

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22652

研究課題名(和文) 特定神経ネットワークの人工的制御技術を駆使した全身麻酔薬の作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidating mechanisms of action of general anesthetics using chemogenetics

研究代表者

紙谷 義孝 (Kamiya, Yoshinori)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90381491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、化学遺伝学的手法を用いて青斑核ノルアドレナリン(NA)神経を制御し、NA神経の全身麻酔時の意識消失・覚醒に果たす役割を明らかにすることである。アデノ随伴ウイルス(AAV1-PRSx8-hM3Dq-HA)を作製し、青斑核NA神経を特異的に制御可能なラットを作製した。NA神経活性化によって揮発性麻酔薬による麻酔導入・覚醒時間はわずかに変化のみであったが、静脈麻酔薬による麻酔導入・覚醒時間は著明に変化した。さらにfree moving下で電気生理学的解析・脳波解析を行う手法を確立し、NA神経制御下に記録を行うことが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

揮発性麻酔薬(セボフルラン)と静脈麻酔薬(プロポフォル)とで、青斑核NA神経の応答様式が異なることが明らかとなった。セボフルランに比べて、プロポフォル投与時の麻酔導入・覚醒時間はNA神経活性化の影響を強く受けた。このことは、セボフルランに比べてプロポフォルがより特異的に青斑核に作用することを示していると考えられる。また、free moving下での電気生理学的記録に成功したことから、全身麻酔薬投与時の一連の神経活動についてより詳細に解析することが可能となった。今後、この手法を用いて様々な種類の全身麻酔薬の作用機序を調べることができるといふ点で、非常に意義があることと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to use chemogenetics to manipulate noradrenergic (NA) neurons in the locus coeruleus to determine the role of NA neurons in the loss of consciousness and arousal during general anesthesia. To specifically manipulate the NA neurons, an adeno-associated virus (AAV1-PRSx8-hM3Dq-HA) was prepared and injected into the rat locus coeruleus. NA neuron activation only slightly altered the induction and arousal times of volatile anesthetics, but markedly altered the induction and arousal times of intravenous anesthetics. Furthermore, we established a method for electrophysiological analysis under free moving and under the control of the NA neurons

研究分野：全身麻酔

キーワード：麻酔薬 chemogenetics 青斑核

## 1. 研究開始当初の背景

「麻酔がなぜかかるか？」は現代においても未解明の科学的疑問である。意識・睡眠・覚醒と密接な関わりがあるとされるのが、中枢神経系に広く分布するノルアドレナリン (NA) 神経である。青斑核を起始核として脳全体に投射し、全身麻酔時の意識消失や覚醒にも深く関与していると考えられているが、全身麻酔薬との関係性は完全には解明されていない。従来の組織標本や遺伝子解析などを用いた *in vitro* の実験系では、生体での意識消失や覚醒の評価が不可能であるため限界があった。一方、生体を用いた *in vivo* の実験系では、脳波解析や MRI 解析などが行われてはいるものの、特定の神経ネットワークの活動を掘り下げるといふ点では限界があった。

申請者の所属する研究室では、電気生理学的手法を用いて *in vivo* のラット青斑核から神経活動を捉えることに成功している。また、青斑核 NA 神経活動の指標であるドパミン- $\beta$ -水酸化酵素 (DBH) の免疫組織化学染色に成功している。しかし、電気生理学的検討では空間的分解能の点で、青斑核における組織学的検討では時間分解能の点で問題があった。さらに、従来の研究では既に麻酔薬を投与された個体からの検討であることから、全身麻酔薬による麻酔導入から覚醒までの一連の経過を追うことは困難であった。これまでの実験系での問題点を解決するために、生体からリアルタイムに電気生理学的解析を行い、かつ、より侵襲が少ない方法で特定の神経回路を人為的に操作可能な DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) 法を用いることで全身麻酔薬の作用機序を解明できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

覚醒下かつ無麻酔下の動物での青斑核神経活動を電気生理学的に解析することで、全身麻酔時の導入～維持～覚醒における青斑核神経の果たす役割を明らかにする。人為的に外部から特定の神経ネットワーク (青斑核 NA 神経) のみを制御可能な DREADD 法を用いる。

## 3. 研究の方法

(1) 青斑核 NA ニューロンを特異的に制御可能なラットの作成: DREADD は人工的に改変したムスカリン受容体で、合成化合物 Deschloroclozapine (DCZ) のみに応答する。改変受容体である hM3Dq は DCZ の結合によりそれを発現する神経のみを興奮させる。青斑核 NA 神経特異的に hM3Dq を発現させるために、NA 神経特異的プロモーターである PRSx8 promoter を用いたアデノ随伴ウイルス (AAV1-PRSx8-hM3Dq-HA) を作製した。この AAV をラットの青斑核に脳定位固定装置を用いて投与した。4 週間以上おいた後に免疫組織学的に発現を確認した。これにより、DCZ の腹腔内投与によって青斑核 NA 神経の人為的制御が可能となった [PNAS 2014; 111: 3859-64]。

(2) ウレタン麻酔下での青斑核からの電気生理学の実験(活動電位の解析): (1) のラットを使用し、ウレタン麻酔下に脳定位固定装置に固定した後、脳表に脳波解析用電極を、青斑核の部位に細胞外記録用電極をそれぞれ留置した。全身麻酔薬) 導入～覚醒までの脳波と青斑核 NA 神経の活動電位を解析した。DCZ 投与による青斑核 NA 神経の活性化を確認するとともに、NA 神経活性化が全身麻酔導入～覚醒までの脳波と活動電位に与える影響を解析した。全身麻酔薬としてセボフルランとプロポフォールを使用し、プロポフォールは尾静脈に留置したカテーテルから投与した。

(3) 覚醒下動物青斑核からの電気生理学的・行動学的実験: (1)のラットにあらかじめ脳定位固定装置を用いて青斑核に細胞外記録用電極を埋め込み、脳表に脳波記録用電極を留置した。術後 10 日程度慣らした後の以下の記録を行った。全身麻酔薬投与から、麻酔導入～維持～覚醒までの Local field potential と脳波を記録し、同時に麻酔導入の指標として肢引っ込み反射の消失までの時間と、覚醒の指標として起き上がりまでの時間とを記録した。

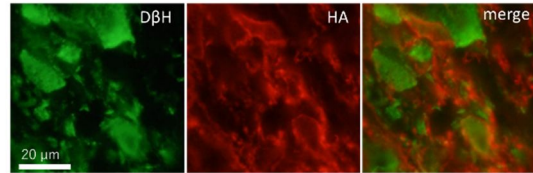


図1

#### 4. 研究成果

(1) DREADD による青斑核 NA 神経の操作(図1・2):

AAV の発現を免疫組織学的に、NA 神経のマーカーである DβH との共発現を確認することで示した。また、ウレタン麻酔下のラット青斑核から細胞外記録を行い、DCZ 投与によって発火が亢進することを確認した。

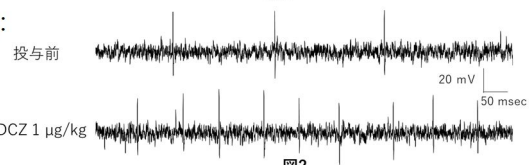


図2

(2) ウレタン麻酔下での青斑核からの電気生理学的実験(活動電位の解析): セボフルラン・プロポフォルは濃度依存性に青斑核 NA 神経の活動電位発火頻度を抑制した。覚醒前の呼気セボフルラン濃度が低濃度の時期には一時的に NA 神経の発火頻度が亢進した。セボフルラン投与終了後から投与前レベルの活動電位発火頻度に回復するまでの時間は、DCZ 腹腔内投与による NA 神経活性化により、コントロール群に比べて短縮する傾向にあった。一方、プロポフォル投与終了後からの回復時間は NA 神経活性化により著明に短縮した。

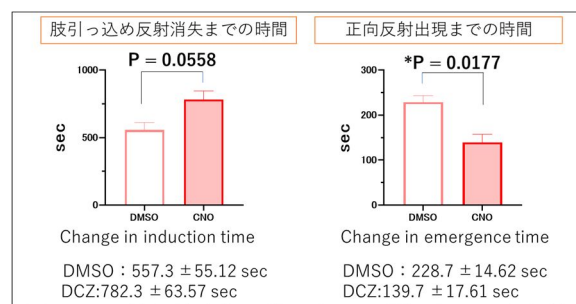


図3 LC-NA活性化が麻酔導入・覚醒に与える影響(セボフルラン投与時)

(3) 覚醒下動物青斑核からの電気生理学的・行動学的実験: DCZ 投与による NA 神経活性化により、セボフルランを用いた麻酔導入時間(肢引っ込み反射消失までの時間)はコントロール群と比較して有意差は認められなかったが、覚醒時間(正向反射出現までの時間)

は、有意に短くなった(図3)。脳波解析を行ったところ、DCZ 投与群では導入から 5 分後の時点での β 波成分が多く、導入から 15

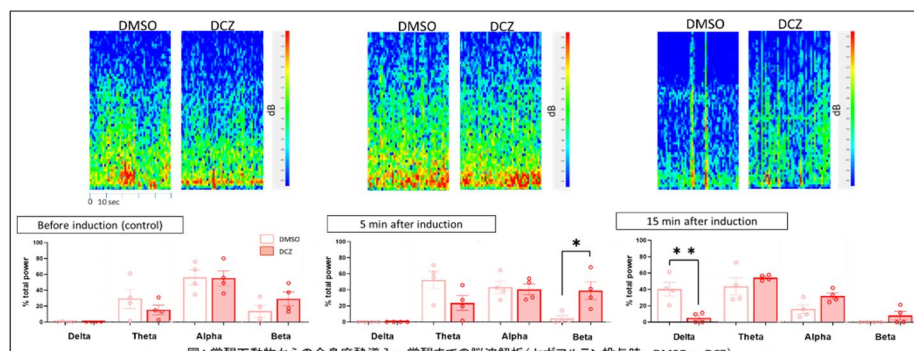


図4 覚醒下動物からの全身麻酔導入～覚醒までの脳波解析(セボフルラン投与時)

分後の時点では δ 波成分が有意に減少していた。さらに、投与終了から 5 分後・15 分後の時点でも β 波成分がコントロール群よりも優位に増加していた。つまり青斑核 NA 神経活性化によって、セボフルラン麻酔時の覚醒度が上がることが示された(図4)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasaki Mika, Kamiya Yoshinori, Bamba Keiko, Onishi Takeshi, Matsuda Keiichiro, Kohno Tatsuro, Kurabe Miyuki, Furutani Kenta, Yanagimura Harue	4. 巻 21
2. 論文標題 Serotonin Plays a Key Role in the Development of Opioid-Induced Hyperalgesia in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pain	6. 最初と最後の頁 ahead of print.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpain.2020.12.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Goh, Kamiya Yoshinori, Sasaki Mika, Ikoma Miho, Baba Hiroshi, Kohno Tatsuro	4. 巻 123
2. 論文標題 Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulphate enhances pain transmission in rat spinal cord dorsal horn	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Anaesthesia	6. 最初と最後の頁 e215 ~ e225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bja.2019.03.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furutani Kenta, Deguchi Hiroyuki, Matsuhashi Mari, Mitsuma Yusuke, Kamiya Yoshinori, Baba Hiroshi	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 A Bolus Dose of Ketamine Reduces the Amplitude of the Transcranial Electrical Motor-evoked Potential	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgical Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 ahead of print
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ANA.0000000000000653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Deguchi Hiroyuki, Furutani Kenta, Mitsuma Yusuke, Kamiya Yoshinori, Baba Hiroshi	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Low-dose droperidol suppresses transcranial electrical motor-evoked potential amplitude: a retrospective study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Monitoring and Computing	6. 最初と最後の頁 ahead of print
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10877-020-00464-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onishi Takeshi, Watanabe Tatsunori, Sasaki Mika, Kamiya Yoshinori, Horie Masao, Tsukano Hiroaki, Hishida Ryuichi, Kohno Tatsuro, Takebayashi Hirohide, Baba Hiroshi, Shibuki Katsuei	4. 巻 597
2. 論文標題 Acute spatial spread of NO mediated potentiation during hindpaw ischaemia in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 3441 ~ 3455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP277615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Mika Sasaki, Yoshinori Kamiya, Keiko Bamba, Moegi Tanaka, Takeshi Ohnishi
2. 発表標題 Opioid-induced hyperalgesia induced by chronic administration of morphine is caused by serotonin in spinal dorsal horn and, in part, through the 5-HT3 receptor.
3. 学会等名 Neuroscience 2019
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	佐々木 美佳  (Sasaki Mika)  (20774061)	新潟大学・医歯学系・助教    (13101)	
研究分担者	倉部 美起  (Kurabe Miyuki)  (30635579)	新潟大学・医歯学系・助教    (13101)	
研究分担者	上野 将紀  (Ueno Masaki)  (40435631)	新潟大学・脳研究所・教授    (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------