

# アミトリプチリンのラット脊髄における 鎮痛作用に関する組織学的研究

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】 抗うつ薬は各種の疼痛緩和に有効であることが臨床的に知られている。しかしその鎮痛作用の機序については、十分には解明されていない。動物実験では、炎症性または神経障害性の疼痛モデルを用いて、各種の抗うつ薬をクモ膜下腔、末梢神経近傍、または腹腔内に投与し、行動学的方法により抗うつ薬が鎮痛作用を持つことを示した報告が多数ある。しかしその作用機序については未だに不明な点が多く、仮説の域を出ない。代表的な仮説としては、抗うつ薬がノルアドレナリンやセロトニンの再取り込みを阻害することで下行性抑制系の作用が増強され鎮痛作用を発揮するというものがある。ノルアドレナリン作動性下行性抑制系は脊髄において $\alpha_2$ 受容体を介した経路と、 $\alpha_1$ 受容体とGABA作動性介在ニューロンが関与する経路の二つが存在していると考えられている。本研究では、これら二つの経路のうち、 $\alpha_1$ 受容体とGABA作動性ニューロンが関与する経路について、抗うつ薬との関係を明らかにすることを目標とした。つまり、抗うつ薬投与により、脊髄において $\alpha_1$ 受容体を介してGABA作動性ニューロンが興奮することを証明するのが目的である。GABA作動性ニューロン興奮の指標としては、c-Fosタンパクの発現を免疫組織学的に検出する方法を用いた。

【対象と方法】 実験1：体重250~350g雄性ラットを使用し、抗うつ薬は臨床的にも広く使用されているアミトリプチリンを使用した。アミトリプチリン(溶媒：6%ブドウ糖液)のクモ膜下腔投与は直接穿刺法により行い、イソフルラン麻酔下に腰椎椎間から薬液をクモ膜下腔投与した。投与後の時間経過とc-Fos発現の関係を調べるために、60 $\mu$ gのアミトリプチリンをクモ膜下投与し、投与して0, 1, 2, 3, 4および5時間後にラットを固定し脊髄を摘出した。アミトリプチリンの投与量とc-Fos発現の関係を調べるため、アミトリプチリン15, 30, 60および90 $\mu$ gを脊髄クモ膜下腔投与し、対象群として溶媒のみをクモ膜下投与した。時間経過との関係で調べた結果に基づき、4時間後にラットを固定し脊髄を摘出した。摘出した標本の凍結切片を作成し、免疫組織染色を施行した。脊髄の切片に対してc-FosのDAB染色、及びc-Fosとグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)の蛍光二重染色を行った。DAB染色したc-Fos陽性細胞の定量と、蛍光二重染色によるc-FosとGADの共存性の解析を行った。c-Fos陽性細胞の定量に関するデータについては、多群間の比較を一元配置分散分析で行い、post-hoc testとしてはTukey's testを用いた。c-FosとGADの局在に関するデータについては、Student t検定を用いて、層別にアミトリプチリン0 $\mu$ g群と60 $\mu$ gのc-Fos陽性細胞数を比較した。

実験2：実験1と同様の方法で薬液をクモ膜下投与した。 $\alpha$ 受容体拮抗薬としてプラゾシン( $\alpha_1$ 受容体拮抗薬)とヨヒンビン( $\alpha_2$ 受容体拮抗薬)を使用した。4群に分けて、第1群(対照群)では6%ブドウ糖10 $\mu$ lのみをクモ膜下腔に投与した。第2群では6%ブドウ糖10 $\mu$ lをクモ膜下腔に投与し、15分後にアミトリプチリン60 $\mu$ gをクモ膜下腔投与した。第3群では6%ブドウ糖10 $\mu$ lに溶解したヨヒンビン30 $\mu$ gをクモ膜下腔に投与し、15分後に6%ブドウ糖5 $\mu$ lに溶解したアミトリプチリン

60 $\mu$ g をクモ膜下腔投与した。第4群では蒸留水 10 $\mu$ l に溶解したプラゾシン 20 $\mu$ g をクモ膜下腔に投与し、15 分後に 6%ブドウ糖 5 $\mu$ l に溶解したアミトリプチリン 60 $\mu$ g をクモ膜下腔投与した。実験 1 と同様の方法で切片を作成した後、c-Fos の DAB 染色を行い、c-Fos 陽性細胞の定量分析を行った。

【結果】 実験 1: 腰髄の c-Fos 陽性細胞数は、アミトリプチリン投与後 4 時間までは経過時間に依存して増加する傾向が認められた。投与 4 時間で最大値となり、0 時間と比較して有意な増加が認められた。用量別では、30、60 および 90 $\mu$ g の投与では、0 $\mu$ g に比較して有意に c-Fos 陽性細胞数が増加した。c-Fos と GAD の蛍光二重染色では、多くの c-Fos 陽性細胞が、同時に GAD 陽性であることが示された。しかし c-Fos 陽性であるが GAD 陰性の細胞も存在した。層区分毎にその共存状況を比較すると、I - II 層においては c-Fos 陽性かつ GAD 陽性の細胞も、c-Fos 陽性かつ GAD 陰性の細胞も、ともに有意に増加した。III - IV 層では c-Fos 陽性かつ GAD 陽性の細胞のみが有意に増加しており、c-Fos 陽性かつ GAD 陰性の細胞は 0 $\mu$ g 群と比較して有意差はなかった。V - VI 層と VII - X 層では c-Fos 陽性かつ GAD 陽性細胞、c-Fos 陽性かつ GAD 陰性細胞ともに、0 $\mu$ g 群と比較して有意な変化を認めなかった。

実験 2:  $\alpha$  受容体拮抗薬を投与後にアミトリプチリンを投与した場合の c-Fos 陽性細胞数を比較した結果、対照群と比較して、ブドウ糖/アミトリプチリン群とヨヒンビン/アミトリプチリン群では、c-Fos 陽性細胞数が有意に多かったが、プラゾシン/アミトリプチリン群では有意差は認めなかった。

【考察】 c-Fos は神経細胞の興奮を示す組織学的なマーカーとして広く利用されている。本研究ではアミトリプチリンによって賦活化される神経経路を解析する指標として c-Fos を用いた。実験 1 から、ラットの脊髄くも膜下腔にアミトリプチリンを投与すると、時間依存性および用量依存性に、脊髄灰白質に c-Fos タンパクが発現することが示された。投与後の時間経過との関係では、4 時間後に c-Fos が最大に増加することが示された。投与量との関係では、60 $\mu$ g までは投与量に依存して c-Fos が増加することが明らかとなった。アミトリプチリンによって c-Fos が誘導されたということは、アミトリプチリンによってある種のニューロンが興奮したことを示している。層別にみると、アミトリプチリンで誘導される c-Fos は主に I - IV 層に分布していることがわかった。c-Fos と GAD の蛍光二重染色によると、III - IV 層においては、アミトリプチリンによって誘導された c-Fos の大部分が GAD と共存しており、また、I - II 層で誘導される c-Fos の多くも GAD と共存している。GAD は GABA 合成に必要な酵素であり、GAD が存在する細胞は GABA 作動性ニューロンである。つまり、アミトリプチリンによって I - IV 層で賦活された多くの細胞、特に III - IV 層で賦活されたほとんどの細胞は、GABA 作動性ニューロンであることが示された。

実験 2 から、 $\alpha_2$  受容体拮抗薬であるヨヒンビンは、アミトリプチリンによる c-Fos 誘導に影響を与えないが、 $\alpha_1$  受容体拮抗薬であるプラゾシンを前投与すると、アミトリプチリンによる c-Fos 誘導が抑制されることが示された。これは、アミトリプチリンが脊髄後角で c-Fos を誘導している神経回路に  $\alpha_1$  受容体が関与していることを意味している。実験 1 と 2 の結果をまとめると、アミトリプチリン投与により、脊髄後角の主に I - IV 層において c-Fos が誘導され、それらの多くは GABA 作動性ニューロンであり、またこの反応には  $\alpha_1$  受容体が関与していることが明らかとなった。

【結論】 ラットの脊髄くも膜下腔にアミトリプチリンを投与すると、 $\alpha_1$  受容体を介して、脊髄後角の GABA 作動性ニューロンが賦活されることが示された。これは、アミトリプチリンの鎮痛作用の一部を担っている可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 森 本 裕 二  
副 査 教 授 丸 藤 哲  
副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

## アミトリプチリンのラット脊髄における 鎮痛作用に関する組織学的研究

抗うつ薬は神経因性疼痛などの疼痛緩和に有効であるが、その鎮痛作用の機序については未だ十分には解明されていない。今回の研究では、 $\alpha_1$ アドレナリン受容体と GABA 作動性ニューロンが関与する経路について、抗うつ薬との関係を明らかにすることを目標とした。実験 1 では、三環系抗うつ薬のアミトリプチリンをくも膜下腔投与し、投与後の時間経過と c-Fos 発現の関係、及び投与量と c-Fos 発現の関係を調べた。摘出した脊髄切片での c-Fos 発現は DAB 染色で評価した。次いで、DAB 染色と、GABA 作動性ニューロンを同定するグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の蛍光二重染色を行い、c-Fos 発現と GABA 作動性ニューロンの共存性の解析を行った。実験 2 では、実験 1 と同様の方法でのアミトリプチリンくも膜下投与に先立ち、 $\alpha_1$ 受容体拮抗薬としてプラゾシン、 $\alpha_2$ 受容体拮抗薬としてヨヒンビンをそれぞれ投与した。実験 1 と同様の方法で脊髄切片を作成した後、DAB 染色を行い、c-Fos 陽性細胞の定量分析を行った。実験 1 では、腰髄の c-Fos 陽性細胞数は、アミトリプチリン投与後 4 時間で最大となり、0 時間と比較して有意な増加が認められた。用量別では、30、60 および 90 $\mu$ g の投与では、0 $\mu$ g に比較して有意に c-Fos 陽性細胞数が増加した。c-Fos と GAD の蛍光二重染色では、多くの c-Fos 陽性細胞が、同時に GAD 陽性であることが示された。以上より、脊髄くも膜下腔にアミトリプチリンを投与すると、時間依存性および用量依存性に、脊髄灰白質においてある種の細胞が興奮し、その細胞は GABA 作動性ニューロンであることが示された。実験 2 では、プラゾシンの前投与で、c-Fos 陽性細胞の増加が有意に抑制された。実験 1 と 2 の結果をまとめると、ラットの脊髄くも膜下腔にアミトリプチリンを投与すると、 $\alpha_1$ 受容体を介して、脊髄後角の GABA 作動性ニューロンが賦活されることが示された。公开发表に際し、副査の吉岡 充弘教授から、①GABA 系を賦活する薬剤でも鎮痛効果はあるか、②選択的にノルアドレナリンの再取り込みを阻害する薬剤の方がこの仮説を証明するにあたって適しているのではないか、という質問があった。次いで、副査の丸藤哲教授から、①くも膜下腔にノルアドレナリンを投与することで鎮痛作用は得られるのか、②臨床的にアミトリプチリンを経口投与した場合髄液への移行性はどの程度か、③脊髄後角 I、II 層には GABA 系のほかに、どのような細胞が賦活されていると考えられるか、という質問があった。最後に主査の森本 裕二教授からは、①慢性疼痛モデルで実験した場合、どのような結果が予想されるか、②アミトリプチリンの機序

を含めて今後の研究の展望はどうか、という質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は自験例や、国内外の鎮痛や抗うつ薬に関する論文を引用し、適切かつ簡潔に回答した。

本研究は、抗うつ薬の鎮痛機序に関して、 $\alpha_1$ 受容体と GABA 作動性ニューロンとの関係を初めて明らかにしたという点で高く評価され、今後さらなる発展が期待される。

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。