

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592576

研究課題名（和文） 歯科治療によるストレス侵襲に対する精神鎮静法の心血管系保護作用

研究課題名（英文） Cardiovascular protective effect of sedation against invasive stress caused by dental care

研究代表者

江口 覚 (EGUCHI SATORU)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：20263866

研究成果の概要（和文）：培養ラット褐色細胞腫細胞(PC12)で、細胞膜電位感受性蛍光色素を用いた膜電位の測定を行った。細胞膜のKATPチャンネル活性に対して静脈麻酔薬のミダゾラムは、有意な変化を認めるに至らなかった。さらにラットを用い慢性疼痛モデルのひとつである、脊髄神経結紮損傷モデル（SNLモデル）作成し、その副腎クロマフィン細胞を単離摘出した。しかし、測定可能な細胞を十分に得るに至らなかった。

研究成果の概要（英文）：In cultured rat pheochromocytoma cells (PC12), membrane potential was measured using the cell membrane voltage-sensitive fluorescent dye. Midazolam intravenous anesthetic, did not reach to detect a significant change in activity of the cell membrane ATP-sensitive potassium channels. Furthermore, spinal nerves ligation injury model (SNL model) that was one of the chronic animal pain models with a rat was made, and the adrenal chromaffin cell was isolated and extracted. However, that failed to get a measurable cell enough.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：精神鎮静法、イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

（1）歯科治療時には治療に伴う疼痛性刺激や治療に対する精神的負担が少なくない。こうしたストレスは時として偶発症を引き起こすことがあり、安全で快適な歯科治療を行

う上で大きな障害となる。精神的ストレスは交感神経系の亢進を生じ、血圧上昇や頻脈など循環器系への負担となり、虚血発作や脳血管障害等の原因となる。循環器系疾患患者や高齢者の歯科治療では交感神経系の活動を

軽減させることが安全な歯科治療につながる。そのひとつとして静脈麻酔薬を用いた精神鎮静法を併用した歯科治療が広く用いられている (Br Dent J. 2000, 23;189:297-302)。鎮静作用を持つ静脈麻酔薬には、交感神経系を抑制することが臨床研究では知られている (日歯麻誌 1991, 19:487-504, 2005, 33:373-381)。しかし、こうした静脈内麻酔薬が循環器系へ与える機序については明らかにされていない。

(2) 心血管系では、手術侵襲や虚血、低酸素などのストレスにより ATP 感受性 K イオン (KATP) チャネルが活性化し、心筋に対する保護的な作用、および冠血管を拡張すると考えられている。(Miki T et al, NatMed 2002, 8:466-72, Suzuki M et al, J Clin. Invest 2002, 109:509-16)。この作用は preconditioning 作用と呼ばれ、先行虚血 (ischemic preconditioning) や、麻酔薬 (anesthetic preconditioning) による保護効果として広く研究が行われている。

(3) KATP 開口薬は、心血管系 KATP 活性を誘導し、冠微小血管の血流改善や心筋細胞を虚血障害から保護して冠動脈疾患患者の予後を改善することが大規模臨床実験で明らかにされている。(The IONA Study Group, Lancet 2002, 359:1269-75)。臨床では KATP 開口薬の nicorandil が、虚血性心疾患患者の周術期に用いられており、心筋虚血障害の予防に役立っている。

(4) 心血管系 KATP チャネルに対する麻酔薬の作用は、手術前後あるいは歯科処置時に起こる心筋虚血は予後に影響を与える重要な因子である。周術期の虚血発作予防や治療は麻酔科医の大きな役割である。近年、冠動脈疾患患者の手術に対する麻酔法で、揮発性吸入麻酔薬中心の麻酔法は静脈麻酔薬中心の麻酔法と比較して、周術期の心筋障害を軽減 (心筋由来逸脱酵素の低下) し、術後の心筋能回復を早めることが報告され注目されている。この作用の重要な機序として、心血管系 KATP チャネル活性に対する揮発性吸入麻酔薬と静脈麻酔薬が及ぼす作用の違いが心血管系 KATP による内因性の心保護作用に影響したと考えられている (Cromheeche S et al, Anesth Analg 2006, 103:289-96)。

(5) われわれは、これまでに生理的条件下で KATP チャネル活性に及ぼす麻酔薬の影響について検討し、その多様な作用を明らかにしてきた (Anesthesiology 2000, 92:1154-59, 2001, 93:766-70, 2002, 96:1142-47, 2004, 100:338-46)。しかし、周術期に KATP チャネル活性を介した心血管系の保護効果に対する麻酔薬の影響は不明な点が多い。KATP チャネル活性は代謝ストレス時に種々の細胞内修飾因子に調節をうけ、KATP 開口薬や拮抗薬の感受性も変化することが報告されている (Neuropsychopharmacology, 2007, 33:1336-42)。しかしながら、代謝ストレス時に KATP チャネル活性と麻酔薬の相互作用がどのような影響を受けるかは現時点では明らかではない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では褐色細胞腫細胞 (PC12) で、ストレス条件下での KATP チャネル活性の変化を検討する。ストレス条件ではカテコールアミンを添加して測定を行う。

(2) 上記条件で KATP チャネル活性に及ぼす静脈麻酔薬の影響を検討する。精神鎮静法で使用されているプロポフォール、ミダゾラムを用いる。またカテコールアミンの有無で静脈内麻酔薬がチャネル活性に影響するかを測定する。

(3) さらに褐色細胞腫細胞でカテコールアミン分泌に関与するカルシウムイオンチャネルと関連を検討する。カテコールアミン存在下で細胞内カルシウムイオン濃度の測定を行う。また、カテコールアミンの存在下で細胞内カルシウム濃度に対する静脈麻酔薬の影響を調べる。

(4) 細胞膜 KATP チャネルへの静脈麻酔薬の影響を測定する。KATP チャネル遮断薬を用いて、カテコールアミン及び静脈麻酔薬の影響を調べる。

(5) 歯科麻酔分野に置ける本研究の特色は、静脈麻酔薬がカテコールアミン分泌細胞の KATP チャネルに与える影響を明らかにすることである。歯科治療時の様々なストレスによる交感神経系の活性を生じる

カテコールアミン分泌に対する静脈麻酔薬の作用を明らかにすることは、循環器疾患患者をはじめとした、合併症患者あるいは歯科局所麻酔時のトラブル予防に対して、精神鎮静法の適応を広げ、より安全で快適な歯科治療計画への指針につながると考える。

(6) カテコールアミンの分泌細胞として褐色細胞腫細胞これまで、数多くの研究に用いられている。また、細胞の分化誘導により、中枢神経系をはじめとして神経系の研究にも用いられている。しかし、KATPチャネルに対する研究は、高血糖時のドーパミン分泌促進 (Metabolism. 2003, 52:922-6) や虚血時の細胞保護効果 (Mol Cell Biochem. 2001, 225:145-50, J Neurochem. 2003;84:1193-2000) などと報告例が少ない。また、麻酔薬の影響を調べた研究については現時点で見あたらない。今回の我々の研究は、ストレス条件下でのカテコールアミン分泌細胞の KATP チャネル活性に対する麻酔薬の影響を明らかにすることであり、神経細胞からのカテコールアミン分泌に対する麻酔薬の影響の解明につながると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

褐色細胞腫細胞 (PC12細胞) を培養する。

(2) 細胞膜 KATP チャネルの確認

PC12細胞に蛍光色素(DiBAC3(4)) をローディングし蛍光顕微鏡測定装置で蛍光強度の変化を測定することにより膜電位の変化を解析測定する。細胞膜 KATP チャネル開口薬である pinacidil を用いてチャネル開閉時の蛍光光度変化を測定する。

(3) 静脈麻酔薬の影響

静脈麻酔薬のミダゾラム、プロポフォールを用い細胞膜電位の変化を測定する。

(4) ストレス条件の動物モデル作成。

Sprague-Dawley ラット (SD ラット) を用いて慢性疼痛モデルを作成する。これはすでに手技の確立されている脊髄神経結紮損傷 (SNLモデル) とした。坐骨神経を形成している第4～6腰部 (L4～L6) 脊髄神経の

うち、L5とL6脊髄神経を絹糸できつく結紮することで作成する。慢性痛の評価は、足底部の機械的刺激に対する反応試験 (Needle Hyperalgesia Response)、および Planter test で行う。

(5) 細胞培養

慢性疼痛モデルラットを用いてクロマフィン細胞を摘出する。ラットの摘出副腎からクロマフィン細胞を単離する。

(6) 細胞膜 KATP チャネルの確認

摘出クロマフィン細胞に蛍光色素(DiBAC3(4)) をローディングし蛍光顕微鏡測定装置で蛍光強度の変化を測定することにより膜電位の変化を解析測定する。細胞膜 KATP チャネル開口薬である pinacidil を用いてチャネル開閉時の蛍光光度変化を測定する。

(7) 静脈麻酔薬の影響

静脈麻酔薬のミダゾラム、プロポフォールを用い細胞膜電位の変化を測定する。

4. 研究成果

(1) 培養ラット褐色細胞腫細胞(PC12)を用いて KATP チャネル活性の測定を試みた。細胞膜電位感受性の蛍光色素 DiBAC3(4)を用いて膜電位の変化を測定した。PC12細胞に蛍光色素をローディングし、蛍光顕微鏡および蛍光強度解析装置 (Meta シリーズ Ver5.0) にて測定した。KATP チャネル開口薬 pinacidil に反応する膜電位変化を確認した。さらに静脈麻酔薬のミダゾラムに対する膜電位の変化を測定した。測定結果に有意な変化を認めるに至らなかった。KATP チャネル開口薬 pinacidil に対する膜電位の変化は、測定条件によるばらつきが認められ、培養継代に伴うチャネル活性の低下、腫瘍化に伴うチャネルの遺伝子発現レベルの異常等が考えられた。静脈麻酔薬のミダゾラム (0.1 μ M ~ 10 μ M) での膜電位変化は有意な結果を得るに至らなかった。蛍光膜電位測定法は、細胞膜イオンチャネルの透過性が減少し、細胞膜の脱分極に伴う蛍光強度の変化を測定する。しかしながら今回の測定では膜電位の制御が難しく有意な結果が得られなかった。こうした膜電位のコントロールに伴い false negative/positive の割合が高くなる欠点も示唆されている。そこで本研究の目的を遂行

するために、正常ラットから急性単離したプライマリ細胞（副腎クロマフィン細胞）を用いてチャンネル活性の測定を試みた。

（2）ストレス条件の動物モデル作成。
疼痛モデルの評価は Needle テストおよび Planter テストで行い、結紮より4日後より有意な疼痛反応を認めた。このラットの副腎クロマフィン細胞を用いた測定を行った。

（3）静脈麻酔薬の影響
疼痛モデルのラットを用いて、副腎クロマフィン細胞の単離を試みた。しかしながら、測定に使用できる細胞を単離培養するに至らなかった。クロマフィン細胞での静脈麻酔薬の影響を測定するには至っていない。

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0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔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

江口 覚 (EGUCHI SATORU)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：20263866

(2) 研究分担者

大下 修造 (OSHITA SHUZO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・

教授

研究者番号：60144945

(3) 連携研究者

河野 崇 (KAWANO TAKASHI)

高知大学・教育研究部 医療学系 臨床医学部門・講師

研究者番号：40380076