

氏名	うえだむつあき 上田睦明
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第362号
学位授与の日付	平成7年7月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科薬学専攻
学位論文題目	脊髄後角内一次感覚神経からのグルタミン酸遊離とその制御に関する薬理学的研究

論文調査委員 (主査) 教授 佐藤公道 教授 赤池昭紀 教授 市川 厚

### 論 文 内 容 の 要 旨

グルタミン酸 (Glu) は、中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、脊髄後角における痛覚情報の伝達に重要な役割を果たしていることが、近年になって明らかとなってきた。痛覚情報を最初に受け取り、脊髄後角の二次ニューロンへ伝達する一次感覚神経 (A $\delta$ , C線維) の中枢側終末部にも、Glu が存在することが示されている。しかし、Glu を伝達物質とするニューロンが多いため、一次感覚神経終末からの Glu 遊離を弁別して示した知見はなかった。そこで、著者は Glu のオンライン測定法を確立し、A $\delta$ , C線維を選択的に興奮させるカプサイシンが脊髄後角切片から Glu を遊離させることを初めて明示した。さらに、Glu 性痛覚情報伝達の調節機構を明らかにする目的で本研究を行い、以下の新知見を得た。

#### 第一章 オンライン測定法によるカプサイシン感受性一次感覚神経からのグルタミン酸遊離の証明

雄性 Sprague-Dawley 系ラットの脊髄腰膨大部から、後角切片を作製し灌流実験を行った。実験には、*in vitro* 灌流装置に固定化グルタミン酸脱水酵素 (GDH) カラムと蛍光ディテクターを接続した系を用いた。この系において、灌流液中の Glu は、固定化 GDH カラムでの反応によって生成する NADH の蛍光として1秒間毎に連続的に検出した。脊髄後角切片にカプサイシンを適用すると、Glu 遊離の増大が濃度依存的 (0.1-3 $\mu$ M) にみられた。カプサイシン誘発 Glu 遊離は、テトロドキシン非感受性であり、細胞外 Ca<sup>2+</sup> 依存性であった。さらに、後根神経切断を施したラットの脊髄後角切片では、カプサイシン適用による Glu 遊離は、対照群に比べ有意に減少した。これらの結果は、Glu がカプサイシン感受性一次感覚神経からカプサイシン刺激によって細胞外 Ca<sup>2+</sup> 依存的に遊離されることを示唆している。

#### 第二章 カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対する抗侵害受容物質の抑制効果

オピオイドや下行性抑制系の神経伝達物質であるノルアドレナリンを、脊髄くも膜下腔内 (IT) 投与すると鎮痛作用が生じることは、よく知られている。そこで、脊髄後角でのこれら内因性鎮痛因子の作用機序を調べる目的で、カプサイシン (3 $\mu$ M) 誘発 Glu 遊離に対する効果を検討した。オピオイド  $\mu$  選択

的アゴニストである DAMGO (0.3-10 $\mu$ M) は、カプサイシン誘発 Glu 遊離を濃度依存的に抑制した。DAMGO (3 $\mu$ M) の抑制効果は、ナロキソン (1 $\mu$ M) によって有意に拮抗された。 $\delta$  選択的アゴニストの DPDPE (1-10 $\mu$ M) も、カプサイシン誘発 Glu 遊離を濃度依存的に抑制し、 $\delta$  選択的アンタゴニストのナルトリンドール (1 $\mu$ M) は、DPDPE (10 $\mu$ M) の抑制作用を有意に拮抗した。しかし、 $\kappa$  選択的アゴニストの U50,488H (1, 10 $\mu$ M) や U69,593 (10 $\mu$ M) は、Glu 遊離に対して有意な影響を及ぼさなかった。さらに、 $\alpha_2$  アドレノセプターアゴニストのクロニジン (0.1-10 $\mu$ M) は、カプサイシン誘発 Glu 遊離を濃度依存的に抑制し、また、この抑制効果は、 $\alpha_2$  アンタゴニストであるヨヒンビン (1 $\mu$ M) で有意に拮抗された。一方、 $\alpha_1$  アドレノセプターアゴニストであるフェニレフリン (1-10 $\mu$ M) は、Glu 遊離に対して有意な効果を発揮しなかった。以上の結果から、脊髄内でのオピオイド  $\mu$ ,  $\delta$ , 及び、 $\alpha_2$  アゴニストの鎮痛作用発現には、少なくとも一部、脊髄後角内におけるカプサイシン感受性一次感覚神経終末からの Glu 遊離の抑制が寄与していることが示唆される。

### 第三章 脊髄後角内プロスタグランジン類のグルタミン酸遊離促進作用および痛覚過敏発現への関与

痛覚過敏発現には脊髄後角内における Glu 性神経伝達の促進が少なくとも一部関与し、さらにプロスタグランジン (PG) 類などいくつかの物質によって媒介されている可能性が示唆されている。そこで本研究では、炎症性痛覚過敏発現に対する脊髄後角内 PG 類の関与とその作用機序としての Glu 遊離への影響を検討した。2%カラゲニン+2%カオリンを右側後肢に皮下投与すると、処置側の機械的侵害受容閾値は2時間後で処置前の約55%にまで低下したが、NMDA アンタゴニストの MK-801 (10nmol) あるいは抗炎症薬のジクロフェナック (10nmol) を IT 投与すると、処置側のみ有意に侵害受容閾値を上昇させた。PGE<sub>2</sub> (100pmol) および PGI<sub>2</sub> メチルエステル (100pmol) を同時に正常ラットに IT 投与すると、投与前の約67%にまで侵害受容閾値を低下させた。また灌流実験において、PGE<sub>2</sub> (0.1-3 $\mu$ M) あるいは PGI<sub>2</sub> メチルエステル (0.1-3 $\mu$ M) は、脊髄後角切片からの Glu 遊離に対してカプサイシン誘発遊離を濃度依存的に増加させた。さらに、両側にカラゲニン処置したラットの後角切片からの Glu 遊離は、非処置ラットの場合に比べ、基礎遊離量およびカプサイシン誘発遊離量ともに有意に増加していた。これらの実験結果から、炎症性痛覚過敏発現には、脊髄後角内 PG 類が関与していること、その作用機序として、カプサイシン感受性一次感覚神経終末からの Glu 遊離を促進させることが考えられる。

以上、著者は、ラット脊髄後角内カプサイシン感受性一次感覚神経終末からの Glu 遊離を初めて示し、さらに、オピオイド  $\mu$  及び  $\delta$  受容体、 $\alpha_2$  受容体によって抑制的に調節されていることを明らかにした。また、炎症性痛覚過敏状態では、脊髄後角内での Glu 性痛覚情報伝達の促進が生じ、この促進には、内因性 PG 類が関与している可能性を示した。本研究の成果は、脊髄後角での興奮性アミノ酸による痛覚情報の伝達とその制御のメカニズムに関する新しい知見を提供した。

### 論文審査の結果の要旨

痛覚情報の伝達・制御機構を論じる上で脊髄後角は重要な部分を占めている。痛覚情報を末梢組織から脊髄後角ニューロンへ伝える一次感覚神経 (A $\delta$ , C 線維) の神経伝達物質に関しては、従来から諸種のペプチドが挙げられてきたが、近年、中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸

(Glu)も重要な役割を果たしている可能性が明らかにされつつある。事実、これらの一次感覚神経の中  
枢側終末部での Glu の存在も示されている。しかし、Glu を伝達物質とするニューロンが多いため、一  
次感覚神経終末からの Glu の遊離を明確に示した知見はなかった。著者は、C および A $\delta$  一次求心性線  
維を選択的に興奮させるカプサイシンによって脊髄後角切片から遊離される Glu 量を計測できるオンラ  
イン測定法を確立し、さらに、本法を用いて Glu 性痛覚情報伝達の調節機構を明らかにするため本研究  
を行い、以下の新知見を得た。

### 第一章 オンライン測定法によるカプサイシン感受性一次感覚神経からのグルタミン酸遊離の証明

ラットの脊髄腰膨大部から作製した後角切片を、固定化グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) カラムと蛍  
光ディテクターが接続されている灌流装置の槽内に入れ、灌流液中に遊離される Glu 量を、固定化 GDH  
との反応によって生成した NADH の蛍光として 1 秒間毎に連続的に定量するオンライン測定法を確立し  
た。灌流液中に適用されたカプサイシンは 0.1~3 $\mu$ M の範囲で濃度依存的に、且つ細胞外 Ca $^{2+}$  依存的に  
Glu 遊離を増大させた。また、この遊離作用は後根切断を施したラットから作製された後角切片では有意  
に減弱された。これらの結果は、Glu がカプサイシン感受性一次感覚神経からカプサイシン刺激によって  
細胞外 Ca $^{2+}$  依存的に遊離されることを示している。

### 第二章 カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対する抗侵害受容物質の抑制効果

カプサイシン誘発 Glu 遊離は、選択的  $\mu$  オピオイドアゴニスト DAMGO あるいは選択的  $\delta$  オピオイド  
アゴニスト DPDPE によって濃度依存的に抑制され、その抑制作用は各々ナロキソンあるいはナルトリ  
ンドールによって拮抗された。しかし、選択的  $\kappa$  オピオイドアゴニスト U50,488H によっては有意な影響  
を受けなかった。さらに、 $\alpha_2$  アドレノセプターアゴニスト、クロニジンによっても濃度依存的に抑制さ  
れ、この抑制作用はヨヒンビンによって拮抗された。しかし、 $\alpha_1$  アドレノセプターアゴニスト、フェニ  
レフリンによっては影響されなかった。これらの結果は、報告されている  $\mu$  および  $\delta$  オピオイドアゴニ  
ストならびに  $\alpha_2$  アドレノセプターアゴニストの脊髄くも膜下腔内注射による鎮痛作用発現には、少なく  
とも一部、脊髄後角における Glu 遊離抑制作用が寄与していることを示唆している。

### 第三章 脊髄後角内プロスタグランジン類のグルタミン酸遊離促進作用および痛覚過敏発現への寄与

ラットにおいて、炎症性痛覚過敏は NMDA アンタゴニスト MK-801 あるいはプロスタグランジン  
(PG) 合成阻害作用を有するジクロフェナックの脊髄くも膜下腔内注射により寛解すること、このような  
炎症性痛覚過敏を起こしているときには脊髄後角切片からの Glu の基礎遊離量およびカプサイシン誘発  
遊離量が増加していること、PGE $_2$  あるいは PGI $_2$  メチルエステルの脊髄くも膜下腔内注射により痛覚過  
敏が起ること、PGE $_2$  あるいは PGI $_2$  メチルエステルは脊髄後角切片からのカプサイシン誘発 Glu 遊離  
を有意に増大させることを明らかにした。これらの実験結果は、炎症性痛覚過敏発現に、脊髄後角内 PG  
類が、Glu 遊離促進を介して、寄与していることを示唆している。

以上の成績は、脊髄後角での Glu による痛覚情報の伝達およびその制御機構に関して新しい知見を提  
供した。

よって、本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

更に、平成 7 年 6 月 23 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。