

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 5月 15日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791710

研究課題名（和文）インビボパッチクランプ法による大脳皮質体性感覚野への麻酔薬作用機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of effects of anesthetic agent on rat somatosensory cortex using in vivo patch clamp recording

研究代表者

塩川 浩輝（HIROAKI SHIOKAWA）

九州大学・大学院医学研究院・麻酔蘇生学・助教

研究者番号：30572490

研究成果の概要（和文）：本研究ではウレタン腹腔内投与による鎮静下のラットを用いて大脳皮質の第一次体性感覚野からのin vivoパッチクランプ記録を行った。また、ラットの後肢に痛覚刺激を与え、その情報が如何に伝達され処理されるかを解析した。さらに、ラットに静脈麻酔薬（プロポフォール、ペントバルビタール、レミフェンタニル、ケタミン）を投与し、各種静脈麻酔薬が感覚情報伝達・処理機構にどのような作用を及ぼすかを評価した。

研究成果の概要（英文）：In this project, in vivo whole-cell patch-clamp recordings were performed from primary somatosensory neurons which responded to the mechanical stimuli to the receptive field of the hind paw area. Propofol, pentobarbital, remifentanyl or ketamine was administered intravenously to the rat after starting recordings. We evaluated the effect of these anesthetic agents by analyzing the responses evoked by pinch stimuli.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000 円	1,050,000 円	4,550,000 円

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：疼痛管理学

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質細胞レベルでの痛覚情報処理に関しては不明な点が多く、全身麻酔薬の神経系に及ぼす影響に関する知見も未だ乏しい。

全身麻酔薬の効果は鎮痛、鎮静、筋弛緩の度合いによって評価される。そのう

ち鎮静薬、筋弛緩薬の効果は客観的に評価することが可能であるが、鎮痛効果はあくまでも患者本人の主観的評価に頼らざるを得ず、全身麻酔薬による意識のない状態で鎮痛効果を客観的に評価する方法は乏しい。実際には鎮痛作用の効果の判定は体動や血圧上昇といった方法しか無く、麻酔薬の神経系に対

対する作用を評価するには不適切と言わざるを得ない。これは、実際に痛覚伝達や情報処理の機序、また神経系のそれらの作用に対し全身麻酔薬がいかに影響を及ぼすかについての知見が未だ乏しいからに他ならない。末梢から直接入力を受ける感覚情報は脊髄後角膠様質ニューロンで統合修飾され、脊髄の投射ニューロンによって視床を介して最終的に大脳皮質へと伝達される。最近ではPETやfunctional MRI、脳磁図など人を対象にした画像法アプローチによる研究の発達により、痛覚情報は大脳の新皮質である第一次体性感覚野や第二次体性感覚野に伝えられ、痛みが知覚されることが明らかとなった。また島や、帯状回、扁桃核、海馬といった大脳辺縁系にも痛覚情報が伝えられ、痛みに対する情動反応が引き起こされることが分かっている。このように痛覚受容に大脳のいかなる部分に関与するかが次第に明らかとなりつつある。

2. 研究の目的

ラットの大脳皮質第一次体性感覚野からin vivoパッチクランプ記録を行い、大脳皮質において痛覚がどのように伝達され情報処理されるかを観察した。さらに、各種麻酔薬を投与し、痛覚情報伝達・処理機構にどのような影響を及ぼすか検討した。

実験計画立案当初は純粋な麻酔作用を観察するため、無麻酔下での応答を確認した後麻酔薬を投与することにしてしたが、無麻酔での痛み刺激は倫理上問題あると考え、ウレタンにより鎮静された(鎮痛効果はない)状態記録をとることとした。

また、麻酔薬は吸入麻酔薬と静脈麻酔薬など様々存在するが、今回は静脈麻酔を中心に鎮静作用、鎮痛作用が評価できるか否か検討した。

3. 研究の方法

(1) in vivo標本の作成

ウレタンの腹腔内投与により鎮静されたラットを腹臥位にし、頭部固定装置にセットした。ラットの大脳皮質第一次体性感覚野で、後肢からの入力がある領域をラットのブレインマップを参考にして確認し、記録部位とした。頭蓋骨を広く剥出し記録部位を中心にしてプラスチックのリングを頭蓋骨に固定しチャンバーを作成した。記録部位にドリルで頭蓋骨に径2~3mmの

穴を開け硬膜を除去しチャンバー内をKrebs液で灌流した。本実験では麻酔薬投与の実験を行うため頸部で気管切開し、Y字型のチューブを挿入し呼吸条件を一定に保つためラット用人工呼吸器に接続して調節呼吸下に実験を行った。また、大腿静脈に静脈麻酔薬投与のためのルートを確認した。大脳皮質よりホールセルパッチクランプ記録を行った。全ての創部には局所麻酔を十分に施して覚醒ラットの創部痛を最小限にし、ストレスを与えないように注意した。

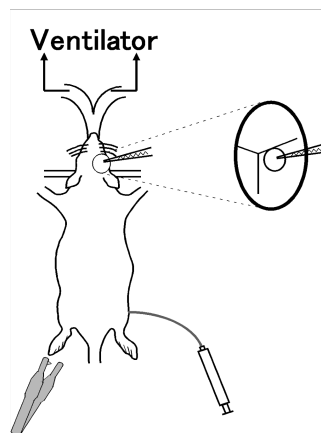


図1 ラット大脳皮質第一次体性感覚野からのin vivoパッチクランプ記録

(2) in vivoパッチクランプ記録と痛覚刺激応答の解析

ラットのブレインマップを参考にして大脳皮質第一次体性感覚野のうち後肢からの感覚入力がある領域を確認し、記録部位とした。

記録電極を大脳皮質に刺入し、ホールセルパッチクランプ記録を行い、単一神経細胞の電流変化、膜電位変化を観察した。

次に、パッチクランプ記録下にラットの後肢に痛覚・触覚刺激を与え、その情報が如何に伝達され処理されるかを解析した。

さらに、各種麻酔薬(プロポフォール、ペントバルビタール、レミフェンタニル、ケタミン)を投与し、痛覚情報伝達・処理機構にどのような影響を及ぼすかを検討した。記録電極内にニューロバイオチンを含めてホールセルパッチクランプを行うことで実験終了後に染色を行い、大脳皮質における記録細胞の位置や細胞の形態を確認した。この染色された標本とブレインマップを比較することにより記録細胞が体性感覚野の足肢領域に存在することを再度確認した。

4. 研究成果

(1) *in vivo*パッチクランプで観察される 周期的興奮と痛覚刺激応答

電位固定法により膜電位を-70mVに固定すると、持続時間および振幅の大きな周期的な興奮性の内向き電流を認めた。電流固定法にて膜電位を記録すると周期的な膜電位変化を認めた。過去の報告では、この膜電位・電流の周期的変化はoscillationと呼ばれている。この現象は脳スライス標本の*in vitro*パッチクランプでは観察されず、脊髄後角からの*in vivo*パッチクランプ記録でも観察することができない。近年小脳からの*in vivo*パッチクランプにより、小脳レベルでもこの 周期的バースト状の興奮が認められており、上位中枢特異的な現象であることが明らかとなっている。さらに、この周期は脳波の周波数と一致していることが過去の報告で明らかとなっている。したがって、この周期を計測することでラットの意識状態を評価しようと考えた。次にパッチクランプ電極刺入部位の対側の後肢足底を鉤付きピンセットで痛覚刺激するとバースト状の興奮性電位・電流変化が観察された。記録電極と同側の後肢や両側前肢に痛み刺激を加えてもこの応答は観察されず、体部位局在性を有していることが示唆された。ここで観察されるoscillationの周波数と痛み刺激に対する応答を解析することで各種静脈麻酔薬の鎮静作用、鎮痛作用を評価した。

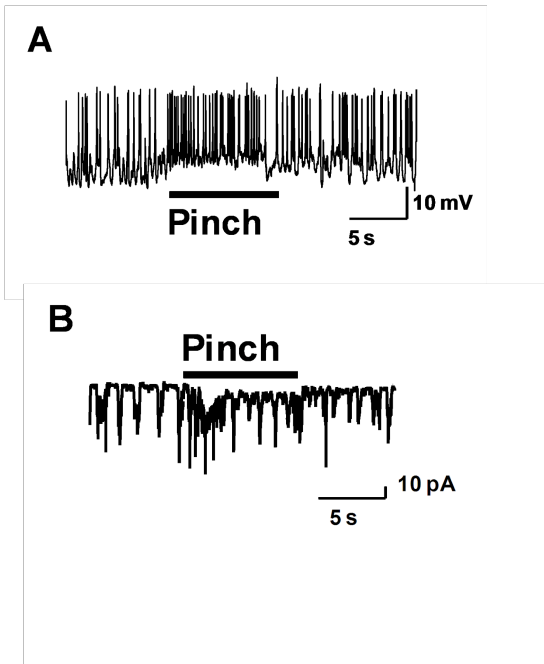


図2 電流固定法 (A)と電位固定法 (B)で

観察できる痛覚刺激応答

(2) プロポフォールの作用の解析

プロポフォール5mg/kgを静脈投与するとoscillationの周期は有意に低下した。すなわち、プロポフォールは臨床鎮静作用を電気生理学的に観察できた。プロポフォールは鎮静薬として広く臨床使用されているものの、鎮痛作用は軽度であると考えられている。しかし、今回の研究結果ではプロポフォール投与後痛覚刺激応答が完全に抑制された。このことはプロポフォールが鎮痛作用を有している可能性を示唆するものである。

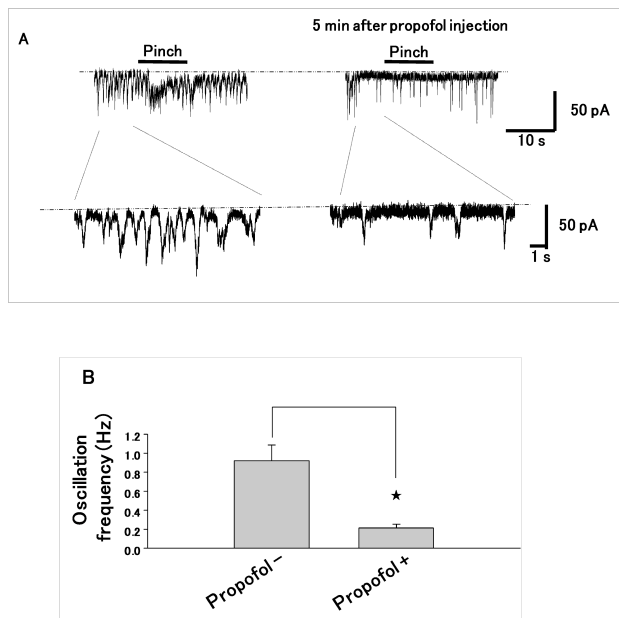


図3 プロポフォールによる鎮痛作用、鎮静作用

(3) ペントバルビタールの作用の解析

次に、臨床鎮静薬として使用されるペントバルビタールの作用を検討した。ペントバルビタール2mg/kgを静脈投与すると

oscillationの発生頻度を減少させ、プロポフォールと同様、鎮痛作用が確認された。第一次体性感覚野への痛覚応答もペントバルビタールで完全に抑制された。したがってペントバルビタールはプロポフォールと同様、鎮静作用のみならず、鎮痛作用を併せ持つことが示唆された。

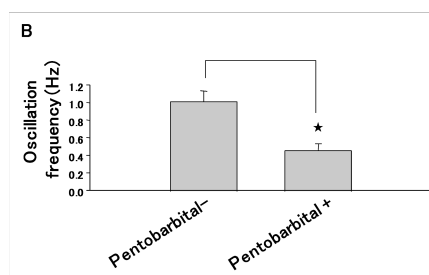
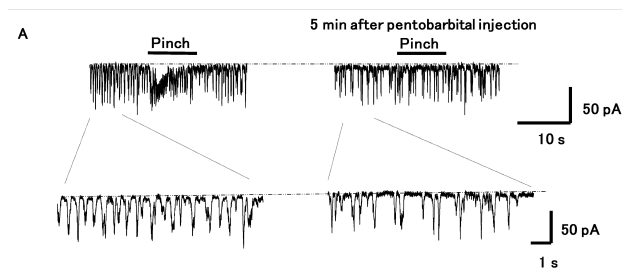


図4 ペントバルビタールの鎮痛作用、鎮静作用

(4) レミフェンタニルの作用の解析

さらに、臨床的に麻薬系鎮痛薬として使用される持つレミフェンタニルの作用を検討した。レミフェンタニル $2\mu\text{g}/\text{kg}$ の静脈投与後もプロポフォールやペントバルビタールと同様、大脳皮質への痛覚情報伝達を完全に抑制することが明らかとなった。したがって、臨床で認めるのと同様強力な鎮痛作用が示唆された。しかし、プロポフォールやペントバルビタールで観察されたoscillationの発生頻度は認めず、鎮静効果は軽度であることが示唆された。

(5) ケタミンの作用の解析

臨床的に鎮痛作用、鎮静作用を有しており、慢性痛治療薬としても注目されているケタミンの作用を検討した。プロポフォールやペントバルビタールと同様、大脳皮質への痛覚情報伝達を抑制することが明らかとなった。しかし、プロポフォールやペントバルビタールで観察されたoscillationの発生頻度の減少効果と比較し、ケタミンではその減少効果は有意に軽度であった。すなわち、ケタミンの鎮静効果は軽度であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

①塩川 浩輝、古賀 公平、山浦 健、辛島 裕士、外 須美夫

発表表題 : Analysis of analgesic effect of propofol by in-vivo patch clamp recordings from the somatosensory cortex of rats
学会名 : European Society of Anesthesiology annual meeting, Euroanaesthesia 2012
発表年月日 : 平成24年6月10日
発表場所 : フランス、パリ

②塩川 浩輝、山浦 健、辛島 裕士、外 須美夫

発表表題 : Analysis of analgesic effect of propofol by in-vivo patch clamp recordings from the somatosensory cortex of rats
学会名 : Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists
発表年月日 : 平成24年10月14日
発表場所 : 米国、ワシントンD.C.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩川 浩輝 (Shiokawa Hiroaki)

九州大学・大学院医学研究院・麻酔蘇生学分野・助教

研究者番号 : 30572490