

学位論文題名

脊髄における亜酸化窒素の
鎮痛機構に関する免疫組織化学的研究

学位論文内容の要旨

亜酸化窒素 (nitrous oxide: N₂O) は 150 年以上にわたり広く使用されている麻酔薬であるが、その作用機序に関しては未だに不明な部分が多い。近年、亜酸化窒素の鎮痛機構にはノルアドレナリン作動性下行性抑制系が関与していることが明らかにされつつある。最近の研究結果を総合すると、亜酸化窒素が作用することによってノルアドレナリン作動性下行性抑制系が賦活化され、脊髄でノルエピネフリンが放出され、結果として脊髄レベルで侵害刺激の伝達が抑制されていると考えることができる。ラットの脊髄で存在が確認されているアドレナリン作動性受容体は、アドレナリン作動性 α_1 受容体 (以下 α_1 受容体) とアドレナリン作動性 α_2 受容体 (以下 α_2 受容体) である。 α_1 受容体は興奮性の、 α_2 受容体は抑制性の神経細胞活動を引き起こす。脊髄レベルでは、亜酸化窒素の作用によって放出されたノルエピネフリンが、 α_2 受容体を介して直接的に侵害刺激伝導を抑制していることが示されている。一方、 α_1 受容体を介して抑制性介在ニューロンを賦活化することにより、間接的に侵害刺激伝導を抑制するという作用機序の存在も推定されるが、未だに仮説の域を出ない。

c-Fos タンパクはニューロン賦活化の組織学的なマーカーとして広く用いられている。本研究は二つの部分から成るが、前半の研究は亜酸化窒素によって賦活化される鎮痛経路に、 α_1 受容体および代表的な抑制性介在ニューロンである γ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性ニューロンが関与していることを、c-Fos を指標にして免疫組織化学的に明らかにすることを目的としている。まず亜酸化窒素によって脊髄で c-Fos が誘導されるか検討し、続いて c-Fos が誘導された細胞は GABA 作動性ニューロンであるか、および同一細胞に α_1 受容体が共存しているかを検討した。

また、亜酸化窒素の鎮痛機序にノルアドレナリン作動性下行性抑制系が関与していることを考えると、新生ラットではノルアドレナリン作動性下行性抑制系が機能的に未完成であるとされているので、亜酸化窒素の鎮痛作用が得られないという仮説が成り立つ。後半の研究では、この仮説を 1 から 4 週齢のラットにおいて、c-Fos の発現を指標に免疫組織化学的方法で検討した。

[方法] 前半の研究では 11 週齢の Fischer 系および Lewis 系雄性ラットを使用した。まず、Fischer 系ラットに 75% 亜酸化窒素を 0 から 180 分間投与し、腰髄レベルでの c-Fos の発現を検討した。次に、Fischer 系ラットに 75% および 25% 亜酸化窒素、または空気を 90 分間投与し c-Fos の発現を検討した。さらに、Lewis 系ラットに 75% 亜酸化窒素を投与し、Fischer 系ラットと c-Fos の発現を比較した。以上の実験では、ラットをパラホルムアルデヒドで固定した後、脊髄を取り出し腰髄の凍結切片を作成した。この切片に対し、1 次抗体としてヤギ抗 c-Fos 抗体、2 次抗体としてビオチン標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体を用い、3,3-diaminobenzidine (DAB) で発色させる方法で c-Fos を染色し、光学顕微鏡で

観察した。

また、75%亜酸化窒素投与 Fischer 系ラットを用いて、c-Fos とグルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamic acid decarboxylase: GAD) が同一細胞に存在しているかを解析した。GAD は GABA 合成に必要な酵素で、GAD が存在する細胞は GABA 産生細胞である。1 次抗体としてヤギ抗 c-Fos 抗体とウサギ抗 GAD 抗体、2 次抗体として蛍光標識したロバ抗ヤギ IgG 抗体とロバ抗ウサギ IgG 抗体を用いた二重染色を行い、共焦点顕微鏡で解析した。さらに、亜酸化窒素によって誘導される c-Fos と α_1 受容体が同一細胞に共存しているかを同様に蛍光二重染色により解析した。

後半の研究では、1, 2, 3 および 4 週齢の Fischer 系ラットに 75%亜酸化窒素または空気を 90 分間投与し、パラホルムアルデヒドで固定した後、脊髄を取り出し頸髄と腰髄の凍結切片を作成した。DAB 染色を行い光学顕微鏡で c-Fos を観察した。

[結果と考察] Fischer 系ラットでは、75%亜酸化窒素投与によって脊髄の c-Fos 陽性細胞が増加した。この反応は亜酸化窒素の投与時間に依存し、90 ないし 120 分で最高となり、基底状態のおよそ 3 倍に増加した。また、濃度にも依存傾向がみられた。層別にみると I-II 層以外で c-Fos の増加が認められ、特に III-IV 層で顕著であった。しかし、Lewis 系ラットでは亜酸化窒素による c-Fos の誘導は認められなかった。このことは、Fischer 系ラットでは亜酸化窒素投与によって強い鎮痛作用が認められたが、Lewis 系ラットでは認められないという行動学的研究の結果に対応するものと考えられる。

二重染色によって c-Fos が誘導される細胞の大部分は、GAD を持つ細胞であることが示された。つまり、亜酸化窒素によって c-Fos が誘導される細胞は主に GABA 作動性ニューロンである。また、III-IV 層で c-Fos が誘導されているニューロンの多くは α_1 受容体を持ったニューロンであることが示された。

以上から、亜酸化窒素は脊髄で α_1 受容体を介して GABA 作動性介在ニューロンを賦活化し、それが鎮痛作用に関与していることが示唆された。しかし、V-VI 層で c-Fos が誘導されるニューロンは α_1 受容体と共存していないものも多く認められたことや、ノルアドレナリン作動性下行性抑制系の終末が分布する I-IV 層以外でも c-Fos の増加が認められたということは、ノルアドレナリン作動性以外の神経経路も関与している可能性を示唆しており、今後さらに検討が必要である。

ラットの発育過程における亜酸化窒素に対する反応をみた研究では、1 週齢のラットでは頸髄、腰髄ともに亜酸化窒素による c-Fos の誘導は認められなかった。2, 3 および 4 週齢では、頸髄、腰髄ともに亜酸化窒素群で c-Fos 陽性細胞の有意な増加が認められた。本研究の結果は、亜酸化窒素は幼若ラットでは鎮痛効果を示さないという行動学的研究の結果と矛盾しない。幼若ラットではノルアドレナリン作動性下行性抑制系が機能的に未完成なためであると考えられる。

[結論]本研究において亜酸化窒素がラット脊髄の GABA 作動性ニューロンを賦活化することが示された。とくに III-IV 層での GABA 作動性ニューロンの賦活化は α_1 受容体を介した反応であることが示唆された。今後のさらなる研究により、亜酸化窒素の作用機序が明らかにされると同時に、不明な点の多い下行性抑制系の機構が解明され、より有効な鎮痛薬や麻酔薬の開発に寄与することが期待される。

また、亜酸化窒素投与によって 2 週齢以上のラットでは脊髄に c-Fos が誘導されるが、1 週齢ラットではこの反応が欠如していることが示された。今後、ヒトの小児期における亜酸化窒素の鎮痛効果に関しての再検討が必要と考えられ、それによって小児麻酔の方法が改善することが期待される。

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 丸 藤 哲

学 位 論 文 題 名

脊髄における亜酸化窒素の 鎮痛機構に関する免疫組織化学的研究

初めに、亜酸化窒素によって賦活化される脊髄の鎮痛経路に、 α_1 受容体および抑制性介在ニューロンである γ -アミノ酪酸(GABA)作動性ニューロンが関与していることを、c-Fosを指標にして免疫組織化学的に示した研究に関する説明が行われた。この研究は、亜酸化窒素はノルアドレナリン作動性の下行性抑制系を賦活化し、脊髄でアドレナリン作動性 α 受容体を介して鎮痛作用を発揮するという、最近提唱されている仮説を背景としたものである。亜酸化窒素は脊髄において α_1 受容体を介してGABA作動性介在ニューロンを賦活化し、これによって間接的に侵害刺激の伝導を抑制するという仮説を、c-Fosタンパクをニューロン賦活化の指標として免疫組織化学的手法で証明することを目的としている。

実験は亜酸化窒素により強い鎮痛作用が得られるFischer系ラットと、鎮痛作用が得られないLewis系ラットを用いて行われた。亜酸化窒素を負荷したFischer系ラットでは、亜酸化窒素の投与時間と濃度に依存して腰髄レベルでc-Fosタンパクが誘導されることが示された。しかしLewis系ラットではc-Fosタンパクは誘導されなかった。次にFischer系ラットにおいて、亜酸化窒素でc-Fosが誘導されたニューロンには、GABA合成酵素であるGADが共存していることが二重染色で証明され、さらに亜酸化窒素でc-Fosが誘導されたニューロンのうち、特にIII層とIV層に存在するニューロンは α_1 受容体とも共存していることが、同様に二重染色で示された。

結論として、亜酸化窒素がラット脊髄のGABA作動性ニューロンを賦活化することが示され、特にIII-IV層においてはGABA作動性ニューロンの賦活化は α_1 受容体を介していることが示された。この機構は亜酸化窒素の鎮痛作用の一部を担っているものと推定された。

次に、新生ラットでは亜酸化窒素による鎮痛作用が得られないとする行動学的研究の結果を背景に、c-Fosの発現を指標に免疫組織化学的側面から、新生ラットにおける亜酸化窒素の効果を検討した研究についての説明が行われた。新生ラットではノルアドレナリン作動性下行性抑制系が機能的に未発達であるため、亜酸化窒素投与によっても脊髄でc-Fos

が誘導されないという仮説を証明することが目的であった。

1 から 4 週齢の Fischer 系ラットを使用し、亜酸化窒素投与後の頸髄と腰髄レベルでの c-Fos タンパクの発現を免疫組織化学で検討した結果、1 週齢では頸髄、腰髄ともに c-Fos は誘導されなかったが、2, 3, 4 週齢では c-Fos が誘導されることが示された。

結論として、亜酸化窒素投与によって 2 週齢以上のラットでは脊髄に c-Fos が誘導されるが、1 週齢ラットではこの反応が欠如していることが示された。新生ラットではノルアドレナリン作動性下行性抑制系が機能的に未完成であるため、亜酸化窒素による鎮痛作用が得られないことが示唆された。

以上が学位論文の要旨に関する発表であり、この発表について主査および副査からの質疑があった。

まず、副査丸藤教授より GABA を介した鎮痛作用に関する質問があった。これに対して、GABA を介した鎮痛作用は、急性痛における補助的作用とともに、慢性痛に対する主要な役割を果たしている可能性があることを文献を引用して回答した。また、脊髄における α_2 受容体の鎮痛への関与についての質問があった。これに対して、 α_2 受容体は脊髄の I-II 層に分布しており、この境域で侵害刺激伝導を直接抑制している可能性があることを文献を引用して回答した。さらに今回発表された形態学的研究に対応するような行動学的研究に関する質問があり、学位論文の引用論文に記載されている α_1 , α_2 受容体遮断薬を投与して行った行動学的研究を引用して回答した。

続いて、副査本間教授より α_1 受容体を介する鎮痛機構と α_2 受容体を介する鎮痛機構ではどちらが主要な鎮痛機構と考えられるかとの質問があった。引用論文に記載されている行動学的研究を引用し、両機構とも同程度の鎮痛効果を有すると考えられるが、過去の報告では α_2 受容体が主体であるとするものが多いことを述べた。また、亜酸化窒素以外で下行性抑制系を介した GABA 作動性ニューロンの賦活化を惹起する薬物や生理的現象があると考えられるかとの質問があった。現在のところ他の麻酔薬では同様の現象は観察されていないことを実験成績をもとに回答し、ストレス反応では亜酸化窒素と同様の反応が認められる可能性があることを付言した。

最後に主査の劔物教授よりこの研究の意義と今後の展望に関する質問があった。今後のさらなる研究により、亜酸化窒素の作用機序が明らかにされ、同時に不明な点の多い下行性抑制系の機構が解明されることが期待されるとの回答があった。

この論文は長らく不明であった亜酸化窒素の作用機序の一部を明らかにしたことで評価され、その成果は今後、鎮痛薬や麻酔薬の開発や使用方法の改善に役立つことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。