

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593056

研究課題名(和文) ドパミン受容体サブタイプの選択的リガンドを応用した新しい全身麻酔法の開発

研究課題名(英文) Selective ligand of dopamine receptor subtype gives to anesthetic action.

研究代表者

小川 慶隆(清水慶隆)(Ogawa, Yoshitaka)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：10294597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：鎮静下あるいは全身麻酔下で侵害刺激を加えたときの脳内ドパミン神経の変化について検討した。マウスをペントバルビタールで鎮静あるいは全身麻酔状態にして侵害刺激を加えると、鎮静下の側坐核においてのみドパミン遊離量は有意に増加したが、線条体や全身麻酔下では侵害刺激の有無にかかわらずペントバルビタールはドパミン遊離量を減少させた。ドパミン再取り込み阻害薬は有意に側坐核のドパミン量を増加させ、ペントバルビタールの鎮静を浅くした。逆に、ドパミン枯渇薬のレセルピンは側坐核のドパミン量を減少させ全身麻酔作用を増強した。本研究により、ドパミン神経の刺激は覚醒と、その抑制は麻酔作用の増強と関係することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the alteration in dopamine neurons of the central nervous system after noxious stimulation during sedation or general anesthesia induced by pentobarbital. The noxious stimulation under pentobarbital sedation increased dopamine release in the nucleus accumbens, but decreased in the striatum. Pentobarbital anesthesia also decreased dopamine release both in the nucleus accumbens and striatum. The dopamine re-uptake inhibitor GBR-12909 significantly increased dopamine concentration in the nucleus accumbens, and reversed pentobarbital sedation. On the contrary, the depletion of dopamine induced by reserpine enhanced pentobarbital anesthetic effects. These results suggest that stimulation of dopamine neurons has a relationship to arousal, and depression of dopamine neurons has a relation to enhancement of anesthesia.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：全身麻酔 ドパミン 正向反射 不動化

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔作用は単に中枢神経系全体が抑制された状態ではなく、健忘、鎮痛、鎮静、意識消失、筋弛緩、侵害刺激による体動の抑制（不動化）といった全身麻酔要素が複合した状態と考えられる。これらの全身麻酔作用が脳内の単一の部位への作用で発現しているとは考え難く、全身麻酔の各麻酔要素はそれぞれ異なった部位や作用機序を介して生じていると考えたほうが解釈しやすい。その機序として、中枢神経系での

- アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid; GABA) 神経などの抑制性神経を促進するか、グルタミン酸神経などの興奮性神経を抑制するか、あるいはその両方の作用により生じると考えられているが、詳細は明らかでない。

中枢神経系において、大脳辺縁系の一部である側坐核は、扁桃核、海馬、腹側被蓋野の神経細胞から入力を受け、側坐核にある中脳辺縁系ドパミン神経は、快・不快、嗜好、意欲、怒り、不安といった情動の制御に重要な役割を果たしている。このことから、中脳辺縁系ドパミン神経は情動に関連した覚醒との関係性が示唆されている。一方、黒質線条体系ドパミン神経細胞の変性・脱落はパーキンソン病を惹起することから、この系は身体の運動制御に関係していると考えられる。最近、侵害刺激は、パニロイド受容体を介した腹側被蓋野から側坐核へ至るドパミン神経を賦活することが報告された。また、側坐核や線条体のドパミン神経刺激は覚醒と関係することが示唆されている。ドパミン神経系が興奮性か抑制性かについては議論の余地があるが、アンフェタミンなどの覚醒剤がドパミン神経の賦活を介して動物を興奮させることから、この点からは興奮性神経と考えることが可能であろう。全身麻酔中に手術侵襲の強さが変わると、麻酔深度が変化するといわれている。実際、全身麻酔薬の投与量がまったく同じであっても、手術中に侵襲が強くなると、体動、血圧上昇、頻脈などの反応を認め、臨床的には麻酔深度が浅くなったと捉えられている。本研究では、鎮静下あるいは全身麻酔下で侵害刺激を加えたときの脳内ドパミン神経の役変化について検討する。

2. 研究の目的

本研究では、マウスにペントバルビタールを全身投与し、麻酔作用のうち特に鎮静、筋弛緩、正向反射消失について評価後、鎮静および正向反射消失状態下で侵害刺激を加えたときに側坐核や線条体でのドパミン量を変化させるか、また、薬物により脳内ドパミン量を増減させたときにこれらの麻酔作用に影響を与えるか、行動薬理学的手法およびマイクロダイアリシス法を用いた神経生化学的手法により *in vivo* で検討す

る。本研究の目的は、これらの実験により、鎮静下あるいは正向反射消失下で侵害刺激を加えたときの脳内ドパミン神経の変化について明らかにし、ドパミン受容体サブタイプを選択的リガンドを応用した新しい麻酔法を開発することにある。

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 25 ± 1 、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、GBR-12909、レセルピンを使用した。

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、腹腔内に投与した。実験室内の温度は 25 ± 1 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。

行動薬理学実験

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; ED_{50}) (righting-reflex ED_{50}) を、筋弛緩の指標として握力低下の有無を用いて評価し、また侵害刺激としては Haffner 法による tail-clamp を用いた。

正向反射スコアは、記録時に手でピーカーを水平面から約 45° の角度に傾け、3 度この操作を繰り返し、以下の正向反射スコアにより行った。スコア 0 はマウスを裏返そうとしてもすぐに正位に向き直る、すなわち正向反射が正常な状態、+1 は 3 回とも 2 秒以内に正向反射がある状態 (軽度正向反射障害)、+2 は 2 秒から 10 秒の間に少なくとも 1 回は正向反射がある状態 (中等度～高度正向反射障害)、+3 は 3 回とも 10 秒以内には正向反射がない状態 (正向反射消失) を示すものとした。この正向反射消失作用は意識消失作用と関係すると考えられる。

意識消失が見られなかったペントバルビタールの投与量について筋弛緩に関すると考えられる握力測定を行った。握力測定には齋藤式マウス用握力測定装置を用いた。ペントバルビタールもしくは生理食塩水を投与したマウスに握力測定装置のグリッドを掴ませ、手で尾を水平に引いた際にマウスが引っ張られる力に耐え切れず、グリッドを放してしまうまでの最大の力 (N) を測定した。測定は 5 分毎に 1 時間測定した。

神経生化学実験

正向反射障害 (鎮静) 時あるいは正向反射消失時に侵害刺激を加えたときの側坐核と線条体での細胞外液をマイクロダイアリシ

ス法により回収した。回収した灌流液中のドパミン量は HPLC-ECD を用いて測定した。また、GBR-12909 もしくはレセルピン投与後の側坐核ドパミン量についても計測した。

まず、マウスを抱水クロラル(400 mg/kg 腹腔内投与)および 2%キシロカイン(頭部の局所麻酔)で麻酔した後、マウス脳低固定装置に固定した。頭部の皮膚を切開・剥離し翻転させ、マウス脳地図に従い側坐核もしくは線条体に向けてガイドカニューラを挿入し、ガイドカニューラ内にダミーカニューラを挿入した。マイクロダイアリシス当日は朝 9 時に抱水クロラル鎮静下(200 mg/kg 腹腔内投与)にてダミーカニューラを除去し、マイクロダイアリシス用プローブを挿入した。プローブはフリームービングユニットに接続し、実験中はマウスがアクリルケージ中を自由に動いて飲水および食料摂取できるようにした。プローブ挿入後はマイクロインジェクションポンプおよびシリンジを用いてシリンジフィルターにて濾過を行ったリンゲル液の送液を灌流速度 1 μ L/min で開始した。マイクロダイアリシスプローブ挿入 5 時間後から回収した灌流液中のドパミン量を測定した。送液ポンプの流速は 150 μ L/min とし、カラムオープンで分析用カラムを 25 に熱した。マイクロダイアリシスにより回収したリンゲル液は、オートインジェクターを用い 10 分毎に分析用カラムおよび電気化学分析機に送液され、ドパミン量をデータプロセッサにて解析した。実験終了後はエーテルで安楽死させた後脳を摘出した。摘出した脳は液体窒素で凍結させ、クライオスタットで 10 μ m に薄切し、ニッスル染色を行い透徹、封入した。光学顕微鏡を用いてプローブの位置を確認し、適切にプローブが側坐核あるいは線条体に留置されていたことが確認された実験のみをデータとして使用した。

4. 研究成果

ペントバルビタール(20, 25, 30, 35, 40, 45 mg/kg)は、用量依存性に正向反射スコアを増加させ、投与 10 分前後にはピークに達した。ピークに達した後は、経時的に正向反射スコアは減少し、120 分後にはいずれの投与量でも投与前の状態に回復した。正向反射の消失の ED₅₀は 37.5(10.1-138.7)mg/kg であった。

生理食塩水およびペントバルビタール 10 mg/kg 投与群では 1 時間の実験中に有意な握力の変化は認められなかったが、ペントバルビタール(15, 25, 30 mg/kg)は、用量依存性に握力を低下させ、ペントバルビタール投与 10 分後に最も握力の低下を認めた。全投与群とも実験終了時の握力は実験前と有意差を認めなかった。

生理食塩水投与群では側坐核と線条体ともに実験中にドパミン遊離量に変化はみられなかった。ペントバルビタールは用量依

性に側坐核と線条体のドパミン量を減少させた。20mg/kg 投与群での側坐核ドパミン量は侵害刺激により有意に増加したが、37.5 mg/kg 投与群では変化を認めなかった。侵害刺激によりすべてのマウスに体動を認めたが、線条体ではいずれの投与量でもドパミン量に変化を認めなかった。

GBR-12909 は投与 30 分後には側坐核におけるドパミン遊離量を有意に増加させた。GBR12909 投与群では正向反射消失に要するペントバルビタールの ED₅₀は 36.9(11.2-122.2) mg/kg であり、用量反応曲線はペントバルビタール単剤との間に有意差は認められなかったが、ペントバルビタール 20 mg/kg 投与時の正向反射スコアは有意に低下した。

レセルピンは投与 60 分後からドパミン遊離量を著しく減少させた。レセルピン投与群ではペントバルビタールの用量反応曲線を左にシフトさせ、正向反射消失に要するペントバルビタールの ED₅₀は 10.4(0.9-122.7) mg/kg と有意に低下していた。また、鎮静用量であるペントバルビタール 20 mg/kg を投与したすべてのマウスで正向反射が消失した。

以上の結果から、ペントバルビタールは用量依存性に線条体と側坐核のドパミン量を減少させ、このドパミン神経の抑制は正向反射消失作用を修飾すると考えられた。また、ペントバルビタール麻酔下での侵害刺激は軽度正向反射障害(鎮静)下では、中脳辺縁系のドパミン神経を賦活し情動系を介して覚醒へと向かわせるが、正向反射消失下では侵害刺激を加えても情動系が働かないため、覚醒へ向かうこと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 3 件)

1: Kikuchi N; Irifune M; Shimizu Y; Yoshida K; Morita K; Kanematsu T; Morioka N; Nakata Y; Sakai N, Selective blockade of N-methyl-D-aspartate channels in combination with dopamine receptor antagonism induces loss of the righting reflex in mice, but not immobility: Psychopharmacology, 232(1), 39-46, 2015. (査読あり)

2: Shimizu Y; Tanigawa K; Ishikawa M; Ouhara K; Oue K; Yoshinaka T; Kurihara H; Irifune M, An appropriate compression pace is important for securing the quality of hands-only CPR--a manikin study, Hiroshima J Med Sci: 63(1-3), 7-11, 2014. (査読あり)

3: Okumura T; Harada K; Oue K; Zhang J; Asano S; Hayashiuchi M; Mizokami A; Tanaka H; Irifune M; Kamata N; Hirata M; Kanematsu

T, Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) regulates lipolysis in adipose tissue by modulating the phosphorylation of hormone-sensitive lipase: PLoS One, 9(6), e100559, 2014. (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

1: 石井 裕明, 入船 正浩: ペントバルビタール鎮静下で侵害刺激により促進されたマウス側坐核ドパミン遊離は、正向反射消失下で抑制される: 第 42 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会(新潟), 2014 年 10 月 11 日.

2: Shimizu Y; Oue K; Yoshinaka T; Doi M; Yoshida M; Irifune M, Simulated training of hands-only CPR for dental students: The 7th Annual Meeting of the Federation of Asian Dental Anesthesiology Societies, Niigata, Japan, October, 11, 2014.

3: Oue K; Irifune M; Kanematsu T, Mice lacking phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP) are protected from high-fat diet-induced obesity: 第 47 回広島大学歯学会総会(広島), 2014 年 6 月 21 日.

4: 入船正浩: 選択的 NMDA チャネル遮断とドパミン受容体拮抗作用の併用はマウスの正向反射を消失させるが、不動化は生じない: 第 28 回中国・四国歯科麻酔研究会(広島), 2013 年 7 月 15 日.

5: Shimizu Y; Tanigawa K; Ishikawa M; Irifune M, Feasibility study for performing effective chest compressions according to the American Heart Association 2010 Guidelines for CPR: American Heart Association 2012 Resuscitation Science Symposium, Los Angeles, U.S.A., November 3, 2012.

6: 宮原 岳史, 入船 正浩, 酒井 規雄, 齋藤 尚亮: プロポフォル誘発性 PKC トランスロケーションにおける C1 ドメインの役割: 第 40 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会(福岡), 2012 年 10 月 6 日.

〔図書〕(計 1 件)

1: 入船正浩, デンタルダイヤモンド社, 脳血管障害, 歯科におけるくすりの使い方 2015-2018, 2014 年, pp328-329.

〔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

小川 慶隆 (OGAWA YOSHITAKA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(歯)・助教
研究者番号: 10294597

(2) 研究分担者

入船 正浩 (IRIFUNE MASAHIRO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(歯)・教授
研究者番号: 10176521
森田 克也 (MORITA KATSUYA)
広島文化学園大学・看護学部・教授
研究者番号: 10116684

(3) 連携研究者

()

研究者番号: