

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20060

研究課題名(和文) 全身麻酔薬による睡眠障害とD体アミノ酸代謝との関連解析

研究課題名(英文) Relationship between D-amino acids and sleep disorder induced by general anesthetic

研究代表者

渡邊 真理子 (WATANABE, Mariko)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：60609220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Dアミノ酸酸化酵素欠損マウスは野生型に比べて血中D-アラニン量が高いことを明らかにした。また、血中D-アラニン量は明期(休眠時)に高く暗期(活動時)に低い概日変動を示すことを明らかにした。Dアミノ酸酸化酵素欠損マウス視床下部のマイクロダイアリシス灌流液中のD-アラニン量は野生型に比べて有意に高いこと、D-アラニン量は明期(休眠時)に高く暗期(活動時)に低い概日変動を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：D-Alanine contents in serum or microdialyrate from thalamus of D-amino acid oxidase deficient mice is higher than one of wild type mice and regulated under circadian rhythm.

研究分野：麻酔科学

キーワード：麻酔薬 概日リズム 睡眠障害 Dアラニン Dアミノ酸酸化酵素欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) プロポフォールによる睡眠障害

睡眠覚醒、代謝やホルモン分泌などは約24時間の概日リズムを持つシステムを制御している遺伝子、時計遺伝子によって調節されていることが知られている。プロポフォール全身麻酔による術後2-3日において睡眠障害がしばしば生じる。近年、プロポフォールにより脳内時計遺伝子(Period 遺伝子)発現が変化することが報告されている(Yoshida et al., 2009)。

(2) プロポフォールの GABA 受容体以外への作用

プロポフォールは、シナプス外 GABA (-aminobutyric acid) A 受容体の感受性を増強することで持続性抑制性電流の発生を促進するとともに、グルタミン酸受容体の一種である N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) 受容体を介する extracellular signal-regulated プロテインキナーゼ (ERKs) リン酸化を抑制することが明らかとなった(Kozinn et al., 2006)。ERKs リン酸化は NMDA 受容体を介するシナプス可塑性や記憶などに重要な役割を果たすことが知られ、臨床使用濃度のプロポフォールが NMDA 受容体を介する高次脳機能に作用することを示している。

(3) NMDA 受容体と睡眠・覚醒

これまで NMDA 受容体拮抗薬が睡眠-覚醒に關与するノルアドレナリン放出を促進させること、睡眠障害には生理的睡眠物質である IL-1, TNF を介した脳内ノルアドレナリン作動性神経活性の変調が關与していること、などが示されてきた。すなわち、NMDA 受容体を介する細胞内シグナルが睡眠-覚醒を調節することが示唆されている。

(4) D-アラニンによる概日リズムへの作用

D-アラニンは、NMDA 受容体グリシン結合部位の内因性リガンドである。D-アラニンは D アミノ酸化酵素(D-amino acid oxidase; DAO)によりケト酸に分解されるとともに過酸化水素を発生する。

NMDA 受容体拮抗薬ケタミンが REM(Rapid eye movement sleep)睡眠を増加させ、睡眠を変調させることが知られている。近年、NMDA 受容体内在性リガンドである D-アラニンが概日リズムに關与することが示された。血中 D-アラニン濃度は 24 時間周期で変動する「概日リズム」を示し、活動期には減少し休息期には増加することが近年報告されている。D-アラニンの概日リズムをヒトで調べた結果 D-アラニン量は起床時に低く、休息体制に入る時間に増えることが明らかとなった。また、ラットへの D-アラニン投与により自然睡眠を誘導することが示された

(Morikawa et al., 2010)。

(5) NMDA リガンドは遊離型 D-アミノ酸代謝を変調する

申請者は、ケタミン投与により D-アミノ酸分解酵素(D-アミノ酸化酵素; DAO)遺伝子発現が亢進し、NMDA 受容体グリシン結合部位内在性リガンドである D-セリン量が減少し、統合失調様症状の発現と連關することを報告した(Watanabe et al., 2010)。また、NMDA 投与により内在性 D-セリン量が変化することが明らかとなっている(Yoshikawa et al., 2004 a, b)。これらの結果は、NMDA 受容体を介する細胞内シグナルの変調が NMDA 受容体内在性アゴニストである D-アミノ酸(Dセリン、Dアラニン)の代謝変化を誘導し NMDA 受容体活性を調整することを示唆する。

2. 研究の目的

以上の先行研究から、申請者はプロポフォールが D-アラニン代謝変化を介して概日リズムを変調し、睡眠障害を誘導するとの仮説に至った。本研究では、D-アラニン分解酵素(D-アミノ酸化酵素; DAO)遺伝子欠損動物などを用いて、プロポフォール投与による血中および脳内 D-アラニン量変化と概日リズム、睡眠障害の連關を明らかにし、全身麻酔後の睡眠障害の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) HPLC-蛍光分析器による D-アラニン量の解析

D-アラニンの検出は Hashimoto らが考案した HPLC 法で行う。すなわち、抽出組織部位よりアミノ酸をトリクロロ酢酸で抽出する。マイクロダイアリシスサンプルあるいは抽出したサンプルに o-phthalaldehyde (OPA) と N-tert-butylloxycarbonyl-L-cystein を加えて蛍光誘導体化反応を行い、Nova-Pak C18 (3.9 mm i.d. X 300 mm; Waters 社)により分離し、検出には 530 nm の蛍光発光 (励起波長 470 nm)を用いる。

(2) HPLC-電気化学検出器による D-アラニン量の解析

マイクロダイアリシスサンプル中の D-アラニンは極めて微量であるため、上記 HPLC-蛍光分析器による測定では検出限界以下である場合が散見された。電気化学検出器は主に酸化・還元反応が起こる成分が測定対象で、反応の際に流れる電流量を検出する。どのくらいの電圧をかければ酸化・還元反応が起こるかは成分により異なるため選択性が高く、感度が極めて高い検出法で、カテコールアミンなど微量生体成分の測定に多く用いられている。申請者はサンプルに o-phthalaldehyde (OPA)と

N-acetyl-L-cystein を加えて蛍光誘導体化反応を行い、EICOMPAC 分析カラム EX3ODS(4.6 mm i.d. X 100 mm : Eicom 社)、移動相 18% Methanol, 100mM pH6.0 リン酸塩緩衝液, 5mg EDTA (2Na) /L、洗浄液 60% Methanol, 100mM pH6.0 リン酸塩緩衝液, 5mg EDTA (2Na) /L、流速 500 uL/min、分離し、検出には 600mV vs Ag/AgCl、グラッシーカーボン電極を用いる。

### (3) in vivo マイクロダイアリス法

脳定位固定装置に ddY マウス(体重 25 g) を固定し、頭頂付近の皮膚を切開し、頭頂を露出させ、bregma の位置を確認する。ドリルで頭頂骨に円形の穴を開け、当該穴の両側にアンカー用の穴を 3カ所開けて、ビスを骨に固定する。プローブ挿入部位の硬膜を 27G 程度の注射針で血管を切らないように切開し、ガイドカニューレならびにダミーカニューレを挿入する。ガイドカニューレとビスをデンタルセメントで骨に固定する。マイクロダイアリス当日、ガイドカニューレにマイクロダイアリスプローブを挿入する。プローブを介して人工脳脊髄液を還流(1 uL/min)する。灌流液をフラクションコレクター(EFC-96, eicom 社)で回収する。

## 4. 研究成果

### (1) D アミノ酸酸化酵素と血中 D-アラニン

ddY 系野生型マウス[DAO(+)]および ddY 系 D アミノ酸酸化酵素欠損[DAO(-)]より採取した血清を HPLC-蛍光分析器により D-アラニン量の解析をおこなった。

D アミノ酸酸化酵素欠損マウスは野生型に比べて血中 D-アラニン量が高いことを明らかにした。また、血中 D-アラニン量は明期(休眠時)に高く暗期(活動時)に低い概日変動を示すことを明らかにした。

### (2) D アミノ酸酸化酵素と視床下部 D-アラニン

背内側視交叉は概日リズムを統括することが知られている。背内側視交叉の投射先である視床下部の in vivo マイクロダイアリスを行い、細胞外液中の D-アラニン量を測定した。D-アラニン分析は条件検討した電気化学検出器による高感度分析法を用いた。D アミノ酸酸化酵素欠損マウスは野生型に比べてマイクロダイアリス灌流液中の D-アラニン濃度が有意に高いこと、D-アラニン量は明期(休眠時)に高く暗期(活動時)に低い概日変動を示すことを明らかにした。

以上の本研究により、全身麻酔薬と睡眠障害との関連解析を行うにあたり、D アミノ酸酸化酵素欠損マウス(DAO 欠損マウ

ス)がモデル動物としての有用性が示唆された。今後、DAO 欠損マウスおよび野生型マウスによる概日リズム変調負荷後に各種麻酔薬による睡眠障害の相違について検討する予定である。

### <引用文献>

(1) Yoshida Y, Nakazato K, Takemori K, Kobayashi K, Sakamoto A, The influences of propofol and dexmedetomidine on circadian gene expression in rat brain. Brain Res. Bull. 2009; 79(6), 441-444.

(2) Kozinn J, Mao L, Arora A, Yang L, Fibuch E, et al., Inhibition of Glutamatergic Activation of Extracellular Signal-regulated Protein Kinases in Hippocampal Neurons by the Intravenous Anesthetic Propofol. Anesthesiology 2006; 105, 1182-1191.

(3) Watanabe M, Yoshikawa M, Takeyama K, Hashimoto A, Kobayashi H, Suzuki T. Subchronic Administration of Ketamine Decreases the mRNA Expression of Serine Racemase in Rat Brain. Tokai J Exp Clin Med 2010; 35(4): 137-173.

(4) Yoshikawa M, Oka T, Kawaguchi M, Hashimoto A. MK-801 upregulates the expression of D-amino acid oxidase mRNA in rat brain. Brain Res Mol Brain Res 2004 a; 131(1-2): 141-144.

(5) Yoshikawa M, Kobayashi T, Oka T, Kawaguchi M, Hashimoto A. Distribution and MK-801-induced expression of serine racemase mRNA in rat brain by real-time quantitative PCR. Brain Res Mol Brain Res 2004 b; 128(1): 90-94.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

(1) Matsuda M, Yoshikawa M, Kan T, Watanabe M, Ajimi J, Takahashi S, Miura M, Ito K, Kobayashi H, Suzuki T. Effect of peptidase inhibitors on dynorphin A (1-17) or (1-13)-induced antinociception and toxicity at spinal level. Pharmacol Pharmacy 2017, 8, 33-51. 査読有

(2) Kanazawa, M, Watanabe, M, Suzuki, T. Reduction in amino-acid-induced anti-hypothermic effects during general anesthesia in ovariectomized rats with progesterone replacement Journal of Anesthesia 2016 30(1), 123-131 査読有

(3) Kanazawa, M, Watanabe, M, Suzuki, Yellowing of desflurane in the vaporizer.

Journal of Anesthesia 2015 29(4), 648 査  
読有

〔学会発表〕(計 1件)

(1)渡邊真理子、吉川正信、鈴木利保 モル  
ヒネ長期投与による NMDA 受容体活性化と神  
経細胞セリンラセマーゼ発現との関連 日  
本麻酔科学会第62回学術集会 2015年5月  
記録有

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 真理子 (WATANABE, Mariko)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：60609220