

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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591718

研究課題名（和文） 麻酔による意識消失メカニズムの新たな展開－視床下部 MCH 産生細胞の役割－

研究課題名（英文） A new approach to explore the mechanism of anesthesia-induced unconsciousness. - The role of the hypothalamic MCH neurons -

研究代表者

福田 悟 (FUKUDA SATORU)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：30116751

研究成果の概要（和文）：メラニン凝集ホルモン(MCH)の睡眠・覚醒サイクルに及ぼす影響を検討した。脳室内投与 MCH は覚醒期を減少したが、REM 睡眠期と nonREM 睡眠期を増大した。睡眠は記憶と密接に関連し、記憶の保持は海馬でのアセチルコリン(ACh)放出が欠かせない。本実験では、脳室内投与 MCH は REM 睡眠期を増大し海馬 ACh 放出を増大した。さらに、REM 睡眠期と海馬 ACh 放出に有意な相関が見られた。また、MCH の脳室内投与は覚醒伝達物質であるヒスタミンの大脳皮質からの放出に影響しなかった。以上の結果より、MCH は記憶と深く関連していることが示唆された。MCH の記憶との関連が麻酔にどのように影響するかは今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of melanin concentrating hormone (MCH) on sleep-wake cycle. Intraventricular (icv) injection of MCH decreased the waking episode time, whereas it increased the sleep episode time (REM & nonREM episode time). It has been reported that sleep is necessary for consolidation of memory with increasing the hippocampal acetylcholine (ACh). In the present study, icv injection of MCH increased the hippocampal ACh. There was a significant correlation between REM episode time and hippocampal ACh effluxes. Icv injection of MCH did not alter the cortical histamine release. These findings suggest that MCH may contribute to the consolidation of memory. Further experiment is necessary to explore whether the memory function of MCH may be involved in the anesthetic state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

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：メラニン凝集ホルモン、睡眠・覚醒、記憶、麻酔

1. 研究開始当初の背景

麻酔薬により何故意識消失が生ずるの

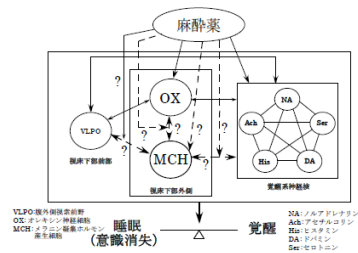
か？また、麻酔メカニズムと自然睡眠・覚醒システムとはどのように異なるのであろうか？とい

う疑問は麻酔科医にとって大きな課題である。近年、分子レベルでの麻酔薬の特異的作用が明らかになり、自然睡眠・覚醒神経経路での麻酔薬の作用が明らかになりつつある。申請者らは、その中でも視床下部に存在するオレキシン(OX) 神経細胞の役割に注目し、脳室内投与 OX はイフルラン麻酔下での脳波を活性化させることを初めて明らかにした(Yasuda Y, et al. Anesth Analg, 2003)。

また、自然睡眠における REM 睡眠を制御すると考えられる前脳基底核にイフルラン麻酔下で OX を投与すると脳波は活性化し、大脳皮質からの興奮性神経伝達物質であるアセチルコリンの放出を増大させることから、OX にイフルラン麻酔からの覚醒作用があることを見いだした(Dong HL, et al. Anesthesiology 2006)。この OX の麻酔からの覚醒における役割に関しては、最近他のグループからも報告されている(Kelz MB, et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008)。一方、視床下部外側には OX 神経細胞のみならずメラニン凝集ホルモン(MCH) 神経細胞が存在し、ラット脳では OX 神経細胞が 6,700 に対して MCH 神経細胞は 12,300 存在する(MonDirrousta M, et al. Eur J Neurosci 2005)。MCH 神経細胞は OX 神経細胞を含めた視床下部神経細胞への投射のみならず、OX 神経細胞や興奮性神経伝達システムであるモアミン系と同じように脳全般に投射している。従来、MCH 神経細胞に関する研究ではエネルギーバランスに関する研究が主体であり、社会的に肥満の抑制が大きなテーマとされる中、睡眠・覚醒におよぼす影響についてはほとんど注目されなかった。

近年、MCH 神経細胞は OX 神経細胞と同様に睡眠・覚醒に関与する神経核に投射していることが明らかになり、MCH の睡眠・覚醒に関する研究が注目されつつある。それによると、脳室内投与 MCH は REM 睡眠期

ならびに non-REM 睡眠期を増大し(Verret L, et al. BMC Neurosci 2003)、OX 神経細胞とは全く反対の作用を呈する(MonDirrousta M, et al. Eur J Neurosci 2005; Bayer L, et al. Neurosci 2005)ことが報告されているが、これら睡眠・覚醒をつかさどる神経核への影響については全く知られていない。(下図)



また、麻酔薬に関する研究では、イフルランまたはセブフルラン麻酔は OX 神経細胞の活動は抑制するが、MCH 神経細胞の活動に影響しない(Kelz MB, et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008)と報告されている。しかし、この研究については MCH 神経細胞活動を c-fos で形態学的観点からのみ見ている研究であり、c-fos の免疫反応がないからといって必ずしもその神経細胞に活性がないとは言えない(Dragunow M & Faull R. J Neurosci Methods, 1989)との報告がある。従って、MCH 神経活動を評価するには c-fos のみでなく、本研究のように実際の MCH の放出を測定することも必要となる。MCH 神経細胞は OX 神経細胞と同様な神経投射が見られているが、麻酔薬が異なればその作用部位も異なることが報告されている。睡眠・覚醒に関する種々の神経核における MCH の役割ならびに MCH 神経細胞と OX 神経細胞との相互作用に対する麻酔薬の影響を見ることは、麻酔による意識消失メカニズム解明の糸口になると考える。

2. 研究の目的

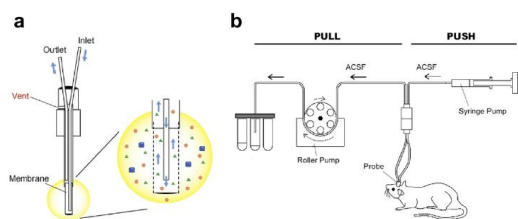
視床下部外側から後側に存在する OX 神

神経細胞は覚醒の維持に重要な働きをしていることが近年の研究から明らかになっている。また、申請者らの研究を含めて、OX 神経細胞は麻酔からの覚醒にも深く関与していることが明らかになった。一方、視床下部外側には OX 神経細胞のみならず、MCH 産生神経細胞が存在し、その数は OX 神経細胞数の約 1.5 倍であり、神経投射領域も OX 神経細胞とよく似ているにもかかわらず、最近まで睡眠・覚醒神経系における役割については殆ど注目されなかった。本研究の目的は、MCH 神経細胞の自然睡眠・覚醒神経系における作用を明らかにし、麻酔のカニズムにおける役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

I. Push-Pull 法による脳内ペプチド放出測定

大脳皮質でのマイクロダイアリシス（ホリスルホン酸膜 細孔径約 0.2 μm のろ過膜：分子量 100 万 dalton 以下）下で Push-Pull 法により採取した溶液を Radio immuno assay (RIA) により測定する。この方法は、以下の論文を参考にして行った。



(Takeda S et. Al. Neuroscience 2011;186:110-119 より引用：A: microdialysis probe の内容、b: Push-Pull の概要)

まず、最初に安静時ならびに NMDA 受容体拮抗薬による興奮に対し大脳皮質からの OX の放出を RIA にて測定した。次に MCH の大脳皮質からの放出についても計画した。

II. MCH 脳室内投与による睡眠・覚醒および大脳皮質または海馬からのアセチルコリン(ACh)

放出に及ぼす影響

- ① 対象：体重 280~350g 前後 Wistar 雄ラット
- ② 実験開始 5~7 日前に、イソフルラン麻酔(2%)
 - ・ラット実験用脳定位固定器具にラット頭蓋を固定
 - ・マイクロダイアリシス用マイクロカニューレ
 海馬留置：Bregma から前後(AP) -5.6 mm, 外側(L) 4.5 mm, 背腹(DV) -3.5 mm
 大脳皮質：Bregma から AP -0.8 mm, L 1.5 mm, DV -4.0 mm に留置
 - ・脳波および項頸筋電図測定用電極を留置
- ③ 実験当日：脳室内投与
 - ① 対照群：生理食塩水(0.5 μl)、② MCH 投与群：1.0 μg 投与後 5 時間観察。
- ④ 大脳皮質または海馬からのマイクロダイアリシスによる ACh の測定

- ・灌流速度 1 $\mu\text{l}/\text{分}$ 20 分毎に灌流液採取→HPLC にて測定
- ・ACh：再生セルロース膜(分子量 5 万 dalton 以下)、電気化学検出器にて測定

III. 内側中核 (Medial Septum: MS) への MCH 微量注入

- ① 対象：体重 280~350g 前後 Wistar 雄ラット
- ② 実験開始 5~7 日前に、イソフルラン麻酔(2%)
 - ・ラット実験用脳定位固定器具にラット頭蓋を固定
 - ・マイクロダイアリシス用マイクロカニューレ
 海馬留置 Bregma から AP -5.6 mm, L 4.5 mm, DV -3.5 mm
 MS 微量投与カニューレ：Bregma から AP 0.8 mm, L 0 mm, DV -5.0 mm に留置
 - ・脳波および項頸筋電図測定用電極を留置
- ③ 実験当日
 1. 対照群：生理食塩水(0.2 μl)、2. MCH 投与群：0.1 μg 微量投与後 2 時間観察。

IV. MCH 脳室内投与時および MS 微量投与

時の REM 時間と大脳皮質または海馬 ACh 放出との関連

REM 睡眠時間と大脳皮質または ACh 放出関係は Spearman rank correlation coefficient を用いた。

V. MCH の脳室内投与が大脳皮質ヒスタミン(HA) 放出に対する影響

① 対象：体重 280~350g 前後

Wistar 雄ラット

② 実験開始 5~7 日前に、イソフルラン麻酔(2%) ・ラット実験用脳定位固定器具にラット頭蓋を固定 ・マイクロアイリス用ダミーニューレ

大脳皮質: Bregma から AP -0.8 mm, L 1.5 mm, DV -4.0 mm に留置

③ 実験当日：脳室内投与

1. 対照群：生理食塩水(0.5 μl)、2. MCH 投与群：1.0 μg 投与後 5 時間観察。

④ 大脳皮質からのマイクロアイリスによる HA の測定

・灌流速度 1 μl/分 20 分毎に灌流液採取→ HPLC で測定し、HA は蛍光検出器にて測定。

4. 研究成果および考察

I. Push-Pull 法による脳内ペプチド放出測定

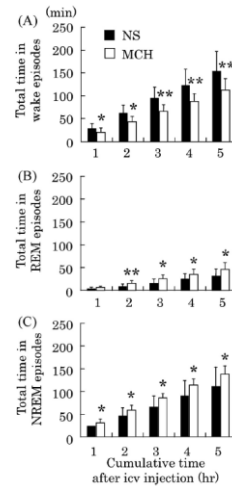
最初に安静時および MK801 誘発興奮時の大脳皮質からの OX または MCH の放出を Push-Pull 法を用いて測定可能かどうかを計画した。まず OX を用いて行い、測定は RIA を用いた。その結果、安静時および興奮時の大脳皮質からの OX 放出はいずれも測定限界以下の濃度でその変化を追うことができなかった。他の報告によるとこの Push-Pull によるペプチド測定は回収率が最大 10% であるとの報告もあり、このことが測定できなかった原因であったかもしれない。このため、MCH に関しては RIA の費用高額の面もあり実験ができなかった。

II. MCH 脳室内投与による睡眠・覚醒および

大脳皮質または海馬からのアセチルコリン(ACh) 放出に及ぼす影響

① 睡眠・覚醒に及ぼす影響

脳室内投与 MCH により、有意に覚醒期は減少し、REM 睡眠期および nonREM 睡眠期は増大した。

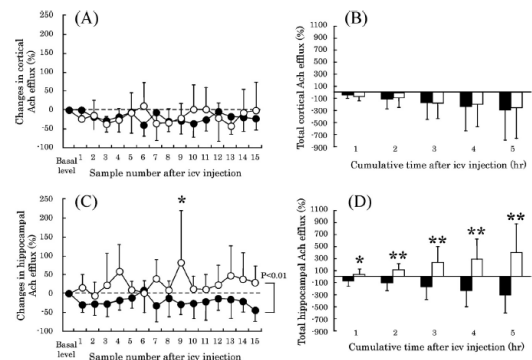


(図 1: 脳室内投与 MCH の睡眠・覚醒サイクルに及ぼす影響：*P<0.05, **P<0.01 対 対照群)

以上の結果より、脳室内 MCH は睡眠 (REM および nonREM 睡眠) を増大することがわかった。

REM 睡眠および nonREM 睡眠ともに記憶と密接な関連があることが知られている。そこで、脳室内 MCH が大脳皮質ならびに記憶と関連のある海馬からの ACh の放出にどのように影響するかを検討した。

② MCH 脳室内投与による大脳皮質または海馬から ACh 放出に及ぼす影響



(図 2 脳室内投与 MCH の大脳皮質または海馬からのアセチルコリン放出に及ぼす影響)

MCH 脳室内投与は大脳皮質からの ACh 放出に影響しなかったが、海馬からの ACh 放

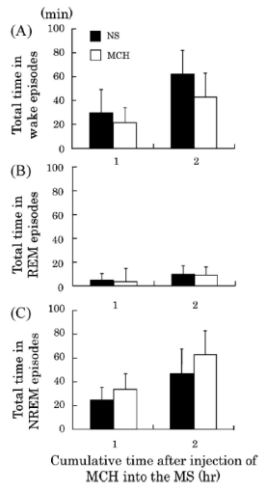
出を有意に増大した。(図 2)

ところで、海馬 ACh の由来を考慮すると、その起源の神経細胞は前脳基底核内側中核 (Medial Septum) であることが知られている。

III. MS への MCH 微量注入による睡眠・覚醒および海馬からの ACh 放出に及ぼす影響

① 睡眠・覚醒への影響

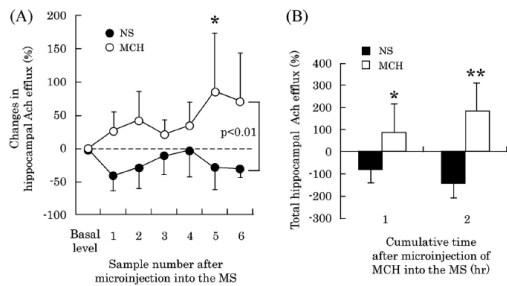
MCH を MS に微量注入しても覚醒期・睡眠期ともに変化はなかった。



(図 3 MS への MCH 微量注入が睡眠・覚醒へ及ぼす影響)

② 海馬 ACh 放出に対する影響

MCH を MS に微量投与すると、海馬からの ACh 放出は増大した。

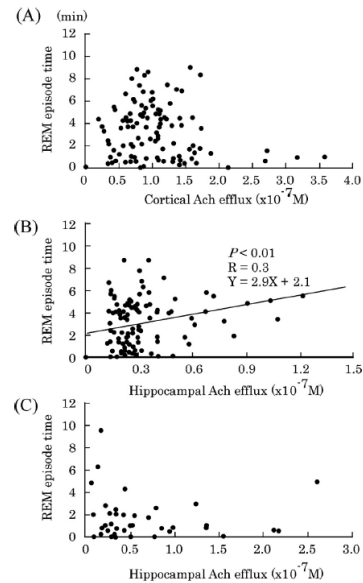


(図 4 MCH の MS への微量注入が海馬からのアセチルコリン放出に及ぼす影響)

IV. MCH 脳室内投与時および MS 微量投与時の REM 時間と大脳皮質または海馬 ACh 放出との関連

脳室内投与 MCH では、REM 睡眠時間と大脳皮質 ACh 放出とは有意な相関がみられなかったが(A)、REM 睡眠時間と海馬 ACh 放出とは有意な相関がみられた。一方、MS への MCH 微量注入時の REM 睡眠時間と海馬 ACh 放出には有意な相関は見られなかった。

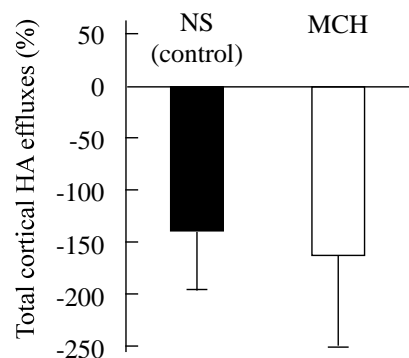
以上の結果から、MCH は主として REM 睡眠を増大させ、記憶に関与することが示唆された。



(図 5 脳室内投与 MCH による REM 睡眠時間と大脳皮質または海馬 ACh との関連および MS 微量等よによる REM 睡眠時間と海馬 ACh との関連)

V. MCH 脳室内投与が大脳皮質 HA 放出に及ぼす影響

MCH は大脳皮質からの HA 放出に有意な影響を与えなかった。(図 7) なお、生理食塩水 (NS) で HA の放出が減少しているのは実験を昼間に施行したため、ラットは寝ていることが多かったためと考える。



(図 7 MCH 脳室内投与後の大脳皮質からの HA の放出変化)

MCHの働きとして睡眠(REMおよびnonREM)を増大することが判明した。しかし、その睡眠期増大作用は覚醒・睡眠サイクルに関連する大脳皮質からの伝達物質(AChおよびHA)の放出とは関連せず、むしろ記憶と深く関連していることが強く示唆された。したがって、MCHは麻酔による意識消失に関与するというよりは、近年報告されている麻酔薬による記憶障害にMCHがどのように関わるかが、今後の重要な課題となった。

(まとめ)

- ① 脳室内投与 MCH の睡眠・覚醒サイクルにおいて、睡眠期 (REM および nonREM 睡眠期) を増大した。
- ② 脳室内投与 MCH は海馬からの ACh 放出を増大し、REM 睡眠期と有意な相関が見られた。
- ③ MS への MCH 微量投与は海馬からの ACh 放出を増大したが、REM 睡眠期には影響しなかった。
- ④ MCH は大脳皮質からの HA の放出に有意な影響を与えなかった。
- ⑤ MCH は記憶と関連することがわかったが、麻酔にどのように影響するかは今後の重要課題である。

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)

- ① Zhi-hong Lu, Satoru Fukuda, Yoichi Minakawa, Atsushi Yasuda, Hidetoshi Sakamoto, Shigehito Sawamura, Hidenori Takahashia, Noriko Ishii. Melanin concentrating hormone induces hippocampal acetylcholine release via the medial septum in rats. Peptides 44, 2013, 32-29.

[学会発表] (計2件)

- ① Zhi-hong Lu, Satoru Fukuda, Atsushi Yasuda, Hidetoshi Sakamoto, Shigeho Morita. Effects of intraventricular melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections on sleep and cortical acetylcholine release.
日本麻酔科学会第58回学術集会
神戸 2011年
- ② 皆川 陽一、路 志紅、福田 悟、坂本 英俊、澤村 成史、高橋 秀則

メラニン凝集ホルモンの記憶促進作用

日本麻酔科学会第59回学術集会

神戸 2012年

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 悟 (FUKUDA SATORU)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：30116751

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

坂本 英俊 (SAKAMOTO HIDETOSHI)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：90349267

森田 茂穂 (MORITA SHIGEHO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：60143476

澤井 淳 (SAWAI JYUN)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：20527410

高田 純子 (TAKATA JYUNKO)

帝京大学・国際教育研究所・助手

研究者番号：00527418

仙頭 佳起 (SENTHO YOSHIKI)

帝京大学・国際教育研究所・助手

研究者番号：80527416