

氏 名	岩下 成人
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士乙第397号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成25年 9月11日
学位論文題目	Involvement of Peripheral NMDA Receptor in Melittin-Induced Thermographic Flare (サーモグラフィー法によるメリチン誘発フレアにおける末梢 NMDA 受容体の関与の検証)
審査委員	主査 教授 田中 俊宏 副査 教授 村田 喜代史 副査 教授 犬伏 俊郎

論文内容要旨

※整理番号	401	(ふりがな) 氏名	いわした なりひと 岩下 成人
学位論文題目	Involvement of Peripheral NMDA Receptor in Melittin-Induced Thermographic Flare (サーモグラフィー法によるメリチン誘発フレアにおける末梢 NMDA 受容体の関与の検証)		
目的	<p>一次求心性線維の末梢終末に存在する侵害受容器は、生体の恒常性を乱す侵害刺激により興奮する。侵害刺激によって生じた活動電位は中枢神経系へ伝わって痛みとして認識されると同時に、軸索反射や脊髄後根反射によって神経軸索を逆行性に伝わり、末梢終末からも神経伝達物質が放出される。末梢終末から放出される神経ペプチドには血管拡張作用があり、それによって生じる神経原性炎症は痛みを増強する末梢性機序の一つと考えられている。ハチ毒の活性主成分であるメリチンをヒト前腕に皮下投与すると強い痛みを誘発し、末梢局所にフレア（発赤）が生じる。サーモグラフィー法によるフレアに伴われる皮膚温変化の解析では、フレアの発生機序に神経原性炎症が関与することが示唆されている。</p> <p>一次求心性線維の脊髄内終末から放出されるグルタミン酸は痛みを増強する中枢性機序のカギとなる物質であるが、末梢終末から放出されるグルタミン酸が神経原性炎症に関与しているかは検証されていない。近年侵害受容器にグルタミン酸受容体が発現していることや、侵害刺激によって末梢終末からグルタミン酸が放出されることが報告され、グルタミン酸は末梢でも痛みの増強に関与する可能性が注目され始めた。</p> <p>本研究の目的は、末梢終末から放出されるグルタミン酸、およびグルタミン酸受容体のサブタイプである NMDA 受容体はメリチンによって誘発される神経原性炎症の発生に寄与するかを明らかにすることである。</p>		
方法	<p>本研究はペントバルビタール麻酔下の SD 系オスラット (250-400g) を対象として行った。室温 23-28℃の環境下で、生理的な体温（直腸温：37.0±1.0℃）を維持して実験した。神経原性炎症に伴われる皮膚温変化の評価はサーモグラフィー法で解析した。50μl の PBS に溶解した薬剤（メリチン、NMDA、MK-801）の足底への皮下投与前後の皮膚温を経時的に測定し、足底全体の皮膚温の平均値は専用ソフトを用いて計測した。薬剤投与前の平均値を基準値とし、薬剤投与後との温度変化を比較した。</p> <p>足底皮下組織内のグルタミン酸濃度の測定は HPLC を組み合わせたマイクロダイアリシス法で行った。メリチン投与後 10 分間毎に灌流液を回収し、投与前の基準値からの変化率を評価した。</p>		

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

結果

ラット足底に $50\mu\text{g}$ のメリチンを皮下投与すると、1分から3分後に投与部位周囲にフレアが認められた。投与側の皮膚温は10分後にピークに達し、その後次第に低下して、60分後にはほぼ投与前のレベルに戻った。投与前の平均皮膚温は投与側で $27.7\pm 0.53^\circ\text{C}$ 、反対側で $27.6\pm 0.66^\circ\text{C}$ で、10分後には投与側が $32.0\pm 0.65^\circ\text{C}$ に達し、反対側 ($27.8\pm 0.60^\circ\text{C}$) と比べて有意に上昇した。また、投与側の皮膚温および経時的変化は、メリチンの濃度依存的に上昇して有意差を認めた。

マイクロダイアリース法を用いた足底皮下のグルタミン酸濃度の基準値は $10.5\pm 0.3\mu\text{M}$ であり、先行研究の結果と同様であった。メリチン ($50\mu\text{g}$) 皮下投与後10分間のグルタミン酸濃度は $200.0\pm 22.2\%$ 上昇し、基準値と有意差を認めた。

メリチン皮下投与によって放出されるグルタミン酸が侵害受容器の NMDA 受容体に作用して神経原性炎症を引き起こすかを検証するために NMDA を皮下投与すると、10mM の NMDA 皮下投与後に有意な皮膚温上昇が認められた。 さらに NMDA 受容体の非競合的拮抗薬である MK-801 をメリチンと共投与するとメリチンによる温度上昇が抑制され、1000 μM の MK-801 では投与後3分から20分間で有意な抑制効果を認めた。

考察

メリチンはカプサイシン感受性 C 線維を選択的に活性化し、カプサイシン受容体である TRPV1 受容体を介して侵害受容器の興奮を起こすことが示されている。カプサイシンあるいはホルマリンの皮下投与や侵害性熱刺激で C 線維を活性化すると末梢神経終末でグルタミン酸が放出されることや、坐骨神経に電気刺激を加えるとその末梢終末部位でグルタミン酸濃度が上昇することが示されている。したがって、本研究の結果は、メリチンによって生じた活動電位がカプサイシン感受性 C 線維を逆行性に伝わり、末梢終末からグルタミン酸が放出されたものと考えられた。

腓腹神経や足底神経の軸索終末には高頻度に NMDA 受容体が発現しており、グルタミン酸は C 線維終末上 NMDA 受容体を興奮させると考えられた。本実験においても NMDA 受容体のアゴニストを投与すると皮膚温の上昇を認め、さらにメリチンによる皮膚温上昇が NMDA 受容体アンタゴニストによって抑制されたことから、メリチン投与によって誘発されるサーモグラフィックフレアには、末梢の NMDA 受容体が関与することが示唆された。

結論

メリチンによって引き起こされるサーモグラフィックフレアは、末梢に放出されたグルタミン酸が NMDA 受容体を活性化することによって増幅されたことが示唆された。 NMDA 受容体拮抗薬の局所投与は、神経原性炎症性疼痛に対する新たな治療薬になりうることを提案する。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	401	氏名	岩下 成人
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>本研究は、痛みの刺激による局所のフレア発症機序について解析したものである。</p> <p>実験小動物局所(足蹠)に、痛み物質であるメリチンを局注すると、サーモグラフィ法で検出可能な有意な温度上昇が生じる実験系を確立し、その実験系を用いて、メリチン皮下投与後の灌流液内グルタミン酸濃度が上昇する事、NMDAを投与する事により温度上昇が再現される事、NMDA受容体拮抗剤であるMK-801を同時投与する事でNMDA投与の効果が打ち消される事、を明らかにした。足蹠灌流液からのグルタミン酸の濃度は、HPLCを用いて行った。</p> <p>本論文は、メリチンによって引き起こされる局所の発赤の機序とは、末梢に放出されたグルタミン酸がNMDA受容体を活性化する事によって増幅された事を示唆する論文であり、かつ、臨床的にもNMDA受容体拮抗薬の局所投与は、神経原性炎症性疼痛に対する新たな治療薬となりうる可能性を示唆したものである。</p> <p>よって、本論文は、神経原性炎症の発赤を生じる作用機序について新しい知見を加えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものとして認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 493 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 25 年 9 月 2 日)</p>			