
原 著

ラット脊髄膠様質ニューロンにおける デクスメドトミジンの作用

石 井 秀 明

新潟大学大学院医歯学総合研究科麻酔科学分野
(主任：馬場 洋教授)

Action of Dexmedetomidine on the Substantia Gelatinosa Neurons of the Rat Spinal Cord

Hideaki ISHII

*Division of Anesthesiology, Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan
(Director: Prof. Hiroshi BABA)*

要 旨

デクスメドトミジンは静脈内投与によって鎮静作用と鎮痛作用が得られる α_2 受容体作動薬であり、近年、特に集中治療領域で臨床使用されはじめた。従来、 α_2 受容体作動薬としてクロニジンが臨床使用されてきたが、クロニジンはその投与量が増すほど α_1 受容体作用が生じてしまうという欠点があった。しかし、デクスメドトミジンの α_2 受容体への選択性は極めて高い（クロニジンの約8倍）ため、デクスメドトミジンによってより副作用の少ない有効な鎮痛効果が得られる可能性がある。これまで、デクスメドトミジンはクロニジンと同様に、脊髄腔内や硬膜外投与にて良好な鎮痛効果が得られたとする報告がある。しかし、神経細胞レベルでデクスメドトミジンの脊髄内での作用機序についての詳細な報告はみられない。そこで、痛覚情報の伝達に重要な役割を担っている脊髄後角でデクスメドトミジンがどのように作用し、その痛覚情報を制御しているのかを明らかにするため、脊髄後角第II層（膠様質）細胞におけるデクスメドトミジンの作用について電気生理学的手法を用いて調べた。

Wistar 系雄性ラットから腰仙部脊髄を切りだし脊髄横断スライス標本を作成して、Krebs 液で灌流した。スライスの下部から透過光で観察すると、膠様質は後角において明るい細胞帯として視認できた。膠様質細胞からブラインド法によるホールセルパッチクランプ記録をおこな

Reprint requests to: Hideaki ISHII
Division of Anesthesiology Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科麻酔科学分野
石井秀明

った。

デクスメドミジン灌流投与によって、ほとんどの細胞で外向き電流を誘起した。0.1 から 30 μ M の濃度範囲において、濃度依存性にデクスメドミジン誘起膜電流は増加し、 EC_{50} は 0.62 μ M であった。誘起膜電流は、 α_1 受容体拮抗薬ブラゾシンで抑制されず、 α_2 受容体拮抗薬ヨヒンピンで抑制された。さらに、 α_{2A} 受容体作動薬オキシメタゾリンによってデクスメドミジンと同様に外向き電流が誘起された。保持膜電位が -90 mV 以上で外向き電流が誘起され、 -90 mV 以下で内向き電流が誘起され、約 -86 mV 付近でその極性が逆転した。電極内液に G 蛋白質活性阻害薬または K^+ チャンネル阻害薬を用いたところ、デクスメドミジンの外向き電流は認められなかった。

本研究の結果から、デクスメドミジンは脊髄後角の膠様質においてシナプス後細胞の α_2 受容体に結合し、G 蛋白質を介して K^+ チャンネルを開口させることによって外向き膜電流（過分極）を誘起することが明らかとなった。このようにして膠様質細胞の興奮性を抑制することによって痛覚情報は上位中枢に伝達されなくなり、鎮痛効果を生じるものと考えられる。

キーワード：デクスメドミジン、 α_2 受容体作動薬、膠様質、鎮痛、ホールセルパッチクランプ

緒 言

α_2 受容体作動薬は疼痛制御機構など多彩な生体の生理的機能を制御している。その抗侵害効果は青斑核と脊髄において α_2 受容体作用が活性化されることで発現すると報告されている。従来、 α_2 受容体作動薬としてクロニジンが臨床使用され、術後痛に対してクロニジンを硬膜外および脊髄腔内投与し良好な鎮痛効果が得られている¹⁾²⁾。デクスメドミジンは静脈内投与によって鎮静作用と鎮痛作用が得られる α_2 受容体作動薬であり、近年、特に集中治療領域で臨床使用されはじめた。デクスメドミジンでもラットの脊髄腔内³⁾⁴⁾ や硬膜外投与⁵⁾ にて良好な鎮痛効果が得られたと報告されている。さらに、全身麻酔中のデクスメドミジンの静脈内投与は揮発性麻酔薬やオピオイドの使用量を減らすことができるとの報告もある⁶⁾⁷⁾。

デクスメドミジンの最大の特徴は、 α_2 受容体に対する選択性が極めて高いことである。クロニジンの α_1 と α_2 受容体選択性が 1 対 220 に対し、デクスメドミジンは 1 対 1620 で α_2 受容体への選択性が非常に高い⁸⁾。クロニジンは、その投与量が増すほど α_1 受容体作用が生じてしまうという欠点があった。しかしながら、この α_2 受容体への選択性が高いデクスメドミジンを用い

ることにより、より副作用の少ない有効な治療が行える可能性がある。

末梢からの侵害情報は、一次求心性線維の細い有髄線維 (A δ 線維) または無髄線維 (C 線維) によって脊髄後角第 II 層に伝導され⁹⁾¹⁰⁾、脊髄後角第 II 層の膠様質細胞には α_2 受容体が存在し鎮痛作用に関与していることが知られている¹¹⁾。しかしながら、神経細胞レベルでデクスメドミジンの脊髄内での作用機序についての詳細な報告はみられない。そこで、痛覚情報の伝達に重要な役割を担っている脊髄後角でデクスメドミジンがどのように作用し、その痛覚情報を制御しているのかを明らかにするため、脊髄後角第 II 層 (膠様質) 細胞におけるデクスメドミジンの作用について電気生理学的手法を用いて調べた。

方 法

1. 脊髄横断スライスの作成

ラット脊髄の横断スライス標本の作成は、Yoshimura らの方法に従って行った¹²⁾。体重 110 ~ 200g (週齢 5 ~ 8 週) の Wistar 系雄性ラットからウレタン麻酔下 (1.5 g/kg 腹腔内投与) に腰仙部脊髄を切りだし、95% 酸素、5% 二酸化炭素の混合ガスで酸素負荷し、冷却した Ca^{2+} -free low Na^+ Krebs 液中に浸した。この溶液の

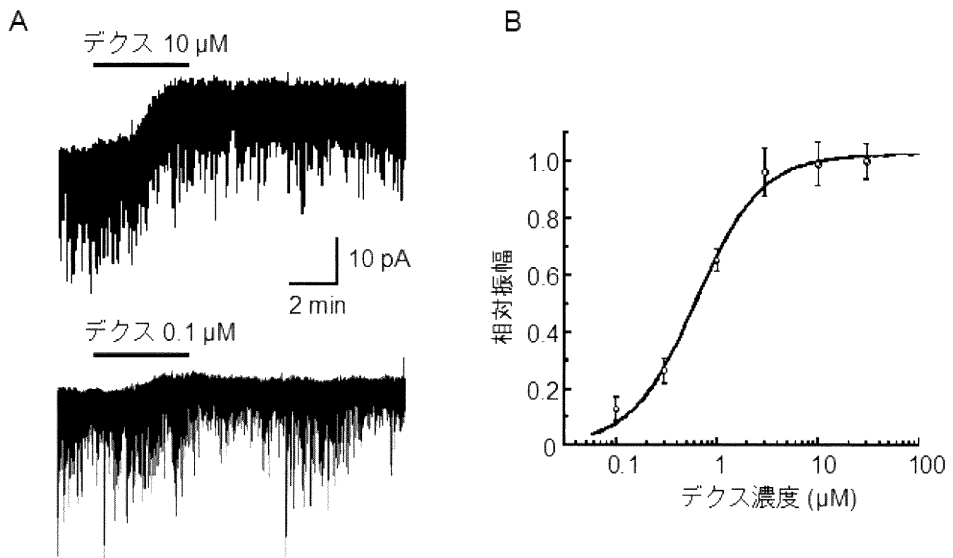


図1 デクスメドトミジン誘起膜電流の濃度依存性

- A. デクスメドトミジン (デクス) 10 μ M と 0.1 μ M を灌流投与したところ外向き電流を誘起した. 保持膜電位は -70mV.
 B. 濃度依存性にデクスメドトミジン誘起膜電流は増加した. EC₅₀ は 0.62 μ M で, ヒル係数は 1.34 であった.

組成は KCl 6.4, MgSO₄ 4.1, NaHCO₃ 26, NaH₂PO₄ 1.3, glucose 10, sucrose 252 (mM) とした. 硬膜, 軟膜およびくも膜を除去した後, 溝を設けた寒天ブロックに脊髄を移した. この寒天ブロックと共に脊髄をマイクロスライサーに設置し, 厚さ約 500 μ m の脊髄横断スライス標本を作成した. このスライスをチェンバーに移して, 36 $^{\circ}$ C に加温した通常の Krebs 液で灌流した (13 ~ 15ml/min). この溶液の組成は以下の通りである: NaCl 117, KCl 3.6, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, Na₂HPO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, glucose 11 (mM).

2. 細胞内記録

スライスの下部から透過光で観察すると, 第II層 (膠様質) は後角において明るい細胞帯として視認できた. 膠様質細胞からブラインド法によるホールセルパッチクランプ記録をおこなった. その記録は先端抵抗が 5 ~ 12M Ω のガラス電極を使用した. 3種類のガラス電極内液を用い, その

組成 (mM) は, (1) potassium gluconate 135, KCl 5, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 2, EGTA 5, HEPES 5, ATP-Mg 5. (2) Cs₂SO₄ 110, tetraethylammonium (TEA) 5, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 2, EGTA 5, HEPES 5, ATP-Mg 5. (3) Guanosine-5'-O-(2-thiodiphosphate) (GDP- β -S) 2 を (1) に添加. いずれも pH 7.2 で, (2) は K⁺チャネルを阻害する場合, (3) は G 蛋白質の作用を遮断する場合のみに使用した. 得られた応答は, パッチクランプ用増幅器 Axopatch 200B で増幅し, コンピューターで記録した後, データ解析用ソフトウェア pClamp9 を用いて解析した. データは平均値土標準誤差で表した.

結 果

1. 脊髄後角神経細胞におけるデクスメドトミジン誘起膜電流
 膜電位を -70mV に保持し, デクスメドトミジ

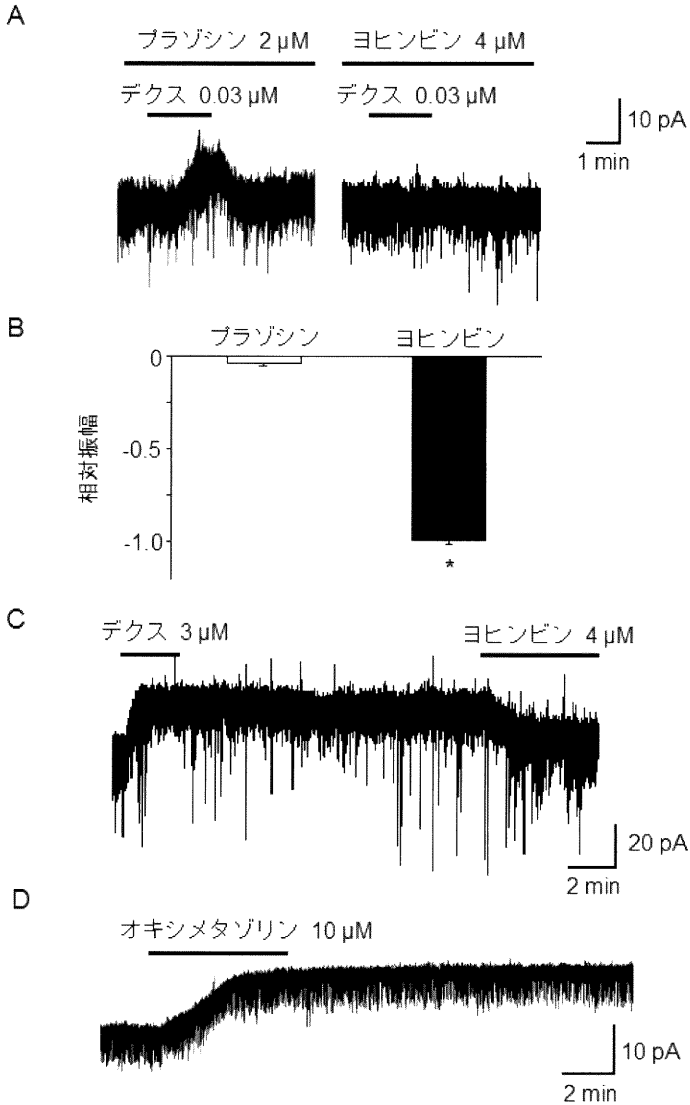


図2 デクスメドミジン応答の薬理的な分析

- A. 低濃度デクスメドミジン (0.03 μM) の灌流投与で誘起される外向き電流は、 α_1 受容体拮抗薬プラゾシン (2 μM) で抑制されず、 α_2 受容体拮抗薬ヨヒンビンの振幅の相対値。* $p < 0.01$, $n = 6$
- C. 高濃度デクスメドミジン (3 μM) の誘起膜電流は長時間持続したが、ヨヒンビン (4 μM) によって抑制された。保持膜電位は-40mV.
- D. α_{2A} 受容体作動薬オキシメタゾリン (10 μM) によって、デクスメドミジンと同様に外向き電流を誘起した。保持膜電位は-40mV.

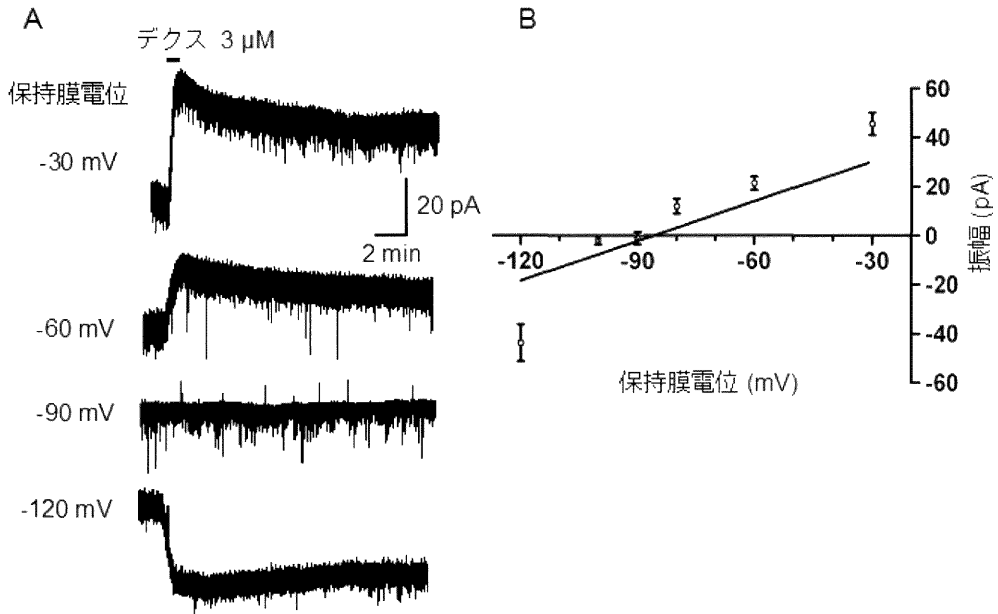


図3 デクスメドトミジンによる K^+ チャネルの活性化

- A. デクスメドトミジン ($3\mu\text{M}$) により, 保持膜電位が -90mV 以上で外向き電流が誘起され, -90mV 以下で内向き電流が誘起された。
 B. 約 -86mV 付近でデクスメドトミジン誘起膜電流の極性が逆転した. この逆転電位は K^+ チャネルの平衡電位に近似していた。

ンを灌流投与したところ, 92% (77/84) の細胞で外向き電流を誘起した (図 1A). デクスメドトミジン $0.1\mu\text{M}$ から $30\mu\text{M}$ の濃度範囲において, 濃度依存性にデクスメドトミジン誘起膜電流は増加した. EC_{50} は $0.62\mu\text{M}$ で, ヒル係数は 1.34 であった (図 1B).

2. デクスメドトミジン応答の薬理学的分析

膜電位を -40mV に保持し, 低濃度のデクスメドトミジン ($0.03\mu\text{M}$) を灌流投与したところ, その平均膜電流の振幅は $9.3 \pm 2.6\text{pA}$ であった. 次に, 同じ細胞で α_1 受容体拮抗薬であるプラゾシン ($2\mu\text{M}$) 存在下でのデクスメドトミジンは同様な応答を示し, 平均膜電流の振幅は $8.7 \pm 2.2\text{pA}$ であった. しかし, α_2 受容体拮抗薬であるヨヒンビン ($4\mu\text{M}$) 存在下では, デクスメドトミジン誘起膜電流は有意に抑制され, その平均膜電

流の振幅は $0.1 \pm 0.1\text{pA}$ であった (図 2A, B). さらに, 高濃度のデクスメドトミジン ($3\mu\text{M}$) の灌流投与によって誘起される外向き電流は長時間にわたり持続するが, この電流に対してもヨヒンビンを灌流投与すると有意に抑制された (図 2C). α_{2A} 受容体作動薬オキシメタゾリンによってデクスメドトミジンと同様に外向き電流が誘起された ($10.2 \pm 1.0\text{pA}$) (図 2D). 以上のことから, デクスメドトミジンの誘起膜電流は α_2 受容体を介したものであることが示された.

3. デクスメドトミジンによる G 蛋白質を介した K^+ チャネル活性化

デクスメドトミジン ($3\mu\text{M}$) により, 保持膜電位が -90mV より脱分極側で外向き電流が誘起され, 過分極側で内向き電流が誘起された. 約 -86mV 付近でその極性が逆転したことより, この

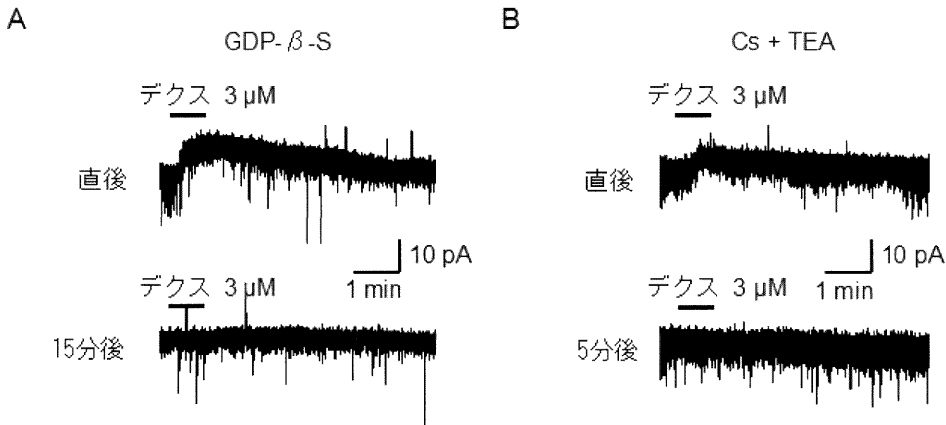


図4 G蛋白質活性阻害薬または K^+ チャネル阻害薬によるデクスメドミジン誘起膜電流の抑制

- A. G蛋白質活性阻害薬 GDP- β -S (2mM) を電極内液に加えた。ホールセル完成直後にデクスメドミジン ($3\mu\text{M}$) を灌流投与するとごく僅かに外向き電流を認めたが、15分後には消失していた。
- B. Cs, TEA を用いた電極内液により、 K^+ チャネルをブロックした。ホールセル完成直後にデクスメドミジン ($3\mu\text{M}$) を灌流投与するとごく僅かに外向き電流を認めたが、5分後には消失していた。

逆転電位は K^+ チャネルの平衡電位に近似している(図3A, B)。よって、デクスメドミジンの誘起膜電流は K^+ コンダクタンスの増加による膜の過分極であることが示された。次に、G蛋白質活性阻害薬 GDP- β -S (2mM) を記録電極に加え、G蛋白質の作用を遮断して実験を行った。ホールセルパッチ完成直後にデクスメドミジン ($3\mu\text{M}$) を灌流投与すると僅かに外向き電流を認めた。しかし、15分後にデクスメドミジン ($3\mu\text{M}$) を再度灌流投与しても膜電流に変化はみられなかった(図4A)。続いて、シナプス後細胞の K^+ チャネルを遮断するために、 K^+ チャネル阻害薬 Cs, TEA を用いた電極内液により、 K^+ チャネル透過性をブロックした。ホールセル完成直後にデクスメドミジン ($3\mu\text{M}$) を灌流投与するとごく僅かに外向き電流を認めたが、5分後に再投与したところこの膜電流は誘起されなかった(図4B)。

考 察

本研究でも、電気生理および薬理学的手法を用いて膠様質におけるデクスメドミジンの作用を解析した結果、シナプス後細胞における α_2 受容体の存在を示すことができた。さらに免疫組織化学的手法を用いた研究で、脊髄後角の浅層に α_2 受容体が高密度に存在し¹³⁾¹⁴⁾、カプサイシン処理した後に α_{2A} 受容体は明らかな減少を認めたが α_{2C} 受容体は減少しないことが報告された。これはシナプス前終末に α_{2A} 受容体、シナプス後細胞に α_{2C} 受容体が存在することを示唆する¹⁴⁾¹⁵⁾。一方、*in situ hybridization*法による研究で脊髄後角に α_{2B} 受容体は存在しないと報告されている¹⁶⁾。しかしながらカプサイシン処理後の α_{2A} 受容体は劇的に減少したが不完全なものであった。これはシナプス後細胞にも α_{2A} 受容体が存在する可能性を示唆し、本研究でオキシメタゾリンによってデクスメドミジンと同様な外向き電流

が誘起されたことから、シナプス後細胞における α_{2A} 受容体の存在が明らかとなった。デクスメドミジンはシナプス後細胞において α_{2A} または α_{2C} 受容体、またはそれらの両方に作用すると考えられる。

ラットを用いた疼痛モデルでデクスメドミジンの髄腔内投与によって用量依存性に鎮痛効果が得られ、低用量では一過性の鎮痛効果を呈し、高用量では鎮痛持続時間の延長をきたした³⁾。本研究においても低濃度デクスメドミジン(0.03 μ M)灌流投与による誘起膜電流の振幅は小さく持続時間は短かった(図2A)。対照的に高濃度のデクスメドミジン(3 μ M)は長時間にわたり脱感作することなく30分以上持続した(図2C)。高濃度になるほどこの傾向は強まった。このデクスメドミジンの持続性はノルアドレナリンと比較して極めて長時間に及んだ¹¹⁾。これはデクスメドミジンがノルアドレナリンよりも α_2 受容体に高い親和性がある¹⁷⁾ためと推察される。デクスメドミジンが脊髄スライス標本から緩徐に拡散することも¹⁸⁾関与していると思われるが、今後さらにその詳細に関して明らかにする必要がある。

デクスメドミジンはクロニジンと比べて効力(potency)が強いという特徴がある。すなわち両者を比較した場合、クロニジンは部分作動薬であり、デクスメドミジンは完全作動薬である。デクスメドミジンはクロニジンと比較し、 α_2 受容体に対して3倍も親油性(lipophilicity)が高く¹⁹⁾、これが効力の強さに影響しているものと思われる²⁰⁾。高親油性であるほど脊髄への非特異的結合力をもたらしためと考えられ、デクスメドミジンはその強い効力によって、より質の高い鎮痛効果が得られる薬剤として期待される。Eisenachらは、デクスメドミジンを羊の髄腔内に投与し、脳脊髄液中のデクスメドミジン濃度を測定した²⁰⁾。行動学的研究において、デクスメドミジン投与直後から90分後まで抗侵害作用を示し、その時間に相当する脳脊髄液中のデクスメドミジン濃度は投与直後が約3000 ng/ml(約10 μ M)で、時間とともに漸減し90分後は約300 ng/ml

(約1 μ Mに相当)であった。本研究でも1から10 μ Mの濃度範囲において、デクスメドミジン誘起膜電流は濃度依存性に増加し、Eisenachらが報告した濃度範囲とほぼ一致している(図1B)。すなわち抗侵害作用を呈するデクスメドミジンの脳脊髄液中濃度は1から10 μ Mであることが示唆された。

本研究では、シナプス後細胞にある α_2 受容体におけるデクスメドミジンの作用を検討したが、シナプス前終末にある α_2 受容体におけるデクスメドミジンの作用は行っていないので、今後の検討が必要である。

結 論

本研究の結果から、デクスメドミジンは脊髄後角の膠様質においてシナプス後細胞の α_2 受容体に結合し、G蛋白質を介してK⁺チャネルを開口させることによって外向き膜電流(過分極)を誘起することが明らかとなった。このようにして膠様質細胞の興奮性を抑制することによって痛覚情報は上位中枢に伝達されなくなり、鎮痛効果を生じるものと考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり御指導および論文の御校閲を頂いた新潟大学大学院医歯学総合研究科麻酔科学分野馬場洋教授、河野達郎准教授に心より深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Anzai Y and Nishikawa T: Thoracic epidural clonidine and morphine for postoperative pain relief. *Can J Anaesth* 42: 292 - 297, 1995.
- 2) Filos KS, Goudas LC, Patroni O and Polyzou V: Hemodynamic and analgesic profile after intrathecal clonidine in humans. A dose-response study. *Anesthesiology* 81: 591 - 601; discussion 27A - 28A, 1994.
- 3) Fisher B, Zornow MH, Yaksh TL and Peterson BM: Antinociceptive properties of intrathecal

- dexmedetomidine in rats. *Eur J Pharmacol* 192: 221 - 225, 1991.
- 4) Yaksh TL, Pogrel JW, Lee YW and Chaplan SR: Reversal of nerve ligation - induced allodynia by spinal alpha - 2 adrenoceptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 207 - 214, 1995.
 - 5) Asano T, Dohi S, Ohta S, Shimonaka H and Iida H: Antinociception by epidural and systemic alpha (2) - adrenoceptor agonists and their binding affinity in rat spinal cord and brain. *Anesth Analg* 90: 400 - 407, 2000.
 - 6) Maze M, Birch B and Vickery RG: Clonidine reduces halothane MAC in rats. *Anesthesiology* 67: 868 - 869, 1987.
 - 7) Segal IS, Vickery RG, Walton JK, Doze VA and Maze M: Dexmedetomidine diminishes halothane anesthetic requirements in rats through a postsynaptic alpha 2 adrenergic receptor. *Anesthesiology* 69: 818 - 823, 1988.
 - 8) Virtanen R, Savola JM, Saano V and Nyman L: Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an alpha 2 - adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol* 150: 9 - 14, 1988.
 - 9) Kumazawa T and Perl ER: Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: indications of their place in dorsal horn functional organization. *J Comp Neurol* 177: 417 - 434, 1978.
 - 10) Yoshimura M and Jessell TM: Primary afferent - evoked synaptic responses and slow potential generation in rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *J Neurophysiol* 62: 96 - 108, 1989.
 - 11) Sonohata M, Furue H, Katafuchi T, Yasaka T, Doi A, Kumamoto E and Yoshimura M: Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording. *J Physiol* 555: 515 - 526, 2004.
 - 12) Yoshimura M and Nishi S: Blind patch - clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: pharmacological properties of synaptic currents. *Neuroscience* 53: 519 - 526, 1993.
 - 13) Roudet C, Mouchet P, Feuerstein C and Savasta M: Normal distribution of alpha 2 - adrenoceptors in the rat spinal cord and its modification after noradrenergic denervation: a quantitative autoradiographic study. *J Neurosci Res* 39: 319 - 329, 1994.
 - 14) Stone LS, Broberger C, Vulchanova L, Wilcox GL, Hokfelt T, Riedl MS and Elde R: Differential distribution of alpha2A and alpha2C adrenergic receptor immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 18: 5928 - 5937, 1998.
 - 15) Olave MJ and Maxwell DJ: An investigation of neurones that possess the alpha 2C - adrenergic receptor in the rat dorsal horn. *Neuroscience* 115: 31 - 40, 2002.
 - 16) Nicholas AP, Pieribone V and Hokfelt T: Distributions of mRNAs for alpha - 2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 328: 575 - 594, 1993.
 - 17) Jasper JR, Lesnick JD, Chang LK, Yamanishi SS, Chang TK, Hsu SA, Daunt DA, Bonhaus DW and Eglen RM: Ligand efficacy and potency at recombinant alpha2 adrenergic receptors: agonist - mediated [35S] GTPgammaS binding. *Biochem Pharmacol* 55: 1035 - 1043, 1998.
 - 18) Koga A, Fujita T, Totoki T and Kumamoto E: Tramadol produces outward currents by activating mu - opioid receptors in adult rat substantia gelatinosa neurones. *Br J Pharmacol* 145: 602 - 607, 2005.
 - 19) Savola JM, Ruskoaho H, Puurunen J, Salonen JS and Karki NT: Evidence for medetomidine as a selective and potent agonist at alpha 2 - adrenoceptors. *J Auton Pharmacol* 6: 275 - 284, 1986.
 - 20) Eisenach JC, Shafer SL, Bucklin BA, Jackson C and Kallio A: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intraspinal dexmedetomidine in sheep. *Anesthesiology* 80: 1349 - 1359, 1994.

(平成 20 年 1 月 15 日受付)