

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20056

研究課題名(和文) 全身麻酔でのオピオイド誘発性痛覚過敏の機序と予防についての電気生理学的検討

研究課題名(英文) Mechanism of opioid induced hyperalgesia and its prophylaxis in general anesthesia; an electrophysiological analysis

研究代表者

舟井 優介 (FUNAI, Yusuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60722486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：初期実験において、基礎となる全身麻酔薬が脊髄後角の痛覚伝達に強力な影響を及ぼしたため、その詳細な検討を要した。セボフルラン(0.1-2MAC)は濃度依存的に脊髄後角の痛覚伝達を抑制した。一方、デスフルランは麻酔域(>0.5MAC)ではセボフルランと同様の反応を生じ、低濃度(<0.2MAC)では逆説的に痛覚伝達を促進した。いずれの吸入麻酔薬も一次求心性線維終末からの興奮性伝達物質の放出に影響を及ぼし、抑制性シナプス伝達に与える影響は少なかった。プロポフォールは痛覚伝達に有意な影響を与えなかった。熱刺激・寒冷刺激による行動実験でも低濃度デスフルランによる痛覚過敏作用が裏付けられた。

研究成果の概要(英文)：We found out that general anesthetics strongly affected on synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn in early experiment, therefore more detailed examinations were required. Sevoflurane(SEV)(0.1-2 MAC) inhalation dose-dependently inhibited the nociceptive transmission in spinal cord dorsal horn. On the other hand, desflurane(DES)inhalation at anesthetic concentration(>0.5MAC) had similar effect as SEV, however, DES inhalation at subanesthetic concentration(<0.2MAC) paradoxically enhanced the nociceptive synaptic transmission. Both volatile anesthetics affected on the release of excitatory neurotransmitters from primary afferent fiber terminals, whereas they had little impact on the inhibitory synaptic transmission. Intravenous propofol had no significant effect on pain modulation. The behavioral test by thermal/cold stimulation also revealed the hyperalgesic property by DES at subanesthetic concentration.

研究分野：疼痛学

キーワード：痛覚過敏 全身麻酔薬 脊髄後角

1. 研究開始当初の背景

現在の一般的な全身麻酔は「バランス麻酔」と称され、全身麻酔薬(吸入麻酔薬や静脈麻酔薬)、麻薬性鎮痛薬(オピオイド)、筋弛緩薬の三者を組み合わせる適切な麻酔状態を維持するものである。近年、本邦で使用可能になった超短時間作動性オピオイドであるレミフェンタニルの登場により、全身麻酔の質は著しく向上した。レミフェンタニルは血中非特異的エステラーゼによって速やかに代謝され、消失半減期が腎機能や肝機能に影響されない。従って、術中の高用量投与が可能であり、手術中に十分な抗侵害作用を得ることができ、生体の有害なストレス反応を抑制できるようになった。

その一方で、高用量オピオイドの投与による術中の急性耐性や、オピオイド投与中止後に逆説的に疼痛が増強する opioid induced hyperalgesia(OIH) と呼ばれる病態が注目され始めている。OIHの存在は、動物実験において示されていたが、近年、ヒトにおいてもレミフェンタニルの高用量投与で生じることが示された。OIHの機序については十分には解明されていないが、ケタミンに予防効果があるためにNMDA受容体に関与するという報告がある。また、ラット脊髄スライス標本を用いた研究では、レミフェンタニルの急速中断後に long-term potentiation(LTP) と呼ばれる後角細胞の反応性の亢進が生じたという報告もある。しかし、*in vivo* 標本でどのような現象が生じるかは未だ不明な点が多い。

近年、ERAS(Enhanced recovery after surgery) という、術後の早期回復・離床を目指す考え方が患者予後の点からも、病院経済の面からも重要視されてきている。早期離床を目指すうえで、十分な術後鎮痛はその核ともいえる必須条件となるが、その中で OIH は術後疼痛管理を困難にする重大な問題となりうる。そのため、OIHの発症メカニズムを明らかにし、その予防や治療につながる機序を解明することには臨床的にも大きな意義がある。

2. 研究の目的

脊髄での痛覚伝達においては、脊髄後角第層、膠様質(substantia gelatinosa; SG)の神経細胞(SGニューロン)の活動制御が重要である。末梢の侵害受容器が感知した侵害刺激は一次求心性線維を伝わり、初めに脊髄後角へ入力する。SGニューロンは、痛覚伝達を担うA δ 、C線維双方からの興奮性シナプス入力を受けるとともに、GABAもしくはグリシン作動性の抑制性ニューロンからの抑制性シナプス入力も受け、それらの情報を統合して投射ニューロンへ情報を伝達する。本研究

の柱となる脊髄後角 *in vivo* パッチクランプ法では、このSGニューロンを標的としている。同法では、生体ラットのSGニューロンから、活動電位閾値下の興奮性シナプス後電流(excitatory postsynaptic currents; EPSCs)や抑制性シナプス後電流(inhibitory postsynaptic currents; IPSCs)など微小電位の高精度な記録が可能であり、これによりシナプス前細胞、後細胞それぞれに対する影響といった詳細なメカニズムを解析できる。さらに同法の大きな特長として、生体を使用するため、全身投与した薬剤の影響を知ることが可能であり、また、痛み刺激などの生理的な刺激に対する応答が記録可能である。*In vivo* では中枢神経系のネットワークや内分泌系などの調節系が温存されているため、細胞や組織標本を用いた実験結果とは異なる結果が得られる可能性もあり、得られた結果はより臨床に即した情報となる。

本研究の最大の目的は、脊髄後角からの細胞外記録および *in vivo* パッチクランプ法を用い、「バランス麻酔」における OIH 発症機序およびその予防法や治療法を明らかにすることである。そのためには、まず基礎となる麻酔薬の作用を調べる必要があり、人工呼吸ラットに吸入麻酔薬や静脈麻酔薬を投与した状態で、痛覚刺激に対する脊髄後角シナプス応答を記録・解析する。次に、高用量レミフェンタニル持続投与中、及びその中断後の痛覚刺激に対する脊髄後角シナプス応答を記録し、OIHの発症機序に迫る。さらに、ケタミンなどを用いた OIHの予防効果についても検討を試みる。

3. 研究の方法

(1) *In vivo* 標本の作成

雄性 5-9 週齢 Sprague-Dawley ラットを用い、腹腔内にウレタンを投与(1.2-1.5g/kg)し全身麻酔を行った。頸部を正中切開し、筋組織を鈍的に剥離し、気管を露出した。輪状軟骨下で気管を切開してシリコンチューブを挿入し、動物用人工呼吸器を用いて人工呼吸を行った。人工呼吸回路には吸入麻酔薬の気化器を組み込んでおり、設定した濃度(0.1-2 MAC)(MAC; minimum alveolar concentration、最小肺泡濃度)でセボフルランまたはデスフルランの投与を行った。また、呼気サンプリングを行い呼気中の酸素濃度・二酸化炭素濃度、麻酔薬濃度をモニタリングした。必要に応じ大腿静脈または尾静脈より静脈路を確保した。次に、背部を切開し、Th12-L2 レベルの椎弓切除を行い、脊髄腰膨大部を露出した。ラットを固定装置に移し硬膜・軟膜を切開することにより、脊髄後角に記録電極が刺入できるスペースを作った。脊髄表面は人工脳脊髄液で灌流した。

(2) 電気生理記録

脊髄後角第 層 (深さ 30-200 μm) の SG ニューロンを目標に電極を刺入した。細胞外記録の場合はタングステン電極 (1.3-1.5 M) を刺入し、ピンチメーターを用いて 2 kg のピンチ刺激に対する活動電位を記録した。パッチクランプの場合はガラス電極 (内液を満たした際の抵抗が 8-15 M のもの) を用い、ホールセルパッチクランプ法により、EPSCs および外向き電流、IPSCs の記録を行った。後肢への痛み刺激による誘発性 EPSCs, IPSCs についても同様に記録した。

(3) Hot Cold Plate Test

初期の研究段階で、吸入麻酔薬デスフルランとセボフルランでは明らかに脊髄後角での疼痛伝達に与える影響が異なることが判明したため、行動実験を追加した。

Hot Cold Plate 35150 (Ugo Basire 社) を用い、ラットを Plate に置きクリアケースで覆った。純酸素と 0.1-0.5 MAC の吸入麻酔薬 (デスフルランまたはセボフルラン) をケージ内に満たし、10 分後に鎮静スケールと熱刺激・冷刺激による逃避閾値について評価した。なお、過鎮静による熱損傷を防ぐために逃避行動が消失する可能性の高い 0.5 MAC 以上の実験を行わなかった。設定条件は、熱刺激の場合は【36 52、Ramp 300 秒間】冷刺激の場合は【24 8、Ramp 320 秒間】とし、逃避行動が現れるまでの時間およびその温度を記録した。

(4) 先行鎮痛による神経障害性疼痛予防効果についての実験

当初の研究計画書の内容には含まれていないが、当研究室では「慢性疼痛の発症機序と予防法を明らかにする」という大きなテーマを持ち、複数の研究を進めている。その中で、神経障害時の先行鎮痛の有用性についての研究について、動物購入費用に本研究費の一部を当てたため、ここに合わせて記載する。

薬剤全身投与群では 5 週齢ラットを用い、手術時に薬液を封入したカプセル Alzet ミニ浸透圧ポンプを腹腔内に埋伏し、2 週間の持続腹腔内投与を行った。プレガバリン 12mg/kg/day・アミトリプチリン 5 mg/kg/day・トラマドール 5 mg/kg/day・デクスメトミジン 0.04 mg/kg/day・プラバスタチン 10 mg/kg/day・ケタミン 1 mg/kg/day のいずれかを用いた。1 週後に神経障害性疼痛モデル (L5 脊髄神経結紮モデル) ラットを作成した。局麻群では 6 週齢ラットで神経障害性モデルを作成すると同時に、0.5%ロピバカイン単回投与群 (手術時に L5 神経に散布) またはカテーテルによる 1%ロピバカイン持続投与群 (L5 神経周囲に 1 週間持続投与) を行った。全ての群で、1 週間ごとに Dynamic Planter Aesthesiometer 37450 (Ugo Basire 社) を用いて患肢の機械刺激に対する逃避閾値を測定した。

4. 研究成果

(1) 細胞外記録

セボフルランは濃度依存的に疼痛誘発性の活動電位を減弱させ、明らかな鎮痛作用を示した。デスフルランは濃度に応じ二相性の反応を呈した。すなわち、麻酔域未満 (<0.2 MAC) では逆説的に疼痛誘発性の活動電位を増加させ、痛覚過敏を来した。麻酔濃度 (>0.5 MAC) のデスフルランは濃度依存的に活動電位を抑制し、鎮痛作用を示した。静脈麻酔薬プロポフォールは、疼痛誘発性の活動電位に有意な変化を生じなかった。

(2) in vivo パッチクランプ法

セボフルランは濃度依存的に自発性 EPSCs および疼痛誘起性 EPSCs の頻度と振幅を減少させた。テトロドトキシン存在下の微小 EPSCs には有意な変化を与えなかったことから、シナプス前部で一次求心性線維または侵害受容器に作用し、興奮性伝達を抑制することで鎮痛作用を示すことが分かった。また、IPSCs は用量依存的に減少したため、下行性疼痛抑制系を始めとした抑制性伝達は鎮痛作用に寄与していないことが示唆された。

一方、麻酔濃度 (>0.5 MAC) のデスフルランはセボフルランと同様の傾向を示したが、低濃度 (0.1-0.2 MAC) では、自発性および疼痛誘起性 EPSCs の頻度と振幅を増加させた。微小 EPSCs の変化はなかったことから、やはりシナプス前部で一次求心性線維または侵害受容器に作用して疼痛伝達を促進することが明らかになった。IPSCs は特異的な変化を示さなかった。

(3) Hot/Cold Plate Test

セボフルランは濃度依存的に熱刺激・冷刺激による逃避閾値をいずれも増加させた。デスフルランは 0.1-0.2 MAC で熱刺激・冷刺激による逃避域値を減少させ、痛覚過敏作用を示した。0.5 MAC デスフルランでは逃避閾値は増加した。全て、電気生理学手法で得られた結果と矛盾しない結果となった。

ここまで、基礎となる麻酔薬による脊髄応答変化が非常に強力で、実験を進めるうえで無視できないと判断したので、より詳細な解析が必要であった。そのため、本研究期間内にオピオイドを使用した OIH の実験を行うまでには至らなかった。しかし、吸入麻酔薬セボフルランとデスフルランによる脊髄応答の違いについて、in vivo パッチクランプ法を用いて電気生理学的に検討した報告はなく、学術的価値を持つ知見が得られた。下記の学会発表のほか、2018 年 10 月の米国麻酔科学会 (サンフランシスコ) でも詳細な発表を予定しており、現在英文論文も作成中である。

(4) 神経障害性疼痛予防効果の検討

疼痛モデル作成 1 週後では、すべての群においてコントロールに比して疼痛域値の上

昇を認め、一定の抗アロディニア作用を認めた。モデル作成2週間後では、局麻群でのみ、ロピバカイン単回投与群、持続投与群ともに有意なアロディニア抑制効果を認めた。以上から、神経障害時の局所麻酔薬による先行鎮痛が、その後のアロディニア抑制に有用であることが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 稲田 陽介、舟井 優介、山崎 広之、森 隆、西川 精宣 「全身麻酔薬の投与量の違いによる脊髄後角膠様質細胞の応答変化」日本臨床麻酔学会第37回大会(東京)2017年11月
2. 山崎 広之、森 隆、舟井 優介、西川 精宣 「先制鎮痛による神経障害性疼痛予防効果の検討」日本区域麻酔学会第4回学術集会(名古屋)2017年4月

6. 研究組織

(1)研究代表者

舟井 優介 (FUNAI, Yusuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60722486