

機関番号：15401  
研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2008～2010  
課題番号：20592373  
研究課題名（和文） 全身麻酔要素である鎮痛・不動化作用におけるサブスタンスPの役割  
研究課題名（英文） The role of substance P in analgesia and immobility induced by general anesthetic agents  
研究代表者  
入船 正浩（IRIFUNE MASAHIRO）  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：10176521

## 研究成果の概要（和文）：

麻酔作用におけるサブスタンスP（SP）の役割を検討した。*In vivo* 実験ではマウスを用い、麻酔作用として侵害刺激に対する体動の消失（不動化）を検討した。*In vitro* 実験では Wistar ラットの脊髄後根神経節（DRG）培養細胞を用い、培養細胞からの SP 遊離を検討した。モルヒネは SP 遊離を抑制することが知られているが、鎮痛作用の 95%有効量のモルヒネは静脈麻酔薬ペントバルビタールによる不動化を有意に増強した。ペントバルビタールは DRG 培養細胞からのカプサイシン刺激 SP 遊離を濃度依存性に抑制した。以上より、ペントバルビタールの不動化は SP 遊離抑制作用と関係することが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

The role of substance P (SP) in general anesthetic action was examined. In *in vivo* study, general anesthetic action was evaluated in mice using an anesthetic end point: loss of movement in response to noxious stimulation (as a measure of immobility). In *in vitro* SP release study, primary afferent neurons prepared from Wistar rat dorsal root ganglion (DRG) cells were cultured. Morphine is known to inhibit SP release from primary afferent neurons. The ED<sub>95</sub> of morphine of analgesia significantly enhanced immobility induced by pentobarbital, an intravenous anesthetic agent. Pentobarbital suppressed the SP release evoked by capsaicin in a concentration-dependent fashion. These findings suggest that the pentobarbital-induced immobility may involve the suppression of SP release from primary afferent neurons.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

研究分野：歯科麻酔学、神経薬理学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：全身麻酔作用、脊髄後根神経節（DRG）細胞、サブスタンスP

## 1. 研究開始当初の背景

| 全身麻酔薬によって引き起こされる麻酔

状態は、健忘、鎮静、意識消失、鎮痛、侵害刺激による体動の抑制（不動化）、自律神経反射の抑制などの要素からなる。Sawamuraらは、麻酔要素のうち鎮静と鎮痛は異なる部位に作用して生じることを報告し、各要素は別々に探求されるべきであると指摘している（*J Neurosci*, 20, 9242-51, 2000）。われわれは、これまでに受けた科学研究費による研究で、麻酔要素のうち意識消失は抑制性の神経伝達物質である $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）の脳内濃度を上げることにより濃度依存性に起こる一方で不動化は生じないこと、興奮性アミノ酸受容体のサブタイプの一つであるN-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体の選択的な遮断は意識消失も不動化も生じないこと、GABA神経刺激とNMDA受容体の遮断を併用しても不動化は起こらないことをすでに報告した。これらの研究結果は、意識消失はGABA神経刺激と関係するが、不動化にはこれら以外の神経系が関与していることを示唆している。事実、作用部位として多くの標的分子が*in vitro*の実験系で確認されている既存の全身麻酔薬では、用量（濃度）依存性に意識消失と不動化の両方を引き起こした。

一方、Rampilらは、外科的切開に対して体動しない（不動化）という現象は、全身麻酔薬の脊髄における作用であると報告した（*Anesthesiology*, 80, 606-10, 1994）。また、whole cellパッチクランプ法を用いた電気生理学実験により、全身麻酔薬がアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させたサブスタンスP（SP）受容体を介する $\text{Cl}^-$ 電流を抑制することが報告された（*Anesth Analg*, 94, 79-83, 2002; *Anesth Analg*, 97, 104-10, 2003）。これらのことは、全身麻酔薬による鎮痛や不動化にSPが関係している可能性を窺わせる。しかし、これらの研究からは、脊髄後角でのSPを介した侵害情報伝達を全身麻酔薬が抑制しているのかはわからない。侵害刺激による一次求心性神経からのSPの遊離は、オピオイドや $\alpha_2$ アドレナリン受容体作動薬により抑制されることがマイクロダイアリシス実験により明らかにされており、これらの受容体の活性化は麻酔要素の発現と関連があると考えられる。

## 2. 研究の目的

全身麻酔薬によって引き起こされる麻酔状態は、健忘、鎮静、意識消失、鎮痛、侵害刺激による体動の抑制（不動化）、自律神経反射の抑制などの要素からなる。これらの全身麻酔要素のうち、意識消失や鎮痛および不動化は、外科手術を行なう上での麻酔にとって特に重要と考えられる。侵害刺激による一次求心性神経から脊髄後角神経への侵害情報伝達にサブスタンスPが内因性伝達物質と

して重要な役割を果たしている。最近、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させたサブスタンスP受容体機能を全身麻酔薬が抑制することが報告された。しかし、全身麻酔作用におけるサブスタンスPの役割については今のところよくわかっていない。

静脈麻酔薬であるペントバルビタールは、GABA<sub>A</sub>受容体の $\beta$ サブユニットに結合してGABA<sub>A</sub>受容体機能を増強し、中枢の抑制性神経伝達を促進することにより麻酔作用を引き起こすと考えられている。しかし、臨床的には、バルビツレートは鎮痛作用がないか、逆に疼痛閾値を低下させるといわれている。一方、ギャバクリンはGABA分解酵素阻害薬であり、全身投与すると脳内内因性GABA濃度が上昇しGABA受容体を活性化する。ペントバルビタールはGABA<sub>A</sub>受容体の直接的な作動薬であるが、ギャバクリンはGABA受容体の間接的な作動薬である。私達は、ギャバクリンは麻酔要素のうち意識消失を引き起こすが、不動化は生じないことをすでに報告した。ところが、興味深いことに、ギャバクリンにオピオイド受容体作動薬のモルヒネや $\alpha_2$ アドレナリン受容体作動薬のデクスメドミジンを併用すると不動化を起こすことを確認している。

モルヒネやデクスメドミジンは、侵害刺激による一次求心性神経からのSP遊離を抑制することがマイクロダイアリシス実験により明らかにされている。しかし、麻酔要素である鎮痛や不動化におけるSPの役割はよくわかっていない。そこで、本研究では、まず、マウスを用いた行動薬理学実験により、麻酔要素のうち意識消失、鎮痛および不動化に及ぼすペントバルビタールの作用を検討した。次に、モルヒネやデクスメドミジンがペントバルビタールの麻酔作用に影響を及ぼすか検討した。また、ラット脊髄後根神経節（DRG）細胞から採取した一次求心性神経培養細胞からのSP遊離に及ぼすペントバルビタールの影響を*in vitro*で調べた。さらに、これらの*in vivo*と*in vitro*で検討したペントバルビタールの作用をギャバクリンの作用と比較検討した。

## 3. 研究の方法

### （1）行動薬理学実験

#### 1）実験材料

実験動物として、ddY系成熟雄性マウス（7-11週齢）を使用した。明/暗12時間（8:00-20:00）、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、固形飼料および飲料水は自由に摂取できる環境下で飼育した。すべての実験においてマウスは一回のみ使用した。

#### 2）使用薬物

本実験では薬物として、ペントバルビタール、ギャバクリン、モルヒネ、デクスメド

ミジンを使用した。

### 3) 実験方法

全ての薬物は0.9%生理食塩水に溶解し、マウスの体重10gあたり0.1 mlとなるよう調整した。実験室内の温度は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に調節し、ヘッドランプにより保温してマウスの体温を維持した。実験は午前10時から午後6時の間で行った。全身麻酔作用は、意識消失の指標として正向反射の消失の50%有効量(50% effective dose;  $\text{ED}_{50}$ )を、不動化の指標として侵害刺激に対する体動の有無の $\text{ED}_{50}$ を、また鎮痛作用の指標としてHaffner法による抗侵害効果の有無の $\text{ED}_{50}$ を用いて評価した。

### (2) SP遊離実験

#### 1) 実験材料

実験動物としてWistar系成熟雄性ラット(6-9週齢)を使用した。明/暗12時間(8:00-20:00)、室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、固形飼料および飲料水は自由に摂取できる環境下で飼育した、全ての実験においてラットは一回のみ使用した。

#### 2) 使用薬物

DRG初代培養には以下のものを用いた。ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)、ウマ血清、ペニシリン/ストレプトマイシン、2.5%トリプシン、コラゲナーゼ、 $^{125}\text{I-Tyr}^8\text{-SP}$ (81.4 TBq/mmol)。

SP遊離実験には、カプサイシン、高濃度カリウム、ペントバルビタール、ムシモール、バクロフェンを使用した。

#### 3) 実験方法

##### ①DRG細胞初代培養

Wistar系成熟ラットを断頭した後、脊椎を氷冷したHank's液中に速やかに摘出し、実体顕微鏡下でDRGのみを無菌的に単離した。単離したDRGを0.125%コラゲナーゼ溶液で2回、90分間、続いて0.25%トリプシン溶液で30分間、それぞれ酵素処理を行った。その後、10%非働化処理済ウマ血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したDMEMに細胞を分散させ、ラミニン処理した35 mm dishを用いて $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ の条件下で7日間培養した。なお、培養時には30 ng/mlの神経栄養因子を添加した。

##### ②SP遊離実験

培養DRG細胞からのSPの遊離は、100 nMのカプサイシンもしくは50 mMの高濃度カリウムイオンで刺激することにより行った。ペプチターゼインヒビターと0.1%ウシ血清アルブミンを含有させたKrebs-HEPES bufferで細胞を洗浄した後、buffer中に薬剤を溶解させ10分間処置した。その後、bufferを回収しrelease液のサンプルとした。そのサンプルを $4^\circ\text{C}$ 、13,000回転で10分間遠心し、得られた上清をSP遊離サンプルとした。

### ③ラジオイムノアッセイ法によるSP遊離量の測定

採取したSP遊離サンプルに抗SP抗体と $^{125}\text{I-Tyr}^8\text{-SP}$ を混合し、 $4^\circ\text{C}$ で18時間処置した。抗体と結合していない遊離型 $^{125}\text{I-Tyr}^8\text{-SP}$ を0.9% BSA含有2%チャコール溶液に吸着させ、2,500 rpm、10分間の遠心分離により沈殿させた後、上清中の結合型 $^{125}\text{I-Tyr}^8\text{-SP}$ の放射能活性を $\gamma$ カウンターにより測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 行動薬理学実験

ペントバルビタールは、用量依存性にマウスの正向反射を消失させた。そのときの $\text{ED}_{50}$ は32(25-41; 95%信頼限界) mg/kgであった。正向反射の消失は投与から10分後にピークとなったため、投与10分後にtail-clampを加えた。ペントバルビタール(30, 40, 50, 70, 80 mg/kg)は、用量依存性にtail-clampによる体動を消失させ、そのときの不動化の $\text{ED}_{50}$ は56(46-68) mg/kgであった。しかし、Haffner法により判定した鎮痛作用は認められず、 $\text{ED}_{50}$ は算出できなかった。

ギャバクリン(35, 50, 70, 100, 200 mg/kg)は用量依存性に正向反射を消失させ、その $\text{ED}_{50}$ は100(75-134) mg/kgであった。しかし、高用量(400 mg/kg)を投与しても不動化およびHaffner法による鎮痛作用は認めなかった。

モルヒネ(1, 5, 6, 7, 10 mg/kg)は用量依存性に鎮痛作用を起こし、その $\text{ED}_{50}$ は5(4-7) mg/kgであった。しかし、正向反射消失作用および不動化作用は認めなかった。

同様に、デクスメドミジン(10, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )は用量依存性に抗侵害作用を示し、その $\text{ED}_{50}$ は150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (66-343)であった。しかし、正向反射消失作用および不動化作用は認めなかった。

モルヒネの鎮痛作用の $\text{ED}_{95}$ (10 mg/kg)は、ペントバルビタールの不動化を有意に増強したが、対照的に等力価量のデクスメドミジン(450  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )は増強しなかった。

ギャバクリンの高用量(400 mg/kg)を投与しても不動化は生じなかった。しかし、ギャバクリン(200 mg/kg)にモルヒネ(5, 10, 15, 25, 50 mg/kg)を併用すると、用量依存性に不動化が認められ、その $\text{ED}_{50}$ は13(8-20) mg/kgであり、鎮痛作用の $\text{ED}_{50}$ に比べ高用量が必要であった。

同様に、ギャバクリン(200 mg/kg)にデクスメドミジン(100, 200, 800, 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )を併用すると、用量依存性に不動化を生じ、その $\text{ED}_{50}$ は530(140-2014)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、鎮痛作用の $\text{ED}_{50}$ に比べ高用量が必要であった。

## (2) SP 遊離実験

培養 DRG 細胞をカプサイシン (100 nM) で刺激すると、無刺激では SP の遊離は平均 50 ng であるのに対し、100 nM のカプサイシンで刺激すると平均 240 ng の SP が遊離された。また、高濃度 (50 mM) のカリウムイオン溶液 (50 mM K<sup>+</sup>) で刺激すると、平均 200 ng の SP が遊離された。そこで、DRG 細胞刺激は、100 nM カプサイシンもしくは 50 mM K<sup>+</sup> で行った。

カプサイシンもしくは高濃度 K<sup>+</sup> で刺激したときの SP 遊離に及ぼすペントバルビタールの影響を調べたところ、カプサイシン刺激で誘発される SP 遊離量を 100% としたとき、ペントバルビタールの濃度が 10<sup>-5</sup> M のとき 78% に、10<sup>-4</sup> M のとき 54% に、10<sup>-3</sup> M のとき 42% に減少させ、カプサイシン誘発 SP 遊離を濃度依存性に抑制した。しかし、高濃度 K<sup>+</sup> 刺激による遊離は抑制しなかった。

一方、高濃度 (1 mM) の GABA 受容体作動薬のムシモールやバクロフェンは、カプサイシン誘発 SP 遊離に全く影響しなかった。

以上より、ペントバルビタール麻酔による不動化には、少なくとも部分的に、SP 遊離抑制作用が関係していることが *in vivo* と *in vitro* で行った両方の実験結果から明らかになった。これらのことはこれまでどこにも報告されておらず、国内外で初めて判明した研究成果である。今後は、全身麻酔作用における SP の役割をさらに明確にし、その機序を応用した新しい麻酔法を確立することにつなげていきたい。

## 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 1 件)

清水慶隆, 入船正浩, 土井 充, 河原道夫, 久留島秀治, 谷川攻一, 麻酔導入により急性心不全となり肥大型心筋症が判明したダウン症の 1 症例, 臨床麻酔, 査読有, 32 巻, 2008, pp1647-1650

[学会発表] (計 6 件)

1. 向井明里, 入船正浩, 宮原岳史, 大植香菜, 土井 充, 清水慶隆, 齊田拓也, 三浦完菜, 西中村 亮, 福島怜子, ペントバルビタールが引き起こす麻酔要素に及ぼす GABA, グリシンおよび神経性ニコチン受容体リガンドの影響, 第 38 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2010 年 10 月 8 日, 横須賀

2. 入船正浩, 向井明里, 宮原岳史, 大植香菜, 土井 充, 清水慶隆, 齊田拓也, 三浦完菜, 西中村 亮, 福島怜子, ペントバルビタールの麻酔要素発現における GABA およびグリシン神経の役割, 第 25 回中国・四国歯科

麻酔研究会, 2010 年 7 月 10 日, 広島

3. 入船正浩, 向井明里, 宮原岳史, 大植香菜, 土井 充, 清水慶隆, 齊田拓也, 三浦完菜, 西中村 亮, 福島怜子, 麻酔要素の発現における GABA 神経の役割—ペントバルビタールと選択的作用薬の違い—, 第 43 回広島大学歯学会総会, 2010 年 6 月 12 日, 広島

4. 入船正浩, 向井明里, 清水慶隆, 齊田拓也, 土井 充, 新井由起子, 三浦完菜, 宮原岳史, 福島怜子, 内因性神経伝達物質と選択的受容体作動薬が引き起こす行動薬理作用の質の違い—特に運動亢進と麻酔作用について—, 第 6 回日本歯科麻酔学会中国・四国地方会, 2009 年 7 月 5 日, 岡山

5. 鬼塚千織子, 入船正浩, 齊田拓也, 向井明里, 井上敦子, 仲田義啓, 全身麻酔要素の一つである不動化におけるサブスタンス P の役割—脊髄後根神経節培養細胞からのサブスタンス P 遊離に及ぼす pentobarbital の影響—, 第 36 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2008 年 10 月 9 日, 大阪

6. 鬼塚千織子, 入船正浩, 井上敦子, 仲田義啓, 河原道夫, ラット一次求心性神経からのサブスタンス P 遊離に及ぼす全身麻酔薬の影響, 第 81 回日本薬理学会年会, 2008 年 3 月 17 日, 横浜

[図書] (計 1 件)

入船正浩, 医歯薬出版, 全身麻酔薬の作用機序、歯科麻酔学 第 7 版, 2010 年, pp254-257

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

入船 正浩 (IRIFUNE MASASHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：1 0 1 7 6 5 2 1

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：