大縫線核の自発発射ニューロンとサイレントニューロンに対するカルバコール、エピバチジン、ノルアドレナリンの作用を解析した。2、同一大縫線核ニューロンに対する、異なる2種の薬物(カルバコールとエピバチジン、ノルアドレナリンとカルバコール、ノルアドレナリンとエピバチジン)の作用を比較した。

「方法」1、ラットを3%セボフルラン麻酔下に断頭し、十分に酸素化された人工脳脊髄液中で脳を摘出し、振動式スライサーで大縫線核を含む高さの脳幹スライス(厚さ400 μ m)を作製した。2、脳幹スライスを酸素化した人工脳脊髄液で灌流した恒温記録槽に固定、実体顕微鏡下で大縫線核を同定し、3MNaCl封入微小ガラス管電極で大縫線核ニューロンの発射活動を細胞外より導出、記録した。サイレントニューロンの発射活動を誘発するためには人工脳脊髄液に溶解したN-メチル-D-アスパラギン酸50 μ Mを使用した。3、発射活動の記録が安定したところで人工脳脊髄液に溶解した薬物を恒温記録槽に灌流、発射頻度の変化を記録した。発射頻度の変化は基準の発射頻度から20%以上増減した場合を有意な効果と判定した。

「結果」カルバコールにより自発発射ニューロンの33%が興奮し、54%は抑制され、サイレントニューロンの50%が興奮した。カルバコールの興奮および抑制作用はアトロピン1 μ Mで拮抗された。カルバコールの抑制作用はムスカリン型アセチルコリン受容体M2拮抗薬メクトラミン1 μ Mで拮抗された。

エピバチジンにより自発発射ニューロンの62.5%、サイレントニューロンの25%が興奮した。ニコチン型アセチルコリン受容体拮抗薬であるメカミラミン1 μ Mによってエピバ

チジンの興奮作用は拮抗された。

ノルアドレナリンにより自発発射ニューロンの67.5%が興奮し、21.5%が抑制され、サイレントニューロンの64%が興奮した。

カルバコールで興奮する自発発射ニューロンの83%、カルバコールで抑制される自発発射ニューロンの58%がエピバチジンで興奮した。カルバコールで興奮したサイレントニューロンにはエピバチジンで興奮するものではなく、カルバコールで興奮しないサイレントニューロンの33%がエピバチジンで興奮した。

ノルアドレナリンで興奮した自発発射ニューロンの40%がカルバコールで興奮し、50%が抑制された。ノルアドレナリンで抑制された自発発射ニューロンはすべてカルバコールで抑制された。自発発射ニューロンではノルアドレナリンで抑制されるもので有意にカルバコールで抑制される割合が多かった。ノルアドレナリンで興奮したサイレントニューロンのうち33%、ノルアドレナリンで興奮しないサイレントニューロンのうち40%がカルバコールで興奮した。

ノルアドレナリンで興奮した自発発射ニューロンの83%、ノルアドレナリンで抑制された自発発射ニューロンの60%、ノルアドレナリンで興奮したサイレントニューロンの67%、ノルアドレナリンで興奮しないサイレントニューロンの25%がエピバチジンで興奮した。

「考察」カルバコールは大縫線核のサイレントニューロンの50%、自発発射ニューロンの33%を興奮させたことから、カルバコールは大縫線核のセロトニン作動性ニューロンと非セロトニン作動性ニューロンの両方を興奮させて下行性疼痛抑制系を賦活化する可能性が考えられる。一方、自発発射ニューロンの54%でカルバコールによる抑制作用が見られたことから、下行性疼痛抑制系に属する大縫線核ニューロンを抑制して部分的に疼痛を増強している可能性と大縫線核ニューロンを抑制することにより、他のニューロンを介して下行性疼痛抑制系を賦活化する可能性の両方が考えられる。カルバコールの作用がアトロピンにより拮抗されたことから、カルバコールの大縫線核に対する作用はムスカリン型アセチルコリン受容体を介していると考えられる。

エピバチジンにより、大縫線核のサイレントニューロンの25%、自発発射ニューロンの62.5%が興奮した。その反応はニコチン型アセチルコリン受容体拮抗薬であるメカミラミンにより拮抗されたことから、エピバチジンはニコチン型アセチルコリン受容体を介して大縫線核ニューロンを興奮させ、下行性抑制系を賦活化して鎮痛作用を発現していると考えられる。エピバチジンによりサイレントニューロンと自発発射ニューロンの両方でエピバチジンによる興奮作用がみられたことから、セロトニン作動性ニューロンと非セロトニン作動性ニューロンの両方が大縫線核におけるエピバチジンの鎮痛作用に関与していると考えられる。

自発発射ニューロンの21%がノルアドレナリンで抑制されたことから、ノルアドレナリンは一部の大縫線核を抑制しており、その入力ブロックされると大縫線核ニューロンが興奮して下行性疼痛抑制系が賦活化され鎮痛作用を示す可能性が考えられる。一方、ノルアドレナリンにより自発発射ニューロンの67.5%、サイレントニューロンの64%で興奮作用がみられた。興奮作用を示すことで疼痛を増強し、その作用がブロックされることにより鎮痛作用がもたらされる可能性も考えられる。

本研究では同一ニューロンに2種類以上の薬物を投与して、作用のみられるニューロンが重複するかどうか、また、その作用に関連がみられるかどうか検討した。多くの大縫線核ニューロンにおいてカルバコール、エピバチジンおよびノルアドレナリンは興奮または抑

制作用を及ぼし、作用のみられるニューロンが重複していることから、共通の経路を通して鎮痛作用が発現する可能性が考えられる。しかし、その作用に統計学的に有意な関連がみられたのは、自発発射ニューロンにおけるカルバコールとノルアドレナリンの作用のみであり、様々な反応の組合わせを示したニューロンがどのように侵害受容機構に関与しているか解析するためには、個々のニューロンが投射する部位を特定した研究が必要となる。

「結語」カルバコールは大縫線核ニューロンを抑制又は興奮させて、エピバチジンは大縫線核ニューロンを興奮させて、内因性鎮痛機構を修飾している可能性がある。カルバコール、エピバチジン、ノルアドレナリンは一部で同じ大縫線核ニューロンの発射活動を修飾し、共通の経路に働いている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 劔 物 修

副 査 教 授 本 間 研 一

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

アセチルコリン受容体作動薬および ノルアドレナリンの大縫線核ニューロンに対する作用

－ラット脳幹スライスを用いて

生体には侵害受容を内部から調節し、痛みを軽減する内因性鎮痛機構が存在する。大縫線核はこの内因性鎮痛機構である下行性疼痛抑制系を構成する重要な神経核の一つである。本論文は生後10日目のラット脳幹スライス標本を用いて、非選択的アセチルコリン受容体作動薬であるカルバコール、ニコチン型アセチルコリン受容体作動薬であるエピバチジン、ノルアドレナリンの大縫線核ニューロンに対する作用を解析し、あわせて同一大縫線核ニューロンにおける異なる2種の薬物（カルバコールとエピバチジン、ノルアドレナリンとカルバコール、ノルアドレナリンとエピバチジン）の作用を比較したものである。各薬物の個々の大縫線核ニューロンに対する作用は、大縫線核ニューロンの発射活動を細胞外から記録し、各薬物を投与した際の発射活動の変化を調べることにより解析した。また、スライス標本において自発発射の見られるニューロン（自発発射ニューロン）は主に非セロトニン作動性ニューロンであり、自発発射の見られないニューロン（サイレントニューロン）は主にセロトニン作動性ニューロンであることから、自発発射ニューロンとサイレントニューロンに分けて解析した。

本論文では、カルバコールにより大縫線核の一部のニューロンで興奮作用および抑制作用がみられ、この興奮作用及び抑制作用がアトロピンで拮抗されることを示した。このことから、カルバコールは主にムスカリン型アセチルコリン受容体を介して大縫線核ニューロンを興奮又は抑制することにより下行性疼痛抑制系を修飾していることが示唆された。また、サイレントニューロンと自発発射ニューロンの両方でカルバコールによる興奮作用が見られたことから、カルバコールがセロトニン作動性ニューロンと非セロトニン作動性ニューロンの両方に作用している可能性を示した。加えて、カルバコールによる抑制作用はムスカリン型アセチルコリン受容体M2拮抗薬メクトラミンにより拮抗されることも示した。エピバチジンについては、大縫線核の一部のサイレントニューロンおよび自発発射ニューロンを興奮させ、その作用はニコチン型アセチルコリン受容体拮抗薬メカミラミンで拮抗されることを示した。このことから、エピバチジンがセロトニン作動性ニューロン及び非セロトニン作動性ニューロンを興奮させることにより、下行性疼痛抑制系を修

飾している可能性が示唆された。ノルアドレナリンについては、大縫線核の一部のニューロンで興奮作用および抑制作用がみられること、興奮作用はサイレントニューロンと自発発射ニューロンの両方で見られることを示した。このことから、ノルアドレナリンが大縫線核ニューロンを抑制または興奮することにより下行性疼痛抑制系を修飾している可能性が示唆された。また、多くの大縫線核ニューロンでカルバコール、エピバチジン、ノルアドレナリンは興奮または抑制作用を及ぼし、同一ニューロンで作用がみられることを示し、カルバコールとエピバチジン、カルバコールとノルアドレナリン、エピバチジンとノルアドレナリンは部分的に共通の鎮痛調節経路に働いている可能性が示唆された。

学位論文の公開発表に際し、副査の吉岡充弘教授より10日目のラットの神経系の発達、大縫線核の下行性疼痛抑制系にかかわるニューロンの割合、今後考え得る鎮痛薬の研究、下行性疼痛抑制系の生理的役割についての質問があった。次いで副査の本間研一教授より大縫線核のセロトニン作動性ニューロンのうち下行性疼痛抑制系にかかわるニューロンの割合、薬物の作用は同一ニューロンに存在する受容体を介するのかインターニューロンを解するのか、サイレントニューロンをN-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）で興奮させた状態の薬物の作用、サイレントニューロンに対し薬物投与後にNMDA投与で発射誘発を確認したか否かについての質問があった。また、主査の劔物修教授よりムスカリン型アセチルコリン受容体M₂拮抗薬投与の理由、薬物の作用において仮説と結果で異なった点と一致した点、今回の研究により疼痛治療にセロトニン作動性ニューロンやノルアドレナリン作動性ニューロンなどを介して働く薬物について考えられることについての質問があった。申請者はいずれの質問に対しても自己の研究結果ならびに文献による最新の知見をもとに適切な回答を行った。

本論文は下行性疼痛抑制系の重要な神経核である大縫線核におけるアセチルコリン受容体作動薬の働きを明らかにし、生体の疼痛調節機構の一部を解明したものであり、この領域の研究の発展に貢献し、臨床における疼痛管理に貴重な示唆を与えるものと考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得等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。