

セロトニン作動性下行性疼痛抑制系に対するガバペンチンの影響の行動学的検討

柳村春江

新潟大学医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻 (麻醉科学)

(主任：馬場洋教授)

**Behavioral Investigation of the Effects of Gabapentin on the Serotonin Pathway  
of the Descending Pain Inhibitory System**

**Harue Yanagimura**

*Department of Anesthesia, Graduate School of Medicine Niigata University*

*(Director: Prof. Hiroshi BABA)*

**要旨**

近年、神経障害性疼痛治療薬としてガバペンチノイドを使用することが多い。ガバペンチノイドは電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの  $\alpha_2\delta$  サブユニットと高い親和性を持ち、当初は抗けいれん薬として開発されたが、メカニズムの研究が進み、下行性疼痛抑制系を活性化して脊髄のノルアドレナリンの放出を増加させることが知られるようになった。下行性抑制系にはノルアドレナリン系の他にセロトニン系が存在するが、ガバペンチノイドの作用にセロトニンが関与しているという報告はほとんどない。そこで本研究では、左 L5 脊髄神経を結紮した神経障害性疼痛モデル (SNL) ラットを用いて、ガバペンチン (GBP) が下行性抑制系のセロトニン経路に及ぼす影響を、行動実験により検討した。SNL ラットに GBP を腹腔内投与すると約 60 分後から足底への機械的刺激に対する逃避閾値の改善が認められ、その効果はおよそ 240 分後まで持続した。GBP を投与した SNL ラットの脊髄くも膜下腔にセロトニン受容体拮抗薬を投与すると逃避閾値の改善が消失したことから、GBP の鎮痛作用にセロトニン系が関与している可能性が示唆された。しかし、パラクロロフェニルアラニンでセロトニンを枯渇させた SNL ラットに GBP を投与すると、GBP による鎮痛効果は認められたものの、セロトニン受容体拮抗薬を投与しても鎮痛効果は拮抗されなかった。一方、ノルアドレナリンを枯渇させた SNL ラットでは、GBP の鎮痛効果そのものが認められなかった。これらの結果から、GBP の鎮痛作用はノルアドレナリン系を介した下行性疼痛抑制系促進の影響が大きく、脊髄での鎮痛作用においてセロトニンが関与している可能性はあるものの、他の系よりも影響は少ないと考えられた。

**キーワード：**ガバペンチン，下行性疼痛抑制系，セロトニン

別刷り請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学医歯学総合研究科麻酔科学分野 柳村春江

## 緒言

ガバペンチン (GBP) やプレガバリンなどのガバペンチノイドは、当初抗けいれん薬として開発された。しかし、近年では多くの国の慢性疼痛治療ガイドラインで神経障害性疼痛に対する第一選択薬として推奨されている<sup>1) 2) 3)</sup>。また、術後の急性疼痛や慢性疼痛に対する有効性は示されていないものの、オピオイド使用を減らす有効な鎮痛薬、周術期の疼痛管理の補助として<sup>4) 5) 6)</sup>、海外を中心にガバペンチノイドは処方が増え続けている<sup>5) 7) 8) 2)</sup>。

ガバペンチンは  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの  $\alpha^2\delta$  サブユニットと高い親和性を持ち、当初はシナプス前膜のカルシウムチャネルを阻害することで伝達物質の興奮性放出を抑制し、痛みの神経伝達を抑制すると考えられていた。しかし、動物モデルを用いた行動学的、組織学的研究により、ガバペンチノイドは脊髄の下行性抑制系を活性化し、ノルアドレナリン放出を増加させることにより鎮痛作用を発揮することが報告されている<sup>9) 10)</sup>。一方臨床的には、GBP を投与した健常者において血中セロトニン濃度が上昇すること<sup>11)</sup>、トラマドールと GBP を併用するとセロトニン症候群を引き起こすことが報告されており、GBP がセロトニン分泌やセロトニン神経伝達を促進することが示唆されている<sup>12)</sup>。しかし、ガバペンチノイドの下行性抑制系のセロトニン経路への作用はよく分かっていない。

本研究では、GBP の脊髄におけるセロトニン (5-HT) 系に対する鎮痛効果を明らかにすることを目的とした。神経障害性疼痛モデルラットに GBP を全身投与して鎮痛効果を引き出し、5-HT 受容体拮抗薬またはアドレナリン受容体拮抗薬を脊髄くも膜下投与して機械刺激に対する疼痛閾値の変化を検討した。

## 対象と方法

### 対象

本研究は、横浜市立大学医学部および新潟大学大学院医歯学総合研究科で実施され、各地の動物実験倫理審査委員会の承認を得た (承認番号：横浜市立大学では F10-112、新潟大学では SA00238, SA00972, SA01183)。動物実験はすべて日本学術会議のガイドラインに従って実施した。

雄の Sprague-Dawley ラット (8-12 週齢, 体重 240-420g, 日本 SLC (浜松) および朝妻動物器材店 (新潟), とともに日本) を使用した。動物は 2~3 匹/ケージとし、十分な水と餌を与え、12 時間の昼夜サイクルのもとで飼育した。

## モデル作成

神経障害性疼痛のモデルとして、脊髄神経結紮 (SNL) モデルラットを使用した。イソフルラン (2%) 麻酔下に、4-0 絹糸で左 L5 脊髄神経を結紮した<sup>13)</sup>。脊髄くも膜下に薬剤を投与する実験では、SNL 術後 7~10 日目に薬物投与用のくも膜下カテーテル (PE-10) を既報の通り第 4・5 腰椎間に設置した<sup>14)</sup>。カテーテルの先端は肩甲骨間の皮下に留置し、使用時にはそこから導出させた。カテーテル留置後、実験までに 4~7 日の回復期間を設けた。SNL 手術後 7 日目に、頸部から皮下に留置した Alzet®浸透圧ポンプ (2ML1, DURECT Corporation, Cupertino, CA) を用いて 5-HT 合成阻害薬であるパラクロロフェニルアラニン (PCPA) を投与した。

SNL 手術中、カテーテル留置中に死亡したラット、モデル作成に失敗したラットを含め、147 匹のラットを使用した。

## 行動実験

SNL 手術後、14~21 日のラットの両後肢の機械的過敏性を測定した。専用のグリッド上にアクリルケージを置き、ラットをケージに入れて 15~30 分環境に慣らした後、auto von Frey 装置 (Ugo Basile 37400, Milano, Italy) を用いて足底を刺激し、逃避閾値を測定した。プローブを 50g の圧力に相当する力で 20 秒間上昇させ、ラットの逃避行動時に加えた圧力を表示した。測定にはラットの足底を左右 5 回刺激し、5 回の足底刺激の値の平均値を逃避閾値とした。測定後、GBP を腹腔内投与し、GBP 投与 60 分後に上記と同様に足底の逃避閾値を測定した。GBP 投与 90 分後の逃避閾値測定後、セロトニンおよびアドレナリン受容体拮抗薬 (メチセルジド; 5-HT<sub>1/2</sub> 受容体拮抗薬, ケタンセリン; 5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体拮抗薬, オンダンセトロン; 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬, プラゾシン;  $\alpha_1$ -アドレナリン受容体拮抗薬, イダゾキサラン;  $\alpha_2$ -アドレナリン受容体拮抗薬) を投与した。各薬剤投与後 180 分まで 60 分ごとに逃避閾値を測定した。また、SNL ラットに対してケタンセリン, オンダンセトロン単独の髄腔内投与を実施し、投与後 180 分まで逃避閾値を測定した。

## 薬剤

GBP (G0318, 東京化成工業, 東京, 日本) を GBP 溶液 (30~50 mg/mL) で 100 mg/kg の用量で腹腔内投与した。PCPA (C3635, Sigma, St. Louis, MO) は 150 mg/kg/day で投与できるように調製した。PCPA 溶液を浸透圧ポンプに充填し、SNL 手術 7 日後に頸部から皮下に植え込み、SNL14 日後に実験を行った。ノルアドレナリンニューロンに対する神経毒である N-(2-chloroethyl) -N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) (C8417, Sigma) を SNL 手術 7 日後に 50 mg/kg で腹腔内投与し、SNL 後 21 日目に実験を行った。メチセルジド (M137, Sigma), ケタンセリン (S006, Sigma), オンダンセトロン (00407, 東京化成工業), プラゾシン (P7791, Sigma), イダゾキサラン (I6138, Sigma) は、過去の研究を参考にし、それぞれ 30  $\mu$ g/10  $\mu$ L を留置カテーテルから注入し、30  $\mu$ L の生理食塩水でフラッシュすることにより投与した。

薬剤は生理食塩水に溶解し、使用前に $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。薬剤の投与量は、過去の報告に基づいて決定した<sup>9) 15) 16) 17) 18) 19)</sup>。

## 免疫染色

脊髄におけるセロトニンやノルアドレナリン合成酵素であるドパミン $\beta$ -水酸化酵素 (D $\beta$ H) の発現量を調べるため、免疫染色を実施した。ラットをイソフルランで深麻酔し、生理食塩水で灌流した後、4%パラホルムアルデヒド (Mildform 10N, 133-10311, 富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) で灌流固定した。脊髄組織を採取し、4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定した。その後、組織を20%スクロースリン酸緩衝液に2晩浸し凍結保護を行った。組織をOCTコンパウンドに包埋して凍結ブロックを作り、 $16\ \mu\text{m}$ に薄切してスライドグラスに載せた。

スライド上の切片をTNT緩衝液(10% 1 M Tris-HCl, pH 7.5, 5% 3 M NaCl, 0.03% Tween20) で2回洗浄し、ブロッキングワンヒスト (06349-64, ナカライテスク, 京都, 日本) を用いて室温で60分間ブロッキングした。その後、切片にウサギ抗5-HT (セロトニン) IgG抗体 (1:4,000; Cat.#;20080, Immunostar, Hudson, WI) もしくはマウスモノクローナル抗D $\beta$ H抗体 (1:8000; Cat.# MAB308, Millipore, Billerica, MA) をかけ、 $4^{\circ}\text{C}$ 冷蔵庫で二晩反応させた。TNTバッファーで2回洗浄した後、切片にCy3-conjugated ヤギ抗ウサギ IgG抗体 (1:1,000; Cat.#111-167-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) もしくはFluorescein conjugated ロバ抗マウス IgG抗体 (1:500, Cat.#AP192F, Millipore) をかけ、 $4^{\circ}\text{C}$ 冷蔵庫で一晩または室温で4時間以上反応させた。抗体はTNBバッファーで希釈したものを使用した。切片をTNTバッファーで2回洗浄し、VECTASHIELD with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole; H-1200, Vector Laboratories, Burlingame, CA) で封入した。観察は、デジタルカメラシステム (DP73, オリンパス) を搭載した蛍光顕微鏡 (BX 53, オリンパス, 東京, 日本) またはオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X810, キーエンス, 大阪, 日本) を使用して行った。

## 統計学的解析

サンプルサイズは、先行研究に基づいて決定した。先験的な統計的検出力の算出は行わなかった。G\* power version 3.1.7.を用いてポストホックパワー分析を行ったところ、パワー $(1 - \beta)$ を0.8,  $\alpha = 0.05$ とし、統計的有意性を得るには4~8匹のラット/グループのサンプルで十分であった<sup>20)</sup>。

データは平均値 $\pm$ 平均値の標準誤差で表示した。Shapiro-Wilk検定によるデータセットの均等分散性と正規性の検定後、行動データに対して反復測定一元配置分散分析 (ANOVA) または反復測定二元配置分散分析を使用し、Tukey検定を用いて多重比較を実施した。すべての統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のGUIであるEZR (埼玉医療センター, 自治医科大学, 日本, 埼玉) を用いて行った。グラフ

はGraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)を用いて作成した。統計的有意性は $p < 0.05$ とした。

## 結果

### 図1 等倍

GBP 投与前後の naive ラットの試験では、神経障害の同側後肢への機械的刺激に対する逃避行動に変化はなかった ( $t = 0.3892$ ,  $df = 7$ ,  $p = 0.709$ , 対応のある T 検定, 図 1A)。術後 2 週間の SNL ラットは、障害側後肢の逃避閾値 (PWT) が対側より低く、痛みに敏感な状態であることが示された。SNL ラットに対して GBP (100 mg/kg) を腹腔内投与すると、投与 60~240 分後に疼痛閾値の改善が認められた。今回の環境では、GBP の投与 240 分後にその影響が減少しても、鎮痛作用は安定していた。一方、対側の PWT はガバペンチン投与後も変化しなかった (各群  $n=8$ , Time:  $F(2.470, 34.57) = 9.350$ ,  $p = 0.0003$ ; Side:  $F(1, 14) = 43.42$ ,  $p < 0.0001$ ; Side \* Time:  $F(5, 70) = 7.957$ ,  $p < 0.0001$ , 反復測定二元配置分散分析, 図 1B)。

### 図2 等倍

#### $\alpha$ -アドレナリン受容体拮抗薬のくも膜下投与

SNL ラットに GBP 100 mg/kg を腹腔内投与し、90 分後に刺激に対する PWT を測定した後、プラゾシンとイダゾキサンをくも膜下カテーテルから投与した。髄腔内投与から 180 分後まで 60 分間隔で PWT を測定した。プラゾシン 30  $\mu\text{g}$  のくも膜下投与は、障害側の GBP の鎮痛効果に有意な影響を与えなかった。一方、対側の PWT は GBP, プラゾシンともに影響を受けなかった (各群  $n=8$ , Time:  $F(2.491, 34.87) = 2.443$ ,  $p = 0.0905$ ; Side:  $F(1, 14) = 16.65$ ,  $p = 0.0011$ ; Time \* Side:  $F(3, 42) = 9.519$ ,  $p < 0.0001$ , 反復測定二元配置分散分析, 図 2A)。イダゾキササン 30  $\mu\text{g}$  をくも膜下腔に投与すると、イダゾキササン投与後 180 分にわたり、障害側後肢の GBP により改善された PWT は低下した。また、対側の PWT はイダゾキササン投与後 60 分で有意に低下し、その後回復した ( $n=6$ , Time:  $F(2.294, 22.94) = 9.680$ ,  $p = 0.0006$ ; Side:  $F(1, 10) = 60.06$ ,  $p < 0.0001$ ; Time \* Side:  $F(3, 30) = 8.843$ ,  $p = 0.0002$ , 反復測定二元配置分散分析, 図 2B)。

### 図3 等倍

#### セロトニン受容体拮抗薬のくも膜下腔投与

$\alpha$ -アドレナリン受容体拮抗薬と同様に、セロトニン受容体拮抗薬 (メチセルジド, ケタンセリン, オンダンセトロン) をくも膜下カテーテルから投与した場合の効果を検討した。上記 3 種類の薬剤は、投与後 180 分間、障害側の GBP の鎮痛効果を有意に低下させた。一方、対側の機械的刺激に対する PWT は GBP 投与後 60 分で低下し、セロトニン受容体拮抗薬をくも膜下腔に投与した 60 分後には GBP 投与前に比べて有意に低下した。対側と障害側の PWT に対する各薬物の効果は概ね類似していた (メチセルジド ( $n=6$ ), Time:  $F(2.313, 23.13) = 26.06$ ,  $p < 0.0001$ ; Side:  $F(1, 10) = 32.00$ ,  $p = 0.0002$ ; Time \* Side:  $F(3, 30)$

= 9.244,  $p = 0.0002$ , 図 3A, ケタンセリン ( $n=8$ ), Time :  $F(2.862, 40.07) = 10.29$ ,  $p < 0.0001$ , Side :  $F(1, 14) = 41.30$ ,  $p < 0.0001$ ; Time \* Side :  $F(3, 42) = 9.212$ ,  $p < 0.0001$ , 図 3B, オンダンセトロン ( $n=7$ ); Time :  $F(2.451, 29.41) = 6.202$ ,  $p = 0.0050$ ; Side :  $F(1, 12) = 20.96$ ,  $p = 0.0003$ ; Time \* Side :  $F(3, 36) = 6.202$ ,  $p = 0.0017$ , 反復測定二元配置分散分析, 図 3C). ケタンセリンおよびオンダンセトロン自体の髄腔内投与は, SNL ラットの障害側後肢において抗疼痛効果を示さなかった (ケタンセリン ( $n=5$ );  $F(1, 623, 6, 49) = 21, 23$ ,  $p=0, 0018$ , 図 4A, オンダンセトロン ( $n=6$ );  $F(2, 4, 12) = 70, 36$ ,  $p < 0.0001$ , 反復測定一元配置分散分析, 図 4B).

#### 神経伝達物質の枯渇状態での評価

図4  
等倍

SNL ラットにおける GBP の鎮痛効果に対する下行性抑制系の神経伝達物質が枯渇した状態の影響を評価した. ノルアドレナリンニューロンに対する神経毒である DSP-4 と 5-HT の合成阻害剤である PCPA を使用した前処理にてノルアドレナリンと 5-HT をそれぞれ枯渇させ, 上記のように PWT を評価した. DSP-4 は投与 2 週間後にラットを灌流固定し, 脊髄の免疫染色を行った. naive ラットに比べ, DSP-4 ラットは  $D\beta H$  染色において有意に染色性が減少していた (図 5A, B). GBP 投与前後の DSP-4 ラットの行動実験を行ったところ, 投与 60 分後の PWT に変化は見られなかった ( $F(1.752, 5.256) = 1.411$ ,  $p = 0.3171$ , 図 5C). DSP-4 投与 2 週間後の SNL ラットに GBP を投与すると, 投与後 60 分では GBP による鎮痛効果が認められなかった ( $n=6$ ; Time :  $F(1, 10) = 25.94$ ,  $p = 2.443$ ; Side :  $F(1, 10) = 52.65$ ,  $p < 0.0001$ ; Time \* Side :  $F(1, 10) = 4.166$ ,  $p = 0.3765$ , 反復測定二元配置分散分析, 図 5D).

図5  
等倍

PCPA は投与 1 週間後にラットを灌流固定し, 脊髄の免疫染色を実施した. PCPA 投与ラットでは naive ラットと比較し 5-HT の染色性が消失していた (図 6A, B). 5-HT の枯渇自体は, ラットの PWT および GBP の鎮痛効果に影響を与えなかった ( $F(1.509, 4.528) = 0.3065$ ,  $p = 0.6944$ , 図 6C). DSP-4 投与ラットとは異なり, PCPA 投与 1 週間後の SNL ラットに GBP を投与すると, 投与後 60 分で GBP による鎮痛効果が認められた ( $n=5$ ; Time :  $F(1.168, 9.342) = 8.356$ ,  $p = 0.0148$ ; Side :  $F(1, 8) = 3.110$ ,  $p = 0.1158$ ; Time \* Side :  $F(2, 16) = 13.97$ ,  $p = 0.0003$ , 反復測定二元配置分散分析, 図 6D). 鎮痛効果を確認した後, メチセルジドを髄腔内投与し, 60 分後に PWT を測定したが, 鎮痛効果の消失は認められなかった ( $n=4$ ; Time :  $F(1.883, 11.30) = 7.220$ ,  $p = 0.0103$ ; Side :  $F(1, 6) = 17.19$ ,  $p = 0.006$ ; Time \* Side :  $F(2, 12) = 3.259$ ,  $p = 0.074$ , 反復測定二元配置分散分析, 図 6E).

## 考察

GBP の投与により naive ラットや SNL ラットの対側の機械刺激に対する逃避閾値には影響しないものの、SNL ラットの障害側における機械過敏性が改善したことは、これまでの報告と同様であった<sup>21) 22) 23) 24)</sup>。GBP の効果は、 $\alpha_2$ -アドレナリン受容体拮抗薬と同様に、5-HT<sub>1</sub>、5-HT<sub>2</sub>、5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬をくも膜下内投与することで拮抗されたが、 $\alpha_1$ -アドレナリン受容体拮抗薬では拮抗されなかった。しかし、GBP の鎮痛効果は5-HT の枯渇には影響されず、この結果はノルアドレナリン枯渇状態では GBP の鎮痛効果が消失するのと対照的であった。5-HT<sub>1,2</sub>受容体拮抗薬であるメチセルジドの髄腔内投与は、5-HT 枯渇 SNL ラットにおける GBP の鎮痛作用に対する拮抗作用を消失させた。これは神経障害性疼痛モデルにおける GBP の鎮痛作用が、セロトニン経路よりも上流のノルアドレナリン系を介した下行性疼痛抑制系の活性化によってもたらされているからだと考えられる。これまでの研究で GBP は下行性疼痛抑制系のノルアドレナリン経路に作用して鎮痛作用を発揮することが示されており、今回の結果はこれらの報告と一致する<sup>9) 15) 24)</sup>。さらに、GBP は下行性疼痛抑制系のセロトニン作動性経路を介して鎮痛作用を発揮する可能性があることが本研究で初めて示された。

下行性疼痛抑制系は、侵害刺激に対する内部制御機構の一つとして提唱されている。GBP などのガバペンチノイドによる鎮痛作用では、ノルアドレナリン系の活性化により脊髄でのノルアドレナリンの放出が増加し、鎮痛作用を発揮すると推測されている<sup>9) 10)</sup>が、一方で GBP とセロトニン作動性下行性疼痛抑制系との関係を検討した報告はほとんどなく、セロトニン経路の関与は明確ではなかった。Kazi らは、術後疼痛モデルラットに GBP を投与し、室傍核 (PVN)、背側縫線核 (DRN)、大縫線核 (NRM) の、神経細胞活性の指標である c-Fos が陽性となった神経細胞を評価した<sup>25)</sup>。GBP 150 mg/kg を腹腔内に投与し足底切開した群では、c-Fos 陽性神経が生理食塩水投与群に比べ PVN で減少、DRN と NRM で上昇する傾向が認められ、GBP 投与によりセロトニン作動性下行性疼痛抑制系の核である DRN と NRM が活性化していることが示された。本研究では、GBP の鎮痛効果は、5-HT 受容体拮抗薬をくも膜下腔に投与することにより拮抗した。このことから脊髄における5-HT の作用も鎮痛に関与していることが示唆された。しかし GBP の鎮痛作用は PCPA によって5-HT を枯渇させても観察された。このことは、セロトニン枯渇 SNL ラットにおいて、セロトニンは疼痛の発生に関与しておらず、GBP の鎮痛作用はセロトニン作動性神経伝達の他に關与する系があることを強く示唆する。また、SNL ラットにおいて5-HT 受容体拮抗薬をくも膜下投与すると GBP の鎮痛作用が消失するという当初の報告と一見矛盾するが、これも GBP がセロトニン作動性神経伝達以外の系も介して鎮痛作用を発揮すると考えれば、セロトニンを枯渇させた SNL ラットにおいて5-HT 受容体拮抗薬が GBP の鎮痛作用を拮抗しないことは矛盾しない。一方ノルアドレナリンを欠乏させた SNL ラットでは、GBP の鎮痛効果は認められなかった。このことから、GBP の鎮痛作用は主にノルアドレナリン系を介し下行性疼痛抑制系が促進され、セ

ロトニン経路はノルアドレナリン系の下流にある可能性が考えられる。セロトニンは下行性疼痛促進系に関与しているという説<sup>26)</sup><sup>27)</sup>もあるが、本研究からセロトニンを枯渇させても神経障害性疼痛の程度は変わらなかったことから、神経障害性疼痛増悪へのセロトニンの寄与についても限定的であるといえることができるだろう。

GBP にはセロトニン活性化作用がある可能性があることがいくつかの研究で示されている。Venkatesha らは、マウスに GBP を投与すると用量依存的に血漿セロトニンが増加することを示した<sup>4)</sup>。Suzuki らは、脊髄の 5-HT<sub>3</sub> 受容体を薬理的にブロックする SNL ラットの事前処理として、オンダンセトロン (5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬) を低用量投与すると GBP の神経活動の抑制と鎮痛作用が消失することを示した<sup>26)</sup>。本研究では、GBP の作用が 5-HT<sub>1,2</sub> 受容体拮抗薬でも拮抗することを示し、GBP による鎮痛作用は 5-HT<sub>3</sub> 受容体以外のセロトニン受容体も介して起こることが示唆された。また、過去の報告では、5-HT<sub>3</sub> 受容体を介したセロトニン神経伝達が神経障害性疼痛モデルの疼痛感覚を増悪させることが示唆されていた<sup>27)</sup>。しかし、我々の結果は 5-HT<sub>2A/2C</sub> および 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬であるケタンセリンおよびオンダンセトロンをそれぞれくも膜下に投与しても、SNL ラットの PWT に影響を与えないことを示している。我々の研究では自由運動下のモデル動物の PWT を測定したのに対し、Suzuki らの研究では麻酔下のモデル動物における von Frey フィラメントによる発火頻度を測定しているため、これらの不一致は、測定方法の違いによって説明できる可能性がある。

本研究にはいくつかの制約がある。臨床的には GBP をはじめとするガバペンチノイドは、神経障害性疼痛に対して鎮痛効果を発揮するのに投与開始後 1 週間程度を要するが、本研究では投与直後の効果のみを検討しているため、ガバペンチノイドの長期投与時の鎮痛効果にどの程度セロトニンや  $\alpha$ -アドレナリン受容体に関与しているかは不明である。また、今回使用した GBP は 100 mg/kg と大量投与であり、ヒトでは鎮痛機序や状況が異なる可能性がある。さらに、ノルアドレナリンと 5-HT の薬理的な枯渇は比較的古典的な研究手法であり、ガバペンチンの鎮痛効果におけるこれらの下行性経路の役割を決定する精度に欠けることが考えられる。これらのモノアミン経路の可塑性は、神経障害性疼痛の病態生理と本質的に関連しているため、その状態に大きな影響を与えることなく枯渇させることはできない。今後、遺伝子組み換え動物を用いた神経伝達物質の調節により、ガバペンチノイドと下行性抑制系との詳細な相互作用が明らかになる可能性がある。

## 結語

本研究では、GBP の鎮痛効果に対するセロトニン受容体拮抗薬のくも膜下投与の影響とその関係を神経障害性モデルラットで検討した。5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬は、GBP の抗疼痛効果を拮抗した。しかし、セロトニン枯渇の状態では GBP の鎮痛作用は阻害されることなく効果を発揮した。GBP の効果にセロトニンが関与していることが示唆されたが、GBP による鎮痛に対するセロトニン作動性効果は他の系よりも影響が少ないと考えられる。



## 謝辞

本研究に際し、ご指導賜りました岐阜大学大学院医学系研究科麻酔科・疼痛医学紙谷義孝先生、佐々木美佳先生、新潟大学医歯学総合研究科麻酔学分野馬場洋先生に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Bates D., Schultheis B. C., Hanes M. C., Jolly S. M., Chakravarthy K. V., Deer T. R., Levy R. M., Hunter C. W.: A Comprehensive Algorithm for Management of Neuropathic Pain. *Pain Med* 20: S2-S12, 2019.
- 2) Tick H., Nielsen A.: Academic Consortium for Integrative Medicine & Health Commentary to Health and Human Services (HHS) on Inter-agency Task Force Pain Management Best Practices Draft Report. *Glob Adv Health Med* 8: 2164956119857656, 2019.
- 3) Wiffen P., Collins S., McQuay H., Carroll D., Jadad A., Moore A.: Anticonvulsant drugs for acute and chronic pain. *Cochrane Database Syst Rev*: Cd001133, 2005.
- 4) G. Venkatesh C. Kalaiyarasi and M. Ramanathan: Antidepressant like Effect of Gabapentin Decreases the Immobility Time in Despair Animal Models in Mice- Role of Serotonergic System in it. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 4: 1702-1706, 2011.
- 5) Gilron I., Bailey J. M., Tu D., Holden R. R., Weaver D. F., Houlden R. L.: Morphine, gabapentin, or their combination for neuropathic pain. *N Engl J Med* 352: 1324-1334, 2005.
- 6) Liu F. Y., Qu X. X., Ding X., Cai J., Jiang H., Wan Y., Han J. S., Xing G. G.: Decrease in the descending inhibitory 5-HT system in rats with spinal nerve ligation. *Brain Res* 1330: 45-60, 2010.
- 7) Hah J., Mackey S. C., Schmidt P., McCue R., Humphreys K., Trafton J., Efron B., Clay D., Sharifzadeh Y., Ruchelli G., Goodman S., Huddleston J., Maloney W. J., Dirbas F. M., Shrager J., Costouros J. G., Curtin C., Carroll I.: Effect of Perioperative Gabapentin on Postoperative Pain Resolution and Opioid Cessation in a Mixed Surgical Cohort: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Surg* 153: 303-311, 2018.
- 8) Morrison E. E., Sandilands E. A., Webb D. J.: Gabapentin and pregabalin: do the benefits outweigh the harms? *J R Coll Physicians Edinb* 47: 310-313, 2017.
- 9) Hayashida K., Obata H., Nakajima K., Eisenach J. C.: Gabapentin acts within the locus coeruleus to alleviate neuropathic pain. *Anesthesiology* 109: 1077-1084, 2008.
- 10) Yoshizumi M., Parker R. A., Eisenach J. C., Hayashida K.: Gabapentin inhibits  $\gamma$ -

- amino butyric acid release in the locus coeruleus but not in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury in rats. *Anesthesiology* 116: 1347-1353, 2012.
- 11) Rao M. L., Clarenbach P., Vahlensieck M., Krätzschar S.: Gabapentin augments whole blood serotonin in healthy young men. *J Neural Transm* 73: 129-134, 1988.
  - 12) Eksi M. S., Turgut V. U., Ozcan-Eksi E. E., Gungor A., Tukul Turgut F. N., Pamir M. N.: Serotonin Syndrome Following Tramadol and Gabapentin Use After Spine Surgery. *World Neurosurg* 126: 261-263, 2019.
  - 13) Ho Kim S., Mo Chung J.: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-363, 1992.
  - 14) Pogatzki E. M., Zahn P. K., Brennan T. J.: Lumbar catheterization of the subarachnoid space with a 32-gauge polyurethane catheter in the rat. *Eur J Pain* 4: 111-113, 2000.
  - 15) Hiroki T., Suto T., Saito S., Obata H.: Repeated Administration of Amitriptyline in Neuropathic Pain: Modulation of the Noradrenergic Descending Inhibitory System. *Anesth Analg* 125: 1281-1288, 2017.
  - 16) Kim S. K., Park J. H., Bae S. J., Kim J. H., Hwang B. G., Min B. I., Park D. S., Na H. S.: Effects of electroacupuncture on cold allodynia in a rat model of neuropathic pain: mediation by spinal adrenergic and serotonergic receptors. *Exp Neurol* 195: 430-436, 2005.
  - 17) Oatway M. A., Chen Y., Weaver L. C.: The 5-HT<sub>3</sub> receptor facilitates at-level mechanical allodynia following spinal cord injury. *Pain* 110: 259-268, 2004.
  - 18) Obata H., Saito S., Sasaki M., Ishizaki K., Goto F.: Antiallodynic effect of intrathecally administered 5-HT<sub>2</sub> agonists in rats with nerve ligation. *Pain* 90: 173-179, 2001.
  - 19) Sasaki M., Kamiya Y., Bamba K., Onishi T., Matsuda K., Kohno T., Kurabe M., Furutani K., Yanagimura H.: Serotonin Plays a Key Role in the Development of Opioid-Induced Hyperalgesia in Mice. *J Pain* 22: 715-729, 2021.
  - 20) Faul F., Erdfelder E., Lang A. G., Buchner A.: G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 39: 175-191, 2007.
  - 21) Chapman V., Suzuki R., Chamarette H. L., Rygh L. J., Dickenson A. H.: Effects of systemic carbamazepine and gabapentin on spinal neuronal responses in spinal nerve ligated rats. *Pain* 75: 261-272, 1998.
  - 22) Field M. J., Oles R. J., Lewis A. S., McCleary S., Hughes J., Singh L.: Gabapentin (neurontin) and S-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents. *Br J Pharmacol* 121: 1513-1522, 1997.
  - 23) Stanfa L. C., Singh L., Williams R. G., Dickenson A. H.: Gabapentin, ineffective in

normal rats, markedly reduces C-fibre evoked responses after inflammation. Neuroreport 8: 587-590, 1997.

- 24) Tanabe M., Takasu K., Kasuya N., Shimizu S., Honda M., Ono H.: Role of descending noradrenergic system and spinal alpha2-adrenergic receptors in the effects of gabapentin on thermal and mechanical nociception after partial nerve injury in the mouse. Br J Pharmacol 144: 703-714, 2005.
- 25) Kazi J. A., Gee C. F.: Effect of gabapentin on c-Fos expression in the CNS after paw surgery in rats. J Mol Neurosci 32: 228-234, 2007.
- 26) Suzuki R., Rahman W., Rygh L. J., Webber M., Hunt S. P., Dickenson A. H.: Spinal-supraspinal serotonergic circuits regulating neuropathic pain and its treatment with gabapentin. Pain 117: 292-303, 2005.
- 27) Suzuki R., Rahman W., Hunt S. P., Dickenson A. H.: Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced in deep dorsal horn neurones following peripheral nerve injury. Brain Res 1019: 68-76, 2004.

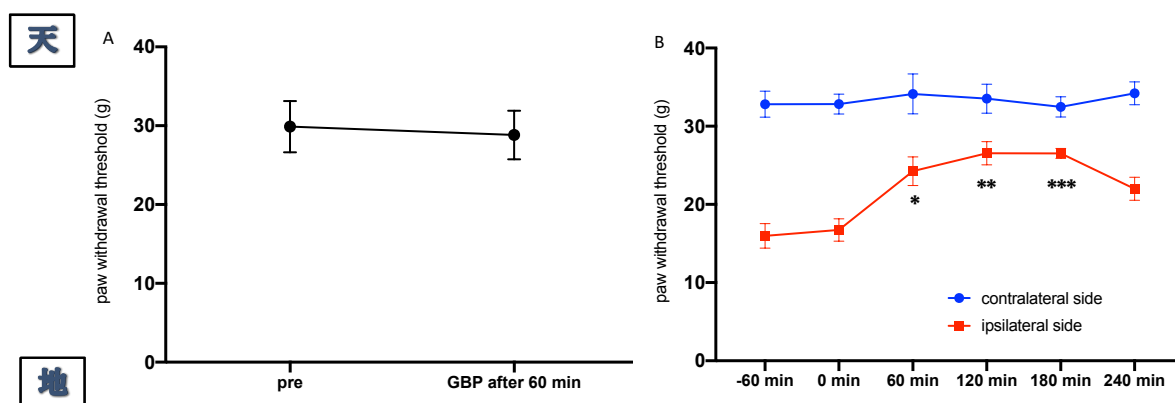
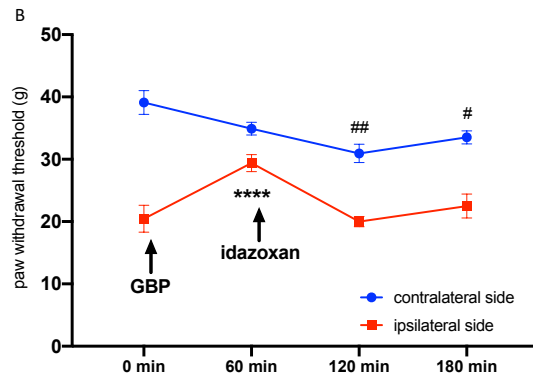
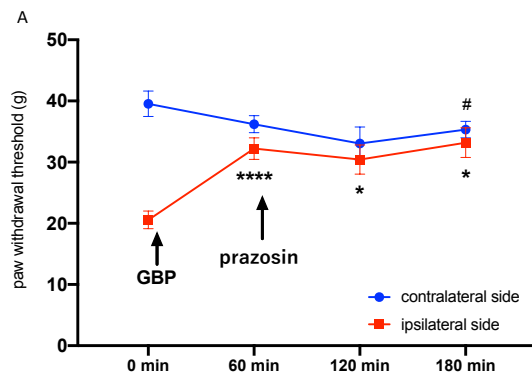


図1: ガバペンチン (GBP) は, naive ラットの機械刺激に対する足底逃避閾値 (PWT) に影響を与えなかったが, 神経障害性疼痛モデルラットにおいて PWT を改善させた。

A: naive ラットに GBP を 100 mg/kg 腹腔内投与し, GBP 投与 60 分後に PWT を測定した. データは各群 4 匹の平均値±SEM で表した. B: SNL ラットに GBP を 100 mg/kg 腹腔内投与し, PWT を測定した. GBP は, 投与後 120~180 分後に対側の PWT に影響を与えることなく, L5 脊髄神経結紮側の PWT を有意に改善した. データは 1 群 8 匹の平均値±SEM で表した. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  は, 同側の 0 分時点と比較して, 二元配置型反復測定分散分析と Tukey 検定で比較した. GBP: gabapentin, PWT: paw withdrawal threshold, SNL: spinal nerve ligation

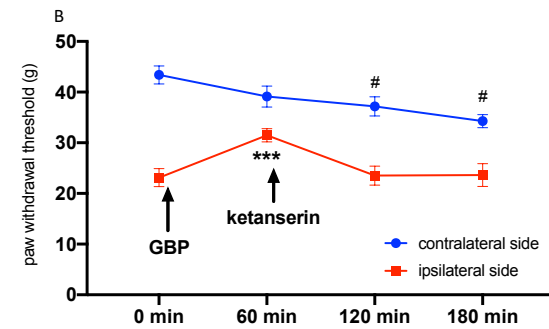
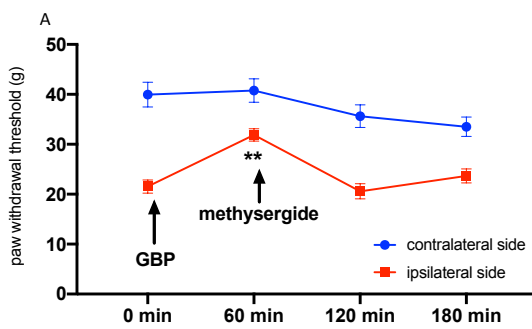
天



地

図 2:  $\alpha_2$ -アドレナリン受容体拮抗薬をくも膜下投与すると, GBP の抗疼痛作用は消失した. GBP を 100 mg/kg 腹腔内投与すると, SNL ラットの障害側で, 投与 60 分後に逃避閾値が改善した. A:  $\alpha_1$ -アドレナリン受容体拮抗薬であるプラゾシン (30 $\mu$ g) のくも膜下投与は, PWT に影響を与えなかった. B:  $\alpha_2$ -アドレナリン受容体拮抗薬であるイダゾキサン (30 $\mu$ g) は, 投与 60 分後に GBP の鎮痛効果を消失させた. さらに, 対側の PWT も有意に悪化した. データはそれぞれ, A では 8 匹, B では 6 匹の平均値 $\pm$ SEM で表した. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; #  $p < 0.05$  は同側の 0 分時点と比較して, 二元配置型反復測定分散分析と Tukey 検定で比較した. GBP : gabapentin, PWT : paw withdrawal threshold, SNL : spinal nerve ligation

天



地

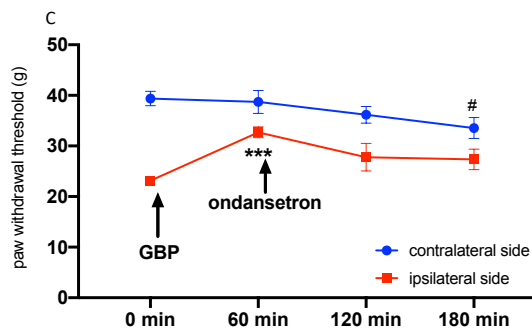
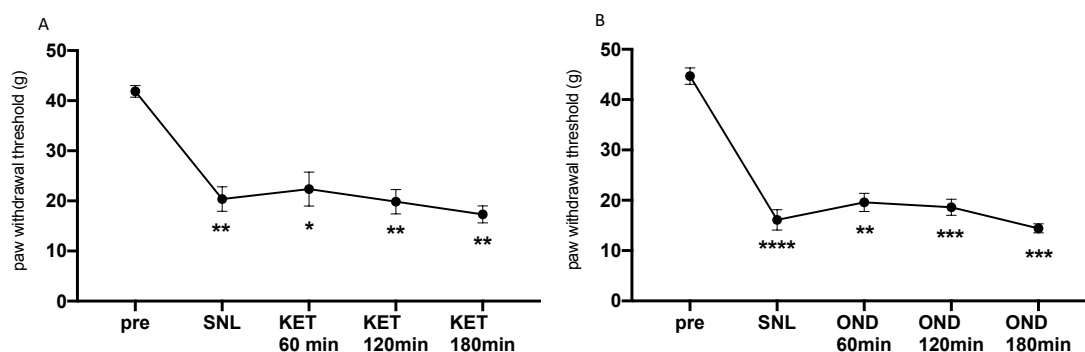


図 3: 5-HT 受容体拮抗薬のくも膜下投与により, GBP の抗疼痛作用は拮抗された. GBP を 100 mg/kg 腹腔内投与すると, 図 1B と同様に逃避閾値は改善した. A: 5-HT<sub>1</sub> 受容体

拮抗薬メチセルジド (30  $\mu\text{g}$ ) の髄腔内投与は、障害側で GBP の抗疼痛作用に拮抗した。B : 5-HT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬ケタンセリン (30  $\mu\text{g}$ ) および C : 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬オンダンセトロン (30  $\mu\text{g}$ ) をくも膜下に投与すると、GBP の抗疼痛作用が拮抗された。5-HT 受容体拮抗薬は、SNL の対側における PWT を悪化させた。データはそれぞれ、A では 6 匹、B では 8 匹、C では 7 匹の平均値  $\pm$  SEM で表した。\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; # $p < 0.05$  は、同側の 0 分時点と比較して、二元配置型反復測定分散分析と Tukey 検定で比較した。GBP : Gabapentin, PWT : paw withdrawal threshold , SNL : spinal nerve ligation

天

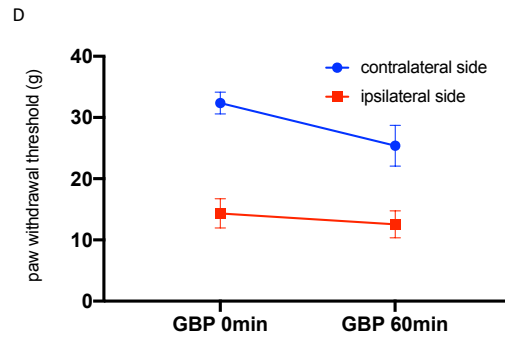
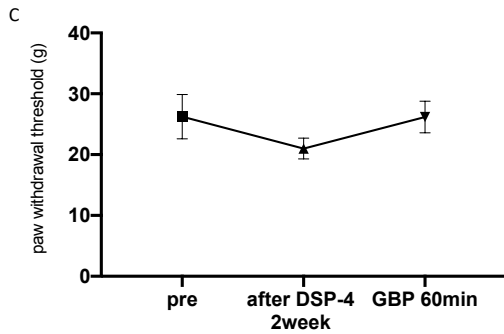
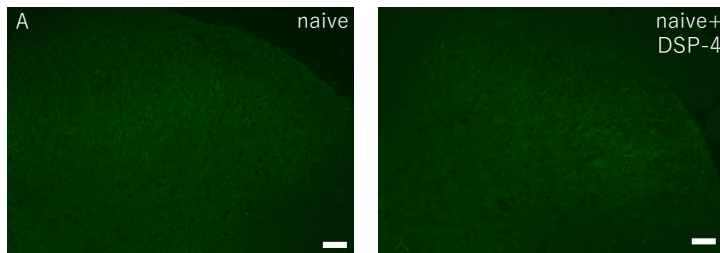


地

図 4 : ケタンセリンおよびオンダンセトロンのくも膜下投与は、SNL ラットの PWT を改善させなかった。

A : ケタンセリン (30  $\mu\text{g}$ ) は、くも膜下投与後 180 分まで、障害側後肢の PWT を変化させなかった。B : オンダンセトロン (30  $\mu\text{g}$ ) は、くも膜下投与後 180 分まで、障害側後肢の PWT を変化させなかった。\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  は、障害側の前時点と比較して、一元配置反復測定分散分析と Tukey 検定により比較した。KET : ketanserin, OND : ondansetron, PWT : paw withdrawal threshold , SNL : spinal nerve ligation

天

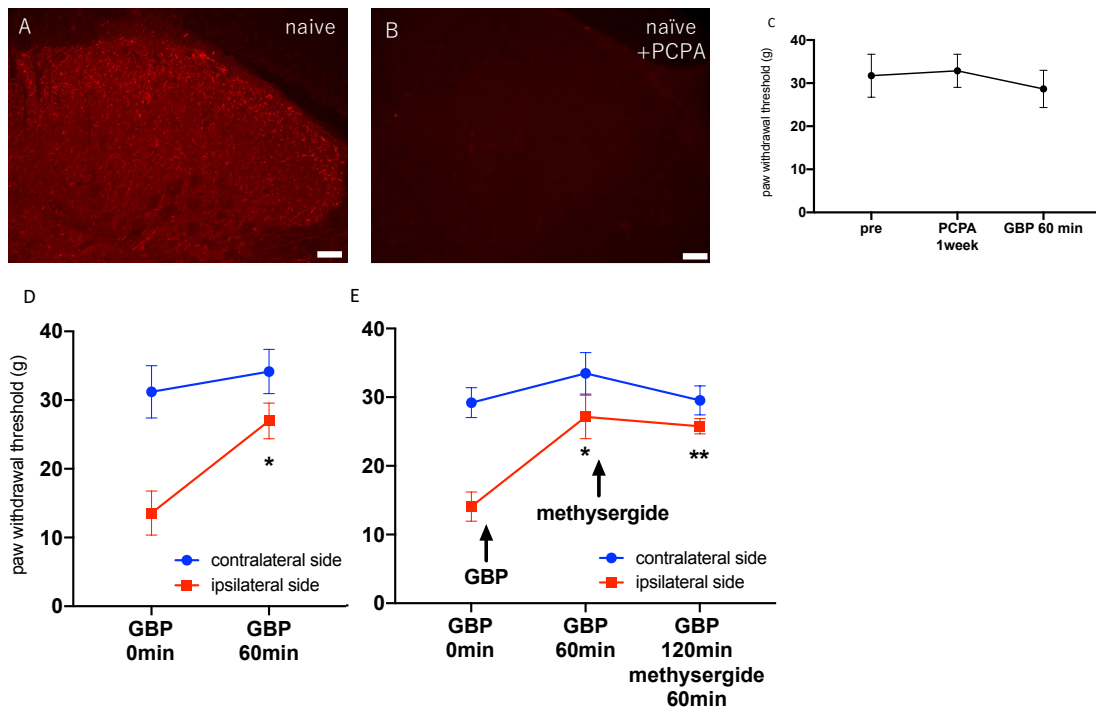


地

図5：中枢神経系におけるノルアドレナリン枯渇状態では，SNLラットにおけるGBPの抗疼痛作用が消失した。

A, B：DSP-4を50 mg/kg腹腔内投与したことによる前処理により，ラットの腰部脊髄後角におけるドーパミンβ-水酸化酵素免疫反応(DβH-IR)が低下した。Scale bar=50 μm。C：DSP-4の前処理は，GBP(100mg/kg)投与による非神経損傷ラットのPWTを変化させなかった。D：DSP-4の前処理は，SNLラットにおけるGBPの抗疼痛効果を消失させた。データは，各群4匹の平均値±SEMで示した。DSP-4：N-(2-Chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride，DβH-IR：dopamine beta-hydroxylase-immunoreactivity，GBP：gabapentin，SNL：spinal nerve ligation

天



地

図 6：中枢神経系における 5-HT の枯渇状態は，SNL ラットにおける GBP の抗疼痛効果に影響を及ぼさなかった。

A, B : PCPA の前処理は，ラットの腰部脊髄後角の 5-HT の染色性を減少させた。PCPA は，浸透圧ポンプを用いて 150 mg/kg/日を 7 日間投与した。Scale bar=50  $\mu$ m. C : PCPA の前処理は，naive ラットにおける逃避閾値および GBP の抗疼痛効果に影響を与えなかった。D : SNL ラットでは，GBP の鎮痛効果は PCPA 前処理によって消失しなかった。E : SNL ラットにおいて，PCPA 前処理をするとメチセルジド (30  $\mu$ g) をくも膜下投与しても GBP の作用を拮抗しなかった。データは各群の平均値  $\pm$  SEM で表した。\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  は GBP 0 分時点と比較して，二元配置反復測定分散分析で比較した。PCPA : *para*-chlorophenylalanine, 5-HT : 5-hydroxytryptamine, GBP : gabapentin, SNL : spinal nerve ligation.