

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	山本 豪
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 860 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	硫酸デヒドロエピアンドロステロンは脊髄後角の痛覚伝達を増強する
論文審査委員	主査 教授 長谷川 功 副査 教授 竹林 浩秀 副査 教授 馬場 洋

博士論文の要旨

【緒言】硫酸デヒドロエピアンドロステロン (Dehydroepiandrosterone Sulfate : DHEAS) は、神経系で生合成される神経ステロイドの一つであり、脊髄にその合成酵素があることから脊髄において作用していると考えられている。これまで DHEAS には脊髄において痛覚過敏作用があり、それにはシグマ 1 受容体や N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体、ガンマアミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid : GABA) _A 受容体の関与が指摘されているが、その作用機序の詳細は明らかになっていない。今回申請者は DHEAS の脊髄後角ニューロンのシナプス伝達機構に及ぼす影響について明らかにするために、行動学的実験とパッチクランプ記録による電気生理学的実験を行った。

【方法】Wister 系雄性成熟ラットを用いて実験を行った。＜行動学的実験＞ラット脊髄くも膜下腔にカテーテルを挿入し、DHEAS (3、10、30 $\mu\text{g}/\text{body}$) または vehicle 群として DHEAS の溶媒である 20% Dimethyl sulfoxide in saline を脊髄クモ膜下投与した。von Frey フィラメントの機械的刺激に対する疼痛反応閾値を計時的に計測した。＜電気生理学的実験＞ラット脊髄横断スライス標本を作製し、脊髄後角第 II 層よりブラインドホールセルパッチクランプ記録を行った。薬液の灌流はクレブス液と同ラインを用い、クレブス液に溶解して投与した。電流固定法による活動電位の測定時には 60 pA の電流を 1000 ms 流した。電圧固定法による測定時にはテトロドトキシンを使用することで、微小興奮性シナプス後電流および微小抑制性シナプス後電流を観察した。DHEAS は 100 μM の濃度で 5 分間灌流投与しその前後で比較した。行動学的実験結果は one or two-way ANOVA で、電気生理学的実験結果は Student の t 検定で統計処理を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】＜行動学的実験＞von Frey フィラメントの機械刺激に対する疼痛閾値は、脊髄くも膜下投与 15 分後に DHEAS 3 μg 群および 10 μg 群は vehicle 群と比較して低下し、30 分後は DHEAS 10 μg 群のみ vehicle 群と比較して低下した。投与後 120 分で投与前と同じ閾値に戻った。DHEAS 30 μg 群では興奮して飛び跳ねる、後肢や尾を噛むといった異常行動が出現したため von Frey テストは行えなかった。＜電気生理学的実験＞電流固定法では細胞の活動電位がスパイクとして観察された。このスパイクの数は DHEAS の灌流投与により増加した。次に電圧固定法で記録した。微小興奮性シナプス後電流は DHEAS の灌流投与により頻度は増加し振幅は増大した。このとき NMDA 受容体拮抗薬である AP5 (50 μM) 存在下において頻度は増加したが振幅は変化せず、シ

グマ 1 受容体拮抗薬である BD1047 (100 μM) 存在下において頻度は増加したが振幅は変化しなかった。微小抑制性シナプス後電流は DHEAS の灌流投与により頻度は減少したが、振幅は変化しなかった。このとき GABA_A 受容体拮抗薬であるビククリン (10 μM) 存在下において頻度、振幅ともに変化せず、グリシン受容体拮抗薬であるストリキシン (2 μM) 存在下において頻度、振幅ともに減少し、シグマ 1 受容体拮抗薬である BD1047 (100 μM) 存在下において頻度、振幅ともに変化しなかった。

【考察】ラットの脊髄くも膜下腔に DHEAS を投与すると、von Frey フィラメントの機械刺激に対する疼痛閾値は用量依存的に低下し、その最大効果時間は 15 分後であった。また電流固定法によるパッチクランプ記録により、DHEAS は脊髄後角第 II 層ニューロンにおいて神経発火を増加させたことから、ニューロンの興奮が痛覚過敏として現れたものと考えられた。電圧固定法によるパッチクランプ記録により、DHEAS による微小興奮性シナプス後電流の頻度増加が認められたことから、DHEAS には興奮性ニューロンのシナプス前終末からのグルタミン酸放出を増加させる作用もあることが分かったが、この反応は NMDA 受容体及びシグマ 1 受容体に非依存的であった。DHEAS による微小興奮性シナプス後電流の振幅の増大は、NMDA 受容体拮抗薬およびシグマ 1 受容体拮抗薬により認められなくなったことから、シナプス後膜の NMDA 受容体やシグマ 1 受容体に DHEAS が作用することが示唆された。微小抑制性シナプス後電流の頻度と振幅はともに DHEAS により減少したが、GABA_A 受容体拮抗薬やシグマ 1 受容体拮抗薬を同時使用すると観察できなくなったことから、抑制性ニューロンのシナプス前終末からの GABA 放出抑制作用とシナプス後膜の GABA_A 受容体抑制作用がありそれにシグマ 1 受容体が関わっていることが分かった。

【結論】DHEAS は脊髄後角ニューロンにおいて、シグマ 1 受容体や NMDA 受容体、GABA_A 受容体に作用し、興奮性シナプス伝達の増強と抑制性シナプス伝達の抑制をすることで、ニューロンを興奮させ痛覚伝達を増強すると考えられた。

審査結果の要旨

神経系で生合成される神経ステロイドの硫酸デヒドロエピアンドロステロン (DHEAS) は、脊髄にその合成酵素があり、痛覚過敏作用を有する。申請者は Wister ラットを対象に DHEAS が脊髄後角ニューロンのシナプス伝達に及ぼす作用を行動学的・電気生理学的に検証した。DHEAS をくも膜下投与すると、von Frey 機械刺激テストにおける疼痛反応閾値は用量依存的に低下した。脊髄スライス標本で後角第 II 層よりホールセルパッチクランプ記録しながら DHEAS を投与すると、電流固定法では活動電位数が増加し、電圧固定法では微小興奮性シナプス後電流の頻度が NMDA 受容体とシグマ 1 受容体に非依存的に増加し、振幅は両受容体に依存的に増加した。微小抑制性シナプス後電流の頻度と振幅は DHEAS の投与で減少し、この抑制は GABA_A 受容体拮抗薬あるいはシグマ 1 受容体拮抗薬の併用で阻害された。以上、DHEAS が脊髄後角ニューロンにおいて興奮性シナプスの増強と抑制性シナプスの抑制により痛覚ニューロンの興奮と伝達を増強する病態機序を明らかにした点に、学位論文としての価値を認める。