



Title	一次知覚神経終末における痛みの受容に対する一酸化窒素の作用
Author(s)	山田, 隆史
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41522
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	やま だ たか し 山 田 隆 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 5 5 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学 位 論 文 名	「一次知覚神経終末における痛みの受容に対する一酸化窒素の作用」
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 野首 孝祠 (副査) 教 授 松浦 英夫 助教授 脇坂 聡 講 師 竹村 元秀

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

組織に傷害を与えるような強い刺激は、一次知覚神経の自由神経終末で受容されて興奮を引き起こし、二次知覚神経、三次知覚神経を経て大脳皮質まで伝達され、痛みとして認知される。炎症部位では、ヒスタミンやプロスタグランジン (PG) などのケミカルメディエーターが産生され、炎症反応やそれに伴う痛みと深く関係していることが知られている。一方、一酸化窒素 (NO) は、内因性の血管平滑筋弛緩因子として発見されたが、近年、循環系や免疫系、神経系の調節にも関与していることが示されている。

本研究は、培養一次知覚神経細胞および実験動物を用い、発痛物質であるブラジキニン (BK) による一次知覚神経の刺激に対する NO と PGE_2 の作用について調べ、痛みの受容におけるこれらの物質の調節作用について検討した。

【研究方法】

1. 三叉神経節細胞の培養

体重200-250gの雄性モルモットより三叉神経節を摘出後、コラゲナーゼおよびトリプシンを用いて酵素処理を行い、三叉神経節細胞を採取し、ポリ-D-リジンでコーティングしてシリコンチャンバーを装着したカバーガラス上で培養を行った。培地は、牛胎児血清 (10%) および 7S-nerve growth factor (50ng/ml) を含む DMEM を用い、神経細胞以外の細胞の増殖を抑制するために cytosine arabinoside (100 μM) を添加した。

2. 細胞内カルシウムイオンの経時的变化の測定

本培養細胞にカルシウムイオン感受性蛍光色素の Fura-2/AM を取り込ませたのち、倒立顕微鏡ステージ上で Krebs-Ringer-bicarbonate 液により灌流を行った。ARGUS-50/CA システム (浜松フォトニクス) を用い、2波長励起1波長蛍光測定 (EX:340nm, 380nm, Em:510nm) による ratio imaging 法にて単一細胞の細胞内カルシウム濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の経時的变化を計測した。

3. 鎮痛試験

体重25-30gの ddy 系雄性マウスに各薬物を投与後、カオリン (250mg/kg) を腹腔内投与し、その直後から30分間に起こる苦悶反応 (writhing 反応) の回数を測定した。

4. NO の測定

体重25-30gの ddy 系雄性マウスにリポポリサッカライド (LPS) あるいは生理的食塩水を腹腔内投与し、3時間後

に腹腔滲出マクロファージを採取して24ウェルのプレートに播種し、24時間培養後培養上清中の亜硝酸イオンを Griess 法により測定した。

【結果および考察】

1. 初代培養三叉神経節細胞において、 PGE_2 は単独では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に影響を示さなかったが、BK 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対して濃度依存的に著明な増強作用を示した。 PGE 受容体サブタイプの EP1, EP2, EP3 のそれぞれの選択的アゴニストである 17-phenyl-trinor PGE_2 , butaprost および AP-324 は、各々単独では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に影響を示さなかったが、BK 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対して増強作用を示した。17-phenyl-trinor- PGE_2 は、3 種の受容体サブタイプのアゴニストの中で最も大きな増強作用を示した。これらの結果より、本培養細胞には EP1, EP2, EP3 受容体が存在し、BK の B2 受容体を介する知覚神経の興奮に対して増強作用を有することが示された。

2. NO 発生剤である 3-morpholinosydnonimine (SIN-1, 200 μM) と N-ethyl-2-(1-ethyl-2-hydroxy-2-nitrosohydrazino)-ethanamine (NOC12, 200 μM) は、単独では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度に影響を示さなかったが、BK による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇に対して増強作用を示した。NOC12 の増強作用は、superoxide dismutase (100U/ml) により影響を受けなかったが、NO ラジカルの選択的消去剤である 2-(4-carboxyphenyl)-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide (200 μM) とグアニル酸シクラーゼの選択的阻害剤の ODQ (10 μM) により阻害された。生体内で、NO と活性酸素との反応により産生されると考えられるヒドロキシラジカルは、BK による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇に影響しなかった。また、8-bromo-cyclic GMP (100 μM) は、BK による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇に対して増強作用を示した。さらに、 Ca^{2+} 非存在下では SIM-1 は BK による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇に対して増強作用を示さなかった。ヒスタミンおよびムスカリン受容体アゴニストのカルバコールによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対して、NOC12 は影響を及ぼさなかった。これらの結果より、NO は cyclic GMP の産生を介して Ca^{2+} の細胞内への流入を促進させることにより、BK 受容体を介した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を増強することが考えられた。

3. カオリンの腹腔内投与により誘発された苦悶反応は、BK の B2 受容体アンタゴニストの前投与により有意に抑制された。 PGE_2 を30分前に前投与すると、カオリンによる苦悶反応の回数は増加した。NOC12 の前投与により、カオリンによる苦悶反応の回数は増加傾向を示した。LPS を投与し腹腔より採取したマクロファージは、LPS の用量に依存して NO を産生した。また、この NO 産生は、iNOS 阻害剤の前投与により抑制された。カオリン投与の24時間前に、*LPS 投与を行うことにより苦悶反応の回数の増加がみられたが、この作用は誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 阻害剤の前投与により拮抗された。これらのことより、LPS による苦悶反応の増強は NO を介したものであることが示唆された。

【結論】

一次知覚神経終末において、一酸化窒素はプロスタグランジン E_2 と同様に、ブラジキニンにより誘発される痛み刺激に対して増強作用を有することが明らかとなり、生体内において一酸化窒素が発痛助物質として機能していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、培養一次知覚神経細胞および実験動物を用い、ブラジキニン (BK) による一次知覚神経の刺激に対する一酸化窒素 (NO) とプロスタグランジン E_2 (PGE_2) の作用について検討したものである。

その結果、一次知覚神経終末において、NO は PGE_2 と同様に BK により誘発された痛み刺激に対して増強作用を有することが明らかになった。

本研究は、一次知覚神経終末における痛みの受容機構を解明する上で極めて重要な示唆を与えるものであり、博士 (歯学) の学位請求に値するものと認める。