

ケタミンの緩和ケア領域における使用動向調査
及びその有用性に関する薬理学的研究

平成 25 年度

北海道医療大学大学院薬学研究科

神山 秀一

Abstract

Introduction: Ketamine, a noncompetitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, has been used for the treatment of cancer pain as an analgesic adjuvant to opioids. Ketamine is known to produce psychotomimetic side effects including cognitive impairments under a high-dose situation, presumably due to cortical hypofunction. The present study aimed to clarify the therapeutic potentials of ketamine as an analgesic adjuvant for pain control, by the behavioral and electrophysiological studies in rats, and the clinical survey in patients with cancer.

Result: (1) Retrospective surveys on cancer patients of Palliative Care Team (PCT) in Sapporo City General Hospital (2006 and 2010-2012) demonstrated that daily dose and duration of ketamine became lower and shorter year by year, with maintenance of pain control.

(2) Neural mechanisms of the psychotomimetic effects of ketamine were evaluated by frontocortical function assessed by behavioral responses as a measure of prepulse inhibition (PPI) and synaptic transmission in the hippocampus-medial prefrontal cortex (mPFC) pathway. Subanesthetic doses of ketamine (5, and 25 mg/kg, i.p.) impaired PPI and depressed synaptic responses in the mPFC. Ketamine-induced synaptic depression was significantly attenuated by 6-hydroxydopamine, SCH23390 or bicuculline, suggesting the possible involvement of dopaminergic modulation mediated via D₁ receptors, which may lead to a net augmentation of synaptic inhibition mediated via GABA_A receptors. On the other hand, ketamine (1 mg/kg, i.p.) did not affect PPI and hippocampus-mPFC synaptic transmission.

(3) Therapeutic potentials of ketamine as an analgesic adjuvant to morphine for pain control were evaluated, focusing on frontocortical function. Coadministration of ketamine (1 mg/kg, i.p.) as a subanalgesic dose significantly enhanced morphine (1 mg/kg, i.p.)-induced antinociceptive activity, shown by the increased reaction latency in the hot plate test. In addition, the noxious thermal stimulus-induced c-Fos expression in the ventrolateral periaqueductal gray matter, a critical brain region for antinociceptive effects of opioids, was significantly suppressed by concomitant ketamine and morphine, without affecting PPI and synaptic transmission in the mPFC.

Conclusion: The present results indicate that the morphine-induced analgesic effect is enhanced by a concomitant subanalgesic dose of ketamine without affecting cortical function. These findings possibly support the clinical notion that low-dose ketamine as an analgesic adjuvant has therapeutic potentials to reduce opioid dosage, thereby improving the quality of life in patients with cancer pain.

略 語 集

aCSF: artificial cerebrospinal fluid

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

ANOVA: analysis of variance

AUC: area under the curve

CA1: ventral hippocampus CA1 subicular

DA: dopamine

DLPAG: dorsolateral periaqueductal gray

DMPAG: dorsomedial periaqueductal gray

DOPAC: dihydroxyphenylacetic acid

EPSP: excitatory postsynaptic potential

GABA: γ -aminobutyric acid

HVA: homovanillic acid

i.c.v.: intracerebroventricular injection

i.p.: intraperitoneal injection

IPSC: inhibitory postsynaptic potential

LPAG: lateral periaqueductal gray

LTP: long-term potentiation

MK801: $[+]$ -5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo-[a,d]-cyclohepten-5,10-iminehydrogen maleate

mPFC: medial prefrontal cortex

NMDA: N-methyl-D-aspartate

NSAIDs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs

PAG: periaqueductal gray

PB: phosphate buffer

PBST: phosphate buffered saline containing Triton-X 100

PCP: phencyclidine

PCT: palliative care team

PKA: protein kinase A

PKC: protein kinase C

PPI: prepulse inhibition

PSA: population spike amplitudes

QOL: quality of life

RVM: rostral ventromedial medulla

STAS-J: The Japanese version of the support team assessment schedule

VLPAG: ventrolateral periaqueductal gray

VTA: ventral tegmental area

WHO: World Health Organization

5-HIAA: 5-hydroxyindole acetic acid

5-HT: 5-hydroxytryptamine

6-OHDA: 6-hydroxydopamine

目次

序論	1
本論	5
第1章 ケタミンの鎮痛補助薬としての使用動向調査 ：市立札幌病院緩和ケアチームのがん性痛マネジメントの変遷	5
第1節 目的	5
第2節 方法	5
第1項 調査方法	5
第2項 統計処理	7
第3節 結果	7
1) 患者背景	7
2) ケタミンの投与量・投与期間	8
3) オピオイドの投与量，使用製剤の内訳	11
第4節 考察	13
第2章 ラット皮質機能に対するケタミンの影響	16
第1節 聴性驚愕反応試験を用いた行動学的検討：PPIに対する影響	16
第1項 目的	16
第2項 方法	16
1) 実験動物	16
2) 使用薬物	17
3) 聴性驚愕反応試験	17
4) 統計処理	20
第3項 結果	
1) PPIに対する影響	20
第4項 考察	21
第2節 覚醒下における電気生理学的検討 ：mPFC シナプス伝達に対する影響	22
第1項 目的	22
第2項 方法	23
1) 実験動物	23
2) 使用薬物ならびに実験プロトコール	23
3) 覚醒下における電気生理学的的方法	23
a) 慢性電極埋め込み	23
b) 誘発集合電位測定	25
c) Paired pulse 応答	25
4) 統計処理	26

第3項	結果	27
1)	誘発集合電位に対する影響	27
2)	Paired pulse 応答に対する影響	28
第4項	考察	29
第3節	麻酔下における電気生理学的検討	
	: mPFC シナプス伝達に対する影響	30
第1項	目的	30
第2項	方法	31
1)	実験動物	31
2)	使用薬物ならびに実験プロトコール	31
3)	麻酔下における電気生理学的方法	31
a)	皮質前頭前野誘発集合電位測定	31
b)	中脳水道中心灰白質における自発発火の測定	32
4)	統計処理	32
第3項	結果	33
1)	PAG の侵害刺激応答に対するケタミンの影響	33
2)	mPFC の誘発集合電位に対するケタミンの影響	34
3)	mPFC の長期増強形成に対するケタミンの影響	35
4)	mPFC の誘発集合電位に対する MK801 の影響	36
第4項	考察	37
第4節	ケタミンの mPFC シナプス伝達抑制に関する神経薬理学的検討	39
第1項	目的	39
第2項	方法	40
1)	使用動物	40
2)	使用薬物ならびに実験プロトコール	40
3)	6-OHDA 前処置	40
4)	電気生理学的ならびに神経薬理学的手法	41
5)	脳内微小灌流法を用いた mPFC 細胞外液中ドパミン濃度測定	42
6)	統計処理	43
第3項	結果	44
1)	ケタミンのシナプス応答に及ぼす GABA _A 受容体拮抗薬の影響	44
2)	6-OHDA 前処置ラットにおけるケタミンのシナプス応答	45
3)	ケタミンのシナプス応答に及ぼす ドパミン D ₁ ならびに D ₂ 受容体拮抗薬の影響	46
4)	ケタミンによる mPFC 細胞外液中のドパミン濃度変化	48
第4項	考察	49

第3章	ラット侵害刺激応答及び皮質機能に対する	
	ケタミン及びモルヒネ併用投与の影響	53
第1節	侵害刺激応答に対する影響	53
第1項	目的	53
第2項	方法	54
1)	実験動物	54
2)	使用薬物	54
3)	行動学的方法（熱板法）	54
4)	免疫組織学的染色	54
5)	c-Fos 陽性細胞の定量解析	55
6)	統計処理	55
第3項	結果	56
1)	足蹠熱性刺激に対する行動応答に対する	
	ケタミン及びモルヒネ併用投与の影響	56
2)	足蹠熱性刺激に対する PAG での c-Fos 発現	58
3)	熱性刺激誘発 c-Fos 発現に対する	
	ケタミン及びモルヒネ併用投与の影響	59
第4項	考察	60
第2節	皮質機能に対する影響	62
第1項	目的	62
第2項	方法	62
1)	実験動物	62
2)	使用薬物	62
3)	聴性驚愕反応試験	62
4)	電気生理学的方法（麻醉下）	62
5)	統計処理	63
第3項	結果	64
1)	PPI に対するケタミン及びモルヒネ併用投与の影響	64
2)	mPFC シナプス伝達に対する	
	ケタミン及びモルヒネ併用投与の影響	65
第4項	考察	66
総括		68
謝辞		70
引用文献		71

学位論文の基礎となる報文

Kamiyama H., Matsumoto M., Otani S., Kimura SI., Shimamura KI., Ishikawa S., Yanagawa Y., Togashi H., Mechanisms underlying ketamine-induced synaptic depression in rat hippocampus-medial prefrontal cortex pathway. *J. Neurosci.*, **177**, 159-169 (2011).

Shikanai H., Hiraide S., Kamiyama H., Kiya T., Oda K., Goto Y., Yanagawa Y., Shimamura KI., Goda Y., Togashi H., Subanalgesic ketamine enhances morphine-induced antinociceptive activity without cortical dysfunction in rats, *J. Anesth.*, [Epub ahead of print] (2013)

Inoue S., Kamiyama H., Matsumoto M., Yanagawa Y., Hiraide S., Saito Y., Shimamura K., Togashi H., Synaptic modulation via basolateral amygdala on the rat hippocampus-medial prefrontal cortex pathway in fear extinction, *J. Pharmacol Sci.*, **123**, 267-278 (2013)

序 論

がん性痛の緩和は、積極的がん治療の時期においても終末期においても、患者の生活の質（quality of life : QOL）向上のために不可欠である。世界保健機構（World Health Organization : WHO）は、がん性痛治療の成績向上を目指して作成した「WHO 方式がん疼痛治療法」を普及するために、「がんの痛みからの解放」の第 1 版を 1986 年に、そして第 2 版を 1996 年に出版している。現在では、世界各国で「WHO 方式がん疼痛治療法」に準拠したがん性痛治療が施行されている。

がん性痛は侵害受容性痛や神経障害性痛が複合していることが多く、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）やオピオイドだけでは十分に緩和できないケースが多々ある。こうした難治性の痛みに対しては鎮痛補助薬の併用が考慮される。鎮痛補助薬には抗うつ薬、抗てんかん薬、抗不整脈薬、抗不安薬、N-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体拮抗薬、ステロイド薬など、様々な薬剤がある（Table 1）。²⁾

Table 1. Analgesic Adjuvant Used in Palliative Care

Classification	Drug (generic name)
antidepressant	amitriptyline, amoxapine, nortriptyline, paroxetine, fluvoxamine
anticonvulsant	carbamazepine, valproic acid, phenytoin, gabapentine, pregabalin, clonazepam
anti-arrhythmic	mexiletine, lidocaine
NMDA receptor antagonist	ketamine
central muscle relaxant	baclofen
steroid	betamethasone, dexamethasone
benzodiazepine anxiolytic	diazepam
bisphosphonate	pamidronic acid, zoledronic acid
other	octreotide, butylscopolamine bromide

ケタミン (ketamine) は、非選択的 NMDA 受容体拮抗作用を持つフェンシクリジン (phencyclidine : PCP) 誘導体の静脈麻酔薬であり、*S*(+)と *R*(-)の光学異性体を有する (Fig. 1) . 脳波上、大脳皮質が徐波化するのに対して大脳辺縁系が覚醒波を示すことから、解離性麻酔薬と言われている。一方で、鎮痛効果を有することも知られており、近年、緩和ケア領域においては、鎮痛補助薬として重要な薬剤の一つに位置づけられている。すなわち、ケタミンをオピオイドに併用することで、神経障害性痛などのオピオイド抵抗性の難治性がん性痛の緩和や、オピオイド鎮痛耐性拮抗作用によるオピオイドの減量が可能と言われている。¹⁻³⁾ 特に、オピオイド単独では十分な鎮痛効果を得られないことが多い神経障害性痛は、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の遊離による NMDA 受容体の活性化が関与していることから、ケタミンの NMDA 受容体拮抗作用がその鎮痛効果に関与していることが推測されている。

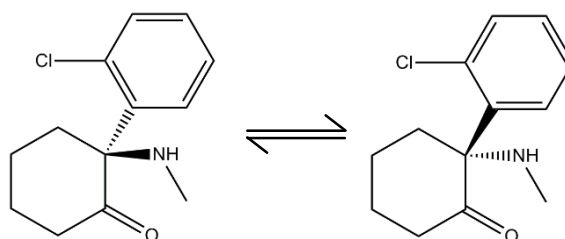


Fig. 1. Chemical Structure of Ketamine

Left, *R*(-)-ketamine. Right, *S*(+)-ketamine.

Ketamine, which is sold as a therapeutic drug ketamine hydrochloride, includes two optical isomers at the same level.

最近の基礎的研究では、下行性痛覚抑制系の最高位に位置する中脳水道中心灰白質 (periaqueductal gray : PAG) においてオピオイド μ 受容体 (μ opioid receptor) と NMDA 受容体の相互調節機能が報告されている。^{4, 5)} しかし、オピオイドとケタミン併用時の鎮痛増強効果に関する基礎的研究報告は少なく、その詳細な機序については不明の点が多い。また臨床報告も必ずしも多くはなく、投与量を含む投与方法はいまだ確立していないのが現状である。

ケタミンは動物実験では過活動 (hyperlocomotion)、認知機能障害あるいは社会性 (social interaction) の欠如などが報告されている。^{6, 7)} 臨床的にも、傾眠・ふらつき・めまいや、悪夢・幻覚といった中枢性の副作用を有すること

が知られており、さらには統合失調症様症状を呈することも報告されていることから、^{8,9)} 副作用リスクを軽減することは、鎮痛補助薬としてケタミンを使用するに際しての重要な課題である。

統合失調症の発症には生物学的あるいは社会心理学的な環境因子、脳機能・神経発達障害などさまざまな要因が複雑に関わっている。統合失調症の症状は、陽性症状（幻覚、幻聴、自我障害等）、陰性症状（感情鈍麻、自発性欠乏、思考弛緩、自閉等）に大別される。さらに、注意機能、記憶機能、ワーキングメモリー、遂行機能といった情報処理機能の障害などの認知機能障害を併発することが知られている。¹⁰⁻¹²⁾ 治療の中心は薬物療法であり、陽性症状の改善にはドパミン (dopamine: DA) D₂ 受容体拮抗薬である定型抗精神病薬、陰性症状および認知機能障害の改善にはドパミン D₂ 受容体ならびにセロトニン (5-hydroxytryptamine: 5-HT) 5-HT₂ 受容体拮抗作用を合わせ持つ非定型抗精神病薬が用いられ、¹¹⁾ 最近では 5-HT_{2A} 受容体拮抗作用を有するドパミン受容体部分作動薬も使用されている。言い換えれば、統合失調症の背景には、ドパミンあるいはセロトニン神経系を中心とした脳内神経伝達物質による伝達異常があると考えられる。しかし、これらの既存の治療薬が無効な例も知られており、他の神経系の関与を視野に多くの治療薬が開発の途にある。¹³⁻¹⁵⁾

例えば、統合失調症における認知機能障害には、ドパミン神経機能異常仮説に加え皮質前頭前野の NMDA 型グルタミン酸受容体の機能低下が関わっていると考えられている。^{16, 17)} これは統合失調症患者でグルタミン酸代謝が変化していること^{18, 19)} や、統合失調症患者死後脳では NMDA 受容体や α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体が減少していること^{10, 20)} などの生化学的臨床研究によって支持される。また、NMDA 受容体拮抗薬であるフェンシクリジンは統合失調症患者の症状を悪化させることや、健常人において統合失調症様症状を示すことが知られている。^{15, 21-24)} げっ歯類においても、フェンシクリジンや[+]-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo-[a,d]-cyclohepten-5,10-iminehydrogen maleate (MK801) などの NMDA 受容体拮抗薬の投与は、統合失調症に類似した異常行動や認知機能障害を引き起こすことから、統合失調症の病態モデルとして用いられてきた。²⁵⁻²⁸⁾

脳画像診断により、統合失調症の病態には、海馬、側坐核、前頭葉などの皮

質一辺縁系が関わっていることが知られている，ラットでは，前頭葉のうち皮質内側前頭前野（medial prefrontal cortex: mPFC）が作業記憶を含む認知機能に重要な役割を担っていると考えられている．mPFCには腹側海馬 CA1 領域（ventral hippocampus CA1 subicular: CA1）から直接グルタミン酸神経が投射しており，²⁹⁾ この海馬－皮質神経回路のシナプス可塑性を含むシナプス伝達は，抗うつ薬長期投与³⁰⁾ や統合失調症治療薬²²⁾ によって影響を受ける．最近，海馬での長期増強（long-term potentiation: LTP）現象は短期記憶に関係するのに対して，mPFCでの長期増強は消去記憶の電気生理学的基盤を示す現象であることが報告されている．³¹⁻³³⁾ mPFCのシナプス伝達はNMDA受容体依存的な可塑的变化を示し，中脳腹側被蓋野（ventral tegmental area: VTA）から投射しているドパミン神経によって調節されていると考えられている．こうした背景から，ケタミンの副作用発生には，海馬－mPFC神経回路のシナプス応答への影響が関与していることが推測される．しかし，ケタミン自身が麻酔作用を有することもあり，シナプス伝達調節機構からその副作用発生機序を追究した実験的研究は皆無である．

本研究は，がん性痛治療における鎮痛補助薬としてのケタミンの有用性を明らかにすることを目的とした．第1章では，がん性痛マネジメントの変遷という視点から，市立札幌病院緩和ケアチームにおけるケタミンの使用動向を後方視的に調査した．第2章では，ケタミンの統合失調症様副作用に関わる脳内機構を明らかにするために，ラット皮質前頭前野シナプス伝達機能に及ぼすケタミンの影響を検討した．第3章では，第2章の結果を踏まえ，鎮痛補助薬としてのケタミンの有用性を薬理的に検証するために，がん性痛治療の中心の一つであるモルヒネとの併用投与による鎮痛効果と副作用という視点から，PAGを中心とした下行性痛覚制御機構及び皮質機能に対するケタミンとモルヒネ併用投与の影響を追究した．

本 論

第 1 章 ケタミンの鎮痛補助薬としての使用動向調査

：市立札幌病院緩和ケアチームのがん性痛マネジメントの変遷

第 1 節 目的

鎮痛補助薬はがん性痛治療において必要不可欠である。その中でケタミンは NMDA 受容体拮抗薬として重要な薬剤の一つに位置づけられており、オピオイドに併用することで、オピオイド抵抗性の難治性がん性痛の緩和や、オピオイド鎮痛耐性拮抗作用によるオピオイドの減量を可能にしている。市立札幌病院緩和ケアチームでは、こうしたケタミンの鎮痛補助効果を期待して、オピオイドにケタミンを併用した持続注射を積極的に施行し、鎮痛成績を向上させている。しかし、こうしたケタミンの有効性を示す報告は必ずしも多くはなく、投与方法もいまだ確立していない。一方、ケタミンは傾眠・ふらつき・めまいなどの他、悪夢・幻覚といった中枢性の副作用を有することが知られているため、副作用リスクの低い投与方法の構築が求められる。近年、本邦においてトラマドール内服製剤やオキシコドン塩酸塩水和物注射液などのオピオイド製剤や、ガバペンチンやプレガバリンなど鎮痛補助薬として推奨される薬剤が新たに登場し、がん性痛に対する薬物治療の選択肢が増えてきている。そこで今回、市立札幌病院緩和ケアチームの症例からケタミン及びオピオイド製剤の使用動向を後方視的に調査し、がん性痛マネジメントの変遷という視点から鎮痛補助薬としての有用性を持ったケタミンの使用動向について検討を行った。

第 2 節 方法

第 1 項 調査方法

対象症例は 2010 年 1 月～2012 年 12 月に市立札幌病院にて他の診療科から緩和ケアチームに紹介され、オピオイドによるがん性痛治療の過程でケタミンを併用した患者のうち死亡時まで介入した患者とし、さらに以前同様の条件で調査を行った 2006 年 4 月～2007 年 3 月の症例も加えた 103 症例とした。対象患者の抽出、患者背景（年齢、性別、原疾患）の調査は市立札幌病院緩和ケア

チームで作成している緩和ケア台帳を用いて行い、ケタミン及びオピオイドの1日投与量・投与期間及びケタミンによる副作用が疑われる診察記事記載の有無に関する調査は診療録を用いて行った。本調査ではケタミン及びオピオイドの1日投与量は維持量のみとし、突出痛に対して使用されるレスキュードーズの使用調査は行わなかった。比較検討は2006年4月～2007年3月（以下、06年群）、2010年1月～12月（以下、10年群）、2011年1月～12月（以下、11年群）、2012年1月～12月（以下、12年群）の4群に分けて行った。オピオイドは、市立札幌病院で臨床的に用いている用量換算（Table 2）に従って全てモルヒネ経口投与量に換算した。今回の対象症例は全て、痛みがThe Japanese Version of the Support Team Assessment Schedule 第3版症状版³⁴⁾(STAS-J)スコア0～2の範囲でコントロールされるように鎮痛薬の調整が行われている（Table 3）。

本研究は市立札幌病院倫理委員会承認の下に行った。

Table 2. Conversion Ratio to Oral Morphine

Morphine			Oxycodone		Fentanyl
oral	intravenous or subcutaneous	epidural	oral	intravenous or subcutaneous	intravenous or transdermal
1	1/2	1/20	2/3	1/2	1/100

Table 3. Pain Score of the Japanese Version of the Support Team Assessment Schedule (Ver. 3)³⁴⁾

<p>0: なし</p> <p>1: 時折の、または断続的な単一の痛みで、患者が今以上の治療を必要としない痛みである。</p> <p>2: 中程度の痛み。時に調子の悪い日もある。痛みのため、病状からみると可能なはずの日常生活動作に支障をきたす。</p> <p>3: しばしばひどい痛みがある。痛みによって日常生活動作や物事への集中力に著しく支障をきたす。</p> <p>4: 持続的な耐えられない激しい痛み。他のことを考えることができない。</p>
--

第2項 統計処理

統計学的処理は全て IBM SPSS Statistics (Version21.0) で行った。対象症例について、年齢は一元配置分散分析 (one-factor analysis of variance: one-factor ANOVA) を、原疾患は χ^2 検定を用いて解析し、危険率 5%未満 ($p < 0.05$) をもって統計学的に有意とした。ケタミン及びオピオイドの投与量は Mann-Whitney の U 検定を用い、有意水準は Bonnferroni の補正を行い $p < 0.0083$ (5%/6) とした。

第3節 結果

1) 患者背景

患者背景の概要は Table 4 に示す。対象症例は 06 年群, 10 年群, 11 年群, 12 年群でそれぞれ 34 例, 13 例, 20 例, 36 例であり, その平均年齢に有意な差は認められなかった。原疾患は, 消化器がんが最も多く, 肺がん・泌尿器がんがそれに続いており, 各群間の分布に有意な差は認められなかった。

Table 4. Patient Background

group	'06	'10	'11	'12
number of cases (male / female)	34 (19 / 15)	13 (6 / 7)	20 (10 / 10)	36 (25 / 11)
age (mean \pm SD) (min-max)	67.3 \pm 11.6 (35 - 89)	57.5 \pm 11.4 (39 - 76)	65.2 \pm 8.8 (53 - 86)	66.1 \pm 9.9 (43 - 85)
origin of the cancer				
lung	3	3	5	4
digestive organ	20	4	8	20
urinary organ	5	1	2	7
gynecological	1	2	2	2
breast	2			1
head and neck	3		1	1
blood		2	2	1
primary unknown		1		

2) ケタミンの投与量・投与期間

ケタミンの1日投与量は開始時から次第に増加し、最大投与量に到達後、死亡するまでに減少する傾向がみられた。開始時の1日投与量の中央値は06年群：100 mg/日、10年群：50 mg/日、11年群及び12年群：30 mg/日であった (Fig. 2)。市立札幌病院緩和ケアチームでは2011年以降、①初日は30 mg/日、②翌日は副作用が認められなければ50 mg/日に増量、③それ以降、患者の症状に合わせて用量調節を行うといった方法をとっており、それを反映する結果となった。また、投与量ごとの患者の分布割合でみると、開始量は06年群では67.6%の患者が100 mg/日以上だったが、10年群では69.2%が50 mg/日以下、11年群及び12年群では70%以上が30 mg/日以下であり、経年的な減少がみられた (Fig. 3)。

最大投与量の中央値は06年群：100 mg/日、10年群：100 mg/日、11年群：75 mg/日、12年群：50 mg/日であり、死亡直前の投与量の中央値は06年群：100 mg/日、10年群：100 mg/日、11年群：50 mg/日、12年群：50 mg/日であった。最大投与量、死亡直前の投与量共に10年群と11年群を境に減少がみられ、10年群と12年群の間には有意な差が認められた (Fig. 2)。投与量ごとの患者の分布割合でみると、11年群及び12年群では50%以上が50 mg/日以下で痛みのコントロールが可能だった (Fig. 3)。

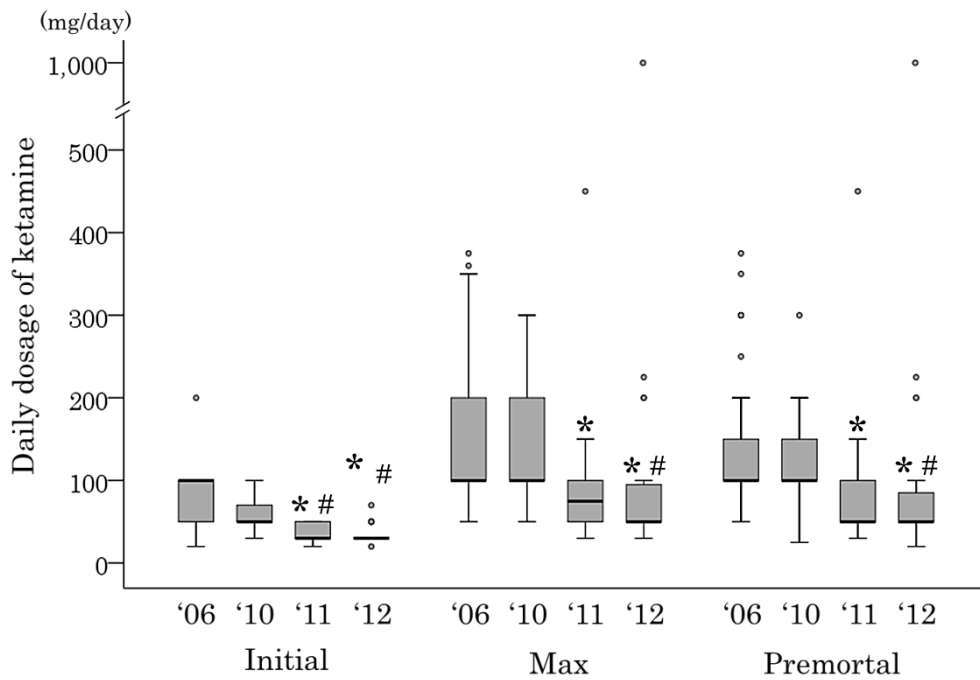


Fig. 2. Median of Ketamine Daily Dosage

Center thick lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by IBM SPSS Statistics; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles; outliers are represented by dots.

* $p < 0.0083$ vs. '06 group, # $p < 0.0083$ vs. '10 group (Mann-Whitney U-test).

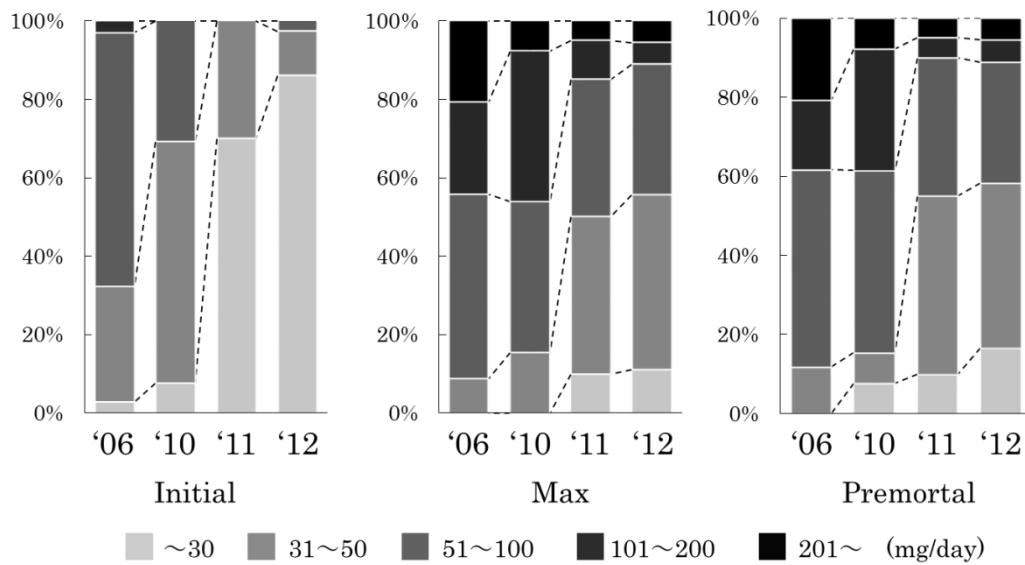


Fig. 3. Distribution (%) of Ketamine Daily Dosage

また、ケタミン投与開始から終了（死亡）までの平均投与期間は、06年群は27.6日、10年群は19.2日、11年群は15.3日、12年群は17.6日だった。06年群に比較して10、11、12年群はいずれも投与期間に減少傾向がみられた。この減少は、開始時から最大投与に至るまでの投与期間の減少によるものであり、最大投与から死亡直前までの投与期間はほぼ変わらなかった（Fig. 4）。この変化の関連要因として、2007年5月にガバペンチン錠、2010年9月にプレガバリンカプセルが採用されたことがあげられる。

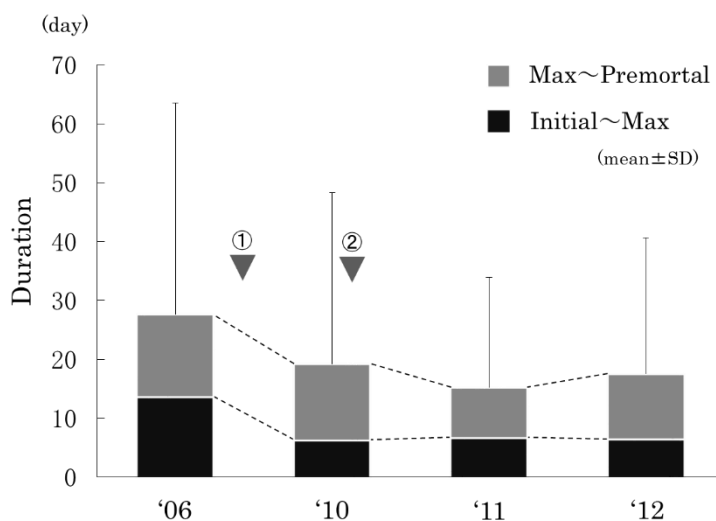


Fig. 4. Duration of Ketamine Administration

- ① Adoption of gabapentin tablets at Sapporo City General Hospital in May 2007.
- ② Adoption of pregabalin capsules at Sapporo City General Hospital in September 2010.

3) オピオイドの投与量, 使用製剤の内訳

オピオイドの1日投与量は, ケタミン開始直前から次第に増加し, 最大投与量に到達後, 死亡するまで投与量を維持する傾向がみられた. オピオイド1日投与量の中央値は, 06年群, 10年群, 11年群, 12年群で, ケタミン開始直前はそれぞれ120, 60, 54, 60 mg/日, ケタミン開始時はそれぞれ180, 128, 80, 72 mg/日であり, 経年的に減少する傾向がみられた. 同様にオピオイドの最大投与量の中央値は06年群, 10年群, 11年群, 12年群のそれぞれで205, 240, 134, 120 mg/日であり, 死亡直前の投与量の中央値はそれぞれ200, 240, 130, 110 mg/日で, いずれの時点も10年群と11年群の間を境として大きく減少しており, 06年群と12年群の間には有意差が認められた (Fig. 5).

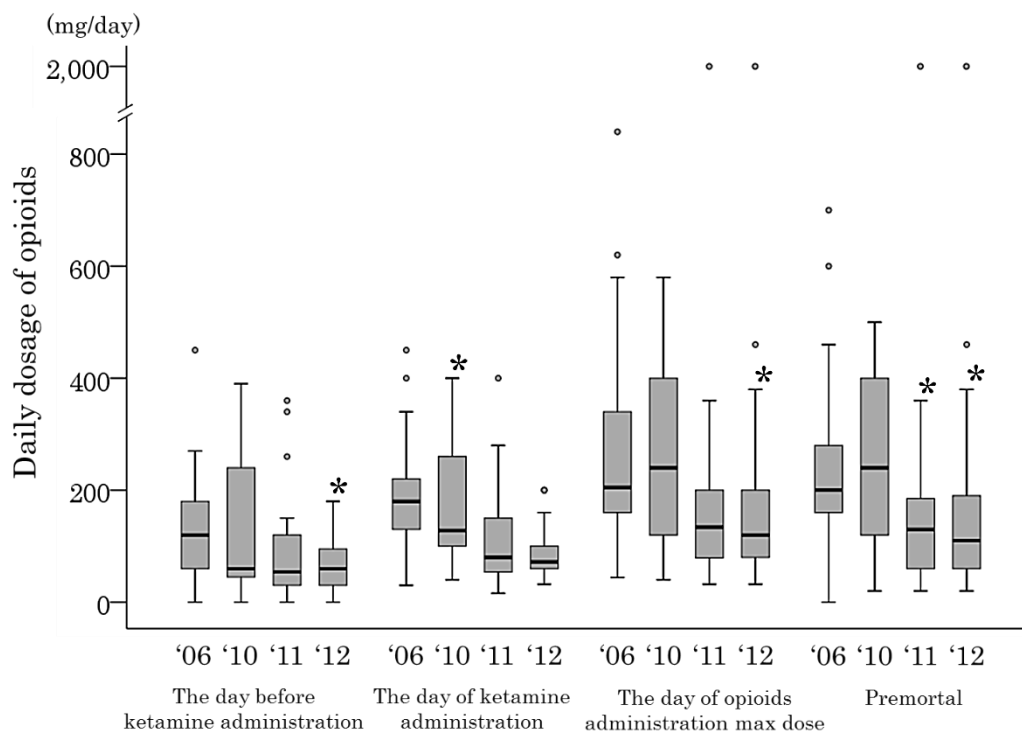


Fig. 5. Median of Opioids Daily Dosage Converted into Morphine

Center thick lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by IBM SPSS Statistics; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles; outliers are represented by dots.

* $p < 0.0083$ vs. '06 group (Mann-Whitney U-test).

各時点における使用オピオイド製剤の内訳を Fig. 6 に示す。ケタミン開始直前はフェンタニル貼付剤とオキシコドン内服製剤が大半を占めており、その中でフェンタニル貼付剤は 06 年群と 10 年群の間を境に使用割合が減少し、反対にオキシコドン内服製剤の使用が増加した。市立札幌病院において 2010 年 9 月に複方オキシコドン注射液、2012 年 7 月にオキシコドン単剤の注射薬であるオキシコドン塩酸塩水和物注射液が採用されたことから、10 年群以降ケタミン開始時のオキシコドン注射製剤の使用が経年的に増加し、12 年群では約 70% の患者にオキシコドン注射製剤が使用されていた。反対にモルヒネ注射製剤及びフェンタニル貼付剤の使用は減少がみられた。一方で最大量投与時や死亡直前にはモルヒネ注射製剤の使用割合が増えていた。ケタミン開始以降のフェンタニル貼付剤使用症例では全てオピオイドの持続注射も併用して用いられていた。また、06 年群及び 10 年群で 1 例ずつ幻覚が疑われる患者がおり、いずれの患者も症状発現時点でのケタミン投与量は 200 mg/日であった。

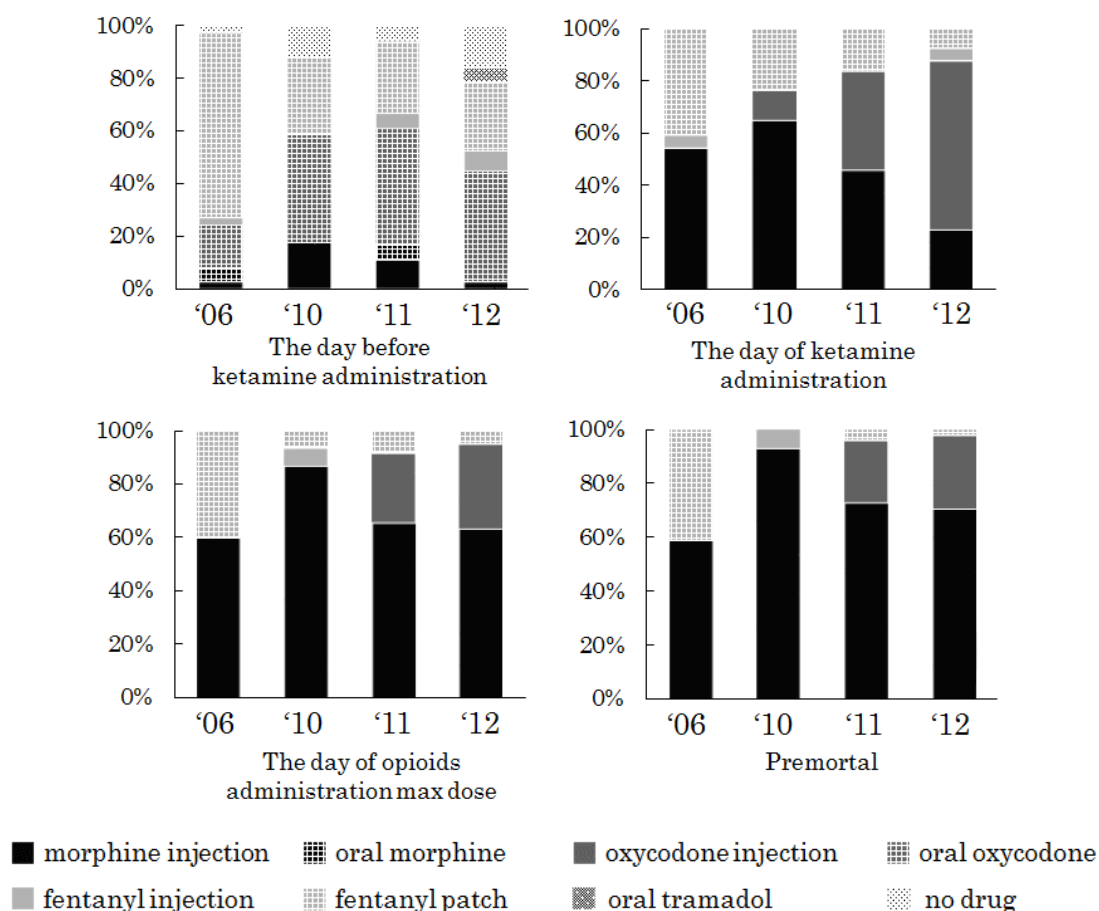


Fig. 6. Breakdown of Administered Opioids

第4節 考察

Mercadante ら¹⁾は、ケタミン (0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg) の急速投与により用量依存性にモルヒネ抵抗性のがん性痛を緩和すると報告している。また、ケタミンはオピオイドの鎮痛耐性に拮抗し、鎮痛効果を増強することが知られており、²⁾ 痛みが増強するにしたがってモルヒネを増量した患者にケタミンの併用を開始することで、モルヒネの投与量を劇的に減少することができたとの報告もされている。³⁾ しかし、鎮痛補助薬としてのケタミンの有効性を示す大規模な質の高い無作為比較試験はなく、投与方法もいまだ確立していない。^{35, 36)} 一方で、ケタミンは幻覚・幻聴・不快感・傾眠・混乱などの副作用が出現することも知られている。¹⁾ 本調査での臨床データから副作用について詳細な検討はできなかったが、06年群及び10年群においてケタミン (200 mg/日) による幻覚を疑われた症例がみられた。市立札幌病院緩和ケアチームでは、2010年までは以前報告したように副作用も考慮し、ケタミンの初回投与量は50 mg/日とし、その後症状に合わせて用量調節を行っている。³⁾ しかし、今回の対象症例ではみられなかったものの、ごくまれにケタミンを50 mg/日で開始しても、レスキュー・早送り時に不快感を訴える患者が見受けられた。そのため、2011年以降、初日は30 mg/日で開始しており、以来ケタミン開始時に不快感を訴える患者を経験していない。この点からも、先に述べた市立札幌病院緩和ケアチームでのケタミン投与方法は有用であると考えられる。

さらにはケタミンが低用量に移行したにも関わらず、オピオイドは増加せず、むしろケタミンと同様に低用量への移行が認められた。その要因の一つとして、市立札幌病院において複方オキシコドン注射液 (2010年9月採用) 及びオキシコドン塩酸塩水和物注射液 (2012年7月採用) が使用可能になったことが考えられる。García de Paredes ら³⁷⁾は、オキシコドン単独投与群は、非オピオイド投与群やオキシコドン以外のオピオイド投与群よりもがん患者の神経障害性痛を軽減すると報告している。住谷ら³⁸⁾は、がん性痛に対するオピオイドの有用性について内臓痛・神経障害性痛・骨痛に分けて展開しており、いずれの痛みにおいてもオキシコドンはモルヒネより有用であると述べている。基礎的研究においても、オキシコドンは他のオピオイドと異なる作用機序をもつことで神経障害性痛に対する効果を現わすことが示唆されている。³⁹⁾ また、オキシ

コドンとはモルヒネと比較して悪心・嘔吐の他、癢痒感や幻覚の副作用が少ないという臨床報告がある。⁴⁰⁻⁴²⁾ こうした特徴を踏まえ、市立札幌病院緩和ケアチームでは現在、持続注開始時のオピオイドとしてオキシコドン塩酸塩水和物注射液を第一選択として使用している。一方、緩和医療学会が作成した「がん患者の呼吸器症状の緩和に関するガイドライン 2011 年版」によると、モルヒネの全身投与はがん患者の終末期に多くみられるような呼吸困難を緩和する効果があるとの報告があるが、他のオピオイドにはその効果を示す根拠はないとされている。⁴³⁾ 市立札幌病院緩和ケアチームでも、終末期など病態の進行により痛み以外の症状が出現しオキシコドン塩酸塩注射液で苦痛緩和が困難になった時期に、モルヒネの持続注へ切り替えることが多い。オピオイドの種類や剤形の選択肢が増えた結果、臨床病期にあったオピオイドが選択されたことで、これまでよりも低用量で痛みを含めた苦痛緩和を図ることができたものと推察された。

フェンタニル貼付剤は経口摂取が困難な患者に対して、比較的簡便に使用可能であり有用性の高い薬剤であるが、かねてから高用量になると鎮痛耐性が出現し増量に見合った鎮痛効果が得られないとの報告があり、⁴⁴⁾ その発生機序に関して基礎的研究での報告もある。⁴⁵⁾ 市立札幌病院緩和ケアチームにおいてもこうした報告と同様に高用量フェンタニルの鎮痛耐性を経験しており、それ以降使用する症例は限定的になった。本調査で明らかとなったフェンタニル貼付剤の使用割合の減少は、こうした背景を反映したものと考えられる。

06 年群と 10 年群を境にケタミンの投与期間が短縮した要因の一つとして、2007 年 5 月にガバペンチン錠、2010 年 9 月にプレガバリンカプセルが採用されたことが寄与していると考えられる。この 10 年群以降の投与期間の短縮は、ケタミン開始時から最大投与量に達するまでの期間の短縮によるもので、最大投与量に達してから死亡するまでの期間にはほとんど差は見られなかった。このことから、ガバペンチンやプレガバリンの使用により内服で痛みのコントロールが可能となった期間が延び、結果的にケタミン投与を開始する時期が後方へシフトしたと推察される。しかし今回、ガバペンチンやプレガバリンの使用量調査は行わなかった。今後は、これらの薬剤の使用動向を明らかにすることで、ケタミンの使用期間との関連性についてさらに追究していきたい。

近年、新たなオピオイド製剤や鎮痛補助薬の登場により治療の選択肢が増えたことで、これまで以上に患者の痛みやその他の諸症状に合わせた適切な症状緩和が可能になってきている。一方で、ケタミンは NMDA 受容体拮抗作用を有するという薬理作用の観点からだけでなく、注射薬として使用可能な数少ない鎮痛補助薬の一つでもあり、その臨床的重要性は高い。

本調査において、ケタミンをより低用量で用いてもオピオイドを増量することなく鎮痛効果が得られることが示唆された。さらにこのケタミンの低用量化は、かねてから臨床的に懸念されていた副作用リスクの低下にもつながるものと期待される。

第2章 ラット皮質機能に対するケタミンの影響

第1節 聴性驚愕反応試験を用いた行動学的検討：PPIに対する影響

第1項 目的

統合失調症における認知機能障害の評価指標として驚愕反応試験におけるプレパルスインヒビション (prepulse inhibition: PPI) が用いられている。⁴⁶⁾ 驚愕反応試験は音や光，電気などによる外界からの刺激に対する驚愕反応を定量的に計測する方法であり，ヒトおよび動物において共通して用いることができる行動学的評価法である。PPIとは，外界からの刺激（パルス: pulse）の直前に，単独では反応を示さない弱い刺激（プレパルス: prepulse）を与えることにより，刺激に対する反応が減弱する現象であり，プレパルスに対する反応に，前頭葉を含む皮質 - 辺縁系の調節機構がフィルター的に関与しているためと考えられている。すなわち，PPIを観察することにより外部からの知覚情報制御としての情報フィルター機能障害を定量的に評価することが出来る。本研究では音刺激による聴性驚愕反応試験を用いて，PPIにおよぼすケタミン及びモルヒネの影響について検討した。

第2項 方法

1) 実験動物

実験には自家繁殖及び三協ラボサービスから購入した 10-14 週齢の雄性 Wistar ST (Slc: Wistar ST) ラットを使用した。自家繁殖したラットは生後 3-4 週齢で離乳させ，1 ケージあたり 3-4 匹で飼育した。購入したラットも，同様に 1 ケージあたり 3-4 匹で飼育した。飼育条件は，室温 22 ± 2 °C，相対湿度 $50 \pm 10\%$ ，換気回数 12 回/時，12 時間毎の明暗サイクル（明期：8：00～20：00）とし，水および固形飼料（MF，オリエンタル酵母工業株式会社，東京，日本）を実験直前まで自由に摂取させた。実験はすべて動物実験委員会の承認を受けて「北海道医療大学動物実験の指針」に準拠して実施した。

2) 使用薬物

ケタミン [(2*RS*)-2-(2-Chlorophenyl)-2-(methylamino)cyclohexanone monohydrochloride] (第一三共株式会社, 東京, 日本) は 0.9%生理食塩水 (生理食塩水: saline) に溶解し, 使用直前まで遮光保存した. ラットの体重 100 g 当たり 0.1 ml になるように溶液を調製し, 腹腔内 (intraperitoneally: i.p.) に投与した. コントロール群には同容量の溶媒 (生理食塩水) を投与した.

3) 聴性驚愕反応試験

薬物は測定開始 10 分前に腹腔内投与した. 実験には, SR-LAB (San Diego Instruments, Inc., San Diego, USA) を使用した. 装置内には, プレキシガラス製フレームの上部に直径 8.2 cm の動物保定用プレキシガラス製シリンダーを取り付けた動物用ホルダーを備え付けた (Fig. 7). 測定箱には防音を施し, 換気を行った. 音はシリンダーの 24 cm 上部に取り付けられたスピーカーより与えた. フレームの下部に取り付けたトランスジューサーによってシリンダー内の動物の動きを数値化して測定し, インターフェイスを通じてマイクロコンピュータに記録した. 測定感度は, 振動キャリブレーター (San Diego Instruments, Inc., San Diego, USA) を用い, 感度レベルが 700 になるよう設定した.

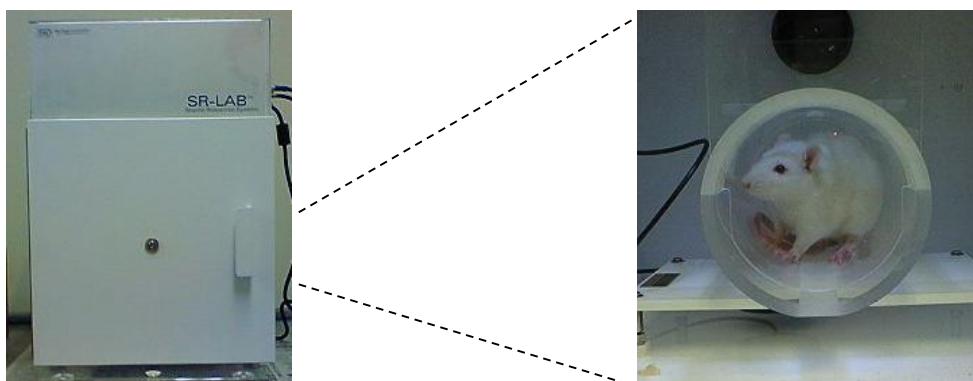


Fig. 7. A Photograph of the Test Chamber Used to Measure Startle Responses

動物を測定用チャンバーに入れ，5 分間測定環境に慣らした後，実験を開始した．65 dB のホワイトノイズ（すべての振動数に対し，単位バンドあたりのエネルギーが一定であるような無秩序な雑音）をバックグラウンドノイズとして，慣らし期間ならびにセッション中を通じて常時流した．その他の音刺激もすべてホワイトノイズを使用した．

以下の実験では 8 種類の音刺激による試行 (trial) を各 10 回ランダムに与え，その試行の間隔 (15, 20, 25, 30 sec) をランダムに設定した．動物の驚愕反応の動きは，パルス開始時より 100 msec 間測定し，その平均値を 1 回の音刺激に対する驚愕反応 (startle response) とした．セッション開始時の驚愕反応はその後の反応に比べて大きいことが以前の検討から明らかになっているので，解析にはセッションの後半 5 回の平均値を驚愕反応として評価した．直前に驚愕反応閾値以下のプレパルスを与えた場合の驚愕反応の減少を示す prepulse inhibition % (PPI (%)) は Fig. 8 に示す式により算出した．

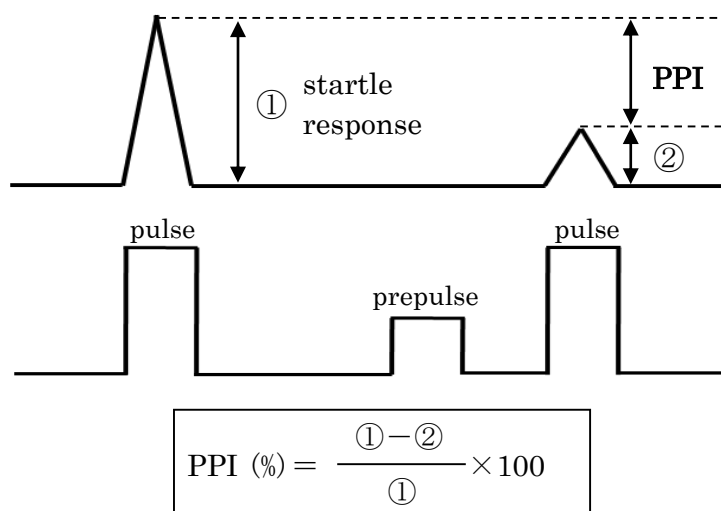


Fig. 8. Calculation of Prepulse Inhibition (PPI)

a) 音刺激条件

以下 8 種類の試行 (trial)を用いた (Fig. 9).

Nostim (バックグラウンドノイズのみ)

P80 trial (80 dB (40 msec) のパルスのみ)

P120 trial (120 dB (40 msec) のパルスのみ)

PP68 trial (68 dB (20 msec) のプレパルス開始 100 msec 後にパルスを与える)

PP71 trial (71 dB (20 msec) のプレパルス開始 100 msec 後にパルスを与える)

PP74 trial (74 dB (20 msec) のプレパルス開始 100 msec 後にパルスを与える)

PP77 trial (77 dB (20 msec) のプレパルス開始 100 msec 後にパルスを与える)

PP80 trial (80 dB (20 msec) のプレパルス開始 100 msec 後にパルスを与える)

※ パルス は 120 dB (40 msec) とし, 驚愕反応および PPI への影響を調べた.

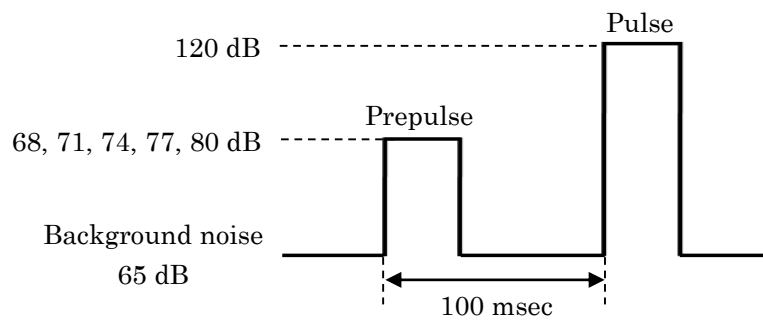


Fig. 9. Time Schedule of Prepulse Inhibition (PPI) Trial

4) 統計処理

各試行 10 回のうち後半 5 回の驚愕反応の平均をその刺激に対する驚愕反応として解析した. すべてのデータは平均値±標準誤差 (mean ± SEM) として表した. 一元配置分散分析 (ANOVA) の後, Dunnett's 多重比較により, コントロール群と比較した. 危険率 5%未満 ($p<0.05$) を統計学的に有意とみなした.

第 3 項 結果

1) PPI に対する影響

当研究室は, すでにコントロール群 (生理食塩水群) ではプレパルス 68-80 dB において正常に PPI がみられることを確認している. ⁴⁷⁾ Fig. 10 A に示すように, ケタミン (5 and 25 mg/kg, i.p.) はコントロール群に比べ PPI を有意に抑制した. ケタミン (1 mg/kg, i.p.) では PPI の抑制は認められなかった. ケタミン (1, 5 and 25 mg/kg, i.p.) は驚愕反応に影響を与えなかった (Fig. 10 B).

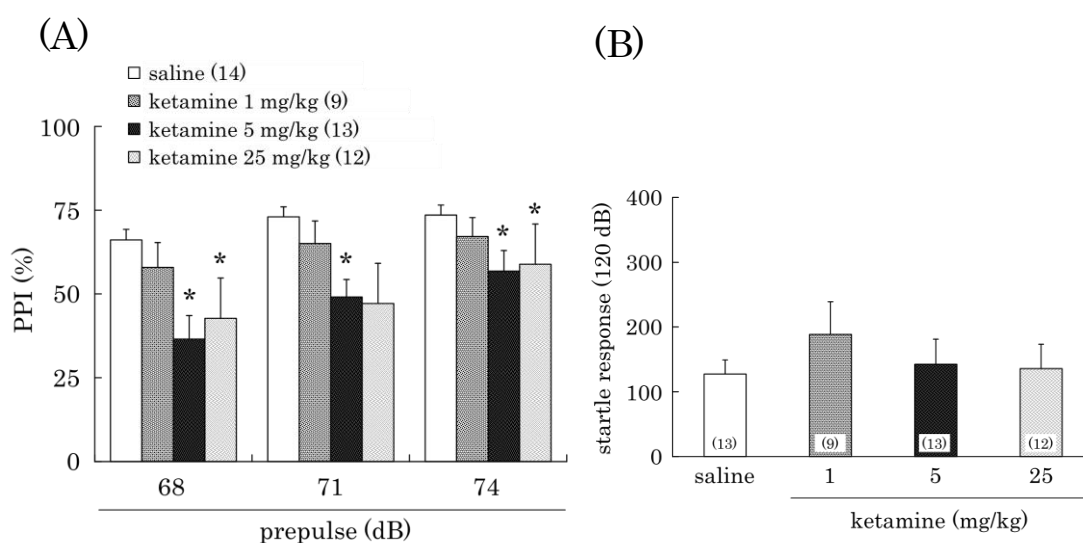


Fig. 10. Effects of Ketamine on the Prepulse Inhibition (PPI)

Prepulse inhibition (PPI) (A) and startle response (B) induced by ketamine (1, 5 and 25 mg/kg, i.p.) administration. Data are expressed as mean ± SEM. The number of rats tested are shown in parentheses. * $p<0.05$ vs. saline groups.

第4項 考察

統合失調症患者では PPI が障害されることから、外部からの知覚情報制御としての情報のフィルター機能が障害されていることが知られている。⁴⁶⁾ 今回、ケタミンは驚愕反応に影響を与えず、PPI を障害する傾向がみられた。低用量 (5 mg/kg, i.p.) および sub-anesthetic dose である中等量 (25 mg/kg, i.p.) では PPI を有意に障害した。一般的に NMDA 受容体拮抗薬による PPI の障害は、ドパミン D₂ 受容体拮抗薬のハロペリドール前投与で影響されず、アリピプラゾールやクロザピンなど非定型抗精神病薬により改善される。⁴⁸⁾ 従って、PPI の障害は、統合失調症の陽性症状ではなく、陰性症状あるいは認知機能障害と関連していると考えられている。今回 PPI の障害を引き起こした中等量のケタミン (25 mg/kg, i.p.) は、麻酔作用が若干みられる量 (sub-anesthetic dose) であるため、麻酔の影響を完全には否定できない。しかしながら、低用量のケタミン (5 mg/kg, i.p.) は正向反射に影響を与えず、麻酔作用は認められなかった (データ未掲載)。したがって、ケタミン (5 mg/kg, i.p.) は知覚情報フィルター機能を低下させて、認知機能障害を引き起こしている可能性が示唆された。一方、さらにより低用量のケタミン (1 mg/kg, i.p.) は PPI を障害しなかったことから、認知機能に影響を及ぼさないことが推察された。

第2節 覚醒下における電気生理学的検討：mPFC シナプス伝達に対する影響

第1項 目的

NMDA 受容体拮抗薬であるフェンシクリジンおよび MK801 は、動物実験において、統合失調症と類似した行動異常、社会性の欠如、PPI の障害など、認知機能障害を含む統合失調症様症状を引き起こすことが知られている。脳スライスや培養細胞を用いた *in vitro* の実験系、あるいは麻酔下の実験では、これらの NMDA 受容体拮抗薬は mPFC の錐体細胞の興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potential: EPSP) を抑制する。^{49, 50)} しかしながら、多くの覚醒下での実験においては、フェンシクリジンおよび MK801 は mPFC の神経発火を引き起こす。⁵¹⁻⁵³⁾ Jodo ら⁵²⁾ は、フェンシクリジンを海馬 CA1 に局所投与すると mPFC の神経発火は促進するが、mPFC に直接投与しても神経発火の促進は起こさないことから、フェンシクリジンの作用部位は mPFC ではなく、海馬であると推定している。また Homayoun と Moghaddann⁵³⁾ は、 γ -amino-butyric acid (GABA) 神経を介する抑制機構が NMDA 受容体拮抗薬により抑制、すなわち脱抑制されたため、mPFC の神経発火が亢進すると説明している。

ケタミンは NMDA 受容体拮抗薬であるが、麻酔作用を有するため、*in vivo* での電気生理学的実験はほとんど行われていない。そこで、本研究は、ケタミンの海馬-皮質神経回路シナプス応答について、最初に覚醒条件下で検討した。ケタミンの投与量としては、第2章 第1節で PPI を障害した用量に焦点を当て、低用量 (1 and 5 mg/kg, i.p.)、中等量 (25 mg/kg, i.p.) ならびに麻酔量として高用量 (anesthetic dose; 100 mg/kg, i.p.) を用いた。

第2項 方法

1) 実験動物

第2章 第1節 第2項 1) に準じた。

2) 使用薬物ならびに実験プロトコール

使用薬物は、第2章 第1節 第2項 2) に準じた。

覚醒下における実験プロトコールを Fig. 11 に示す。脳内電気刺激とニューロン活動について paired pulse 実験（後述）を行った後、テスト刺激を海馬 CA1 に 30 秒毎に与え、mPFC で誘発集合電位（population spike amplitudes: PSA）を計測した。30 分後にケタミン（1, 5, 25 and 100 mg/kg）を腹腔内投与（i.p.）し 40 分間誘発集合電位を測定した後、再度 paired pulse 応答を計測した。

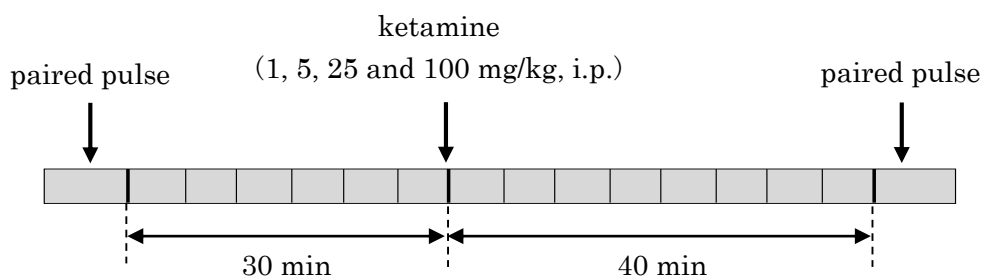


Fig. 11. Experimental Protocol under Consciousness

3) 覚醒下における電気生理学的方法

a) 慢性電極埋め込み

ペントバルビタール（50 mg/kg, i.p.）麻酔下で脳定位固定装置（株式会社成茂科学器械研究所，東京，日本）にラットを固定し，頭部皮膚を正中切開した。体温はヒートパッドで 36.5-38.0°C に保った。脳アトラス⁵⁵⁾ に従い，記録電極挿入位置（A: 3.3 mm, L: ±0.8 mm）および刺激電極挿入位置（P: 6.0 mm, L: ±5.6 mm）に歯科用ドリル（ANS 3000, 株式会社マリーノテクニクサプライ，埼玉，日本）で小孔を開けた。覚醒下用記録電極にはエナメル被覆ステンレス製単極電極（先端径 100 μm），覚醒下用刺激電極はエナメル被覆ステンレス製双極張り合わせ電極（先端径 200 μm, 先端間距離 500 μm）を用いた（Fig.

12). 記録電極を内側前頭前野 (mPFC, A: 3.3 mm, L: ± 0.8 mm, V: 3.3 mm), 刺激電極を同側の腹側海馬 CA1 領域 (CA1, P: 6.0 mm, L: ± 5.6 mm V: 3.5-5.5 mm) に挿入し, これらを陽極とした. ビスを頭蓋骨に埋め込み, 記録電極に付随させた銅線を巻きつけて不閉電極およびアースとした.

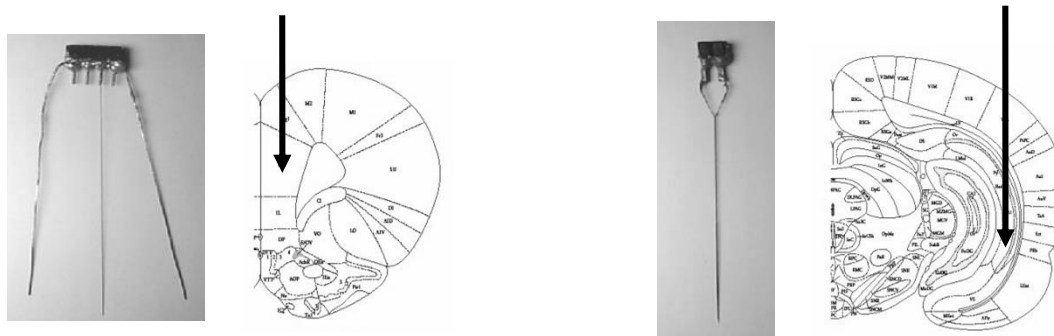


Fig. 12. Shape and Position of Recording and Stimulating Electrodes

Recording electrode inserted into the mPFC (A: 3.3 mm, L: ± 0.8 mm, V: 3.3 mm) (left) and stimulating electrode inserted into the CA1 (P: 6.0 mm, L: ± 5.6 mm, V: 3.5-5.5 mm) (right) for conscious experiment.

記録電極は増幅器に接続した後, 油圧式マイクロマニピュレーター (MMO-220A, 株式会社 成茂科学器械研究所, 東京, 日本) を用いて, 硬膜より深さ 3.3 mm まで挿入した. 次に刺激電極を刺激装置 (SEN-7203, 日本光電工業株式会社, 東京, 日本) およびアイソレーター (SS-203J, 日本光電工業株式会社, 東京, 日本) に接続したのち, 腹側海馬 CA1 領域刺激による mPFC の誘発集合電位を観察しながら, 波形が観察される位置まで刺激電極を挿入した.

波形は刺激後平均 20 ± 2 msec に現れる陰性波を評価の対象とした. テスト刺激強度 100-400 μ A で刺激し, 誘発集合電位をインプットボックス (S-0476, 日本光電工業株式会社, 東京, 日本) および高感度増幅器 (MEG-5200, 日本光電工業株式会社, 東京, 日本) を介してオシロスコープ (VC-11, 日本光電工業株式会社, 東京, 日本) で観察した. 解析には誘発集合電位を用いた. 波形を確認後, 電極を超速硬常温重合レジン (GC UNIFAS II, 株式会社ジーシー, 東京, 日本) を用いて固定した (Fig. 13).

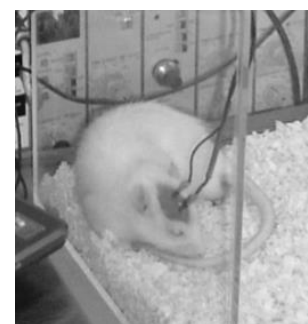


Fig. 13. A Photograph of Experiment on Recording Evoked Potentials in the CA1-mPFC Pathway of a Conscious Rat

b) 誘発集合電位測定

約 1 週間の術後回復期間をおいた後、最大反応が得られる刺激強度を 100% として、20% 間隔で刺激して波形を記録し、Input-Output curve を作成して誘発集合電位の刺激強度依存性を確認した。テスト刺激として誘発集合電位が最大反応の 60% になる刺激強度で 30 秒毎に 250 μ sec の電気刺激を与え、オシロスコープで誘発集合電位の波形を観察した。また、データ解析装置 (Power Lab System, ADInstruments Pty Ltd., NSW, Australia) を用いて、アナログデジタル変換を行い、7 回のテスト刺激による加算平均を 5 分ごとに記録した。30 分間誘発集合電位を記録したのち、0.9% 生理食塩水またはケタミン (1, 5, 25 and 100 mg/kg) を腹腔内 (i.p.) 投与し、60 分間、誘発集合電位を記録した。

実験は原則的に右側で行い、十分な記録波形が得られない場合は左側で行った。実験終了後、ウレタンで深麻酔し、記録電極および刺激電極に直流電流 (300 μ A, 10 sec) を流した後、脳を摘出し、10%ホルマリン液に固定した。30% スクロース置換後、 -80°C で凍結保存し、電極の位置を確認した。

c) Paired pulse 応答

Paired pulse 応答とは、テスト刺激の間隔を変化させることで、一回目の刺激応答 (S1) に対する二回目の刺激応答 (S2) の比 (paired pulse ratio: S2/S1) を評価する方法であり、短期シナプス可塑性を表す現象と考えられている。テスト刺激の間隔として、再現性の良いデータが得られた 50 msec, 100 msec および 150 msec を用いた。Input-Output curve にてテスト刺激条件を設定した後 paired pulse 実験を施行し、得られた S2/S1 比をコントロール値 (薬物投与前値) とした。実験プロトコールに従い (前述)、ケタミン投与後 40 分後に再度 paired pulse 実験を行い、S2/S1 比をコントロール値と比較することで、ケタミンによる paired pulse 応答の変化を評価した。

4) 統計処理

すべてのデータは平均値±標準誤差 (mean ± SEM) で表した.

mPFC 誘発集合電位測定は薬物投与直前の値を 100%とし, 百分率で換算した. ケタミン投与 40 分間の曲線下面積 (area under the curve: AUC) はコントロール群 (生理食塩水群) と比較した.

Paired pulse 実験は, 一回目の刺激応答 (S1) に対する二回目の刺激応答 (S2) の比 (paired pulse ratio) を, ケタミン投与前後で比較した. ケタミン投与前の値をコントロール群とした.

統計解析は one-factor ANOVA の後, Dunnett's 多重比較により, コントロール群と比較した. 危険率 5%未満 ($p < 0.05$) をもって統計学的に有意とした.

第3項 結果

1) 誘発集合電位に対する影響

覚醒下においてケタミンは用量依存的に誘発集合電位を減弱させた。麻酔量のケタミン (100 mg/kg, i.p.) は誘発集合電位を約 50%まで抑制した。投与 40 分間の曲線下面積 (AUC) で表すと、ケタミン (5, 25 and 100 mg/kg, i.p.) はコントロール群 (生理食塩水群) と比較し用量依存的に誘発集合電位を有意に抑制した。ケタミン (1 mg/kg, i.p.) では誘発集合電位の有意な抑制は認められなかった (Fig. 14).

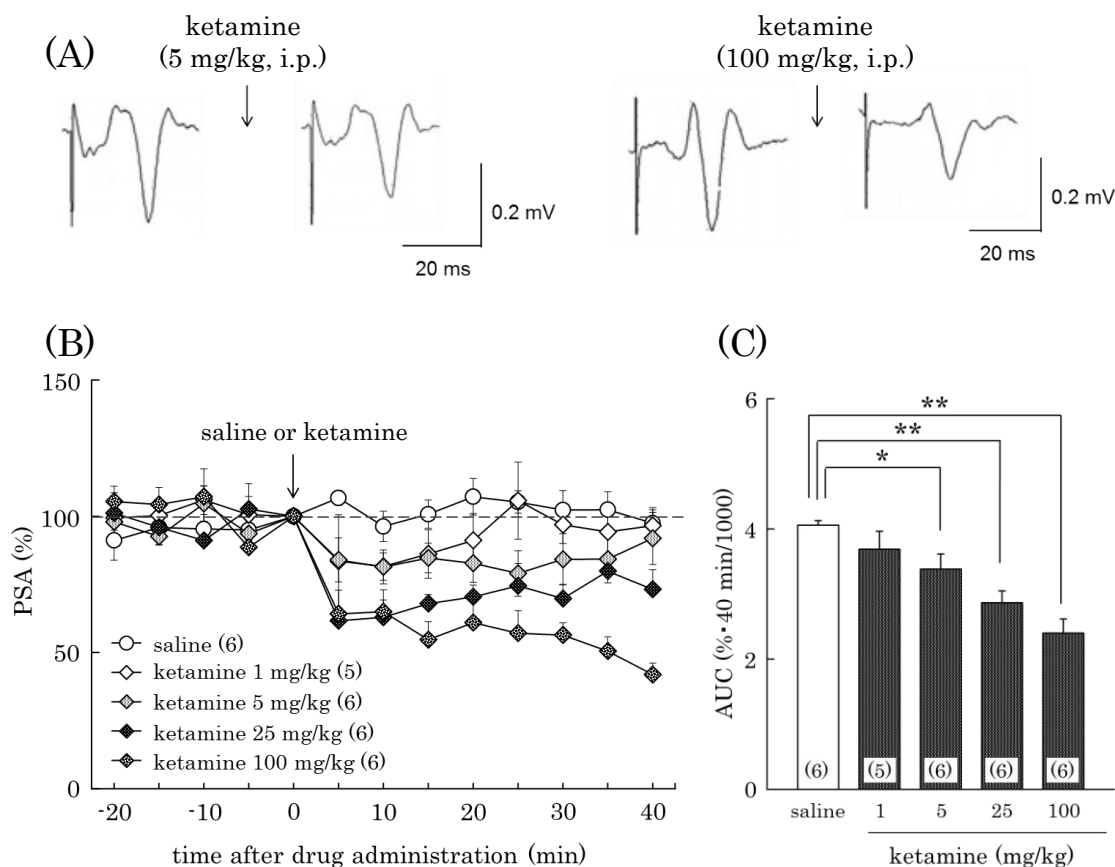


Fig. 14. Effects of Ketamine on the Population Spike Amplitudes (PSA) in the mPFC under Consciousness

Specimen recordings (A), time course responses (B) and area under the curves (AUC) (C) of the PSA after ketamine (1, 5, 25 and 100 mg/kg, i.p.) administration. Data are expressed as mean \pm SEM. Allow indicates administrated point. The number of rats tested are shown in parentheses. * p <0.05 and ** p <0.01 vs. saline groups.

2) Paired pulse 応答に対する影響

コントロール群 (ケタミン投与前) では刺激間隔 (paired pulse interval) 50 msec で paired pulse 応答の増強がみられた。また、刺激間隔が長くなるに従い paired pulse 応答は増強から減弱へと移行した。一方、低用量のケタミン投与後には、paired pulse 応答の減弱ではなく増強がみられた。ケタミン (1 mg/kg, i.p.) 投与群では刺激間隔 150 msec で、ケタミン (5 mg/kg, i.p.) 投与群では 100 msec ならびに 150 msec で、コントロール群に比べ有意な paired pulse 応答の増強がみられた。ケタミン (25 and 100 mg/kg, i.p.) の paired pulse 応答は、いずれの刺激間隔でも、コントロール群との間に有意差はみられなかった (Fig. 15).

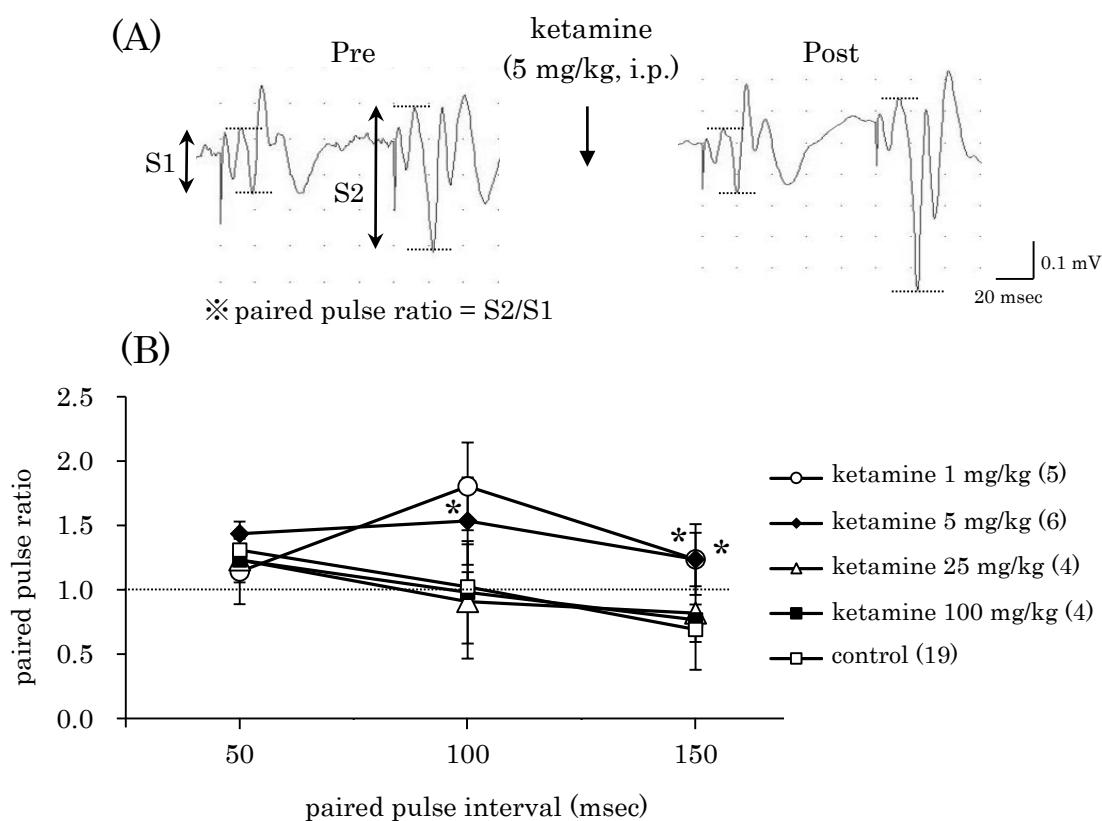


Fig. 15. Effects of Ketamine on the Paired Pulse Response in the mPFC under Consciousness

Specimen recordings (A) and paired pulse ratio (S2/S1; B) before and after ketamine (1, 5, 25 and 100 mg/kg, i.p.) administration. Control means pre value before ketamine administration. Data are expressed as mean \pm SEM. The number of rats tested are shown in parentheses. * $p < 0.05$ vs. controls.

第4項 考察

ケタミンは麻酔作用を有するため、ラット海馬 CA1-mPFC 神経回路のシナプス応答に関する報告は現在のところみられない。今回、覚醒下で、ケタミンが用量依存性に mPFC での誘発集合電位を減弱させたことから、シナプス伝達効率を抑制することが初めて明らかとなった。ケタミンは、海馬 CA1 領域刺激によるグルタミン酸神経の興奮がシナプスを介して mPFC 錐体ニューロンに伝達する過程を抑制するものと考えられた。ケタミンによる海馬 CA1-mPFC 神経回路のシナプス伝達抑制が、海馬 CA1 領域の抑制による可能性は現在のところ否定できない。その理由は、フェンシクリジンをも PFC ではなく海馬に局所投与した場合のみ mPFC の神経発火がみられるからである。⁵²⁾しかしながら、一般的に麻酔薬は皮質の神経活動を抑制することが知られている。今回、麻酔量 (100 mg/kg, i.p.) あるいは sub-anesthetic dose (25 mg/kg, i.p.) のケタミンでみられた誘発集合電位の減弱、すなわちシナプス伝達の抑制は、mPFC の錐体ニューロンの活動抑制を反映していると考えられる。このシナプス伝達抑制反応は用量依存性を示すことから、低用量 (5 mg/kg, i.p.) においても、ケタミンは mPFC のシナプス伝達を抑制したものと推測された。

Paired pulse については、現在もその解釈には議論があるが、プレシナプスからの神経伝達物質の遊離を反映しているという考え方が大半であり、それには神経終末での Ca^{2+} 濃度の上昇が関係していると考えられている。また、シナプス伝達効率が抑制されると paired pulse 応答の増強が起りやすく、促進すると paired pulse 応答の減弱が起りやすいという報告もある。⁵⁶⁾この解釈に基づくと、低用量のケタミン (1 and 5 mg/kg, i.p.) はプレシナプス調節機構により mPFC の錐体ニューロン活動を抑制していると考えられる。一方、高用量のケタミン (25 and 100 mg/kg, i.p.) はプレシナプス調節機構に加え、ポストシナプスの NMDA 受容体を遮断し、シナプス伝達を抑制していると考えられる。この作用部位の違いが、聴性驚愕反応試験における PPI 障害を示す低用量のケタミンと、麻酔作用を表す高用量のケタミンとの作用機序の違いを反映しているものかもしれない。

第3節 麻酔下における電気生理学的検討：mPFC シナプス伝達に対する影響

第1項 目的

第2章 第2節で、ケタミンは用量依存的に海馬 CA1-mPFC 神経回路のシナプス伝達を抑制することが明らかになった。聴性驚愕反応試験を用いた行動学的検討により PPI の障害がみられた低用量 (5 mg/kg, i.p.) ではプレシナプス調節機構を介し、中等量 (25 mg/kg, i.p.) ではプレシナプス調節機構に加えポストシナプスに作用して、mPFC のシナプス伝達効率を抑制することが示唆された。以上の結果に基づき、本節では、認知機能障害を反映していると考えられている PPI の障害とシナプス伝達抑制機構との関連性について、麻酔下で電気生理学的に追究した。実験に先立ち、覚醒下と麻酔下のケタミンのシナプス応答に違いがあるか否かについて検討した。またケタミンは麻酔量より低用量で、鎮痛作用を有するため、ケタミン (5 and 25mg/kg, i.p.) のシナプス抑制機構と鎮痛作用の関連性について検討した。実験には下行性痛覚抑制の最高中枢であり侵害刺激応答に重要な脳部位である PAG の神経発火を指標として用いた。

第2項 方法

1) 実験動物

第2章 第1節 第2項 1) に準じた。

2) 使用薬物ならびに実験プロトコール

使用薬物はケタミンならびに(+)-MK 801 maleate (CALBIOCHEM, Darmstadt, Germany) を用いた。薬物は全て 0.9%生理食塩水に溶解し、0.1 ml/kg の用量で投与 (i.p.) した。高頻度刺激 (high frequency stimulation: tetanus) は、ケタミン (5 mg/kg) 投与 20 分後に行った (Fig. 16)。

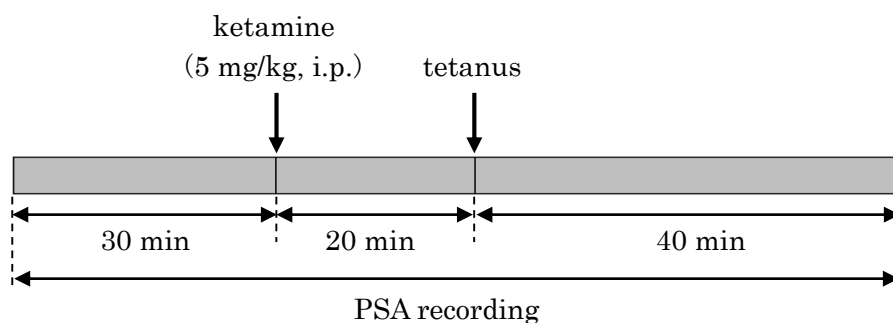


Fig. 16. Experimental Protocol under Anesthesia

3) 麻酔下における電気生理学的方法

a) 皮質前頭前野誘発集合電位測定

ウレタン (1 g/kg, i.p.) 麻酔下で麻酔下用記録電極および刺激電極を用い、覚醒下と同様の方法で電極を挿入し (前述) 記録波形を確認後、測定を行った。ケタミン (5 mg/kg) および MK801 (0.1 mg/kg) を腹腔内 (i.p.) 投与し、40 分間、誘発集合電位を記録した。また、ケタミン (5 mg/kg, i.p.) 投与 20 分後に高頻度刺激 (tetanus; 250 Hz (刺激持続時間 250 μ sec, 刺激間隔 4 msec, 50 回) の刺激を 10 秒ごとに 10 回施行) を 1 分 30 秒の間隔をあけて 2 回与え、その後 40 分間誘発集合電位を記録し、長期増強形成について検討した。

b) 中脳水道中心灰白質における自発発火の測定

ウレタン (1 g/kg, i.p.) 麻酔下で, PAG (P 7.8 mm; L 0.8 mm; V 5.0-6.0 mm) に記録電極を挿入した (Fig. 17). 自発発火は記録電極からインプットボックス (JB-220J, 日本光電工業株式会社, 東京, 日本) および高感度増幅器 (S-0476, 日本光電工業株式会社, 東京, 日本) を介してオシロスコープ (VC-11, 日本光電工業株式会社, 東京, 日本) で観察した. 硬膜から深さ 5.0 mm 付近で自発発火の増加がみられる部位を PAG とし, 実験終了後, 直流電流 (300 μ A, 20 sec) で電気凝固し, 脳を摘出し, 電極の位置を確認した. 侵害刺激として片側後肢を手術用鉗子で 20 秒間挟み, 痛み刺激を与えた. ケタミン (5 and 25 mg/kg, i.p.) 投与 5 分前および投与 10 分後に 20 秒間の機械的つまみ刺激 (pinching) を与え, 侵害刺激に対するケタミンの影響を検討した.

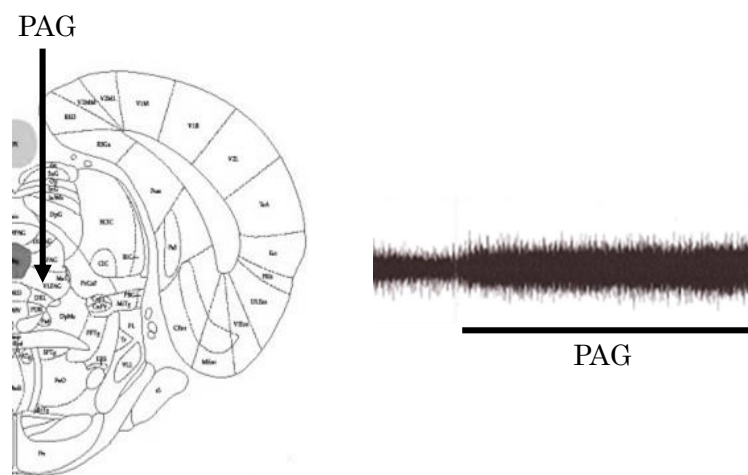


Fig. 17. Neural Firing Recorded in the Periaqueductal Gray (PAG)

4) 統計処理

第 2 章 第 2 節 第 2 項 4) に準じた. ただし 2 群間の比較には unpaired t-test を用いた. 危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) を統計学的に有意とみなした.

第3項 結果

1) PAGの侵害刺激応答に対するケタミンの影響

Fig. 18 に示したように、侵害刺激である後肢 pinching による PAG での神経発火は増加し、この反応には再現性がみられた。ケタミン (25 mg/kg, i.p.) は、侵害刺激によってみられた PAG の神経発火の増強を明らかに抑制した。一方、ケタミン (5 mg/kg, i.p.) は侵害刺激による PAG の神経発火を抑制しなかった(Fig. 18).

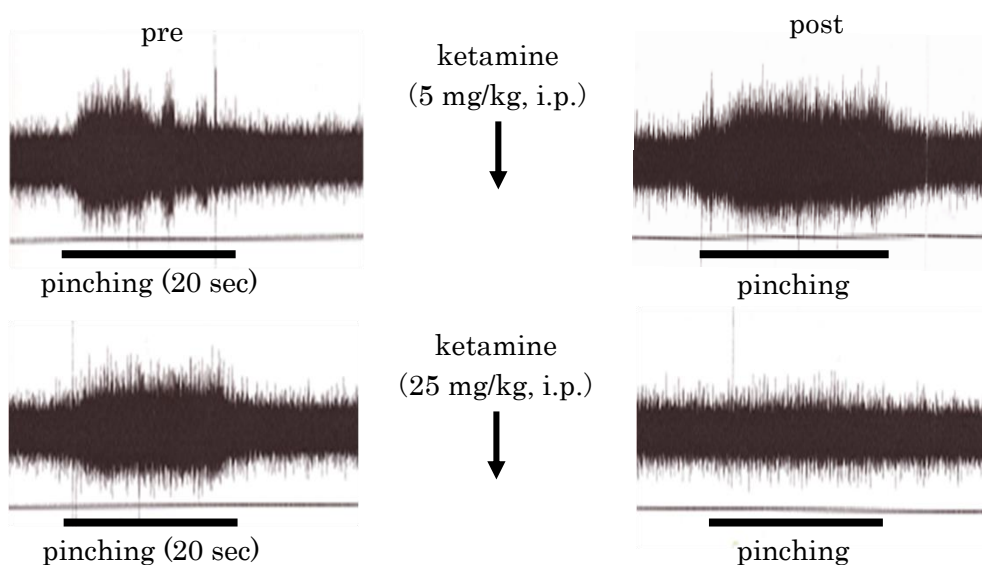


Fig. 18. Typical Recordings of PAG Neural Firing Induced by Nociceptive Stimuli before (pre) and after (post) Ketamine (5 or 25 mg/kg, i.p.) Administration under Anesthesia

2) mPFC の誘発集合電位に対するケタミンの影響

ウレタン (1 g/kg, i.p.) 麻酔下においてケタミン (1, 5 and 25 mg/kg, i.p.) は用量依存的に誘発集合電位を減弱させた. 投与 40 分間の AUC で表すと, ケタミンはコントロール群 (生理食塩水群) と比較し用量依存的に誘発集合電位を有意に抑制した. ケタミン (5 and 25 mg/kg, i.p.) による mPFC のシナプス抑制は覚醒下 (Fig. 14) とほぼ同程度であった. ケタミン (1 mg/kg, i.p.) では誘発集合電位の有意な抑制は認められなかった (Fig. 19).

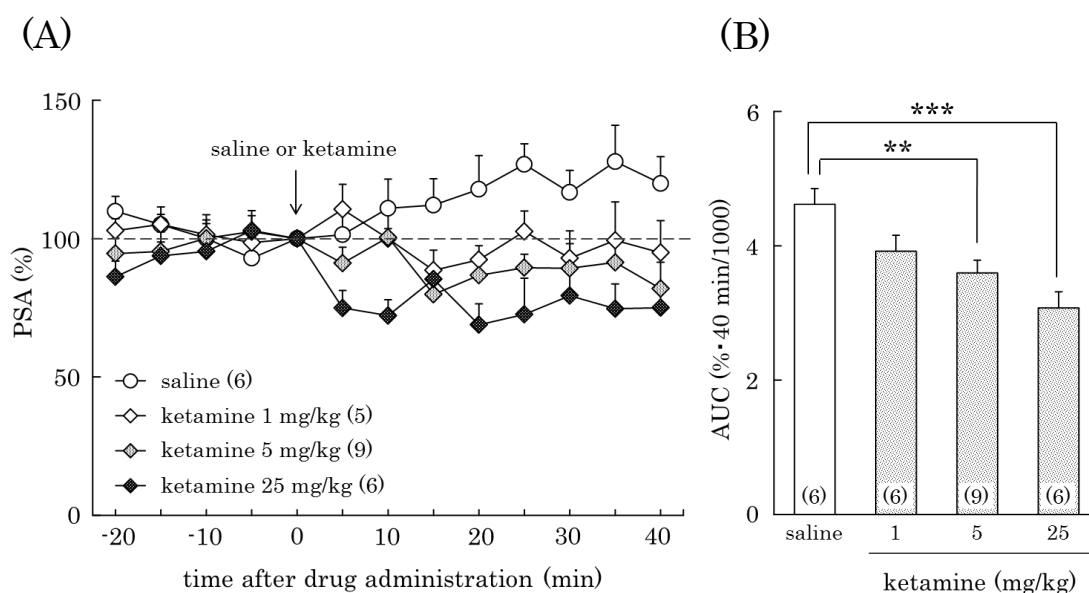


Fig. 19. Effects of Ketamine on Hippocampus-mPFC Synaptic Responses under Anesthesia

Figure shows the time-course of changes in the population spike amplitude (PSA) of mPFC responses following ketamine (5 and 25 mg/kg, i.p.) administration in anesthetized rats. Arrow indicates administration (i.p.) point. The right figure shows the areas under the curve (AUC) after ketamine administration. Data are expressed as the mean \pm SEM. The number of rats tested is shown in parentheses. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

4) mPFC の誘発集合電位に対する MK801 の影響

NMDA 受容体拮抗薬の MK801 (0.1 mg/kg, i.p.) は誘発集合電位を徐々に増強させた (Fig. 21B). AUC が示すように, MK801 投与群とコントロール群 (生理食塩水群) との間に有意な差がみられた (Fig. 21C).

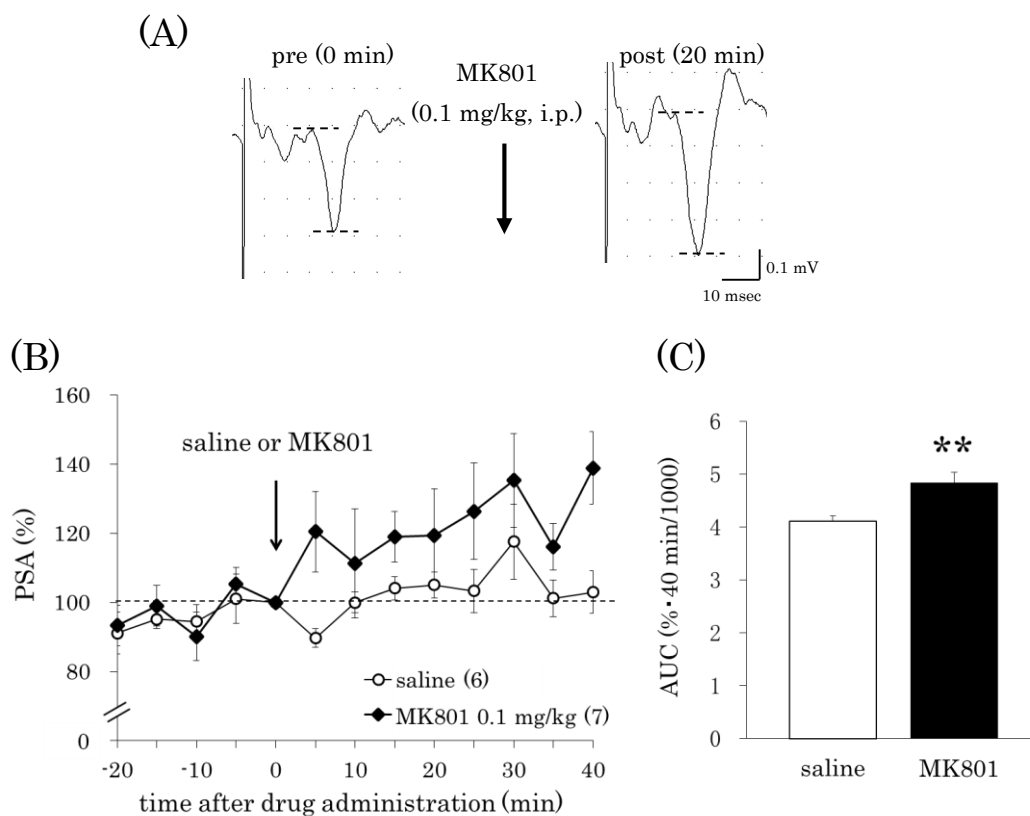


Fig. 21. Effects of MK801 on the Population Spike Amplitudes (PSA) in the mPFC under Anesthesia

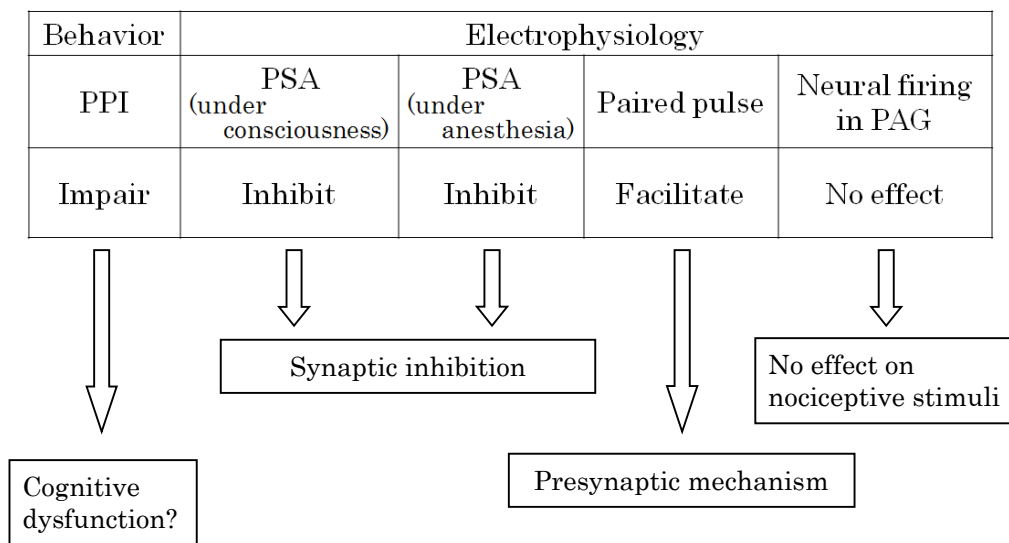
Specimen recordings (A), time course responses (B) and area under the curves (AUC) (C) of the PSA after MK801 (0.1 mg/kg, i.p.), respectively. Data are expressed as mean \pm SEM.

The number of rats tested are shown in parentheses. ** $p < 0.01$ vs. saline groups.

第4項 考察

ケタミン (5 mg/kg, i.p.) の麻酔作用, 鎮痛作用を視野に入れて行った行動ならびに電気生理学的実験結果を Table 5 にまとめた.

Table 5. Summary of Frontocortical Effects of Ketamine (5 mg/kg, i.p.) Evaluated by Behavioral and Electrophysiological Responses



ケタミン (25 mg/kg, i.p.) は侵害刺激による PAG の神経発火増強を抑制した. 下行性痛覚抑制系の最上位に位置する PAG は, 侵害刺激応答の調節に重要な部位であり, オピオイド系鎮痛薬の作用部位の一つでもある. 痛みは侵害受容性痛, 神経因性痛, 心因性痛に分けられ, ケタミンは神経因性痛に有効であると言われている. 本研究でみられたケタミンの侵害刺激抑制効果と, 神経因性痛あるいは臨床用量との関連性については, 本結果だけで十分に議論できない. しかし, 少なくとも PPI の障害を示したケタミン (5 mg/kg, i.p.) は, PAG の侵害刺激応答には影響を及ぼさないことが明らかとなった.

麻酔下においてケタミン (5 and 25 mg/kg, i.p.) は覚醒下と同程度にシナプス伝達を抑制した. この事実から, ウレタン麻酔は, ケタミンのシナプス応答に影響を与えないことが示唆された. しかし, ケタミンの麻酔効果はハロタンやジアゼパムによって変化することが報告されている.⁵⁴⁾ sub-anesthetic dose

である中等量 (25 mg/kg, i.p.) あるいは麻酔量 (100 mg/kg, i.p.) でみられたケタミンのシナプス伝達抑制が、ウレタン麻酔の影響を受けるか否かは、本実験からは明らかにすることが出来なかった。

前述した通り、ケタミン (5 mg/kg, i.p.) は PPI を障害する。したがって麻酔作用および鎮痛作用を有しない低用量のケタミンが示したシナプス伝達抑制は、PPI の障害と関連性する可能性がある。ケタミンに比べ選択性の高い NMDA 受容体拮抗薬である MK801 は、今回 mPFC のシナプス伝達を促進した。これは MK801 が mPFC の神経発火を促進した報告^{51, 53)} と矛盾しない。しかしながら、MK801 は海馬 CA1 のシナプス応答を促進する⁵⁷⁾ ため、フェンシクリジン同様、海馬 CA1 領域を興奮させることにより、mPFC のシナプス伝達を促進しているのかもしれない。今回、基礎的検討により、ケタミン (5 mg/kg, i.p.) は mPFC の細胞間隙中グルタミン酸遊離量を減少させることを確認している (データ未掲載)。一方、MK801 (0.1 mg/kg, i.p.) はグルタミン酸遊離量に影響をおよぼさなかった。これらの事実は、ケタミンは MK801 の作用部位と異なり、mPFC のグルタミン酸神経に作用しシナプス伝達を抑制する可能性がある。この可能性はケタミン (5 mg/kg, i.p.) が長期増強形成を抑制することからも支持される。言い換えると、ケタミンによる mPFC のシナプス伝達抑制機構と PPI の障害との関連性を強く示唆するものである。

長期増強は海馬においては記憶・学習の電気生理学的現象として知られているが、mPFC の長期増強形成も抗うつ薬長期投与や、非定型抗精神病薬により増強すること^{29, 30)} や、消去記憶の形成に関わること^{31, 32, 58)} などが報告されている。これらの研究結果から、mPFC の長期増強抑制はおそらく「hypofrontality」の電気生理学的現象を現していると推測される。すなわち麻酔作用あるいは鎮痛作用を示さない低用量のケタミンによる、可塑性を含むシナプス伝達の抑制が、認知機能障害と関連していると考えられた。

第4節 ケタミンの mPFC シナプス伝達抑制に関する神経薬理的検討

第1項 目的

統合失調症の病因には、従来のドパミン神経機能異常説、グルタミン酸神経機能低下説に加え、抑制性介在ニューロンである GABA 神経によるグルタミン酸神経調節機能不全が推察されている。^{16, 17)} 例えば、Tanaka ら⁵⁹⁾ は、抑制性 GABA 神経の調節機能不全が統合失調症の認知機能障害に関連している可能性を示唆している。実際 MK801 は、mPFC の GABA 神経を抑制（脱抑制）することにより、mPFC のシナプス応答を促進していると考えられている。⁵²⁾ 海馬-皮質神経回路のグルタミン酸神経を介したシナプス伝達には、GABA 神経のみならず、ドパミンやセロトニン神経を介した調節機構の関与が報告されている。特に、VTA から投射しているドパミン神経は、海馬 CA1-皮質神経回路の長期増強形成に関わっていると考えられている。²⁹⁾ ケタミンは、NMDA 受容体拮抗作用を有するが、ドパミンやセロトニンあるいはオピオイド受容体にも親和性を示すことが報告されている。^{60, 61)}

本章では、ケタミン (5 mg/kg, i.p.) でみられた mPFC のシナプス伝達抑制機構を解明するため、GABA およびドパミン神経との関連性に焦点を当て、神経薬理的に追究した。この目的のため、GABA_A 受容体拮抗薬を用い、ケタミンによるシナプス抑制機構に GABA 神経が関わっているか否かを検討した。またドパミン神経毒である 6-ヒドロキシドパミン (6-hydroxydopamine: 6-OHDA) を前処置し、mPFC のドパミン神経を破壊した際のケタミンによるシナプス応答を検討した。さらに、ドパミン D₁ および D₂ 受容体拮抗薬を用いて、ケタミンによるシナプス伝達抑制に関与しているドパミン受容体を追究し、認知機能障害との関連性について考察した。

第2項 方法

1) 使用動物

第2章 第1節 第2項 1) に準じた。

2) 使用薬物ならびに実験プロトコール

GABA_A受容体拮抗薬のビククリン (Bicuculline: TOCRIS, Bristol, UK) は人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid: aCSF, 2.7 mM KCl, 140 mM NaCl, 0.3 mM NaH₂PO₄, 1.7 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM CaCl₂·2H₂O, 1 mM MgCl₂·6H₂O, pH 7.2) に溶解し, 投与量が 0.2 μg/4 μl/rat になるように調製した。ドパミン神経毒の6-ヒドロキシドパミン (6-OHDA: シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社, 東京, 日本) は 0.1% ascorbic acid/saline に溶解し, 投与量が 150 μg/5 μl/rat になるように調整した。ドパミン D₁ 受容体拮抗薬の SCH23390 (シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社, 東京, 日本) およびドパミン D₂ 受容体拮抗薬のハロペリドール (Haloperidol: 和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) は 0.9%生理食塩水に溶解し, 投与量がそれぞれ 10 μg/4 μl/rat および 1.5 mg/2 ml/kg になるように調製した。薬物は冷所で遮光保存し, 常温に戻してから投与した。実験プロトコールは Fig. 22 に図示した。

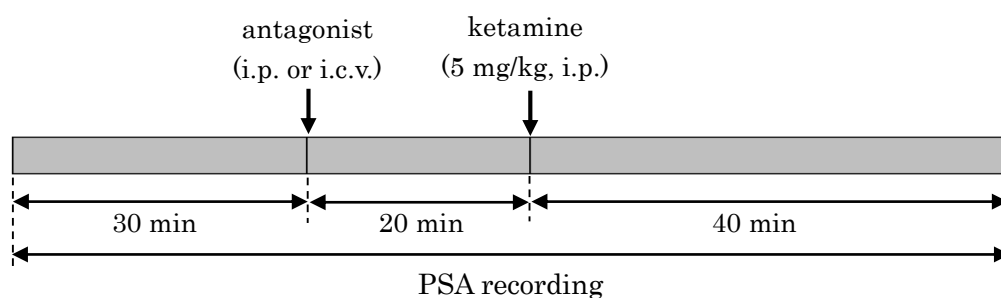


Fig. 22. Experimental Protocol with and without Antagonists under Anesthesia

3) 6-OHDA 前処置

ペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下で脳定位固定装置 (株式会社成茂科学器械研究所, 東京, 日本) にラットを固定し, 頭皮を正中切開した。脳アトラス⁵⁵⁾ に従い右半球の側脳室投与部位 (P: 0.8 mm, L: +1.6 mm) に齒科

用ドリルで小孔を開けた。6-OHDA (150 µg/rat) は側脳室 (P: 0.8 mm, L: +1.6 mm, V: 3.3 mm) に 30G の注射針を挿入し、インフュージョンポンプ (EP-50, 株式会社 エイコム, 東京, 日本) を用いて 1 µl/min の流速で 5 分間側脳室投与 (i.c.v.; 5 µl/rat) した。投与後, 5 分間放置してから注射針を抜き, 逆流がないことを確認してからビスで小孔をふさいだ。6-OHDA 投与 10 分前にモノアミン酸化酵素 (monoamine oxidase: MAO) 阻害薬のパージリン (25 mg/kg) を腹腔内投与した。溶媒 (0.1% ascorbic acid/saline) を側脳室投与した群を偽手術 (Sham) 群とした。6-OHDA 処置ならびに偽手術群はホームケージで 2 週間飼育した後, 電気生理学的実験に供した。実験終了後に脳を摘出し, 皮質, 線条体, 海馬に分画し, 液体窒素で凍結した後, -80°Cにて冷凍保存した。常法に従い, ⁶²⁾ ドパミンならびに代謝産物の DOPAC および HVA 濃度を, 高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) 付き電気化学検出器 (electrochemical detector: ECD) にて測定して, ドパミン神経が障害されているか否かを確認した。またセロトニンとその代謝産物の 5-HIAA (5-hydroxyindole acetic acid) 含量も同時測定した。

4) 電気生理学的ならびに神経薬理学的手法

第 2 章 第 2 節 第 2 項 3) に準じて麻醉下にて, 刺激電極を海馬 CA1 領域に, 記録電極を mPFC に挿入し, 誘発集合電位を計測した。6-OHDA (150 µg/rat, i.c.v.) 前処置ラットを用い, ケタミン (5 mg/kg, i.p.) による誘発集合電位の変動を検討した。GABA_A 受容体拮抗薬のビククリン (0.2 µg/rat, i.c.v.), ドパミン D₁ 受容体拮抗薬の SCH23390 (10 µg/rat, i.c.v.) ならびにドパミン D₂ 受容体拮抗薬のハロペリドール (1.5 mg/kg, i.p.) は, それぞれケタミン (5 mg/kg, i.p.) 投与 20 分前に, 側脳室内あるいは腹腔内投与した。人工脳脊髄液 (2.7 mM KCl, 140 mM NaCl, 0.3 mM NaH₂PO₄, 1.7 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM CaCl₂·2H₂O, 1 mM MgCl₂·6H₂O, pH 7.2) を側脳室投与した群または 0.9%生理食塩水を腹腔内投与した群をコントロール群とした。

側脳室内投与は, まず電極挿入前に, 脳アトラス ⁵⁵⁾ に従い側脳室投与部位 (P: 0.8 mm, L: +1.6 mm) に歯科用ドリル (ANS 3000, マリーノテクニクサプライ, 埼玉, 日本) で小孔を開け, ガイドカニューレ (AG-4, 株式会社 エイ

コム, 東京, 日本) を側脳室 (P: 0.8 mm, L: +1.6 mm, V: 3.3 mm) に挿入し超
速硬常温重合レジン (GC UNIFAS II, 株式会社ジーシー, 東京, 日本) を用い
て固定した. インジェクションカニューレ (A-I-4-02, 株式会社 エイコム, 東
京, 日本) の先端の膜部分を切断したものを挿入し, 薬物をインフュージョン
ポンプ (EP-50, 株式会社 エイコム, 東京, 日本) を用いて 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で
4 分間投与 (4 $\mu\text{l}/\text{rat}$) した. インジェクションカニューレは, 薬物投与後 5 分
間, 静置してから抜いた.

5) 脳内微小灌流法を用いた mPFC 細胞外液中ドパミン濃度測定

ウレタン (1 g/kg, i.p.) 麻酔下で実験を行った. 剃毛後, 脳定位固定装置 (株
式会社 成茂科学器械研究所, 東京, 日本) にラットを固定し, 脳アトラスに従
い, mPFC (A: 3.3 mm, L: +0.8 mm, V: 1.0 mm) にマイクロダイアリス用ガ
イドカニューレ (AG-4, 株式会社 エイコム, 東京, 日本) を挿入し, 超速硬常
温重合レジン (GC UNIFAS II, 株式会社ジーシー, 東京, 日本) を用いて固定
した. ガイドカニューレを介して, mPFC にマイクロダイアリス用プローブ
(A-I-4-02, 株式会社 エイコム, 東京, 日本) を挿入した. ガスタイトシリンジ
(#1002, Hamilton Corporation, Nevada, USA) に充填した人工脳脊髄液 (2.7
mM KCl, 140 mM NaCl, 0.3 mM NaH_2PO_4 , 1.7 mM Na_2HPO_4 , 1.2 mM
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 7.2) をシリンジポンプ (ESP-64, 株
式会社 エイコム, 東京, 日本) を用いて, 流速 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ で灌流した.

得られた透析液から, 高速液体クロマトグラフィーを用いドパミン濃度を測
定した. 脳内微小透析自動システム HTEC-3000MAD (株式会社 エイコム, 東
京, 日本) ならびに微小生体試料分析システム HTEC-300, マイクロシリンジ
ポンプ ESP-64, オートインジェクター ESA-20, データ処理装置 EPC-500,
マイクロダイアリスシーベルユニット TSU-20C を用いた. 分離カラムには
EICOMPAC CAX (2.0 mm i.d. \times 200 mm) を用いた. 移動相は 30%メタノー
ル, 5 mg/l EDTA \cdot 2Na (ethylenediammine-N,N,N',N'-tetraacetic acid) を含
有する 0.1 mol/l 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) を用い, 流速 250 $\mu\text{l}/\text{min}$
とした. また, カラム温度 35°C, 加電圧 +450 mV vs Ag/AgCl (参照電極) に
設定した.

ドパミンの基礎遊離量が安定した後 20 分間隔でサンプリングを開始し、40 分後にケタミン投与を行い、その後 80 分間測定した。

6) 統計処理

第 2 章 第 3 節 第 2 項 4) に準じた。

第3項 結果

1) ケタミンのシナプス応答におよぼす GABA_A 受容体拮抗薬の影響

ケタミン (5 mg/kg, i.p.) でみられた誘発集合電位の減弱は, GABA_A 受容体拮抗薬のビククリン (0.2 μg/rat, i.c.v.) 前投与により有意に抑制された (Fig. 23). ビククリン (0.2 μg/rat, i.c.v.) 単独投与では誘発集合電位に影響をおよぼさなかった (AUC (%・min/1000): 3.86 ± 0.40, n=6).

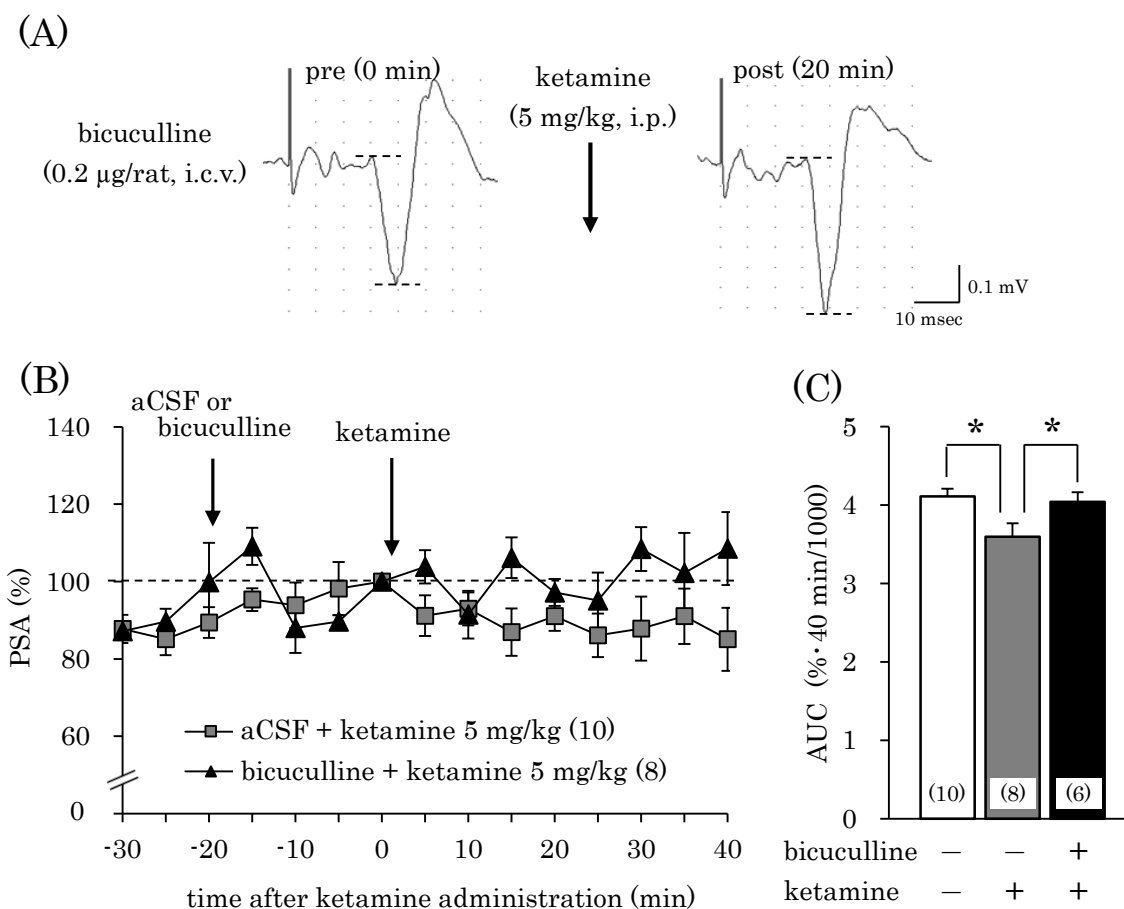


Fig. 23. Effect of GABA_A Receptor Antagonist on Ketamine-induced Synaptic Inhibition in the Rat mPFC

Specimen recordings (A), time course responses (B) and area under the curves (AUC) (C) of the population spike amplitudes (PSA) after ketamine (5 mg/kg, i.p.) with or without bicuculline (0.2 μg/rat, i.c.v.). Data are expressed as mean ± SEM.

The number of rats tested are shown in parentheses. *p < 0.05.

2) 6-OHDA 前処置ラットにおけるケタミンのシナプス応答

6-OHDA 前処置ラットの皮質ドパミン, DOPAC ならびに HVA 含量は Sham 群に比べ, 著しく減少していた. 一方, セロトニンならびに 5-HIAA 含量は, 6-OHDA 前処置の影響を受けなかった (Table 6). ケタミン (5 mg/kg, i.p.) でみられた誘発集合電位の抑制は, 6-OHDA (150 µg/rat, i.c.v.) 前処置ラットでは消失した (Fig. 24).

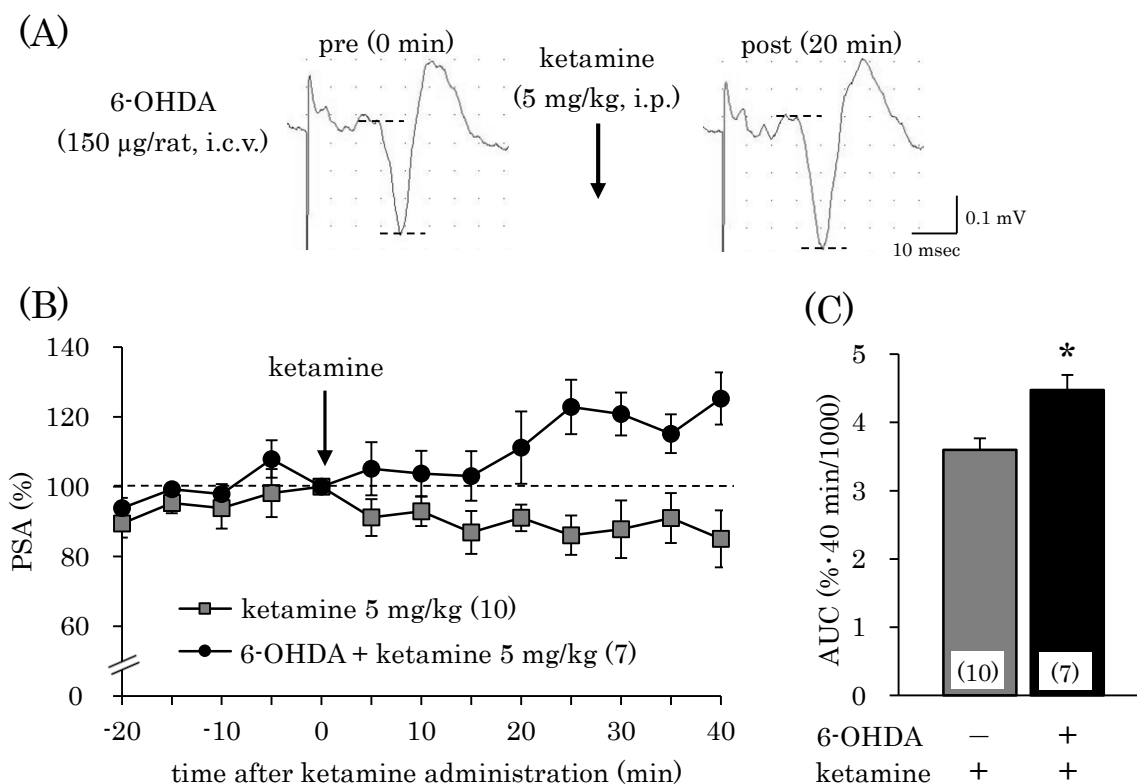


Fig. 24. Effects of Pretreatment with 6-OHDA on Ketamine-induced Synaptic Inhibition in the Rat mPFC

Specimen recordings (A), time course responses (B) and area under the curves (AUC) (C) of the population spike amplitudes (PSA) after ketamine (5 mg/kg, i.p.) in 6-OHDA lesioned rats. Data are expressed as mean \pm SEM. The number of rats tested are shown in parentheses. * $p < 0.05$ vs. ketamine in intact rats.

Table 6. Cortical Contents of DA, 5-HT and Their Metabolites in 6-OHDA Lesioned Rats

	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
Sham (3)	957 \pm 95	132 \pm 7	96 \pm 6	654 \pm 52	527 \pm 46
6-OHDA (10)	91 \pm 30 *	15 \pm 4 *	13 \pm 3 *	569 \pm 28	440 \pm 37

(pg/mg wet weight)
mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Sham

3) ケタミンのシナプス応答におよぼすドパミン D₁ ならびに D₂ 受容体拮抗薬の影響

ケタミン (5 mg/kg, i.p.) による誘発集合電位の減弱は, ドパミン D₁ 受容体拮抗薬の SCH23390 (10 μg/rat, i.c.v.) 前投与により有意に抑制された (Fig. 25).

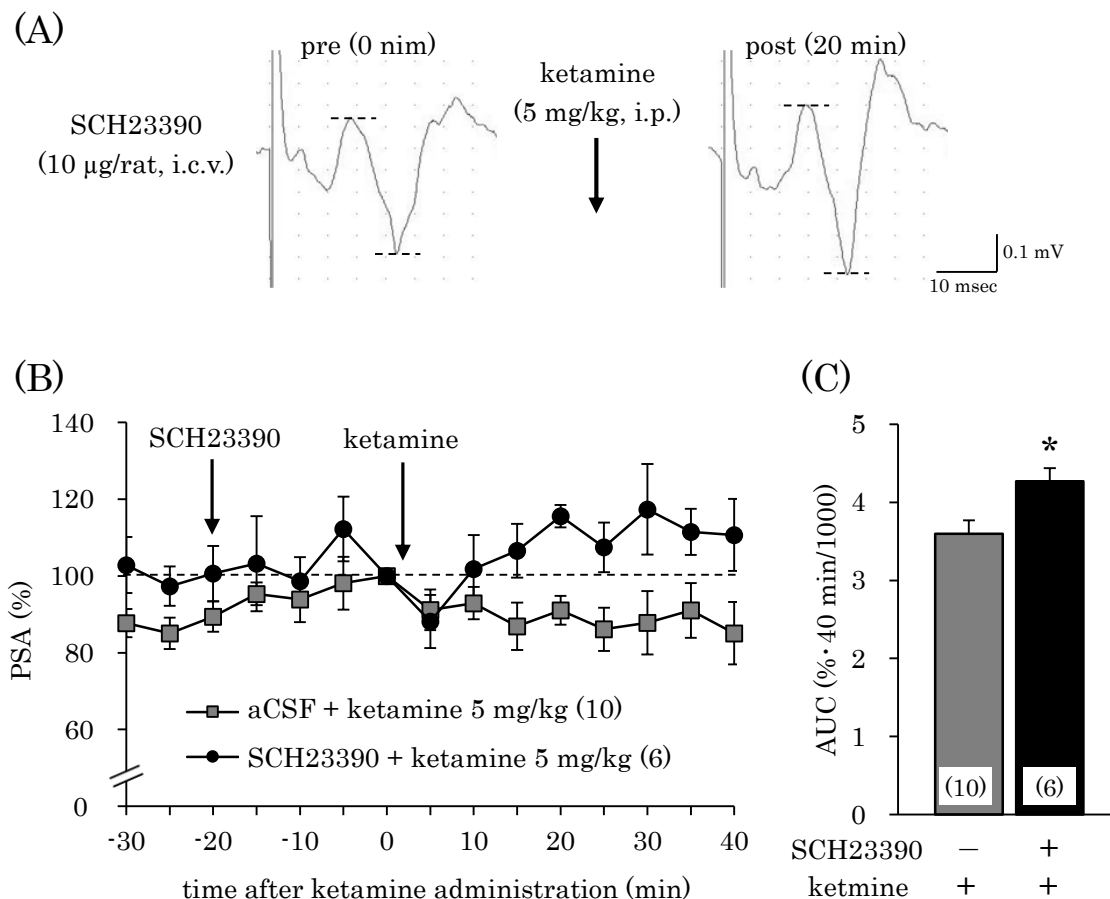


Fig. 25. Effects of D₁ Receptor Antagonist on Ketamine-induced Synaptic Inhibition in the Rat mPFC

Specimen recordings (A), time course responses (B) and area under the curves (AUC) (C) of the population spike amplitudes (PSA) after ketamine (5 mg/kg, i.p.) with or without SCH23390 (10 μg/rat, i.c.v.). Data are expressed as mean ± SEM.

The number of rats tested are shown in parentheses. *p < 0.05.

一方、ドパミン D₂ 受容体拮抗薬のハロペリドール (1.5 mg/kg, i.p.) はケタミン (5 mg/kg, i.p.) による誘発集合電位の抑制に影響を与えなかった (Fig. 26). SCH23390 (10 μg/rat, i.c.v.) (AUC (%・min/1000): 4.04±0.28, n=4) およびハロペリドール (1.5 mg/kg, i.p.) (AUC (%・min/1000): 4.21±0.20, n=4) 単独投与による誘発集合電位への影響はみられなかった。

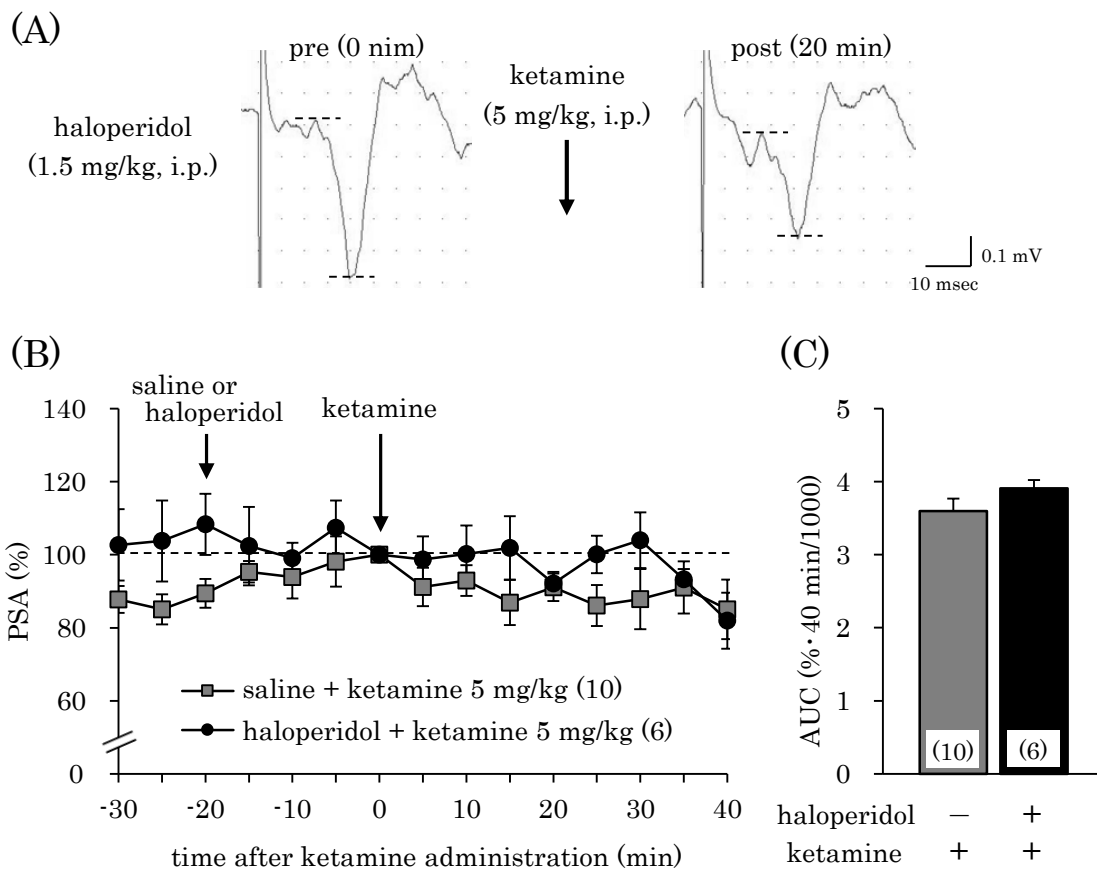


Fig. 26. Effect of D₂ Receptor Antagonist Haloperidol on Ketamine-induced Synaptic Inhibition in the Rat mPFC

Specimen recordings (A), time course responses (B) and area under the curves (AUC) (C) of the population spike amplitudes (PSA) after ketamine (5 mg/kg, i.p.) with or without haloperidol (1.5 mg/kg, i.p.). Data are expressed as mean ± SEM.

The number of rats tested are shown in parentheses.

4) ケタミンによる mPFC 細胞外液中のドパミン濃度変化

ケタミン (5 and 25 mg/kg, i.p.) により, mPFC での細胞外液中のドパミン濃度は有意に増加し, その反応には用量依存性がみとめられた (Fig. 27).

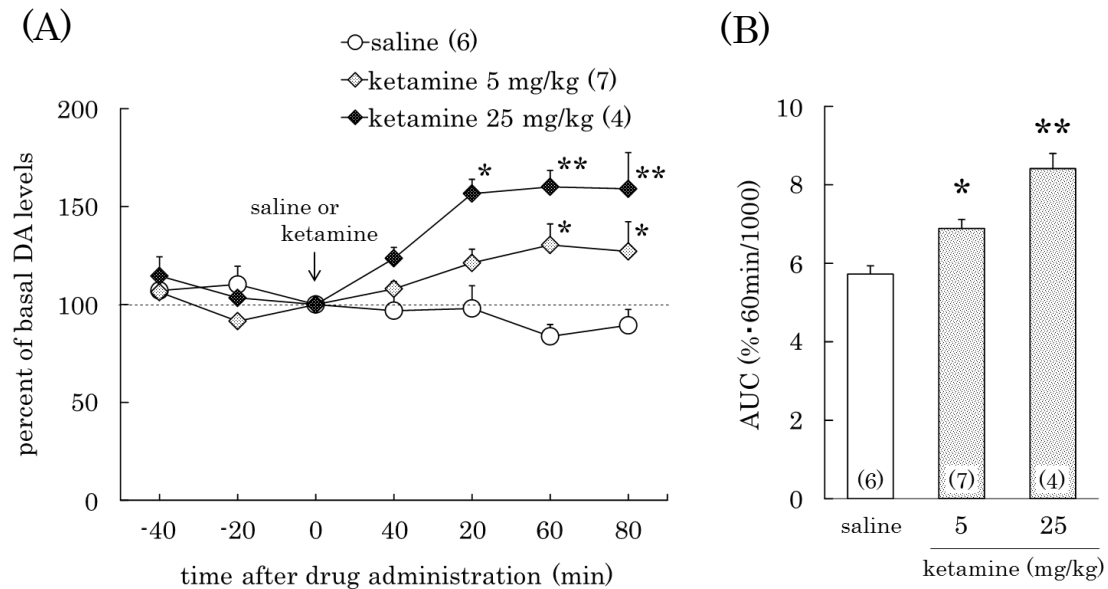


Fig. 27. Effects of ketamine on extracellular dopamine (DA) levels in the medial prefrontal cortex under anesthesia

Time-course changes (A) and area under the curve (AUC) (B) calculated 60 min after administration. Each value represents the mean \pm SEM. Numbers of animals tested are indicated in parentheses. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ vs. saline groups.

第4項 考察

本節では、統合失調症の認知機能障害と GABA 神経の調節機能不全との関連性に焦点を当て、ケタミン (5 mg/kg, i.p.) のシナプス伝達調節機構に GABA あるいはドパミン神経系が関与しているか否かについて神経薬理的に検討した。GABA_A 受容体拮抗薬のビククリン前投与により、ケタミンのシナプス伝達抑制作用が減弱された結果から、GABA_A 受容体がケタミンのシナプス応答に関与していることが示唆された。すなわち、ケタミンによる海馬 CA1 - mPFC 神経回路のシナプス伝達抑制は、GABA_A 受容体を介していると考えられた。

一方、ケタミンのシナプス伝達抑制は、ドパミン神経毒の 6-OHDA 前処置により消失したことから、ドパミン神経系が重要な役割を担っていると考えられた。興味深いことに 6-OHDA 前処置群では、ケタミン投与によりシナプス伝達効率はむしろ増強する。すなわち mPFC のドパミン神経活動が低下している際には、ケタミンのシナプス応答は、MK801 と同様にシナプス伝達を促進する方向に転じた。ケタミンは、NMDA 受容体のみならずドパミン受容体刺激作用を示すことが報告されている。⁶¹⁾ また、mPFC の細胞外液中ドパミン濃度はケタミン (5 mg/kg, i.p.) により有意に増加した。したがって、未処置ラットでみられたケタミンと MK801 のシナプス応答の違いは、ドパミン神経あるいはドパミン受容体を介した調節機構における両薬物の作用の違いを反映しているのかもしれない。

ケタミンのシナプス伝達抑制は、ドパミン D₁ 受容体拮抗薬による前処置で消失した。一方ドパミン D₂ 受容体拮抗薬による影響はみられなかった。これらの結果から、ケタミンはドパミン D₁ 受容体を介して、シナプス伝達を抑制していることが明らかになった。皮質前頭前野のドパミン D₁ 受容体は認知機能に関与していると考えられている。^{29, 63)} 例えば、統合失調症患者の認知機能障害を改善する非定型抗精神病薬のクロザピンはドパミン D₁ 受容体拮抗作用により長期増強形成を増強する。²⁹⁾ 一方、ドパミン D₁ 受容体は長期増強形成抑制にも関わっている。例えばメタンフェタミンを反復投与すると、長期増強形成抑制がみられ、この抑制はドパミン D₁ 受容体拮抗薬で回復する。⁶⁴⁾ このように、mPFC におけるシナプス可塑性の形成は、ドパミン神経活動が低下

あるいは過亢進しても抑制される,いわゆる **Bell-shape** を示すことが知られており, このシナプス応答にはドパミン D₂ 受容体ではなく, ドパミン D₁ 受容体が関与していると考えられている.⁶⁵⁾ ケタミンによる長期増強形成抑制が, ドパミン D₁ 受容体を介しているか否かは, 今回明らかにできなかったが, 興味深い課題である. もし, ケタミンによる長期増強抑制が, ドパミン D₁ 受容体拮抗薬で回復するならば, すなわち長期増強が形成されるならば, ケタミンによるドパミン神経活動亢進状態 (mPFC の細胞外液中ドパミン遊離量促進により推測される) では, ドパミン D₁ 受容体を介して長期増強が抑制されるという仮説を支持することになるかもしれない.

以上の結果を Table 7 にまとめた. ケタミンは PPI を障害する用量 (5 mg/kg, i.p.) で, 海馬 CA1-mPFC 神経回路のシナプス可塑性を含むシナプス伝達を抑制した. このシナプス伝達の抑制には GABA_A 受容体を介した GABA 神経ならびにドパミン D₁ 受容体を介したドパミン神経調節機構が関与していることが示唆された. また, ケタミン (5 mg/kg, i.p.) は paired pulse 応答を促進したこと, および mPFC のグルタミン酸濃度を低下させたこと (データ未掲載) を考え合わせると, ケタミンはプレシナプス調節機構を介して, mPFC のシナプス伝達を抑制していると考えられた.

Table 7. Summary of Behavioral, Electrophysiological and Neuropharmacological Effects of Ketamine

Behavior	Electrophysiology		
PPI	PSA	Paired pulse	LTP
Impair (5 and 25 mg/kg)	Inhibit (5-100 mg/kg)	Facilitate (1 and 5 mg/kg)	Inhibit (5 mg/kg)

	Neuropharmacology			
	GABA _A receptor antagonist	DA neurotoxin	D ₁ receptor antagonist	D ₂ receptor antagonist
Ketamine-induced synaptic inhibition	Inhibit	Inhibit	Inhibit	No effect

ケタミンは GABA_A 受容体あるいはドパミン D₁ 受容体を介し、どのような機序で海馬 CA1-mPFC のシナプス伝達を抑制するのだろうか. フェンシクリジンや MK801 を用いた多くの研究から, NMDA 受容体を介した GABA 神経調節機構が皮質に存在していることが示唆されている. 17, 52, 59, 66) したがって, ケタミンは, フェンシクリジンや MK801 と同様, GABA 神経活動を抑制 (脱抑制) している可能性も否定できない. しかし, ケタミンのシナプス伝達抑制機構にはドパミン神経系が関与しているため, ドパミン D₁ 受容体を介した調節が, NMDA 受容体遮断による GABA 神経による抑制性調節を凌駕しているのかもしれない. 最近, *double in situ hybridization* を用いた分子生物学的手法により, PFC の錐体細胞あるいは GABA 神経にはドパミン D₂ 受容体よりドパミン D₁ 受容体が多く存在していることが明らかになった. 67) また多くの研究は, ドパミン D₁ 受容体を介した GABA 神経活動の調節機構が皮質に存在していることを明らかにしている. 57, 68-71) 例えば Seemans ら 70) は, ドパミン D₁ 受容体作動薬は皮質錐体細胞の GABA 神経活動を刺激し, 抑制性シナプス後電位 (IPSC) の促進を引き起こすことを示している. このような文献的考察を踏まえ, 以下の作業仮説を立てた (Fig. 28). 低用量のケタミン (5 mg/kg, i.p.) は VTA から投射しているドパミン神経活動を亢進し, ドパミン D₁ 受容体を介して介在ニューロンである GABA 神経を興奮させ, プレシナプス調節機構によりグルタミン酸作動性神経の活動を抑制することによって, 結果的に mPFC のシナプス伝達を抑制する. これに加えて, 高用量のケタミンは, ポストシナプスの NMDA 受容体を遮断することにより, グルタミン酸作動性神経活動を抑制し, mPFC のシナプス伝達を抑制すると考えられる.

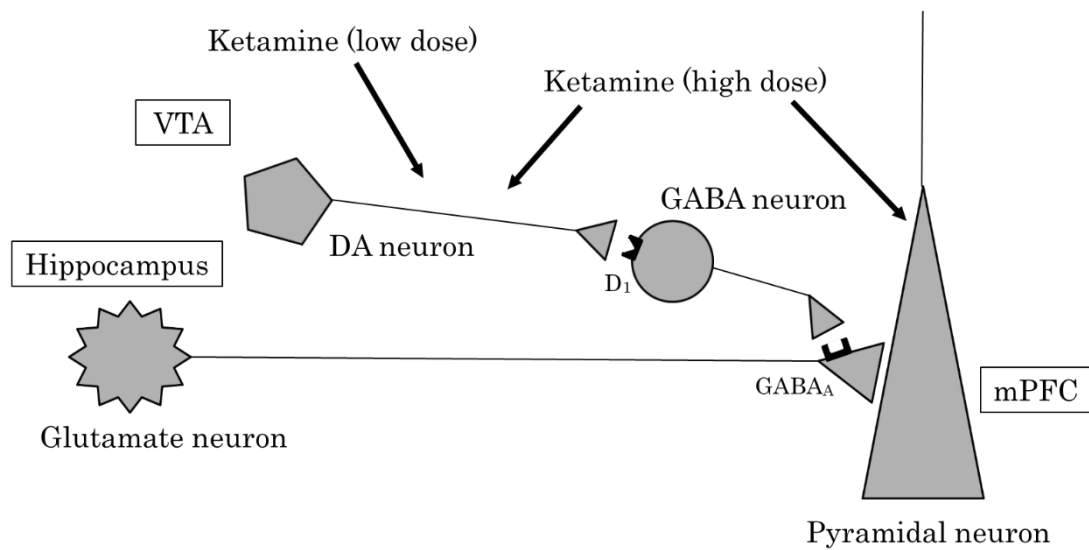


Fig. 28. Hypothesis of Ketamine-induced Synaptic Inhibition in the Rat Hippocampal-mPFC Pathway

ケタミンが示す多様な薬理作用は、投与量によって関与する責任受容体あるいは作用部位の違いから説明できる可能性がある。言い換えれば、ドパミン-GABA-グルタミン酸神経相互調節のインバランスが、認知機能障害と関連しているのかもしれない。したがって、mPFCにおけるケタミンのシナプス伝達調節機構を明らかにすることは、認知機能障害の神経科学的基盤の解明のみならず、がん性痛治療における鎮痛補助薬としてのケタミンの有効性を理解する上でも、意義があるものと思われる。

第3章 ラット侵害刺激応答及び皮質機能に対する

ケタミン及びモルヒネ併用投与の影響

第1節 侵害刺激応答に対する影響

第1項 目的

ケタミンは、がん性痛を有する患者に鎮痛補助薬としてオピオイドと併用して用いられている。ケタミンは麻酔量以下で鎮痛作用を示すことが知られており、鎮痛補助薬として用いる場合は麻酔作用を示さない低用量 (sub-anesthetic dose) で用いられる。さらに、ケタミンはオピオイドと併用することでオピオイドの投与量を減少させることができるとの臨床報告もあることから、オピオイドの鎮痛耐性に対して拮抗作用を有すると考えられている。市立札幌病院緩和ケアチームにおいても臨床的経験に基づき、ケタミンの鎮痛作用のみならず、オピオイド鎮痛耐性拮抗作用を期待して積極的に使用している。しかし、ケタミンの鎮痛補助薬としての有用性を示す大規模でエビデンスレベルの高い臨床報告は少なく、その投与方法は未だ確立していない。基礎的研究においても、ケタミンとオピオイドを併用した鎮痛効果に関する報告は少なく、その機序は明らかになっていない。

臨床的には、低用量のケタミンによる副作用がしばしば認められ、特に幻覚、悪夢といった中枢性の副作用が臨床的に問題となることがある。そのため、副作用リスクを軽減するためにも、用量設定を含めた投与方法の確立が強く求められている。前章の動物実験にて、麻酔作用を示さないケタミン (5 mg/kg i.p.) でも聴性驚愕反応試験におけるPPI及び皮質前頭前野シナプス伝達を抑制することが明らかとなった。この結果は臨床的知見とも一致するものである。一方、より低用量のケタミン (1 mg/kg, i.p.) は皮質機能に影響を与えないことも明らかとなった。

これらの結果を踏まえ、本章では、より低用量のケタミン (1 mg/kg, i.p.) をモルヒネに併用投与することによる侵害受容応答への影響について、行動学的小および免疫組織学的視点から検討した。

第2項 方法

1) 実験動物

第2章 第1節 第2項 1) に準じた。

2) 使用薬物

ケタミン及びモルヒネ（武田薬品工業株式会社，大阪，日本）は 0.9%生理食塩水（生理食塩水: saline）に溶解し，使用直前まで遮光保存した。ラットの体重 100 g 当たり 0.5 ml になるように溶液を調製し，腹腔内（intraperitoneally: i.p.）に投与した。コントロール群には同容量の溶媒（生理食塩水）を投与した。

3) 行動学的方法（熱板法）

動物を薬物投与 20 分後にアクリルで覆った $52 \pm 1^\circ\text{C}$ の熱板（直径 21cm，ステンレス製，株式会社 夏目製作所，東京，日本）の上に置き，疼痛回避行動の指標となる足舐め行動（Licking）または飛び上がり行動（Jumping）がみられるまでの反応潜時（Reaction latency）を記録した。組織の損傷を防ぐため Cut-off 値は 30 秒とした。

ケタミン（1, 5 and 25 mg/kg, i.p.）及びモルヒネ（0.2, 1 and 2 mg/kg, i.p.）単独投与の行動応答評価として，0.9%生理食塩水または薬物の腹腔内投与 20 分後に実験を行った。次に，ケタミン（1 mg/kg, i.p.）とモルヒネ（0.2, 1 and 2 mg/kg, i.p.）の併用投与の行動応答評価として，0.9%生理食塩水またはケタミン腹腔内投与直後に 0.9%生理食塩水またはモルヒネを腹腔内投与し 20 分後に同様に実験を行った。

4) 免疫組織学的染色

熱板法による足蹠熱性刺激 2 時間後，ラットをペントバルビタール（60 mg/kg, i.p. 大日本住友製薬株式会社，東京，日本）で麻酔した。その後，4%パラホルムアルデヒド（和光純薬工業株式会社，大阪，日本）含有 0.1 M リン酸緩衝液（PB; pH 7.2）を左心室から灌流し，脳を摘出した。一晩の後固定を行った後，30%スクロース含有 0.1 M PB に置換し，OCT compound（サクラファインテックジャパン株式会社，東京，日本）に包埋して， -80°C にて保存した。ク

リオスタット (HM 300, Leica, Germany) を用いて厚さ 30 μm の冠状断凍結切片を作成し, 0.01%アジ化ナトリウム和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) 含有 0.1M PB にて, 4°Cで保存した.

PAG を含む冠状切片を, 10%正常ロバ血清 (Jackson Immuno Research, USA) を含む界面活性剤 (Triton-X) 含有リン酸緩衝液生理食塩水 (PBST) 中で, 1 時間ブロッキング処理を施したのち, 1 次抗体を室温にて一晩反応させた. 1 次抗体は, ウサギ抗 c-Fos 抗体 (1:20,000; PC38T, Calbiochem) とマウス抗 NeuN 抗体 (1:2,000 MAB377, Chemicon) を用いた. PBST で洗浄後, 2 次抗体を室温にて遮光下で 1 時間反応させた. 2 次抗体として 1 次抗体に用いた動物種に特異的結合能をもつ Alexa Fluor 488-あるいは Alexa Fluor 555-conjugated antibody を 1:200 の希釈倍率で用いた. PBST で洗浄後, 切片をスライドガラスに貼り付け風乾させ, Vectorshield (Vector) を用いて封入した. 画像は共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, オリンパス株式会社, 東京, 日本) を用いて取得した.

5) c-Fos 陽性細胞の定量解析

免疫組織化学的染色により取得した画像をコンピュータに取り込み, 一定面積 (675 μm \times 675 μm) において, バックグラウンドよりも一定以上の信号強度を示す c-Fos 陽性細胞を, ImageJ (NIH) を用いて, 自動的にカウントした. PAG は bregma から尾側に 7.8 mm に位置する部位を中心として選択した. c-Fos 陽性細胞は, bregma から -7.8 mm の冠状断スライスを中心に前後 30 μm ごとに作成した切片の背内側 PAG (dorsomedial PAG: DMPAG), 背外側 PAG (dorsolateral: DLPAG), 外側 PAG (lateral PAG: LPAG), 及び腹外側 PAG (ventrolateral: VLPAG) の各部位においてそれぞれ 3 回行い, 平均値をその個体の値とした.

6) 統計処理

同一用量のモルヒネ単独投与と併用投与の比較には Student's unpaired T-test を用いた. それ以外は第 2 章 第 1 節 第 2 項 4) に準じた.

第3項 結果

1) 足蹠熱性刺激に対する行動応答に対する

ケタミン及びモルヒネ併用投与の影響

ケタミンは用量依存的に熱性刺激に対する反応潜時を延長させる傾向がみられた。ケタミン (25 mg/kg, i.p.)はコントロール群 (生理食塩水群)と比較して、反応潜時を有意に延長させた。しかし、ケタミン (1 and 5 mg/kg, i.p.) は反応潜時を延長させなかった (Fig. 29).

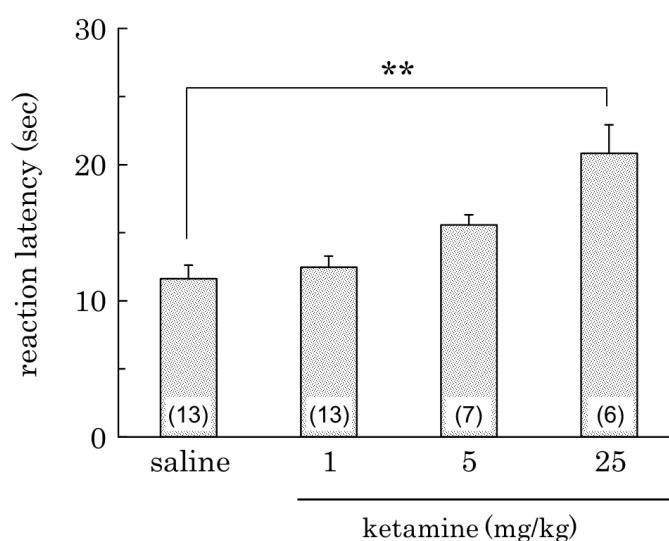


Fig. 29. Analgesic Activity of Ketamine

The analgesic dose of ketamine was determined in the hot plate test. At a dose of 25 mg/kg, but not 1 and 5 mg/kg, ketamine significantly increased reaction latency compared with the saline group. Data are expressed as mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. saline groups. The number of rats tested is shown in parentheses.

モルヒネは用量依存性に熱性刺激に対する反応潜時を延長した。

モルヒネ (1 and 2 mg/kg, i.p.) はコントロール群 (生理食塩水群)と比較して、有意に反応潜時を延長させた。モルヒネ (0.2 mg/kg, i.p.) は反応潜時を有意に延長しなかった (Fig. 30).

これまでの結果から、副作用リスクが少なく、鎮痛作用も示さない投与量すなわち無作用量のケタミン (1 mg/kg, i.p.) をモルヒネ (0.2, 1 and 2 mg/kg,

i.p.) と併用し、モルヒネの鎮痛効果への影響を検討した。ケタミン (1 mg/kg, i.p.) をモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) と併用すると、コントロール群 (ケタミン+生理食塩水群) と比較し有意に反応潜時を延長し、さらにはモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) 単独で投与した場合と比較しても有意な延長がみられた。モルヒネ (0.2 mg/kg, i.p.) に併用しても、コントロール群, モルヒネ (0.2 mg/kg, i.p.) 単独投与群いずれとも有意な延長はみられなかった。モルヒネ (2 mg/kg, i.p.) に併用すると、コントロール群 (ケタミン+生理食塩水群) と比較し有意な延長が認められたが、モルヒネ (2 mg/kg, i.p.) 単独投与群と比較して有意な延長は認められず、いずれの群も反応潜時は Cut-off 値 (30 sec) 付近まで延長していた。

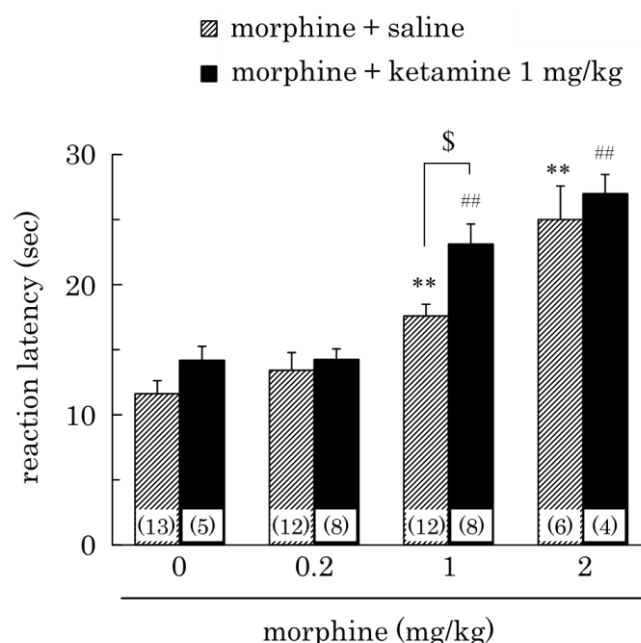


Fig. 30. Synergistic Effects of Ketamine and Morphine on the Analgesic Activity

The concomitant effects of ketamine and morphine were determined in the hot plate test. Coadministration of 1 and 2 mg/kg morphine with 1 mg/kg ketamine produced a significant increase in reaction latency compared with the saline group (* $p < 0.05$). Moreover, the morphine-induced analgesic effect was significantly enhanced by the subanalgesic dose of ketamine ($\$p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. saline groups. ## $p < 0.05$ vs. ketamine 1 mg/kg alone groups. $\$p < 0.05$ vs. morphine alone. The number of rats tested is shown in parentheses.

2) 足蹠熱性刺激に対する PAG での c-Fos 発現

熱性刺激を負荷しない状態での PAG 各部位の c-Fos 発現数 (cells/(675 μm)², n = 4)は以下の通りであった. DMPAG (27.8 \pm 1.4), DLPAG (52.0 \pm 3.1), LPAG (52.0 \pm 5.1), VLPAG (40.0 \pm 1.7). 熱性刺激負荷により誘発された c-Fos 発現数 (cells/(675 μm)², n = 4)はそれぞれ, DMPAG (28.0 \pm 2.2), DLPAG (50.8 \pm 4.1), LPAG (42.8 \pm 5.0), VLPAG (60.5 \pm 4.9)であり, VLPAG においてのみ有意な発現数増加が認められた ($F_{1,6} = 26.0$, **p<0.01) (Fig. 31).

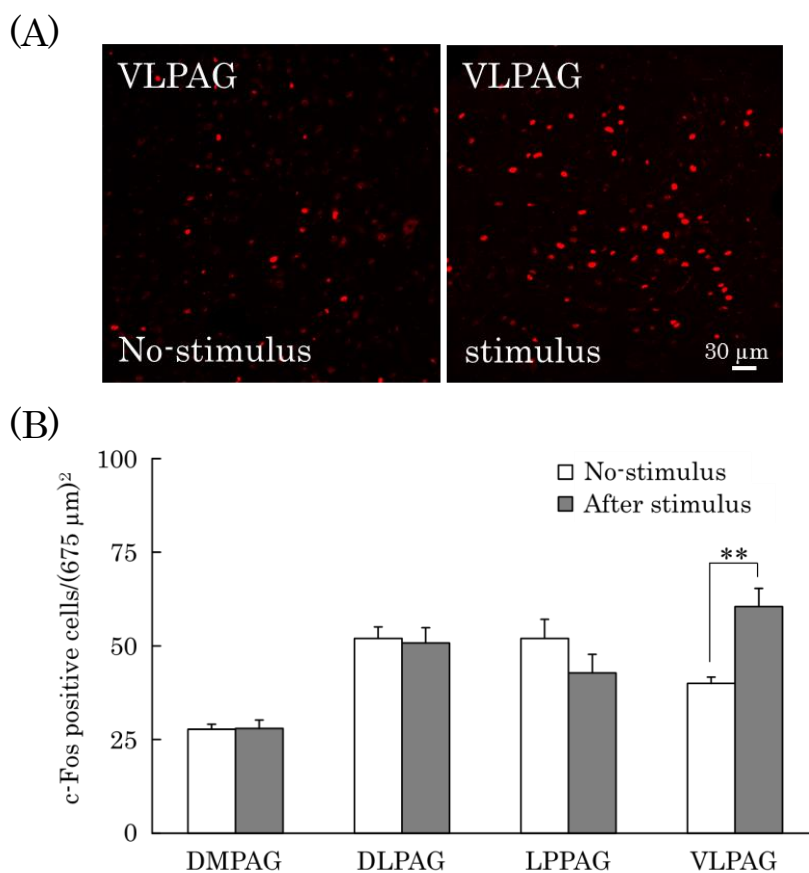


Fig. 31. c-Fos Expression Induced by Noxious Thermal Stimulus in the Periaqueductal Gray (PAG)

A, High-power photographs shows basal c-Fos expression of no-stimulus (left) and thermal stimulus-induced c-Fos expression (right) in the ventrolateral PAG (VLPAG). **B**, The number of thermal stimulus-induced c-Fos-positive neurons in the dorsomedial PAG (DMPAG), dorsolateral PAG (DLPAG), lateral PAG (LPAG), and VLPAG. The expression of c-Fos-positive neurons significantly increased in the VLPAG, but not DMPAG, DLPAG, and LPAG. Data are expressed as mean \pm SEM. *p<0.05 vs. nonstimulus groups (**B**). Bar, 30 μm .

3) 熱性刺激誘発 c-Fos 発現に対する

ケタミン及びモルヒネ併用投与の影響

VLPAG における熱性刺激誘発 c-Fos 発現数 (cells/(675 μ m)², n = 4) は以下の通りであった. 生理食塩水 + 生理食塩水 (60.5 \pm 4.9), ケタミン + 生理食塩水 (61.25 \pm 5.9), 生理食塩水 + モルヒネ (56.8 \pm 1.6), ケタミン + モルヒネ (34.5 \pm 4.7).

この VLPAG における c-Fos 発現数増大はケタミン (1 mg/kg, i.p.) ならびにモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) の併用投与により有意に抑制された ($F_{3, 12} = 2.0$, * $p < 0.05$). しかし, ケタミン (1 mg/kg, i.p.) またはモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) のそれぞれの単独投与では c-Fos 発現の抑制は認められなかった (Fig. 32).

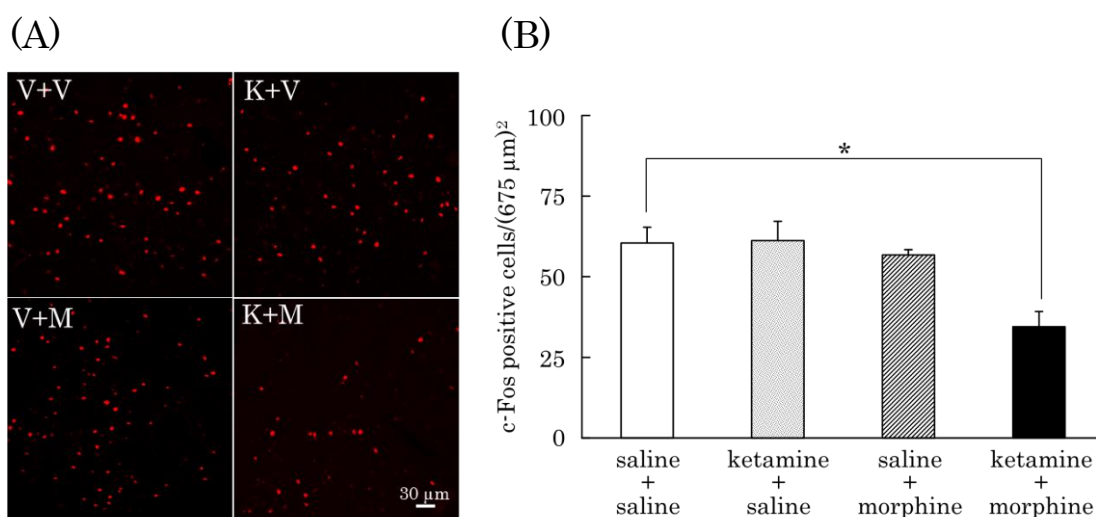


Fig. 32. Effects of Ketamine and/or Morphine on c-Fos Expression Induced by Noxious Thermal Stimulus in the Periaqueductal Gray (PAG)

A, High-power fluorescent photographs shows the effect of ketamine and/or morphine administration on thermal stimulus-induced c-Fos expression. Coadministration of ketamine (1 mg/kg) and morphine (1 mg/kg) suppressed c-Fos expression in the VLPAG.

B, The number of thermal stimulus-induced c-Fos-positive neurons after coadministration of ketamine and morphine in the VLPAG. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. saline + saline groups (**B**). Bar, 30 μ m.

第4項 考察

ケタミン (1 mg/kg, i.p.) は、生理食塩水 群と比較して熱板法における反応潜時に影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、前章にて、ケタミン (1 mg/kg, i.p.) は皮質機能に影響を及ぼさないことも明らかとなっている。一方、モルヒネ (1.0 and 2.0 mg/kg, i.p.) は熱板法における反応潜時を延長させた。これらの結果を踏まえ、単独では作用を示さない低用量のケタミン (1 mg/kg, i.p.) を、鎮痛効果を示す最少用量のモルヒネ (1.0 mg/kg, i.p.) に併用投与すると熱性刺激に対する鎮痛作用が増強した。この結果より、低用量のケタミンはモルヒネの鎮痛効果を増強することが示唆された。

モルヒネの鎮痛作用発現に重要な脳部位である PAG⁴⁾ は動物において、恐怖やストレス、痛みに対する行動応答や身体的反応、自律神経反応に重要な役割を担っている。⁷²⁾ 解剖学的に、PAG は背側、外側、腹側に分けられ、生理学的、行動学的にその機能が区別され、それぞれ神経経路も異なっている。⁷³⁾ たとえば、背側 PAG を刺激すると恐怖や不安を誘発や、血圧上昇、発声が見られる。これは感情に関連した反応である。一方、VLPAG を刺激すると痛みや Freezing を誘発する。⁷⁴⁾ 吻側延髄腹内側部 (rostral ventromedial medulla : RVM) に沿って下行性に投射している PAG は、オピオイドの鎮痛作用を介する解剖学的に重要な部位である。オピオイドは VLPAG に投与したときのみ抗侵害作用を示す。⁷⁵⁾ このことは VLPAG がオピオイドを介した鎮痛作用の調節に重要な部位であることを示している。本研究によって、熱性刺激が VLPAG での c-Fos 発現を誘発することが示され、それはケタミン (1 mg/kg, i.p.) とモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) の併用投与によって抑制されたことが明らかとなった。Fos ファミリーの転写因子の誘導は様々な刺激に対する神経の興奮の指標として広く用いられている。⁷⁶⁾ この c-Fos 発現は、VLPAG 活性化による神経調節機構が、モルヒネとケタミンの併用投与による相乗的な鎮痛効果の基盤であることを示している。

鎮痛補助薬としてモルヒネに併用した際のケタミンの神経学的機序や分子的機序は明らかになっていない。最近、PAG においてオピオイド μ 受容体が活性化することで、プロテインキナーゼ C (PKC)/ プロテインキナーゼ A (PKA) 調節機構を介した NMDA 受容体から負のフィードバックが働く相互調節機構が

報告された。^{4,5)} これらの受容体の後シナプス機構は侵害刺激の伝達や調節に関連している可能性がある。このオピオイド μ 受容体と NMDA 受容体間の相互調節機能は双方向性である。しかしながら、NMDA 受容体の持続的な活性化は神経障害性痛の原因である。モルヒネを含むオピオイドは、NMDA 受容体活性化の刺激となるオピオイド μ 受容体と NMDA 受容体の結合を阻害する可能性がある。それが、オピオイド μ 受容体シグナル伝達拮抗作用やオピオイド鎮痛耐性拮抗作用の原因かもしれない。つまり、モルヒネの作用を抑制的に調節する NMDA 受容体の活性化を防ぐことが、ケタミンの鎮痛補助薬としての作用機序の一端かもしれない。

第2節 皮質機能に対する影響

第1項 目的

第3章 第1節では, 行動学的, 免疫組織学的実験により, モルヒネ (1 mg/kg, i.p.) にケタミン (1 mg/kg, i.p.) を併用することで, モルヒネの鎮痛効果が増強することが示唆された. 第2章では低用量のケタミン (1 mg/kg, i.p.) は皮質機能に影響を与えないことも明らかとなっている.

そこで, 本節では臨床において求められている副作用リスクの少ない投与量をさらに追究することを目的として, ケタミン (1 mg/kg, i.p.) とモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) の併用投与が皮質機能に影響を与えるか否かについて, 行動学のおよび電気生理学的手法を用いて検討した.

第2項 方法

1) 実験動物

第3章 第1節 第2項 1) に準じた.

2) 使用薬物

第2章 第1節 第2項 2) に準じた.

3) 聴性驚愕反応試験

第2章 第1節 第2項 3) に準じた.

4) 電気生理学的方法 (麻酔下)

ウレタン (1 g/kg, i.p.) 麻酔下で, 覚醒下と同様の方法で記録電極および刺激電極を挿入し記録波形の確認を行った. 30 分間誘発集合電位を記録したのち, 0.9%生理食塩水またはケタミン (1 mg/kg) を腹腔内投与し, 直後に 0.9%生理食塩水またはモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) を投与後, 40 分間, 誘発集合電位を記録した.

5) 統計処理

すべてのデータは平均値±標準誤差 (mean ± SEM) で表した。誘発集合電位は薬物あるいは0.9%生理食塩水投与直前値を100%とし, 百分率で換算した。

統計解析は驚愕反応, PPI, 誘発集合電位の40分間のAUC値それぞれについて, two-factor ANOVAの後, 交互作用を比較した。危険率5%未満 ($p < 0.05$) を統計学的に有意とみなした。

第3項 結果

1) PPIに対するケタミン及びモルヒネ併用投与の影響

ケタミン (1 mg/kg, i.p.) 及びモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) は, 単独投与では聴性驚愕反応試験における PPI には影響を与えなかった. さらに, ケタミン (1 mg/kg, i.p.) とモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) の併用投与も PPI には影響を与えなかった (Fig. 33 A).

モルヒネ (1 mg/kg, i.p.) 単独投与は, 驚愕反応を抑制する傾向がみられたが, 有意な差は認められなかった. また, ケタミン (1 mg/kg, i.p.) 群の, 驚愕反応はコントロール群と比較して同程度であった (Fig. 33 B).

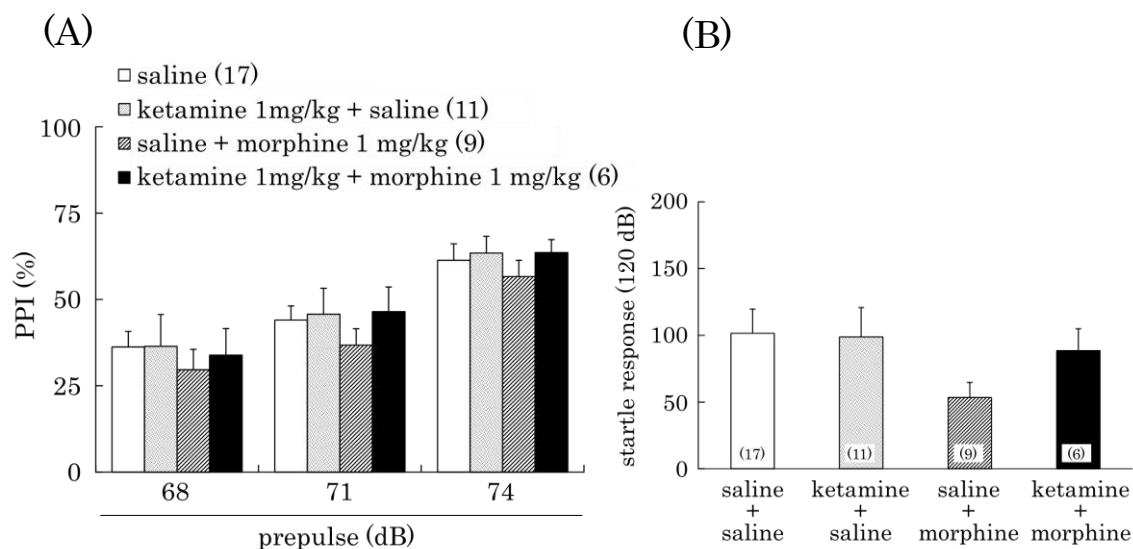


Fig. 33. Effects of Ketamine and/or Morphine on the Prepulse Inhibition (PPI)

Prepulse inhibition (PPI) (A) and startle response (B) induced by ketamine (1 mg/kg, i.p.) and/or Morphine (1 mg/kg, i.p.) administration. Data are expressed as mean \pm SEM. The number of rats tested are shown in parentheses.

2) mPFC シナプス伝達に対するケタミン及びモルヒネ併用投与の影響

ケタミン (1 mg/kg, i.p.) 及びモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) の単独投与は、誘発集合電位に影響を与えなかった。さらにケタミン (1 mg/kg, i.p.) とモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) の併用投与も誘発集合電位に影響を与えなかった (Fig. 34 A)。また投与後 40 分間の AUC においても、ケタミン (1 mg/kg, i.p.) 及びモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) の単独投与及び併用投与による有意な差は認められなかった (Fig. 34 B)。

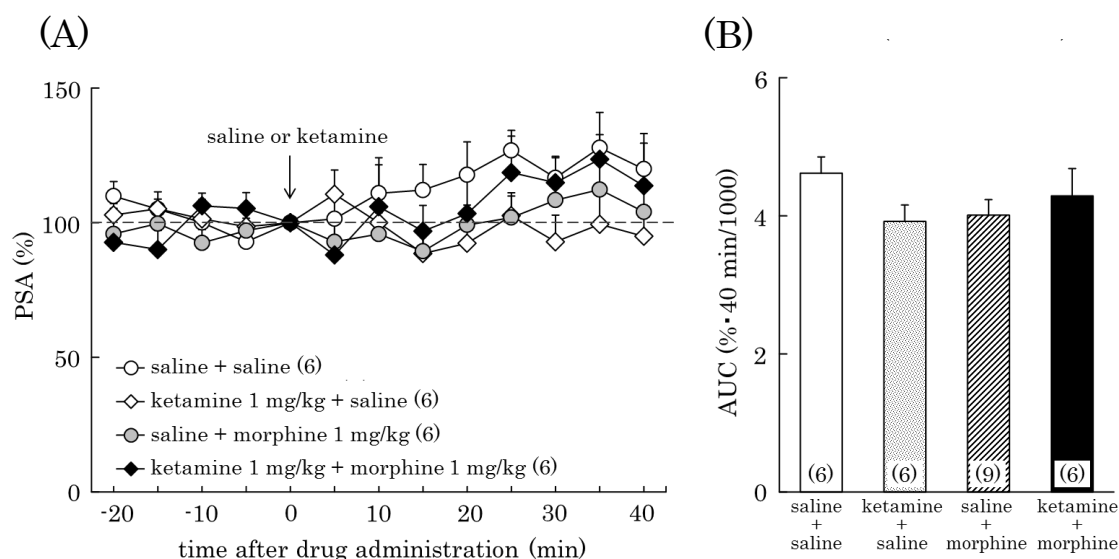


Fig. 34. Effects of Ketamine and/or Morphine on Synaptic Efficacy in the Hippocampal-mPFC Pathway

The hippocampal stimulation-evoked field potential in the mPFC was measured as the peak population spike amplitude (PSA). The time course of the PSA changes (A), and The area under the curve (AUC) of the PSA (B) for 40 min before and after saline, ketamine (1.0 mg/kg), and morphine (1.0 mg/kg) administration. Stimulation of the hippocampal CA1/subicular region induced a characteristic negative synaptic potential in the mPFC. Each time-course of response changes was expressed as the percentage of the PSA obtained immediately before saline, ketamine and/or morphine administration. Data are expressed as mean \pm SEM. The number of rats tested is shown in parentheses.

第4項 考察

本節において、モルヒネ (1 mg/kg, i.p.) の単独投与及び、ケタミン (1 mg/kg, i.p.) とモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) の併用投与は、聴性驚愕反応試験における PPI を障害せず、皮質前頭前野シナプス伝達の抑制も認められなかったことから、皮質機能に影響を及ぼさないことが示唆された。

第2・3章の結果を Fig. 35 にまとめた。ケタミン (25 mg/kg, i.p.) は抗侵害作用を示したが、皮質機能を抑制した。ケタミン (5 mg/kg, i.p.) は抗侵害作用を示さず、皮質機能抑制作用が認められた。それに対して、低用量のケタミン (1 mg/kg, i.p.) は、単独では抗侵害作用を示さなかった。この無作用量 (sub-analgesic dose) のケタミンは皮質機能すなわち認知機能に影響を与えないことが示唆された。一方、モルヒネ (1 mg/kg, i.p.) は抗侵害作用を示す最低用量であり、単独では皮質機能には影響を与えないことが明らかとなった。

さらには、無作用量であるケタミン (1 mg/kg, i.p.) は、モルヒネ (1 mg/kg, i.p.) に併用することで、認知機能に影響を与えずに、モルヒネ (1 mg/kg, i.p.) の鎮痛効果を増強することが推察された。

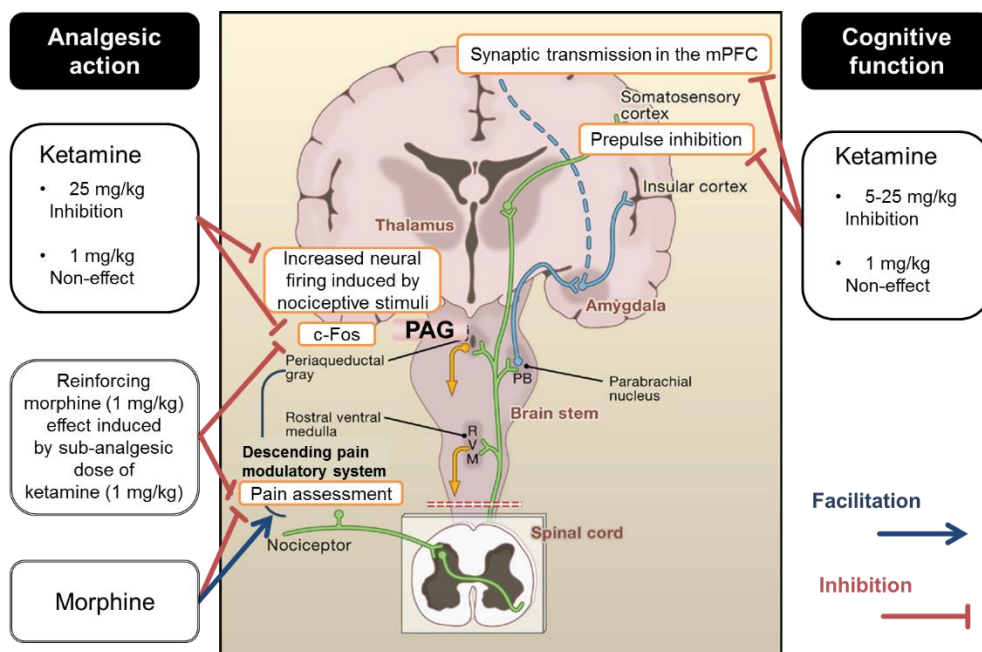


Fig. 35. Possible Mechanisms of Effects of Ketamine and/or Morphine on Cortical Functions and Antinociceptive Activity in Rats (Basbaum et al., modified from Ref⁷⁷)

本研究では、痛みの評価として機械刺激と熱性刺激、いわゆる急性侵害刺激に対する応答をみているため、ケタミンの神経障害性痛への効果については今後の検討が必要である。また、今回はケタミン及びモルヒネの単回投与による検討を行ったが、臨床ではモルヒネなどのオピオイド持続投与の際にケタミンを併用することが多く、実際、市立札幌病院緩和ケアチームにおいても同様に、オピオイドにケタミンを併用した持続投与を行っている。こうしたことから、本研究での投与量と臨床用量との関連性についても単独に論ずることはできない。しかし、本研究により、ラットにおいて認知機能に影響を与えずに、モルヒネの鎮痛効果を増強させるケタミン投与量を見出したことは、臨床において求められている副作用リスクの低いケタミンの投与方法を検討する上で有用な情報になると考えられる。

今後、さらにケタミンの神経薬理学的作用メカニズム及び、オピオイドとの併用による鎮痛作用メカニズムを明らかにすることで、より安全かつ有効なケタミンの臨床応用が図られ、がん患者の痛みの緩和にこれまで以上に貢献することが強く望まれる。

総 括

NMDA 受容体拮抗薬であるケタミンは緩和ケア領域において、鎮痛補助薬として重要な薬剤の一つである。ケタミンはオピオイドに併用することで、神経障害性痛などのオピオイド抵抗性の難治性がん性痛の緩和や、オピオイド鎮痛耐性拮抗作用によるオピオイドの減量を可能にされている。しかし、オピオイドとケタミンの併用時の有効性に関する臨床報告や基礎的研究報告は少なく、その詳細はいまだ明らかになっていない。

ケタミンは臨床において悪夢・幻覚といった中枢性の副作用が問題となることがあり、さらには統合失調症様症状を呈することも報告されている。動物実験では過活動 (hyperlocomotion)、認知機能障害あるいは社会性の欠如などが報告されている。

本研究は、がん性痛治療における鎮痛補助薬としてのケタミンの有用性を、市立札幌病院におけるケタミン及びオピオイド製剤の使用動向に関する後方視的調査研究ならびにラットの行動応答及び皮質シナプス伝達を指標とした薬理学的実験研究から明らかにすることを目的とした。

第1章では、がん性痛マネジメントの変遷という視点から、市立札幌病院緩和ケアチームでのケタミンの使用動向を後方視的に調査した。その結果、近年、がん性痛治療における薬物の選択肢が増えたことで、これまで以上に適切な治療が可能になる一方で、ケタミンの投与量には減少傾向がみられ、それに伴い副作用リスクが低下することで、有効かつ安全に使用されるようになってきていることが示された。

第2章では、ケタミンの統合失調症様副作用に関わる脳内機構を明らかにするために、ラット皮質前頭前野シナプス伝達機能に及ぼすケタミンの影響を検討した。

麻酔作用を示さない低用量のケタミン (5 mg/kg, i.p.) は皮質機能を抑制することが示唆され、その作用メカニズムとして、ドパミン-GABA-グルタミン酸神経相互調節のインバランスが、認知機能障害と関連している可能性が推

察された。一方、低用量のケタミン (1 mg/kg, i.p.) は皮質機能に対して影響を及ぼさないことが示された。

第3章では、第2章の結果を踏まえ、鎮痛補助薬としてのケタミンの有用性を薬理的に検証するために、現在もがん性痛治療の中心の一つであるモルヒネとの併用効果を、大脳皮質を含む痛みの制御機構に対する影響について追究した。その結果、抗侵害作用を示さず、皮質機能へも影響を与えない低用量のケタミン (sub-analgesic dose; 1 mg/kg, i.p.) をモルヒネ (1 mg/kg, i.p.) に併用することで、認知機能に影響を与えずに、モルヒネ (1 mg/kg, i.p.) の鎮痛効果を増強することが示された。

以上、第1章における臨床的背景をもとに、ケタミンの副作用と鎮痛薬としての有用性という視点からラットを用いた理学的実験研究を行った。本研究での投与量と臨床用量との関連性については単純に論ずることはできないが、動物実験において認知機能に影響を与えずに、モルヒネの鎮痛効果を増強させるケタミン投与量を見出したことは、臨床において求められている副作用リスクの低いケタミンの投与方法を構築する上で有用な情報を提供するものと考えられる。

今後、さらにケタミンの神経薬理学的作用メカニズム及び、オピオイドとの併用による鎮痛作用メカニズムが明らかにすることで、より安全かつ有効なケタミンの臨床応用が図られ、がん患者の痛みの緩和にこれまで以上に寄与することが期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究に際し，終始懇切丁寧なる御指導，御鞭撻を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科病態生理学分野 富樫廣子教授に深謝致します。

本研究に際し，有益なる御助言，御討論を頂きました北海道医療大学大学院薬学研究科薬理学分野 平藤雅彦教授，臨床薬剤学分野 唯野貢司教授，環境衛生学分野 増田園子教授に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり，終始有益な御教示を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科病態生理学分野 松本眞知子前准教授に心より感謝致します。

本研究に際し，幾多の御助言，御支援を頂きました北海道医療大学大学院薬学研究科病態生理学分野 柳川芳毅講師ならびに北海道医療大学薬学部薬理学講座（病態生理学）平出幸子助教，基礎薬学研究を通して御協力頂きました学生の方々に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり，幾多の御助言，御支援を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科臨床薬理毒理学分野 島村佳一教授ならびに北海道医療大学薬学部薬理学講座（臨床薬理毒理学） 鹿内浩樹助教に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり，幾多の御助言，御支援を賜りました北海道医療大学薬学部薬学教育支援室 木村真一准教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり，幾多の御助言，御支援を賜りました市立札幌病院院長 富樫正樹先生，副院長（薬剤部長事務取扱）向井正也先生，緩和ケア内科部長 合田由紀子先生，緩和ケア内科 小田浩之先生，前薬剤部長 岩井新治先生，薬剤課長 後藤仁和先生に深く感謝致します。

平成 26 年 3 月
北海道医療大学大学院薬学研究科
神山 秀一

引用文献

- 1) Mercadante S., Arcuri E., Tirelli W., Casuccio A., Analgesic Effect of Intravenous Ketamine in Cancer Patients on Morphine Therapy: A Randomized, Controlled, Double-Blind, Crossover, Double-Dose Study, *J. Pain Symptom Manage.*, **20**, 246-52 (2000).
- 2) 日本緩和医療学会緩和医療ガイドライン作成委員会編集, がん疼痛の薬物療法に関するガイドライン 2010 年版, 東京, 金原出版株式会社, pp. 66-71 (2010).
- 3) 合田由紀子, ケタミンのモルヒネ鎮痛への影響・臨床の立場から, *ペインクリニック*, **24**, 484-92 (2003).
- 4) Rodríguez-Muñoz M., Sánchez-Blázquez P., Vicente-Sánchez A., Berrocoso E., Garzón J., The mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: implications in pain control, *Neuropsychopharmacology*, **37**, 338-349 (2012).
- 5) Sánchez-Blázquez P., Rodríguez-Muñoz M., Berrocoso E., Garzón J., The plasticity of the association between mu-opioid receptor and glutamate ionotropic receptor N in opioid analgesic tolerance and neuropathic pain, *Eur. J. Pharmacol.*, **716**, 94-105 (2013).
- 6) Cilia J., Hatcher P., Reavill C., Jones D. N., (+/-) Ketamine-induced prepulse inhibition deficits of an acoustic startle response in rats are not reversed by antipsychotics, *J. Psychopharmacol.*, **21**, 302-311 (2007).
- 7) Sams-Dodd F., Lipska B. K., Weinberger D. R., Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood, *Psychopharmacology (Berl)*, **132**, 303-310 (1997).
- 8) Newcomer J.W., Farber N.B., Jevtovic-T.V., Selke G., Melson A.K., Hershey T., Craft S., Olney J.W., Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis, *Neuropsychopharmacology*, **20**, 106-118 (1999).

- 9) Krystal J.H., D'Souza D.C., Mathalon D., Perry E., Belger A., Hoffman R., NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development, *Psychopharmacology (Berl)*, **169**, 215-233 (2003).
- 10) David A.L., Bitá M., Cognitive Dysfunction in Schizophrenia, *Arch. Neurol.*, **63**, 1372-1376 (2006).
- 11) 大内尉義, 伊賀立二, 疾患と治療薬 改訂第 5 版, 南江堂, 東京, pp. 667-668 (2006).
- 12) Breier A., Cognitive deficit in schizophrenia and its neurochemical basis, *Br. J. Psychiatry Suppl.*, **37**, 16-18 (1999).
- 13) Breier A., Pierre V.T., John. N.H., Gray D.T., Frank P.B., 村崎 光邦監修, 統合失調症 最新神経薬理学, The MIT Press, Cambridge, pp. 266-268 (2003).
- 14) Scarr E., Dean B., Muscarinic receptors: do they have a role in the pathology and treatment of schizophrenia?, *J. Neurochem.*, **107**, 1188-1195 (2008).
- 15) Daniel R.W., Schizophrenia drug say goodbye dopamine, *Nature Medicine*, **13**, 1018-1019 (2007).
- 16) Alexander H., Rainer S., Thorsten D.P., Oliver G., Bernhard B., Hans O., Georg N., S-ketamine and GABA-A-receptor interaction in humans: an exploratory study with I-123-iomazenil SPECT, *Hum. Psychopharmacol.*, **23**, 549-554 (2008).
- 17) Houman H., Bitá M., NMDA Receptor Hypofunction Produces Opposite Effects on Prefrontal Cortex Interneurons and Pyramidal Neurons, *J. Neurosci.*, **27**, 11496-11500 (2007).
- 18) Kerwin R., Patel S., Meldrum B., Quantitative autoradiographic analysis of glutamate binding sites in the hippocampal formation in normal and schizophrenic brain post mortem, *Neuroscience*, **39**, 25-32 (1990).
- 19) Tsai G., Passani L.A., Slusher B.S., Carter R., Baer L., Kleinman J.E., Coyle J. T., Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains, *Arch. Gen. Psychiatry*, **52**, 829-836 (1995).

- 20) Beneyto M., Kristiansen L.V., Oni-Orisan A., McCullumsmith R.E., Meador-Woodruff J.H., Abnormal Glutamate Receptor Expression in the Medial Temporal Lobe in Schizophrenia and Mood Disorders, *Neuropsychopharmacology*, **32**, 1888-1902 (2007).
- 21) Jonathan B., Jessica I., Lisa M.S., Timothy J.B., Andrew H., Effects of phencyclidine (PCP) treatment on social behaviors and operant discrimination and reversal in C57BL/6J mice, *Front. Behav. Neurosci.*, **3**, 1-11 (2009).
- 22) Krystal J.H., Karper L.P., Seibyl J.P., Freeman G.K., Delaney R., Bremner J.D., Heninger G.R., Bowers M.B.Jr., Charney D.S., Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses, *Arch. Gen. Psychiatry*, **51**, 199-214 (1994).
- 23) Anil K.M., Debra A.P., Caleb M.A., Igor E., Allan C., David P., Alan B., Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics, *Neuropsychopharmacology*, **17**, 141-150 (1997).
- 24) Adler C. M., Malhotra A. K., Elman I., Goldberg T., Egan M., Pickar D., Breier A., Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia, *Am. J. Psychiatry*, **156**, 1646-1649 (1999).
- 25) Konradi C., Heckers S., Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment, *Pharmacol. Ther.*, **97**, 153-179 (2003).
- 26) Goff D. C., Coyle J. T., The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia, *Am. J. Psychiatry*, **158**, 1367-1377 (2001).
- 27) Powell C. M., Miyakawa T., Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder?, *Biol. Psychiatry*, **59**, 1198-1207 (2006).

- 28) Arguello P. A., Gogos J. A., Modeling madness in mice: one piece at a time, *Neuron*, **52**, 179-196 (2006).
- 29) Matsumoto M., Shikanai H., Togashi H., Izumi T., Kitta T., Hirata R., Yamaguchi T., Yoshioka M., Characterization of clozapine-induced changes in synaptic plasticity in the hippocampal-mPFC pathway of anesthetized rats, *Brain Res.*, **1195**, 50-55 (2008).
- 30) Ohashi S., Matsumoto M., Otani H., Mori K., Togashi H., Ueno K., Changes in synaptic plasticity in the rat hippocampo-medial prefrontal cortex pathway induced by repeated treatments with fluvoxamine, *Brain Res.*, **949**, 131-138, (2002).
- 31) Hugues S., Garcia R., Reorganization of learning-associated prefrontal synaptic plasticity between the recall of recent and remote fear extinction memory, *Learn Mem.*, **14**, 520-524 (2007).
- 32) Farinelli M., Deschaux O., Hugues S., Thevenet A., Garcia R., Hippocampal train stimulation modulates recall of fear extinction independently of prefrontal cortex synaptic plasticity and lesions, *Learn Mem.*, **13**, 329-334 (2007).
- 33) Inoue S., Kamiyama H., Matsumoto M., Yanagawa Y., Hiraide S., Saito Y., Shimamura K., Togashi H., Synaptic modulation via basolateral amygdala on the rat hippocampus-medial, *J. Pharmacol. Sci.*, **123**, 267-278 (2013)
- 34) STAS ワーキンググループ編集, STAS-J(STAS-J 日本語版)スコアリングマニュアル第3版, (2007).
- 35) Bell R.F., Eccleston C., Kalso E.A.. Ketamine as an adjuvant to opioids for cancer pain. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **11**, CD003351 (2012).
- 36) Quibell R, Prommer EE, Mihalyo M, Twycross R, Wilcock A. Ketamine. *J. Pain Symptom Manage.*, **41**, 640-649 (2011).

- 37) García de Paredes M.L., del Moral González F., Martínez del Prado P., Martí Ciriquíán J.L., Enrech Francés S., Cobo Dols M., Esteban González E., Ortega Granados A.L., Majem Tarruella M., Cumplido Burón J.D., Gascó Hernández A., López Miranda E., Ciria Santos J.P., de Castro Carpeño F.J., First evidence of oncologic neuropathic pain prevalence after screening 8615 cancer patients. Results of the On study. *Ann. Oncol.*, **22**, 924-930 (2011).
- 38) 住谷昌彦, 山田芳嗣. 多様な病態を示すがん性疼痛に対するオピオイド鎮痛薬の有用性—オキシコドンの鎮痛プロファイルを中心に—. *癌と化学療法*, **38**, 977-982 (2011).
- 39) Howard S., Smith, M.D., Opioids and Neuropathic Pain. *Pain Physician*, **15**, ES93-110 (2012).
- 40) Lauretti G.R., Oliveira G.M., Pereira N.L., Comparison of sustained-release morphine with sustained-release oxycodone in advanced cancer patients. *Br. J. Cancer*, **89**, 2027-2030 (2003).
- 41) Kalso E., Vainio A., Morphine and oxycodone hydrochloride in the management of cancer pain. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **47**, 639-646 (1990).
- 42) Mucci-LoRusso P., Berman B.S., Silberstein P.T., Citron M.L., Bressler L., Weinstein S.M., Kaiko R.F., Buckley B.J., Reder R.F., Controlled-release oxycodone compared with controlled-release morphine in the treatment of cancer pain: a randomized, double-blind, parallel-group study. *Eur. J. Pain*, **2**, 239-249 (1998).
- 43) 日本緩和医療学会緩和医療ガイドライン作成委員会編集, がん患者の呼吸器症状の緩和に関するガイドライン 2011 年版, 金原出版株式会社, 東京, pp. 52-60 (2011).
- 44) 新城 拓也, 岡田 雅邦, フェンタニル貼付剤の増量に反応しないがん性疼痛に対する経口モルヒネへのオピオイドローテーション, *Palliative Care Res.*, **2**, 306-309 (2007).

- 45) Imai S., Narita M., Hashimoto S., Nakamura A., Miyoshi K., Nozaki H., Hareyama N., Takagi T., Suzuki M., Narita M., Suzuki T., Differences in tolerance to anti-hyperalgesic effects between chronic treatment with morphine and fentanyl under a state of pain. *Jpn. J. Neuropsychopharmacol.*, **26**, 183-192 (2006).
- 46) Braff D. L., Geyer M. A., Sensorimotor gating and schizophrenia: Human and animal model studies, *Arch. Gen. Psychiatry*, **47**, 181-188 (1990).
- 47) 河原申弥, 聴性驚愕反応試験に関する基礎的検討とその応用, 修士論文, (2008).
- 48) Fejgin K., Safonov S., Pålsson E., Wass C., Engel J. A., Svensson L., Klamer D., The atypical antipsychotic, aripiprazole, blocks phencyclidine-induced disruption of prepulse inhibition in mice, *Psychopharmacology (Berl)*, **191**, 377-385 (2007).
- 49) Arvaov V. L., Wang R. Y., NMDA-induced response in pyramidal neurons of the rat medial prefrontal cortex slices consists of NMDA and no-NMDA components, *Brain Res.*, **768**, 361-364 (1997).
- 50) Chen L., Muhlhauser M., Yang C. R., Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo, *J. Neurophysiol.*, **89**, 691-703 (2003).
- 51) Jackson M. E., Homayoun H., Moghaddam B., NMDA receptor hypofunction produces concomitant firing rate potentiation and burst activity reduction in the prefrontal cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **101**, 8467-8472 (2004).
- 52) Jodo E., Suzuki Y., Katayama T., Hoshino K. Y., Takeuchi S., Niwa S., Kayama Y., Activation of medial prefrontal cortex by phencyclidine is mediated via a hippocampo-prefrontal pathway, *Cereb. Cortex*, **15**, 663-669 (2005).
- 53) Homayoun H., Moghaddam B., NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons, *J. Neurosci.*, **24**, 11496-11500 (2007).

- 54) Nakao S., Adachi T., Murakawa M., Shinomura T., Kurata J., Shichino T., Shibata M., Tocyama I., Kimura H., Mori K., Halothane and diazepam inhibit ketamine-induced *c-fos* expression in the rat cingulate cortex, *Anesthesiology*, **85**, 874-882 (1996).
- 55) Paxinos G., Watson C., The rat brain 5th ed., Elsevier academic press, Boston (2005).
- 56) Zucker R. S., Regehr, W. G., Short-term synaptic plasticity, *Annu. Rev. Physiol.*, **64**, 355-405 (2002).
- 57) Buck N., Cali S., Behr J., Enhancement of long-term potentiation at CA1-subiculum synapses in MK-801-treated rats, *Neurosci. Lett.*, **392**, 5-9 (2006).
- 58) Herry C., Garcia R., Prefrontal cortex long-term potentiation, but not long-term depression, is associated with the maintenance of extinction of learned fear in mice, *J. Neurosci.*, **22**, 577-583 (2002).
- 59) Tanaka S., Dysfunctional GABAergic inhibition in the prefrontal cortex leading to "psychotic" hyperactivation., *BMC. Neurosci.*, **9**, 41-53 (2008).
- 60) Nakao S., Miyamoto E., Masuzawa M., Kambara T., Shingu K., Ketamine-induced c-Fos expression in the mouse posterior cingulate and retrosplenial cortices is mediated not only via NMDA receptors but also via sigma receptors, *Brain Res.*, **926**, 191-196 (2002).
- 61) Kapur S., seeman, P., NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D₂ and serotonin 5-HT₂ receptors-implications for models of schizophrenia, *Mol. Psychiatry*, **7**, 837-844 (2002).
- 62) Judo C., Terado M., Matsumoto M., Hamaue N., Ohno K., Togashi H., Pathophysiological implications of cerebral isatin, an endogenous monoamine oxidase inhibitor, *J. Pharmacol. Sci. Suppl. I.*, **106**, 223 (2008).
- 63) Kobori N., Dash P. K., Reversal of brain injury-induced prefrontal glutamic acid decarboxylase expression and working memory deficits by D₁ receptor antagonism, *J. Neurosci.*, **26**, 4236-4246 (2006).

- 64) Ishikawa A., Kadota T., Kadota K., Matsumura H., Nakamura S., Essential role of D1 but not D2 receptors in methamphetamine-induced impairment of long-term potentiation in hippocampal-prefrontal cortex pathway, *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 1713-1719 (2005).
- 65) Trantham D. H., Neely L. C., Lavin A., Seamans J. K., Mechanisms underlying differential D₁ versus D₂ dopamine receptor regulation of inhibition in prefrontal cortex, *J. Neurosci.*, **24**, 10652-10659 (2004).
- 66) Lewis D. A., Hashimoto T., Volk D. W., Cortical inhibitory neurons and schizophrenia, *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 312-324 (2005).
- 67) Santana N., Mengod G., Artigas F., Quantitative Analysis of the Expression of Dopamine D₁ and D₂ Receptors in Pyramidal and GABAergic Neurons of the Rat Prefrontal Cortex, *Cereb. Cortex*, **19**, 849-860 (2009).
- 68) Towers S. K., Hestrin S., D₁-like dopamine receptor activation modulates GABAergic inhibition but not electrical coupling between neocortical fast-spiking interneurons, *J. Neurosci.*, **28**, 2633-2641 (2008).
- 69) Crandall J. E., McCarthy D. M., Araki K. Y., Sims J. R., Ren J. Q., Bhide P. G., Dopamine receptor activation modulates GABA neuron migration from the basal forebrain to the cerebral cortex, *J. Neurosci.*, **27**, 3813-3822 (2007).
- 70) Seamans J. K., Gorelova N., Durstewitz D., Yang C. R., Bidirectional dopamine modulation of GABAergic inhibition in prefrontal cortical pyramidal neurons, *J. Neurosci.*, **21**, 3628-3638 (2001).
- 71) Wang J., O'Donnell P., D₁ dopamine receptors potentiate NMDA-mediated excitability increase in layer V prefrontal cortical pyramidal neurons, *Cereb. Cortex*, **11**, 452-462 (2001).
- 72) Lovick T. A., Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: role in adaptive behavioural responses. *Prog. Neurobiol.*, **40**, 631-644 (1993).
- 73) Bandler R., Shipley M. T., Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression?, *Trends Neurosci.*, **17**, 379-389 (1994).

- 74) Depaulis A., Keay K. A., Bandler R., Longitudinal neuronal organization of defensive reactions in the midbrain periaqueductal gray region of the rat. *Exp. Brain Res.*, **90**, 307-318 (1992).
- 75) Yaksh T. L., Al-Rodhan N. R., Jensen T. S., Sites of action of opiates in production of analgesia. *Prog. Brain Res.*, **77**, 371-394 (1988).
- 76) Curran T., Morgan J. I., Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J. Neurobiol.*, **26**, 403-412 (1995).
- 77) Basbaum A.I., Bautista D.M., Scherrer G., Julius D., Cellular and molecular mechanisms of pain, *Cell*, **139**, 267-284 (2009).