

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11042

研究課題名(和文) 成熟型延髄呼吸中枢におけるノシセプチンの役割と責任部位の解明

研究課題名(英文) Elucidation of effects of nociceptin/orphanin FQ on the central respiratory rhythm generators of a matured mammal

研究代表者

瀧田 恒一 (Takita, Koichi)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：80261311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：3週齢ラットからのworking heart brainstem preparation (WHBP)を用いて、ノシセプチンの成熟型呼吸リズム中枢への影響を検討した。WHBPにおいて1-2時間の横隔神経からの呼吸活動の記録が可能であった。ノシセプチンは、WHBPの横隔神経から記録された吸気活動を停止させた。この結果は、ノシセプチンが成熟型呼吸リズム中枢において、リズム抑制の神経修飾物質としての役割を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3週齢ラットからのworking heart brainstem preparationは、そのviabilityの維持には、標本灌流等の条件の微妙な調整が必要であるが、成熟型呼吸リズム中枢研究の有用なin vitroモデルとなると考えられる。ノシセプチンが、成熟型呼吸リズム中枢において、呼吸回数を減少させる、あるいは無呼吸を誘発する抑制的神経修飾物質としての役割を示唆するという本研究成果は、ノシセプチンの周術期(麻酔中、後)呼吸抑制への関与の可能性を示唆するものであり、周術期における呼吸中枢と関係する合併症の機序解明、予防、治療に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：By using working heart brainstem preparations from 3 weeks-old Wistar rats, the effects of nociceptin/orphanin FQ on the central respiratory rhythm generation in juvenile mammal (not neonatal) have been examined. Nociceptin/orphanin FQ stopped inspiratory activities in this in vitro model. This suggests that nociceptin/orphanin FQ plays a role as an inhibitory neuromodulator in respiratory rhythm generators of matured mammals.

研究分野：麻酔科学

キーワード：呼吸中枢 ノシセプチン

1. 研究開始当初の背景

ノシセプチンは、G タンパク質共役受容体の内因性受容体であり、1995 年の発見以来、多くの研究により侵害受容、鎮痛、モルヒネ耐性形成、学習記憶、中枢性心血管制御などの生理作用、薬理作用をもつことが知られている。新生動物の延髄呼吸中枢においても、呼吸リズムを抑制する神経伝達物質であり、新生動物における呼吸リズムジェネレーターと考えられる preBötzing complex と parafacial respiratory group のニューロン活動を抑制することが申請者らにより明らかにされている。

新生動物では、一次呼吸リズムは延髄の自発振するペースメーカーニューロンにより形成される。一方非新生動物(若年、成熟)では、一次呼吸リズムは脳幹のニューロンネットワークにより形成されることが知られている。したがって成熟型(非新生動物)呼吸中枢におけるノシセプチンの作用は、新生動物とは同じではない可能性がある。ペースメーカー機構の変換期はラットでは、生後 2 週間であり、ヒトでは生後 6 か月と推定されている。

脳幹呼吸リズム中枢研究のための実験モデルは、標本に横隔神経活動等の「呼吸活動」が含まれること、肺、気道および末梢化学受容体からの求心性入力と上位中枢からの入力が排除されること、また Anesthetic-free の状態で、神経修飾物質の作用を検討できることが条件となる。この条件を満たすモデルとしては、新生動物では、新生ラット脳幹脊髄標本(0-4 日齢の新生ラットの脳幹と脊髄からなる)が有名であるが、若年、成熟動物では、酸素化された灌流液の浸透により標本の viability を保つことが困難であり、大動脈から酸素化された灌流液の送液により viability を維持するラット working heart brainstem preparation が、成熟型呼吸リズム中枢検討のための in vitro 標本として望ましいと考えられる。

本研究では、ラット working heart brainstem preparation を用いることにより、ノシセプチンの成熟型呼吸リズム中枢での役割を明らかにすることができ、本研究から得られた知見は、周術期における呼吸中枢と関係する合併症の機序解明に貢献することが期待されると考えた。

2. 研究の目的

(1) 成熟型呼吸リズム形成中枢解析モデルとしてのラット working heart brainstem preparation を確立する。

(2) ラット working heart brainstem preparation におけるノシセプチンの呼吸リズム作用を検討し、成熟型呼吸リズム中枢におけるノシセプチンの役割を明らかにする。

(3) 成熟型呼吸中枢にノシセプチン受容体が存在するかについて明らかにするため、免疫組織学的手法により、脳幹における呼吸リズム形成に重要な役割をはたしていると予想される preBötzing complex, parafacial respiratory group のニューロンに、ノシセプチン受容体が存在するかを検討する。

3. 研究の方法

(1) ラット working heart brainstem preparation

3~4 週齢(45-78g)の Wistar 系雄ラットを使用した。3-4%のイソフルラン麻酔下(tail pinch で反応しない麻酔深度)で、開腹し、横隔膜以下で動物を半切断し、上半身を直ちに 4℃ に冷やした人工脳脊髄液に浸透し、開頭後、四丘体の上縁で除脳した。標本を、冷蔵庫で 4℃ に冷やした解剖シャーレに移し、4℃ 人工脳脊髄液中で、横隔膜の除去、胸郭前側 3 分の 2 の除去、左右肺の除去、左横隔神経の剖出、下行大動脈の剖出(上行大動脈送血の場合は、下行大動脈の結紮)、灌流液ドレナージのための右心房切開を行った。次に標本を記録槽へ移し、上行あるいは下行大動脈から先端を加工した 17G のダブルルーメン中心静脈用カテーテル(SMAC 1317-8WG, Covidien)を挿入し、標本灌流を開始した(ルーメンのもう一方は血圧測定に用いた)。灌流液は、バブリング槽内で 95%酸素、5%二酸化炭素でバブリングし、恒温槽で加温し、送液した。送液用のペリスタポンプ(AC-211011-2、ATTAO 社)は、バブリング槽と恒温槽の間に設置された。標本の血管断端、右心房からドレナージされた灌流液は、記録槽の排出口から排液され(排液ペリスタポンプ)、30 μm のナイロンメッシュのフィルターを通しバブリング槽に回収し、再循環させた。灌流システムのドレナージ側、バブリング槽直前に 50ml の目盛りきりザーバーを組み込み、分時灌流量を測定した。灌流液(人工脳脊髄液)の組成は以下のとおりである、NaCl, 125mM; NaHCO₃, 24mM; MgSO₄, 1.25mM; KH₂PO₄, 1.25mM; KCl, 5mM; CaCl₂·H₂O, 2.5mM; glucose, 10 mM; Ficoll 70, 1.25%; Vasopressin, 200pM。

横隔神経からの呼吸活動の記録は、左横隔神経断端をガラス電極で吸引し、信号を高入力抵抗のプリアンプと AC フィルターアンプ(50Hz-3kHz)(AB-621G, Nihon Kohden)で増幅した(x 50000)。また、横隔神経からの信号は、整流され 100ms の時定数で積分された(EI-6-1G, Nihon Kohden)。信号は増幅後アナログデジタル変換器を通し、コンピューター上でモニタリングしサンプリング速度 1kHz で記録された(Power lab 4/ 26 ML846, AD Instrument)。

(2) Working heart brainstem preparation の呼吸活動に対するノシセプチンの作用

薬物の投与

ノシセプチン(Tocris Bioscience)はバブリング槽中に投与した。灌流システム内液総量を初回充填量 300ml としてノシセプチンの濃度を計算した。実験中、システム内の灌流液の追加、除去は行われなかった。

Gasping の誘発
灌流を止めることにより、Gasping を誘発した。

(3)免疫組織染色

3 週齢の Wistar 系雄ラットに 3-4%のイソフルランの深麻酔下に開胸し、左心室内に留置したテフロン針から 4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定を行った。灌流固定後に開頭して脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒドに一晩浸漬後、20%スクロース溶液、30%スクロース溶液に標本が完全に沈下するまで浸漬させた。その後 preBötzing complex, parafacial respiratory group を含む 30 μ m 厚の水平断薄切切片をクリオスタト(CM1850、Leica Biosystems)を使用し作成し、MAS コーティングスライドガラスにマウントし、十分に乾燥させた。

切片をマウントしたスライドガラスを 0.1M リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で 3 回洗浄した後、室温のメタノール 50ml、0.1M PBS 50ml、過酸化水素水にて 30 分間クエンチ処理を行った。0.1M PBS で 3 回洗浄し、goat 血清で 60 分間室温下のブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、ノシセプチン受容体を標的とした抗ノシセプチン受容体抗体(1:400,1:800, GTX 37594, Genetex Inc)を含んだ goat 血清-0.1M PBS と 4 日一晩反応させた。続けて 0.1M PBS で 3 回洗浄し、ビオチン標識 Rabbit - IgG (Goat) を含んだ 0.1M PBS を使用し室温で 60 分間反応させた。二次抗体反応後、0.1MPBS で 3 回洗浄し、アビジン ビオチン複合体システム(Vectastatin ABC Rabbit Kit, Vector 社)を規定量 0.1M PBS で希釈し、室温で 60 分間反応させた。その後、0.1M PBS で 3 回洗浄し、DAB キット(Vector 社)を蒸留水で規定量まで希釈し、10~15 分間反応させた。反応終了後、0.1M PBS で 3 回、蒸留水で 1 回洗浄後、乾燥させ、100%エタノールで 10 分間の脱水処理、キシレンで 10 分間の透徹処理を行い、乾燥後、VectaMount Permanent Mounting Medium で封入した。

4 . 研究成果

(1)ラット working heart brainstem preparation の確立

左横隔神経からの吸気関連電気活動の記録には成功したが、記録可能時間は、30-90 分にとどまった。脳幹阻血時間(動物半切から灌流開始まで)は 20 分程度であった。横隔神経からの記録には、心電図も記録されるが、心室心房間で結紮し、心室筋を除去することにより、このノイズは減じることができた。灌流速度は、15ml/分から開始し 5-10 分をかけ 25-35ml/分に増やした。20-25ml/分を越えたあたりから自発呼吸、舌・顎運動が出現した。灌流量を 35ml/分以上に増やしても、標本の浮腫が悪化し、記録可能時間も短縮した。送液部位として、下行大動脈、上行大動脈からの灌流液の送液を試みたが、送液部位による差は認められなかったが、上行大動脈のほうが、径が太くカニューレーションが容易なため、上行大動脈送液を選択した。灌流圧は 30mmHg から 100mmHg までの広範囲であったが記録可能時間と特に相関はなかった。送液温を 31 から 25 に下げても横隔神経活動記録可能時間は 90 分を越えることはなかった。ラット working heart brainstem preparation では 5-6 時間の呼吸活動の記録が可能であると Paton JF らにより報告されている。本研究で長時間の記録ができなかった理由は、明らかにできなかったが、Paton JF らと使用した送液ポンプ(Watson-Marlow 505D, Falmouth, Cornwall)と申請者の使用したポンプが異なるため、その送液パターンの違いが記録可能時間(呼吸中枢生存時間)に違いを生じた可能性がある。

(2)ノシセプチンの作用

比較的安定した記録ができた自発呼吸開始 15-45 分の間にノシセプチン(100nM, n=4;10nM,n=3)を灌流液に投与したところ、横隔神経から記録された吸気活動は、10 分以内に消失した。吸気活動消失後灌流液停止により Gasping の誘発を試みたところ、2 例のみ Gasping が誘発された。

本研究結果は、ノシセプチンが成熟型呼吸リズム中枢においても、呼吸リズムを抑制する神経修飾物質としての役割を示唆する。ただし、本研究に用いた標本は、viability が低い可能性があることより、さらなる検討が必要である。また、working heart brainstem preparation においては、blood-brain-barrier が intact か否かの問題もあり、灌流液に投与した薬物が、ダメージをうけた blood-brain-barrier を通過して、中枢神経系に作用するのか、また blood-brain-barrier が intact で、血管断端から漏れた薬物が中枢神経系の表面、切断面から浸透して作用するのか等を区別するため、本標本で、神経修飾物質・薬物の中枢神経作用を調べる場合、中枢神経系への局所投与が必要であると考えられる。

(3)脳幹呼吸リズム関連部位におけるノシセプチン受容体の有無

免疫組織染色法により、ノシセプチン受容体の同定(n=3)を試みたところ、呼吸関連部位(preBötzing complex, parafacial respiratory group)には immunoreactive な細胞は認められなかった。この結果は、使用した一次抗体に原因がある可能性もあり、今後別の一次抗体、in situ hybridization による検討が必要であると考えられる。

ノシセプチンが、成熟型呼吸リズム中枢において、抑制的神経修飾物質として役割を示唆するという本研究成果は、ノシセプチンの周術期呼吸抑制への関与の可能性を示唆するものであり、周術期における呼吸中枢と関係する合併症の機序解明、予防、治療に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----