

機関番号 : 11101

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20591797

研究課題名 (和文) 上行性賦活系を応用した麻酔覚醒機序の検討 : 速やかな覚醒と穏やかな回復を目指して

研究課題名 (英文) Study on a mechanism of emergence from general anesthesia-apply of the ascending arousal system for smooth recovery from general anesthesia

研究代表者

榎方 哲也 (KUSHIKATA TETSUYA)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 80250603

研究成果の概要 (和文) : SD系雄性ラット大脳皮質、橋より作製したスライス標本にニューロペプチイドS (NPS) を灌流、NA、Ach、HA、グルタミン酸の放出は有意な変化を認めなかった。

SD系雄性ラットにおいてNPSはケタミンとチオペンタールの麻酔時間を有意に短縮させた。NPS受容体の拮抗薬である[D-Cys(tBu)5]NPSは上記の麻酔時間を延長し、両者同時投与ではNPSの効果が減殺された。ケタミン (100 mg/kg) を用いた麻酔において、麻酔後1日目よりNREM睡眠が対照値より一過性に増加した。REM睡眠は減少した。オレキシン、NPSはこの効果を減弱した。

研究成果の概要 (英文) : We Studied effect of Neuropeptide S (NPS) on NA, Ach, HA, and glutamate release from male adult SD rat cerebral cortex. NPS had no effect on these substances release. We also examined if NPS or Orexin had any effect on thiopental or ketamine anesthesia time, and ketamine-induced sleep disturbance. NPS decreased these anesthesia times. NPS and OX decreased the sleep disturbance.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 麻酔・蘇生学

キーワード : 麻酔学、麻酔の質、覚醒

1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化、手術適応の拡大に伴う症例数の増加に伴い、個々の症例のリスクの増大はますます著しい。このような状況で現在の麻酔科学に求められるものは安全性、快適性であろう。さらに、医療全体に求められるものとして限られた医療資源を有効に活用しなければならず、経済性も欠かせない。このような相反する要素を調和させることが麻酔科学の研究に求められる条件の一つであろうと考え、本件を申請した。

2. 研究の目的

本研究では新たに作用が発見された内因性の覚醒物質ニューロペプチド(NPS)を中心に従来の申請者らの研究実績、すなわちノルアドレナリン(NA)、オレキシン(OX)との関連から見た麻酔機序の解明と麻酔後の睡眠障害治療の試み、と合わせ、上記のテーマに沿った研究を提案した。OX、NPS、NA 作動性神経の関連をうまく活用することで、作為的なコントロールではなく、生体自身の機能をもって、急激な覚醒に伴う合併症を減少させつつ、速やかな回復を目指す麻酔管理法が確立できうる。ひいては「安全」、「快適」、「医療経済」に寄与することが期待された。本研究はこのための基礎的な所見を築き、将来の発展の礎となるものと考えている。

3. 研究の方法

In vitro

NPS が脳内ノルアドレナリン神経活性に影響を及ぼすか、また、静脈麻酔薬の影響はどうか大脳スライスを用い検討した。

体重 300-350g の SD 系ラットを頸椎脱臼による安楽死後、断頭し脳組織を摘出する。氷上で肉眼的に大脳皮質を分離し、tissue chopper により 1.0×0.35×0.35 mm の大きさの大脳皮

質スライスを作成した。作成後スライス (5-7 mg protein) を 1 ml の Krebs 溶液で満たされた試験管内に入れた。

10 分間のインキュベーションの後基礎値を測定、その後各試験管内の Krebs 溶液中のスライス標本と共に、バッファー内(37°C)に NPS (10⁻⁷-10⁻³M) を添加した。静脈麻酔薬はフエンタール、ケタミン、プロポフォール、とし濃度は 10⁻⁷-10⁻³M とした。放出されたノルアドレナリン量を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法を用いて測定し、得られた各種拮抗薬のノルアドレナリン放出抑制に関する濃度反応曲線からノルアドレナリン放出に対する 50%抑制濃度を(IC₅₀)求めた。

In vivo

体重 300-350g の SD 系ラット実験動物とし、NPS と麻酔時間、麻酔中の脳波の変化を検討する。

1. NPS と NPS 受容体拮抗薬が GABA 型および NMDA 型麻酔薬の麻酔時間に及ぼす影響

体重 300-400g の雄性 SD 系ラットを使用しペンタバルビタール (50mg/kg) 麻酔下に従来の方法に則り脳室内投与用のガイドカニューレを挿入、1 週間の回復期間をおく。当日にガイドカニューレを介し、NPS (0、0.01、0.1 nmol : 覚醒量) と NPS 受容体拮抗薬の [Aib5]NPS (20 nmol) 投与、ケタミン (100mg/kg)、プロポフォール (60mg/kg) をそれぞれ腹腔内投与し麻酔を行った。これら麻酔薬の量は標準量である。麻酔時間の定義は従来の正向反射消失から、復元までの時間とした。呼吸数も麻酔深度の指標として測定した。

2. NPS、OX が GABA 型および NMDA 型麻酔薬の麻酔下の脳波に及ぼす影響

上記と同様体重 300-400g の雄性 SD 系ラットを使用しペンタバルビタール (50mg/kg) 麻酔下に従来の方法に則り脳波導出用の電極を頭蓋骨に装着、筋電図導出の電極は背筋に縫着した。これらの電極を歯科用セメン

トで動物の頭蓋骨に固着し導線に接続、無拘束で記録可能な中継器を介し増幅器に接続した。手術後は環境温21°C、明暗周期12時間の恒温ケージ内で1週間飼育し環境馴化を図った後、上記の麻酔薬、NP SまたはOXを同様に投与し、脳波、筋電図を記録した。麻酔中の脳波を帯域別に分類、 α (8Hz-13Hz)、 β (8Hz-13Hz)、 θ (8 Hz-13Hz)、 δ (8Hz-13Hz)の各帯域毎の電位の二乗を算出し、麻酔前、後の値と比較検討した。上記の麻酔法前後の睡眠をポリグラフ（日本光電社製DC101H）及び生体信号用アンプ（日本光電社製AB-100H）で記録した。

附) 睡眠の評価：

導出された脳波及び筋電図を7日間連続でコンピュータに保存、実験終了後、オフラインで睡眠状態を評価する。対照値としては同一ラットの麻酔薬投与前 24 時間の睡眠を用いた。記録された脳波（即時的7リエ分析を含む）及び筋電図を10秒毎に区切り、各時間毎にラットの意識状態を睡眠研究で幅広く用いられている基準、覚醒、ノンレム（NREM）睡眠、レム（REM）睡眠に分類した。各意識状態の判定の診断基準は、覚醒は高周波低電位の脳波所見と粗大な体動の表出、ノンレム睡眠は低周波高電位の脳波所見と体動の欠如、レム睡眠は高周波低電位の脳波所見と体動の欠如である。対照値として、同一ラットの麻酔薬投与前 24 時間の睡眠を記録した後、各種全身麻酔薬投与後の睡眠状態を一週間連続で記録した。麻酔後の睡眠量の増減を24時間単位で対照値と比較、投与後何日目に睡眠が増減したか検証した。更にNREM睡眠中の θ 波領域成分（4Hz-8Hz）の電位の二乗（Slow wave activity: SWA）を算出し、睡眠量の評価と同様の方法で変化の推移を検討した。結果は各測定日24時間の平均値を100%とし、1時間毎の測定値を相対

値に変換した。統計は睡眠量の経日的変化に対し一元配置分散分析を適用、有意差が認められた場合、Post hoc 分析として Student-Newman-Keuel 検定を用い比較対照した。

4. 研究成果

In vitro:

SD系雄性ラット大脳皮質、橋より従来の申請者らの方法に従って作製したスライス標本にニューロペプチドS（NPS）を灌流、ノルアドレナリン、アセチルコリン、ヒスタミン、グルタミン酸の放出をHPLC、ELISAで測定したが有意な変化を認めなかった。

In vivo:

SD系雄性ラットにおいてNPS（0.1, 1.0, 10.0 nmol icv）はケタミン（100mg/kg）の麻酔時間を有意に短縮させた。

SD系雄性ラットにおいてNPS（0.1, 1.0, 10.0 nmol icv）はケタミン（100mg/kg）とチオペンタールの麻酔時間を有意に短縮させた。また、NPS受容体の拮抗薬である[D-Cys(tBu)5]NPS（20 nmol icv）は上記の麻酔時間を延長し、NPSと[D-Cys(tBu)5]NPS同時投与では対照群と麻酔時間に有意差が得られなかった。この結果は内因性のNPSが麻酔時間の維持に影響していることを示唆するものである尚、いずれの麻酔薬においても導入時間にNPSは影響を与えなかった。更にケタミン（100 mg/kg）を用いた麻酔において、麻酔前後の睡眠を連続7日間記録しその変化を検討した。各時間毎にラットの意識状態を睡眠研究で幅広く用いられている基準、覚醒、ノンレム（NREM）睡眠、レム（REM）睡眠に分類した。各意識状態の判定の診断基準は、覚醒は高周波低電位の脳波所見と粗大な体動の表出、ノンレム睡眠は低周波高電位の脳波所見と体動の欠如、レム睡眠は高周波低電位の脳波所見と体動の欠如である。麻酔後

に睡眠が変化する事が判明した。ケタミン麻酔後1日目よりREM睡眠が対照値より、麻酔2-3日目をピークとして一過性に増加した。NREM睡眠は減少傾向にあったが、有意な差異は認められなかった。上記の如く投与したオレキシン及びNPSはケタミンの睡眠に対する効果を減弱した。脳温の変化はNPS投与群の麻酔中から24時間に亘り他群と比較して有意な上昇を認めた。

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4件)

- ① Kushikata T, Yoshida H, Kudo M, Salvadori S, Calo G, Hirota K, The Effects of Neuropeptide S on General Anesthesia in Rats, *Anesth Analg*, 査読有、112巻、2010、845-849
- ② Tose R, Kushikata T, Yoshida H, Kudo M, Furukawa K, Ueno S, Hirota K, Orexin A decreases ketamine-induced anesthesia time in the rat: the relevance to brain noradrenergic neuronal activity, *Anesth Analg*, 査読有、108巻、2009、491-495
- ③ Tose R, Kushikata T, Yoshida H, Kudo M, Furukawa K, Ueno S, Hirota K, Interaction between orexinergic neurons and NMDA receptors in the control of locus coeruleus-cerebrocortical noradrenergic activity of the rat, *Brain Res*, 査読有、1250巻、2009、81-87
- ④ Ono T, Kawaguchi Y, Kudo M, Kushikata T, Hashiba E, Yoshida H, Kudo T, Furukawa K, Douglas SA, Guerrini R, Calo' G, Hirota K, Urotensin II evokes neurotransmitter release from rat cerebrocortical slices, *Neurosci Lett*, 査読有、440巻、2008、275-279

[学会発表] (計3件)

- ① 榎方哲也, Orexin decreased ketamine anesthesia-induced sleep disturbance, 第12回弘前国際フォーラム、2010年10月29日、弘前市、日本国
- ② Kushikata T, 他, Orexin A attenuates sleep-disturbance following ketamine anesthesia, 12th Annual EuroSiva meeting, 2009年6月5日、ミラノ市、イタリア共和国

- ③ 榎方 哲也, シンポジウム4 (S-4) 「脳神経科学の進歩と麻酔薬作用メカニズム-ノルアドレナリン神経ネットワークと全身麻酔機序、日本麻酔科学会第55回学術集会、2008年6月13日、横浜、日本国

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎方 哲也 (KUSHIKATA TETSUYA)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80250603

(2) 研究分担者

廣田 和美 (HIROTA KAZUYOSHI)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20238413

吉田 仁 (YOSHIDA HITOSHI)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00374843

工藤 美穂子 (KUDO MIHOKO) (H20-H21)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30003411

(3) 連携研究者

工藤 美穂子 (KUDO MIHOKO) (H21-H22)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30003411