原 著

ラット培養脊髄後根神経節ニューロンにおける ノルアドレナリンのブラジキニン応答への影響 ——ホールセルパッチクランプ法による電気生理学的解析——

前 田 亮

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学系専攻

口腔機能再建学講座 疼痛制御学分野

(主任：嶋田昌彦教授)

東京医科歯科大学難治疾患研究所 先端分子医学研究部門 自律生理分野

(指導：片山芳文教授)

(2007 年 1 月 31 日 受付)

Modulation of Bradykinin Responses by Noradrenaline in Cultured Neonatal Rat Dorsal Root Ganglion Neurons ——Electrophysiological Analysis by Whole-Cell-Patch Clamp Method——

MAEDA Akira

Orofacial Pain Management, Department of Oral Restitution, Division of Oral Health Sciences,

Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

(Chief : Prof. SHIMADA Masahiko)

Department of Autonomic Physiology, Division of Advanced Molecular Medicine,

Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

(Director : Prof. KATAYAMA Yoshifumi)

It is widely accepted that the sympathetic nerve activity might participate in some mechanisms underlying neuropathic pain which sometimes develops after nerve injuries.

Many chemical substances have been proposed to induce pain sensation. Bradykinin (BK) is the most potent in exciting nociceptors and in sensitizing them to thermal and mechanical stimuli. We investigated modulatory effects of sympathetic agents on BK actions in primary afferent dorsal root ganglion (DRG) cells. The present electrophysiological experiments by using the patch clamp technique were conducted to examine the effects of noradrenaline (NA) on BK responses and to determine the sites and mechanism of interaction between them.

1. Small (diameter, 20-35 μm) DRG neurons responded to BK with inducing inward currents (BK-responses), but no BK responses could be evoked in DRG neurons larger than 35 μm .

2. NA at 10 μM augmented the BK responses in amplitude compared to the control response.

3. Clonidine at 1 μM augmented the BK responses in amplitude, but isoproterenol at 1 μM failed to augment the BK responses.

4. After pretreatment with yohimbine, the BK responses were not changed by NA.

It is concluded that NA-induced augmentation of the BK actions occurred by activating α 2-adrenergic receptor. Furthermore, this experimental system is a useful model in order to study the cellular mechanisms of neuropathic pain.

I. 緒 言

近年、自律神経作動薬による痛みの増強が報告されて

おり、また自律神経系がニューロパシックペイン (neuropathic pain, 神経因性疼痛) の発現に関与すると考えられている^{1,2)}。歯科領域におけるニューロパシックペイ

ンには、下顎臼歯部の抜歯やデンタルインプラント埋入後にしばしば引き起こされる下歯槽神経の損傷を原因とする難治性慢性痛が挙げられる^{3,4)}。さらに、抜髄処置や感染根管治療による慢性歯痛も考えられ、アロディニア (allodynia) や痛覚過敏 (hyperalgesia) などの主症状を有する^{5,6)}。また臨床的には星状神経節ブロックに代表される交感神経節ブロックや、クロニジンの硬膜外およびくも膜下への投与が広く行われており、その鎮痛効果が知られている⁷⁻⁹⁾。しかしながら、末梢の侵害受容器の感受性に対し、自律神経系がどのように関与しているかはいまだ不明である。

痛みには感覚的側面 (痛覚) と情動的側面 (不快、不安など) があり¹⁰⁾、脳のノルアドレナリン神経はその両者において重要な役割を担っている。一方、末梢領域におけるニューロパシックペインには交感神経系が関与するという報告²⁾もあるが、ノルアドレナリンの病態生理的役割については不明な点が多い。また、これら難治性疼痛の治療には、鎮痛補助薬としてノルアドレナリントランスポーター (NET) を含むモノアミン神経伝達物質トランスポーターの阻害薬である抗うつ薬が用いられているが、疼痛制御との関係は十分にはわかっていない¹¹⁾。

ところで、侵害受容性ニューロンの応答は、カテコールアミン、オピオイドペプチド、プロスタグランジンなどのニューロモジュレーターの影響を受けることが知られている¹²⁻¹⁴⁾。また、サブスタンス P やカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、ATP、ニューロキニン A などの神経ペプチドが、末梢における痛みの変調や維持に関与していると考えられている¹⁵⁻¹⁷⁾。

自律神経作動薬のなかでも、特にアドレナリン作動性薬物が痛みの変調を起こすという Banik らの報告がある¹⁸⁾。彼らは、ラットの皮膚の侵害受容器におけるブラジキニン (bradykinin; 以下、BK) とノルアドレナリン (noradrenaline; 以下、NA) の相互作用を検討した。その結果、NA 存在下では BK によって誘発されるスパイクの頻度および振幅がいずれも増大した。しかし、BK 応答に対する NA の影響について、細胞レベルでのメカニズムは明らかでない。したがって、BK と NA の相互作用を細胞レベルで解析するための実験系が必要である。

侵害受容器の感作にかかわる疼痛誘発物質のうち、BK は最も強力な発痛物質の一つであり、脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion; 以下、DRG) ニューロン細胞体を興奮させることが知られている¹⁹⁾。すなわち、DRG 細胞体で末梢と同じように BK 応答を得ることが可能で、実際に DRG 細胞体における BK 感受性に関する報告が多数ある²⁰⁻²²⁾。したがって、DRG 細胞体における BK 応答への NA の効果を研究することは、末梢での痛みと交感神経活動の相互関係を細胞レベルで解明する

ために重要と考える。

本研究では、新生ラットの培養 DRG ニューロンを用い、BK に感受性を示す DRG ニューロンに対して種々のアドレナリン作動薬を投与したときの BK 応答の変化について、ホールセルパッチクランプ法による電気生理学的解析を行った。

II. 方 法

1. 細胞培養

本研究は、東京医科歯科大学実験動物委員会の承認を受け、本学の動物実験の基本指針に従って行われた (No. 0060010 and No. 0070070)。

生後 1~3 日の Wistar 系新生ラット (埼玉実験動物供給所) を用い、ペントバルビタールナトリウム (ネプタール® 注射液、大日本製薬社製) を腹腔内に投与後、脊髄後根神経節 (DRG) を注意深く摘出した。摘出した DRG に割を入れ、パパイン 20.3 units/ml 含有の lowCa²⁺-lowMg²⁺ Krebs' 溶液に浸漬し、37°C、CO₂ 濃度 5% のインキュベーター内で 20 分間酵素処理を行った。その後、10% ウシ胎児血清 (fetal calf serum, Gibco 社製) を添加したダルベッコ変法イーグル培養液 (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM, SIGMA 社製、以下、培養液) で 3 回洗浄を行った。続いて、先端径を 5 mm にカットし熱処理したパスツールピペット (IWAKI 社製) でポンピングを 150~200 回行い、細胞体を分離した。分離した細胞体を、あらかじめラミニンでコーティングした培養ディッシュ (径 35 mm) に播種し、培養液 2 ml を添加し、37°C、CO₂ 濃度 5% のインキュベーター内で 1~3 日間培養を行った。なお、使用した Krebs' 溶液のイオン組成 (mM) は、NaCl, 117; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgCl₂, 1; glucose, 11; 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), 25 であった。また pH は NaOH 水溶液により 7.2 に調整し、lowCa²⁺-lowMg²⁺ Krebs' 溶液は、Krebs' 溶液に EDTA (ethylenediaminetetracetic acid, 2.5 mM) を添加し作製した。

2. 電気生理学的手法による記録

倒立顕微鏡 (Olympus 社製) を用いて直視下 (200 倍) で培養 DRG 細胞を観察しながら実験した (図 1)。細胞の形状と大きさから、球状に盛り上がった細胞を DRG ニューロンと判断した。ホールセルパッチクランプ法を用い、voltage-clamp モードで細胞膜電流の測定を行い、Holding potential (保持電位) は -60 mV に保った。記録用アンプには Axopatch-1D アンプ (Axon Instruments 社製) を使用し、電流信号は Bessel filter を通し、ペンレコーダー (三栄社製) で記録した。さらに、ガラス電極は、ボロシリケート製ガラスチューブ (Warner

Instrument 社製) を 2 段引きパッチ電極製作器 (NARISHIGE 社製) を使用し、電極内液充填時の電極抵抗が 5~10 M Ω になるように作製した。電極をマニピュレーター (NARISHIGE 社製) に装着し、電極の先端を細胞膜に接触させ電極内に陰圧をかけ、電極との漏れ抵抗をギガ Ω のレベルで維持した (ギガシール)。続いて、シリンジで陰圧を加え電極と接した膜を穿孔し、細胞内液と電極内液を交通させ、ホールセルの状態を形成した。電極内液のイオン組成 (mM) は、CsCl, 100; MOPS, 40; MgCl₂, 1; EGTA, 10; CaCl₂, 1; ATP, 2 であった。また pH は KOH 水溶液により 7.2 に調整した。シリージレジスタンスの電氣的補正は行わなかった。細胞外液のイオン組成 (mM) は、NaCl, 150; KCl, 5; CaCl₂, 2; MgCl₂, 2; glucose, 10; HEPES, 10 で、pH は NaOH 水溶液により 7.3 に調整した。室温は 20~25°C に保ち、実験用チャンバーを、細胞外液の容量が 1 ml になるように作製した。Bradykinin (BK) は Krebs' 溶液で希釈しガラスチューブに充填し、パッチ電極の反対側にチューブの先端を位置させ、細胞体までの距離を約 30 μ m とした。ガラスチューブを Pneumatic PicoPump (World Precision Instruments 社製) に接続し、窒素ガスの圧 (1 psi.) で細胞体へ投与した (以下、本投与法をパフ投与と記載)。ノルアドレナリン (NA)、イソプロテレノール (isoproterenol)、クロニジン (clonidine)、ヨヒンビン (yohimbine) は、マイクロピペットを用いて直接チャンバー内の溶液中に静かに投与した。薬剤は実験直前に蒸留水で希釈し、最終濃度の調整を行った。実験中は、細胞外液の灌流は行わなかった。

3. 使用薬剤

本実験で使用した薬物 (入手先) は下記のとおりである。

Bradykinin (Wako 社製), noradrenaline bitartrate (Wako 社製), isoproterenol bitartrate (SIGMA 社製), clonidine hydrochloride (SIGMA 社製), yohimbine hydrochloride (SIGMA 社製), papain (Worthington biochemical 社製), 3-(N-morpholino propanesulfonic acid) (MOPS, SIGMA 社製), 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES, Wako 社製), ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, SIGMA 社製), ネンブタール® (大日本製薬社製)

4. 統計学的検索

解析には、t-検定ならびに SPSS II ソフト (エス・ピー・エス・エス社製) を使用し、一元配置分散分析: Scheffé の検定を行った (ANOVA)。有意水準は 5% (両側検定) とした。

III. 結 果

1. 脊髄後根神経節 (DRG) 細胞体における bradykinin (BK) の作用

幼若ラットの培養 DRG 細胞体にホールセルパッチクランプ法を適用し、膜電位固定モードで保持電位 (holding potential) を -60 mV に設定し、BK を用い 1~数秒間のパフ投与 (空気圧: 1 psi.) を行った。BK を作用させると、ただちに内向き電流 (inward current) が惹起され、通常 5 秒以内にピークに達し、パフ投与を止めた後は 10~15 秒の半減時間で静止状態に戻った (図 2)。BK によって誘発された内向き電流 (以下、BK 応答) は、本実験で試みた DRG 細胞体 250 例中 53 例で観察された。この BK 応答は主として直径 35 μ m 未満の小型の DRG 細胞体から記録された。そこで、BK 応答を示す細胞数と細胞体の径との関係を検討した結果、細胞体の直径が 35 μ m 未満の小~中型細胞では 150 例中 53 例で BK 応答が確認されたが、35 μ m 以上の大型細胞では BK 応答は観察されなかった (図 3)。また、直径 35 μ m 未満でもさらに詳しくみると、より小径の細胞のほうが BK に感受性を示す傾向があるため、可能なかぎり小型細胞を用いて解析を進めた。

BK を充填した微小ガラスチューブに加えるパフ投与時の空気圧と持続時間を一定に保持しても、ガラスチューブの先端径や細胞との位置関係によって BK 応答の大きさは変動するので、数回のパフ投与の結果、安定した BK 応答が得られることを確認したうえで実験を進めた。

2. NA 存在下における BK 応答

交感神経アドレナリン作動性節後線維の末端から放出される交感神経作動薬は、主として NA である。そこで、BK と交感神経作動薬の相互作用を単一細胞のレベルで検討するために、DRG 細胞体における BK 応答に及ぼす NA の影響を解析した。

図 4 に示すように、NA (10 μ M) によって BK 応答はそれぞれ 220% (A)、120% (B) ほど増大した。しかし、NA 濃度が一定でも、パフ投与に用いる微小ガラスチューブ内の BK 濃度が高い (A) のほうが、NA による増大効果が (B) に比べて大きいことが確認された。同様な結果は試みた 4 例すべてで観察された。

次に、パフ投与に用いる微小ガラスチューブ内の BK 濃度を一定とし、NA の濃度を変化させて BK 応答を記録した (図 5 A)。BK 応答が安定して得られることを確認した後、その平均値をコントロール値として用い、それぞれの実験における BK 応答のコントロール値を 100% として、その後の実験条件での BK 応答を百分率 (%) で表示した (図 5 B)。NA による BK 応答の増大は、

図1 倒立顕微鏡下での実験中の写真

a: BK に感受性をもつ小型 DRG 細胞体。b: BK に感受性をもたない大型 DRG 細胞体。
R: 記録用パッチ電極, B: BK を充填した微小ガラス管。スケールは 30 μm 。

図2 a: 10 μM の BK を 1 秒間パフ投与 (puff) したとき, DRG 細胞から記録された電流応答 (図 1 の a から記録)。b: BK 応答なし (図 1 の b から記録)。矢印は投与時期を表す。保持電位: -60 mV

NA が 10 μM では $121 \pm 1.3\%$ ($n=4$), 20 μM では $146 \pm 4.3\%$ ($n=4$) で, NA の濃度が高いと BK 応答の増大効果は有意に大きくなった (図 5 B)。この結果は記録チャンパー内の NA を増量させることによって得られたので, この NA 作用には脱感作がさほど顕著ではないと思われた。

3. アドレナリン作動薬(α , β 作動薬)存在下における BK 応答

NA には α 作用ならびに β 作用があるため, まず非選択的 β 作動薬であるイソプロテレンールを投与し, BK 応答の変化を観察した (図 6 A)。イソプロテレンール 1 μM では, BK 応答はほとんど変化しないか, もしくはやや小さくなることが観察された (図 6 B)。したがって, β 作動薬は BK 応答の増強に関与しないと結論された。

神経損傷後の神経断端部には α_2 アドレナリン受容体の出現が知られている²³⁾ため, 選択的 α_2 作動薬であるクロニジンを投与し, BK 応答の変化を観察した。図 7 A に示すように, クロニジン 1 μM を投与すると, BK 応答はコントロール値 (a) と比較し約 200%ほど大きくなった (b)。さらに, 4 ニューロンについて同様の結果が得られ, BK 応答はクロニジン 1 μM により有意に増大した

($159 \pm 9.6\%$, $n=4$; $p<0.05$; 図 7 B)。また, 図 7 A(c) に示すように, クロニジンによる BK 応答増強効果は, α_2 -blocker であるヨヒンビン (後述) で消失することが同一ニューロンで観察された。

4. ヨヒンビン存在下における BK 応答に与える NA の効果

NA による BK 応答の増大は α_2 作用によることを確認するため, α_2 -blocker であるヨヒンビンを用いて NA による BK 応答増大効果の変化を調べた (図 8)。あらかじめ, ヨヒンビン 10 μM を DRG 細胞に作用させても膜電流に影響を与えないこと, ならびに BK 応答にも影響しないことを確認した (図 8 B, $101 \pm 1.2\%$, $n=6$; $p>0.05$)。ヨヒンビン 10 μM 存在下で NA による BK 応答の有意な増大は観察されなかった (図 8 B, $104 \pm 1.0\%$, $n=6$; $p>0.05$)。

IV. 考 察

本研究では, 交感神経作動薬が侵害受容性応答へ及ぼす作用を, パッチクランプ法による電気生理学的解析を用い, 細胞レベルで行った。主として小型 DRG 細胞に BK の感受性が認められ, BK 応答は NA により増大し

図3 BKに対する応答性と細胞体の大きさ(μm)の関係
それぞれのクラスで50個のDRGニューロンに10 μMのBKを投与したときに応答した数を示す。数値は、以上～未満を表示。

図5 NA濃度とBK応答の増大との関係

A: 10 μMのBKを1秒間パフ投与(puff)したときの電流応答。aはコントロール(BK単独), bは10 μMのNA存在下, cは20 μMのNA存在下でのBK応答をそれぞれ示す。保持電位: -60 mV

B: コントロール値を100%としたときのNAによるBK応答の増大を示す。縦軸は増大率(%)でmean±S.E.M.(n=4)を表示。横軸はNAの濃度。*: p<0.05

た。同様のBK応答の増大は、クロニジンでも観察され、これらの増大反応はヨヒンビンによって遮断された。一方、イソプロテレノールはBK応答の増大を起こさなかった。

以上のことから、NAによるBK応答の増大作用は α_2

図4 NAによるBK応答の増大

A: 100 μMのBKを1秒間パフ投与(puff)したときの電流応答。aはコントロール(BK単独), bは10 μMのNA存在下での応答を示す。

B: 10 μMのBKを1秒間パフ投与(puff)したときの電流応答。aはコントロール, bは10 μMのNA存在下での応答を示す。

保持電位: -60 mV

図6 イソプロテレノール(Iso)がBK応答に与える影響

A: aは10 μMのBKを1秒間パフ投与(puff)したときの電流応答(コントロール), bは1 μMのIso存在下でのBK応答を示す。保持電位: -60 mV

B: コントロール値(左柱)を100%としたときのIsoによるBK応答の変化を示す。縦軸は増大率(%)でmean±S.E.M.(n=4)を表示。

図7 クロニジン (Clo) が BK 応答に与える影響

A : 10 μM の BK を 1 秒間パフ投与 (puff) したときの電流応答。a はコントロール (BK 単独), b は 1 μM の Clo 存在下, c は Clo 1 μM とヨヒンビン (Yoh) 10 μM 存在下での BK 応答。保持電位: -60 mV

B : Clo による BK 応答の増大を示す。縦軸は増大率 (%) で mean ± S.E.M. (n=4) を表示。*: p < 0.05

作用によるものであると考えられた。本研究で用いた実験系は、交感神経と痛覚とのかかわりを細胞レベルで検討するうえで、有用なモデルと考えられる。

1. 実験条件について

電気生理学的手法による研究は、実験条件によって記録にばらつきがでる。細胞膜を通過する電流を記録するパッチクランプ法も、当然実験条件の影響を受ける。細胞外液の温度や室温の変化、振動などの環境要因はもとより、実際に BK を投与する際に用いた微小ガラスチューブの先端径や細胞との位置関係、パフ投与時の空気圧、持続時間などにより BK 応答の大きさに変動がみられた。そのため、本研究は数回のパフ投与の結果、安定した BK 応答が得られることを確認したうえで実験を実施した。

2. BK 応答を示す DRG 細胞

BK に対する応答は、内向き電流として記録された。今回の実験では、BK をパフ投与にて DRG に作用させたが、すべての細胞から BK 応答が観察されたわけではなく、直径 35 μm 未満の小型 DRG 細胞の約 35% (53/150)

図8 NA による BK 応答の増大に対するヨヒンビン (Yoh) の作用

A : 10 μM の BK を 1 秒間パフ投与 (puff) したときの電流応答。a はコントロール (BK 単独), b は Yoh 10 μM 存在下, c は Yoh 10 μM と NA 10 μM での BK 応答を示す。保持電位: -60 mV

B : BK 応答の増大を示す。縦軸は増大率 (%) mean ± S.E.M. (n=6) で、横軸に A の a, b, c に対応した実験条件を表示。

で確認されたにすぎない。小型細胞は、疼痛伝達に関与する一次知覚ニューロンと考えられ、中型～大型の細胞は触覚などに関与するとされており、われわれの見解と符合する。本研究では、図3に示すようにより小さい細胞ほど BK 応答が誘発される頻度が高く、このことから BK レセプターが小型細胞で発現する傾向があると考えられた。

BK レセプターの発現には培養時間の長さが重要で、培養開始 18 時間では約 43% の細胞に、開始後 42 時間では約 85% の細胞で発現が確認され、その後は経時的に減少すると報告されており²⁴⁾、また小型細胞で発現の確率が高いとしている。今回われわれは培養開始後 24～72 時間の細胞を使用した。培養 48 時間の小型細胞を用いて実験を行えば、もっと高率に BK 応答が得られたかもしれない。

しかしながら、BK 応答の有無は細胞の大きさや培養時間に関係せず、DRG ニューロンが線維芽細胞に似た形態をしている satellite cell と接触していることが BK 応答に必須条件とする報告もある²⁵⁾。この報告では、周囲を satellite cell に囲まれている大型 DRG ニューロンか

らも BK 応答が得られ、孤立している DRG 細胞からは、大小にかかわらず BK 応答が確認されないとしている。しかし、この論文では $35\ \mu\text{m}$ の細胞が最小であり、それより小さい細胞では実験していないことがわれわれの実験条件と異なる点である。DRG から分離した satellite cell より BK 応答が得られることが知られており²⁶⁾、DRG 細胞独自の応答ではなく、satellite cell の応答を記録していた可能性が考えられる。

3. NA による BK 応答の増大と痛覚過敏発現の可能性

侵害受容器の感作にかかわる疼痛誘発物質のうち、BK は最も強力な発痛物質の一つであり¹⁹⁾、複数の発痛物質との相互作用により痛みが増強することが知られている²⁷⁾。また、痛覚過敏を引き起こす原因として、交感神経と発痛物質との相互作用が行動学的研究により報告されている¹⁸⁾。すなわち、Banik らはラットの皮膚の侵害受容器で BK と NA の相互作用を調べ、NA が正常および炎症の両方で BK 応答を感作させることを明らかにした¹⁸⁾。われわれは細胞レベルでの実験を行い、NA で BK 応答を増大させる結果を得た。本実験で、BK の濃度が高いほど NA による増大が明瞭であることが観察され、このことから炎症の程度が強いほど、ならびに組織損傷が激しいほど NA、すなわち交感神経作動薬の影響を受けやすく、それにより痛みの増強を引き起こすと推測される。また、BK の濃度を一定とし、NA の濃度を上げるほど、BK 応答が濃度依存性に増大した。すなわち、交感神経活動の程度に依存して痛覚過敏を引き起こす可能性があることを細胞レベルで示すものであり、本実験系が疼痛研究における有用なモデルとなることを示唆する。交感神経活動は心理的な影響を受けやすく²⁸⁾、慢性疼痛患者の治療にはこのような背景から心理的アプローチも必要だと思われる²⁹⁾。

4. 受容体の同定

NA による BK 応答増大のメカニズムを薬理的に検討した。NA は α および β 両方の作用をもっているため、それぞれの受容体作動薬を用いさらに比較検討を行った。まず初めに、痛みの増強とのかかわりについてほとんど知られていない β 作動薬について検討した。 β 作動薬であるイソプロテレノールで緩徐な外向き電流が発生したが、BK 応答の増大は起こさなかった。イソプロテレノールが DRG ニューロンで過分極を引き起こすことはすでに明らかにされており³⁰⁾、今回のわれわれの結果と一致する。したがって、NA による BK 応答の増大に、 β 受容体は関与していないことが示唆された。

ところで、三叉神経領域や末梢において、神経が損傷を受けたり強い炎症状態が引き起こされると、傷害を受けた神経断端部や DRG ニューロンに、 α_2 受容体が多数発現することが報告されている^{23,31-35)}。そこで、選択的

α_2 作動薬であるクロニジンについて検討した。DRG 細胞では、クロニジンは NA と同様に、BK 応答を増大させた。NA とクロニジンによる BK 応答の増大は、選択的 α_2 拮抗薬であるヨヒンビンにより遮断された。

以上のことから、NA による BK 応答の増大作用は、 α_2 アドレナリン受容体を介して起こることが結論された。

BK 応答は G-プロテインとのかかわりが深いことが報告されている³⁶⁾。今回得られた NA 作用の細胞内プロセスを明らかにするために、今後、NA と G-プロテインの関与を研究する必要があると考える。

V. 結 論

培養ラット DRG ニューロンを用いて、BK 応答に対する NA の効果を電気生理学的に検討し、以下の結論を得た。

1. 主として小型 DRG ニューロンに BK 感受性が認められた。
2. NA の投与により、BK 応答の増大が認められた。
3. BK 応答の増大は、クロニジンの投与でも観察され、ヨヒンビンにより増大は遮断された。イソプロテレノールでは、BK 応答の増大は観察されなかった。

以上より、NA による BK 応答の増大は、 α_2 アドレナリン受容体を介していることが示唆された。同時に、末梢におけるニューロパシックペインのメカニズムを解明するうえで、この実験系は有用な細胞モデルとなりうることを提唱できた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜りました東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科疼痛制御学分野 嶋田昌彦教授、ならびに東京医科歯科大学難治疾患研究所先端分子医学研究部門自律生理分野 片山芳文教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり多大なご助言、ご支援を賜りました本学疼痛制御学分野 鈴木長明前教授、ならびに長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生体情報科学分野 戸田一雄教授に心より深く感謝申し上げます。さらに、培養標本作製のご指導をいただきました、千葉科学大学危機管理学部環境安全システム学科 本間知夫助教授に心より深く感謝いたします。最後に、終始温かいご支援、ご協力をいただきました自律生理分野、ならびに疼痛制御学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究の要旨の一部は、第 33 回日本歯科麻酔学会学術講演会 (2005 年 10 月、鹿児島) において発表した。

文 献

- 1) 檀 健二郎, 原澤一郎: ニューロパシックペイン—新し

- い概念と治療法一. 慢性疼痛 18 : 40-49, 1999.
- 2) Honma, Y., Yamakage, M. and Ninomiya, T. : Effects of adrenergic stimulus on the activities of Ca^{2+} and K^{+} channels of dorsal root ganglion neurons in a neuropathic pain model. *Brain Res.* 832 : 195-206, 1999.
  - 3) 佐久間泰司 : 口腔領域のニューロパシクペイン. *Pain Clinic* 23 : 643-650, 2002.
  - 4) Mashu, S., Suzuki, N., Takayama, H., *et al.* : Acupuncture therapy to inferior alveolar nerve injury following placement of a dental implant. *Pain Res.* 13 : 47-52, 1998.
  - 5) 福田謙一, 金子 譲 : 幻歯痛の臨床. *Pain Clinic* 25 : 320-327, 2004.
  - 6) 砂川光宏 : 歯原性の慢性痛一特に歯内治療の観点から一. *Pain Clinic* 26 : 1066-1074, 2005.
  - 7) 森脇克行 : 痛みと交感神経遮断法. *Pain Clinic* 27 : 63-71, 2006.
  - 8) Siddall, J. P., Gray, M., Rutkowski, S. and Cousins, J. M. : Intrathecal morphine and clonidine in the management of spinal cord injury pain. *Pain* 59 : 147-148, 1994.
  - 9) Martin, J. T., Kim, A. S. and Eisenach, C. J. : Clonidine maintains intrathecal self-administration in rats following spinal nerve ligation. *Pain* 125 : 257-263, 2006.
  - 10) 宮崎東洋 : ペインクリニック一痛みの理解と臨床一. 東京, 1997, 克誠堂出版, 23-34.
  - 11) Stahl, S. M. (仙波純一訳) : 精神薬理学エッセンシャルズ一神経科学的 基礎と応用一. 東京, 1999, メディカルサイエンスインターナショナル, 135-217.
  - 12) Ren, Y., Zou, X., Fang, L. and Lin, Q. : Sympathetic modulation of activity in $A\delta$ - and C-primary nociceptive afferents after intradermal injection of capsaicin in rats. *J. Physiol.* 93 : 365-377, 2005.
  - 13) Zhou, L., Zhang, Q., Stein, C. and Schafer, M. : Contribution of opioid receptors on primary afferent versus sympathetic neurons to peripheral opioid analgesia. *J. P.E.T.* 286 : 1000-1006, 1998.
  - 14) Mizumura, K., Minagawa, M., Tsujii, Y. and Kumazawa, T. : Prostaglandin E_2 -induced sensitization of the heat response of canine visceral polymodal receptors in vitro. *Neurosci. Lett.* 161 : 117-119, 1993.
  - 15) Belanger, S., Ma, W., Chabot, J. G. and Quirion, R. : Expression of calcitonin gene-related peptide, substance P and protein kinase C in cultured dorsal root ganglion neurons following chronic exposure to mu, delta and kappa opiates. *Neuroscience* 115 : 441-453, 2002.
  - 16) Lee, Y., Takami, K., Kawai, Y., Girgis, S., Hillyard, J. C., MacIntyre, I., Emson, C. P. and Tohyama, M. : Distribution of calcitonin gene-related peptide in the rat peripheral nervous system with reference to its coexistence with substance P. *Neuroscience* 15 : 1227-1237, 1985.
  - 17) Petersen, M., Zhang, J., Zhang, M. and LaMotte, R. H. : Abnormal spontaneous activity and responses to norepinephrine in dissociated dorsal root ganglion cells after chronic nerve constriction. *Pain* 67 : 391-397, 1996.
  - 18) Banik, K. R., Sato, J., Giron, R., Yajima, H. and Mizumura, K. : Interactions of bradykinin and norepinephrine on rat cutaneous nociceptors in both normal and inflamed conditions in vitro. *Neurosci. Res.* 49 : 421-425, 2004.
  - 19) Koda, H. and Mizumura, K. : Sensitization to mechanical stimulation by inflammatory mediators and by mild burn in canine visceral nociceptors in vitro. *J. Neurophysiol.* 87 : 2043-2051, 2002.
  - 20) Burgess, M. G., Mullaney, I., McNeill, M., *et al.* : Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *J. Neurosci.* 9 : 3314-3325, 1989.
  - 21) Sugiura, T., Tominaga, M., Katsuya, H. and Mizumura, K. : Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J. Neurophysiol.* 88 : 544-548, 2002.
  - 22) Ma, C., Greenquist, K. W. and Lamotte, R. H. : Inflammatory mediators enhance the excitability of chronically compressed dorsal root ganglion neurons. *J. Neurophysiol.* 95 : 2098-2107, 2006.
  - 23) Birder, A. L. and Perl, R. E. : Expression of α_2 -adrenergic receptors in rat primary afferent neurones after peripheral nerve injury or inflammation. *J. Physiol.* 515 : 533-542, 1999.
  - 24) Banquet, G., Petersen, M. and Heppelmann, B. : Bradykinin receptors in cultured rat dorsal root ganglion cells : Influence of length of time in culture. *Neuroscience* 75 : 1211-1218, 1996.
  - 25) Heblich, F., England, S. and Docherty, J. R. : Indirect actions of bradykinin on neonatal rat dorsal root ganglion neurones : a role for non-neuronal cells as nociceptors. *J. Physiol.* 536 : 111-121, 2001.
  - 26) England, S., Heblich, F., James, F. I., Robbins, J. and Docherty, J. R. : Bradykinin evokes a Ca^{2+} -activated chloride current in non-neuronal cells isolated from neonatal rat dorsal root ganglia. *J. Physiol.* 530 : 395-403, 2001.
  - 27) Nicol, D. G. and Cui, M. : Enhancement by prostaglandin E_2 of bradykinin activation of embryonic rat sensory neurones. *J. Physiol.* 480 : 485-492, 1994.
  - 28) Osborne, L. T., Jensen, P. M., Ehde, M. D., Hanley, A. M. and Kraft, G. : Psychosocial factors associated with pain intensity, pain-related interference, and psychological functioning in persons with multiple sclerosis and pain. *Pain* 127 : 52-62, 2007.
  - 29) 川島正人, 真秀重成, 芝地貴夫, 他 : 心理的要因が大きく関与した口腔・顎・顔面痛に対する自律訓練法の応用. *日歯麻誌* 29 : 207-212, 2001.
  - 30) Pluteanu, F., Ristoiu, V., Flonta, M. and Reid, G. : α_1 -adrenoceptor-mediated depolarization and β -mediated hyperpolarization in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci. Lett.* 329 : 277-280, 2002.
  - 31) Takeda, M., Ikeda, M., Tanimoto, T., Lipski, J. and Matumoto, S. : Changes of the excitability of rat trigeminal root ganglion neurons evoked by α_2 -adrenoreceptors. *Neuroscience* 115 : 731-741, 2002.
  - 32) 岩田幸一 : 三叉神経領域に発症する慢性疼痛の神経メカニズム. *Pain Clinic* 26 : 1059-1065, 2005.
  - 33) McLachlan, M. E., Janig, W., Devor, M. and Michaelis, M. : Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature* 363 : 543-546, 1993.
  - 34) Xie, Y., Zhang, J., Petersen, M. and LaMotte, R. H. : Functional changes in dorsal root ganglion cells after

- chronic nerve constriction in the rat. J. Neurophysiol. 73 : 1811-1820, 1995.
- 35) Djouhri, L., Koutsikou, S., Fang, X., McMullan, S. and Lawson, N. S. : Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact c-fiber nociceptors. J. Neurosci. 26 : 1281-1292, 2006.
- 36) McGuirk, M. S. and Dolphin, C. A. : G-protein mediation in nociceptive signal transduction : An investigation into the excitatory action of bradykinin in a subpopulation of cultured rat sensory neurons. Neuroscience 49 : 117-128, 1992.