

機関番号：13101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791438

研究課題名 (和文) オピオイドの脊髄虚血に対する神経保護効果の電気生理学的解析

研究課題名 (英文) Electrophysiological analysis of opioidergic neuroprotective effect in spinal cord ischemia

研究代表者

本田 博之 (HONDA HIROYUKI)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：20535174

研究成果の概要 (和文)：

周術期に頻用されるオピオイドは、脊髄虚血による運動麻痺を増悪させる可能性が報告されている。電気生理学的手法を用いた本研究により、オピオイドは脊髄運動ニューロンにおける神経伝達を修飾することが明らかとなったが、虚血による障害を悪化させないことが判明した。脊髄虚血の可能性がある大血管手術の麻酔管理にオピオイドを使用しても神経障害を助長する作用はないと推測される。

研究成果の概要 (英文)：

There is a possibility that perioperative administered opioids worsen paralysis caused by spinal cord ischemia. To elucidate the effects of opioids in spinal motoneurons and its significance during an ischemic insult, we conducted the electrophysiological experiments. We revealed that the opioids modulated synaptic transmission in spinal motoneurons, however, it did not exacerbate the ischemic injury. Our findings indicate that opioids administration during spinal cord ischemia should be considered as a potential component of anesthetics during aortic surgery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：麻酔・蘇生学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：周術期管理、脊髄虚血、オピオイド、パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

大血管手術に伴う脊髄虚血は麻痺や感覚障害を引き起こし、患者のQOL (Quality of life) を著しく損なう。これまで副腎皮質ステロイドホルモン大量投与をはじめとして様々な薬理的神経保護のアプローチが検討されてきたが、有効性や副作用などの点で満足できる結果が得られる方法は確立していない。麻酔中に頻用されるオピオイドμ受容体作動薬は

高濃度で神経障害を助長する可能性があると考えられ、臨床的にもオピオイド誘発麻痺としてその現象が報告されている。しかし、これらの報告は脊髄虚血モデルを用いた実験であり、モデル作成方法やオピオイド投与時期、濃度などが一定しておらず、また、そのメカニズムについても推測の域を出ない。すなわち、臨床において日常的に使用されているにも関わらず、オピオイドによる神経保護作

用・障害作用の細胞レベルでの詳細な機序については判明していないといえる。

2. 研究の目的

(1) 脊髄前角ニューロンにおいてオピオイド受容体はどのような電気生理学的特徴を有するか明らかにする。

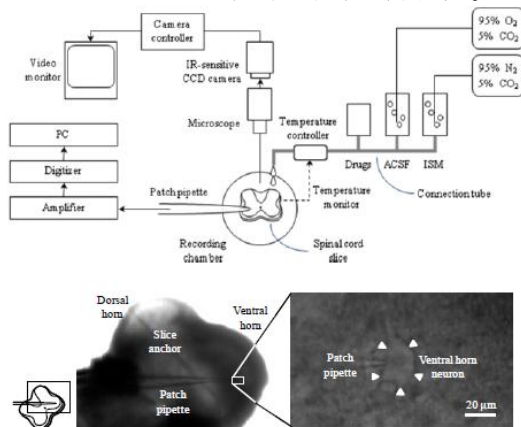
(2) 虚血負荷に対してオピオイド受容体作動薬が神経保護効果を持つかどうかを明らかにする。

(3) 脊髄前角に存在する運動ニューロンと介在ニューロンとで虚血脆弱性に差があるかどうかを明らかにする。

(4) 脊髄虚血におけるオピオイドの意義を明らかにし、大血管手術時におけるオピオイドの使用方法について新たな知見を加える。また、この結果を応用することで、周術期の脊髄虚血のみならず、外傷性脊髄損傷における二次損傷の予防など、オピオイド受容体を標的とした新たな脊髄保護方法を確立する上での手がかりとする。

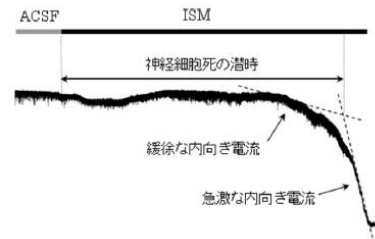
3. 研究の方法

(1) 生後8~12日の幼若ラットより脊髄を摘出して厚さ約500 μ mの脊髄横断スライスを作成し、記録用チャンバーに移して人工脳脊髄液で灌流する。チャンバー内の人工脳脊髄液の温度は36 $^{\circ}$ Cに調節する。近赤外線システムを装備した顕微鏡を用いて脊髄前角の第IX層に存在するニューロンをテレビモニター下に観察しながら微小電極を誘導し、ホールセル・パッチクランプ記録を行う(下図)。

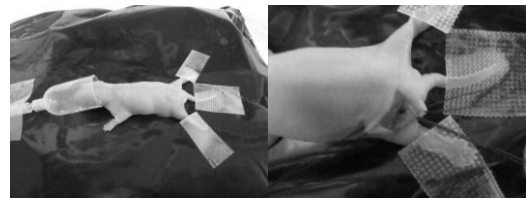


(2) 脊髄前角ニューロンにおけるオピオイド起因性電流を解析した報告はないため、各種オピオイド受容体サブタイプに対する選択的作動薬を灌流し、これによって誘起される電流の特性について解析する。

(3) 人工脳脊髄液に含まれる酸素とグルコースをそれぞれ窒素とスクロースに置換した溶液を灌流して実験的虚血負荷を行う。虚血負荷開始から緩徐な脱分極、急激な脱分極、細胞死に至るまでの時間(潜時)を測定する(下図)。次に各オピオイド受容体に対する選択的作動薬の存在下で同様の実験的虚血負荷を行い、虚血負荷開始から電位変化までの潜時など上記の項目について記録し、オピオイド受容体作動薬非存在下でのデータと比較検討する。



(4) 運動ニューロンの同定は以下のように行う。幼若ラットを麻酔し、大腿部に皮膚切開を加えて大腿四頭筋を露出する。逆行性神経トレーサーの結晶を筋肉内に埋設し(下写真)、創を縫合閉鎖して麻酔から覚醒させる。トレーサー注入から24時間以上経過した後再度ラットを麻酔して脊髄を摘出し、厚さ約500 μ mの脊髄横断スライスを作成する。落射蛍光装置(オリンパス)を装備した顕微鏡で観察して、蛍光を発する運動ニューロンと蛍光を発しない介在ニューロンを同定する。



4. 研究成果

(1) 選択的 μ 受容体作動薬であるDAMGOを灌流投与したところ、約60%の脊髄前角ニューロンで外向き電流が誘起された。このDAMGO誘起性電流はテトロドトキシンによって影響されず、用量依存性であり、そのEC50は約0.1 μ Mであった。電流-電位曲線から得られた逆転電位は-86 mVであった。 K^+ チャンネル阻害薬を同時に灌流投与すると電流の振幅が抑制された。電極内液に K^+ チャンネル阻害薬やG蛋白質阻害薬を添加することでも電流の振幅が抑制された。これらの結果からDAMGOはG蛋白質を介して内向き整流 K^+ チャンネルを開口し、膜を過分極すると考えられた。

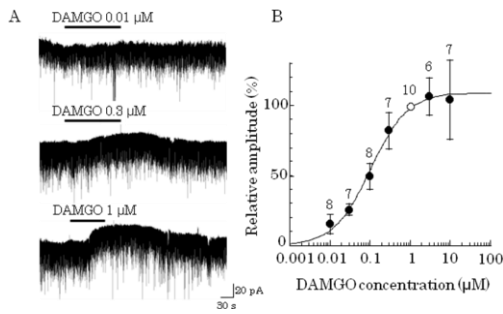


図1 DAMGO 誘起性電流の濃度-効果曲線

(2) 興奮性と抑制性の両方において、DAMGO は自発性ならびに微小シナプス後電流の頻度を抑制した。このことから、 μ 受容体は脊髄前角ニューロンのシナプス末端にも存在し、その活性化により神経伝達物質の放出が抑制されることが判明した。

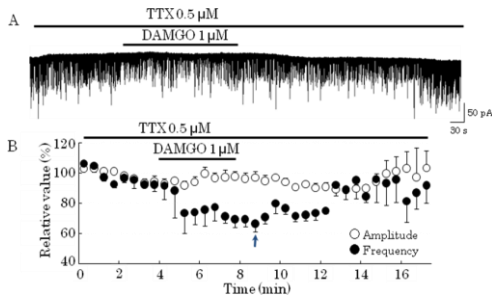


図2 DAMGO はテトロドトキシン (TTX) 存在下で記録される微小興奮性シナプス後電流の頻度を減少させる

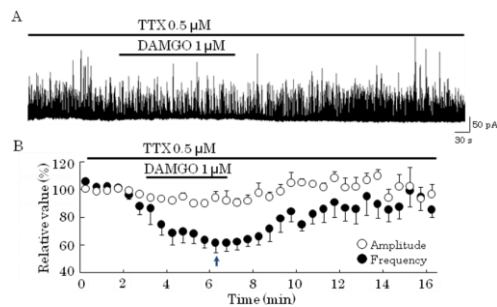


図3 DAMGO は微小抑制性シナプス後電流の頻度を減少させる

(3) 虚血模倣液灌流投与によって全ての細胞で細胞死を示唆する内向き電流が誘起された。この電流の潜時を解析したところ、日齢や、細胞膜特性の膜容量と安静時膜電位に相関することが判明した。

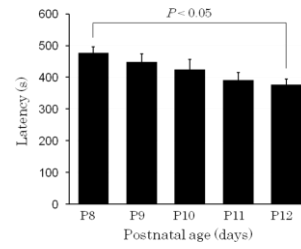


図4 日齢(P)に伴って潜時(Latency)が短縮

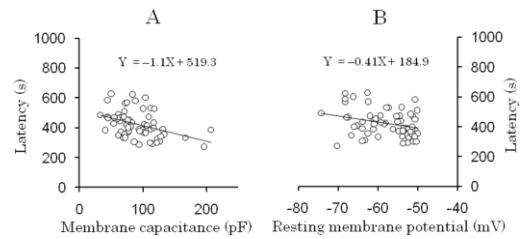


図5 膜容量(A)と静止膜電位(B)は、潜時と相関する

(4) DAMGOを同時灌流投与しながら虚血模倣液灌流投与によって誘起される内向き電流の潜時を測定した。しかし、内向き電流の潜時に有意な変化は認められなかった。

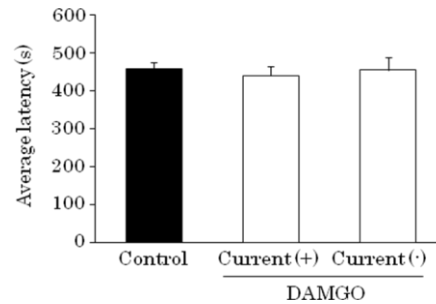


図6 DAMGO誘起性電流の有無に関わらず、 μ 受容体活性化は虚血による内向き電流の潜時に影響しなかった

(5) 麻酔下に大腿四頭筋内に逆行性神経トレーサー (Fast-DiI) の結晶を埋設した。24時間後に脊髄スライス標本を作成し顕微鏡で観察すると、蛍光を発する運動ニューロンを同定できた。しかし、埋設術後生存率は10%程度と低く、さらなる手技の改善を要すると考えられた。

(6) モルヒネやフェンタニルなどの μ 受容体作動性のオピオイドは周術期に頻用されるが、これまでに脊髄前角ニューロンにおける作用を報告したものはなかった。本研究により脊髄前角ニューロンに存在する μ 受容体がG蛋白質を介して内向き整流K⁺チャネルを開口し細胞膜を過分極すること、また、シ

ナプス末端に作用して神経伝達物質放出を抑制していることが明らかになった。

虚血病態に関して、脊髄前角ニューロンの虚血病態の電気生理学的解析により細胞膜特性や日齢といったパラメータが神経細胞死に影響を及ぼしていることを示した。これらのパラメータを補正したうえで虚血病態における μ オピオイドの作用を解析したが、有意な影響を及ぼしていなかった。

脊髄虚血が重篤な合併症のひとつに挙げられる大血管手術の麻酔管理にオピオイドを使用しても、過去の報告から示唆される神経障害を助長する作用はないと推測された。

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2件)

- ① □Hiroyuki Honda, Hiroshi Baba, Tatsuro Kohno, Electrophysiological analysis of vulnerability to experimental ischemia in neonatal rat spinal ventral horn neurons, Neuroscience Letters, 査読有、494、2011、161-164
- ② □本田博之、河野達郎、ケタミンの神経保護作用、臨床麻酔、査読無、33巻、2009、1456-1463

[学会発表] (計2件)

- ① Hiroyuki Honda, Hiroshi Baba, Tatsuro Kohno, Mu opioid receptor agonist modulates synaptic transmission to neonatal rat spinal ventral horn neurons but does not affect neuronal death induced by experimental ischemia, 40th Annual meeting of neuroscience, 2010年11月15日、San Diego (CA, USA)
- ② 本田博之、馬場洋、河野達郎、オピオイドは脊髄前角における虚血性神経細胞死を助長しない、第57回日本麻酔科学会学術集会、2010年6月4日、福岡県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 博之 (HONDA HIROYUKI)
新潟大学・医歯学総合病院・特任助教
研究者番号：20535174

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：