

平成 2 6 年 5 月 1 5 日現在

機関番号 : 3 2 2 0 3

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2012 ~ 2013

課題番号 : 2 4 7 9 1 6 2 3

研究課題名 (和文) 全身麻酔薬が脊髄サブスタンス P 放出と C - F O S 発現に与える影響

研究課題名 (英文) Effects of general anesthetics on substance P release and c-Fos expression in the spinal dorsal horn

研究代表者

高 薄 敏 史 (TAKASUSUKI, TOSHIFUMI)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 8 0 3 4 8 0 5 2

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要 (和文) : 全身麻酔薬がホルマリン誘発性脊髄後角サブスタンス P 放出に与える影響をNK1 receptor internalization (NK1Ri) を指標に評価し、さらに脊髄後角c-Fos発現に対する効果についても評価を行った。プロポフォール、ペントバルビタール、イソフルラン、亜酸化窒素は侵害受容性NK1Riを抑制しなかったが、イソフルラン+亜酸化窒素およびフェンタニルはNK1Riを抑制した。またすべての全身麻酔薬は侵害受容性c-Fos発現を抑制した。これらの全身麻酔薬は脊髄においてシナプス後性抑制効果を示し、さらにフェンタニル、イソフルラン+亜酸化窒素はサブスタンスPを介したシナプス前性抑制も示した。

研究成果の概要 (英文) : We examined the effects of general anesthetics on formalin-induced substance P release and c-Fos expression in superficial dorsal horn. Fentanyl, but not propofol, pentobarbital, isoflurane nor nitrous oxide alone inhibited NK1 receptor internalization (NK1Ri). However, isoflurane+nitrous oxide reduced NK1Ri. All agents reduced c-Fos expression in the superficial dorsal horn. General anesthetics at anesthetic concentrations block spinal neuronal activation through a mechanism which is independent of an effect upon small primary afferent peptide release. The effect of fentanyl alone and the synergistic effect of isoflurane and nitrous oxide on substance P release suggests a correlative rationale for the therapeutic use of these anesthetic protocol by blocking nociceptive afferent transmitter release and preventing the initiation of cascade which are immediately postsynaptic to the primary afferent .

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 麻酔・蘇生学

キーワード : 全身麻酔薬 サブスタンス P NK1R internalization c-Fos

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔薬の中には100年以上臨床使用されているものもあるがこれらの作用機序の詳細は未だ明らかにされていない。特にイソフルラン、亜酸化窒素といった吸入麻酔薬の機序に関しては不明な点が多く、現在も数多くの研究が行われている。過去の研究において、これらの鎮痛機序に脊髄におけるグルタミン酸放出抑制の関与が電気生理学的に示唆されている。また GABA_A、グリシンといった抑制性シナプス系の関与、あるいはニコチン性 Ach 受容体の関与も指摘されている。また亜酸化窒素に関しても、GABA_A、ニコチン性 Ach 受容体、グルタミン酸 (AMPA 受容体、NMDA 受容体)、下行性抑制系 (オピオイド系、ノルアドレナリン系) などの関与が指摘されている。プロポフォールあるいはバルビツレートといった静脈麻酔薬は主に鎮静作用を有するが、その機序は中枢神経における GABA が誘発する一過性抑制性 Cl⁻ 電流の活性化であるという報告がある。また NMDA 受容体、グリシン受容体あるいは TRPV 1 受容体の関与を示す研究もある。これら全身麻酔薬は脳、脊髄などの中枢神経における様々な作用が複雑に影響しあうことでその効果を発現するとも考えられており、未だに統一された見解はない。一方、鎮痛薬として広く使われているモルヒネは、全身およびくも膜下投与により脊髄後角表層における第1次求心性線維からのサブスタンス P 放出を有意に抑制することが知られている。そこで我々は様々な全身麻酔薬が脊髄後角サブスタンス P 放出に影響を与え、それが全身麻酔薬の作用機序の一つになっているのではないかと推測した。

c-Fos は神経興奮を示す調節因子であり、中枢神経において NMDA といった興奮性シナプス伝達におけるシナプス後性成分を反映していると考えられている。過去の研究において、セボフルランやフェンタニルが脊髄 c-Fos 発現に対して抑制効果を示すものもあり、これらの評価はシナプス後性作用を調べるうえで有用と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、全身麻酔薬の作用機序を明らかにするために各薬剤の脊髄後角表層における興奮性神経伝達物質の一つであるサブスタンス P の第1次求心性線維からの放出に与える影響を neurokinin 1 receptor internalization (NK1Ri) を用いて免疫組織学的に評価することである。サブスタンス P の評価は過去に ELISA 法を用いた報告があったが近年、侵害受容刺激によりシナプス前終末端から放出されたサブスタンス P は2次ニューロンに存在する neurokinin 1 受容体 (NK1R) と結合し、細胞内に取り込まれて内在化 (internalization) することが免疫組織学的に証明されている。この手法を用いて各麻酔薬の侵害受容性シナプス伝達に与え

る影響を明らかにすることが可能と考えられる。侵害受容刺激による脊髄後角 C 線維からのサブスタンス P 放出に電位依存型カルシウムチャンネル (VDCCs) がシナプス前および後において関与していることが我々の過去の実験で明らかになっている。モルヒネといったオピオイドは第1次求心性線維においてシナプス前終末端の VDCCs を抑制し、グルタミン酸あるいはサブスタンス P などの興奮性神経伝達物質の放出を抑制することが知られている。よって全身麻酔薬がサブスタンス P 放出を抑制するならば、シナプス前終末端における VDCCs 抑制も全身麻酔薬の複雑な作用機序のひとつの経路として考えられ、全身麻酔薬のさらなる作用機序の解明に役立つと思われる。加えて各麻酔薬の脊髄後角表層ニューロンにおけるシナプス後性作用について評価するために免疫組織学的手法により c-Fos 発現を評価した。

3. 研究の方法

1) NK1R internalization (NK1Ri) の評価

Sprague Dawley ラット (250-300g) を、プロポフォール (100mg/kg)、ペントバルビタール (50mg/kg)、イソフルラン (2MAC=2.4%) + 空気、亜酸化窒素 (66%) + 酸素 (33%)、イソフルラン (2MAC) + 亜酸化窒素 (66%) + 酸素 (33%)、フェンタニル (20 µg) 生理食塩水の7群に分類し、各全身麻酔薬を投与した。プロポフォール、ペントバルビタール、フェンタニル、生理食塩水は腹腔内投与とし、イソフルラン、亜酸化窒素は麻酔器を用いて吸入させた。吸入麻酔開始10分後あるいは腹腔内投与15分後にラット後肢足底部に5%ホルマリン (50 µl) を皮下注射し、侵害受容モデルを作製した。ホルマリン皮下注射10分後、4%パラホルムアルデヒドを用いて経心臓的灌流固定を行った。灌流固定直後、ラットから脊髄を取り出し、4%パラホルムアルデヒドで後固定、さらに30%スクロースに一昼夜浸漬した後、脊髄をO.C.Tに包埋、-70℃で冷凍保存した後、クリオスタットを用いて厚さ30 µmの標本切片を作製した。この標本切片を洗浄し、抗NK1ポリクローナル抗体 (1:3000) を滴下し一晩常温保存、翌日 Alexa 488 (1:1000、NK1 受容体を標識)、Alexa 594 (1:1000、ニューロンを標識) を用いた2次抗体を滴下し、2時間暗所保存した。ProLong を標本に滴下し、カバーガラスを留置した後、蛍光仕様システム顕微鏡 (OLYMPUS BX53) を用いて左右脊髄後角表層 (lamina I) におけるNK1Ri陽性ニューロンと陰性ニューロンの比率を算出し、各麻酔薬の脊髄第1次求心性線維からのサブスタンス P 放出に対する効果を評価した。算出されたNK1Riの割合 (%) は t 検定あるいは一元配置分散分析法 (one-way ANOVA) を用いて統計処理し、比較検討した。

加えて、過去に他施設において亜酸化窒素の作用機序にオピオイドの関与を示唆する

研究がある。この事実を確認するため、亜酸化窒素投与群のうち、ナロキソン（1mg/kg）を麻酔開始 15 分前に腹腔内投与し、サブスタンス P 放出に対する亜酸化窒素の影響の変化について調べた。

さらにこれらの全身麻酔薬が NK1Ri を有意に抑制した場合、その麻酔薬の NK1Ri への直接的な抑制を除外する目的で、麻酔薬投与 20 分前にサブスタンス P（30nmol）をラット髄腔内に投与し、外因性に惹起された脊髄 NK1Ri に対する影響についても評価した。

2) c-Fos 発現の評価

ラットを前述のごとく 3 群に分け、吸入麻酔薬投与開始 10 分あるいは静脈麻酔薬投与 15 分後、5%ホルマリン（50 μ l）をマウス後肢足底部に皮下注射し、2 時間経過観察した。麻酔効果の減弱が疑われた場合は適宜麻酔薬を追加投与した。その後、前述のごとく 4%パラホルムアルデヒドによる経心臓的灌流固定を行い、取り出した脊髄を O.C.T に包埋し、-70℃ に凍結させる。クリオスタットを用いて 30 μ m に切り出し、free-floating 法を用いて抗 Fos ポリクローナル抗体（1:5000）に浸漬、一昼夜 4℃ で保存した。翌日、標本を洗浄、Alexa 488 および 594（1:500）に浸漬し、2 時間暗所保存した。プレパレートに留置し、ProLong 滴下、カバーガラスで覆い、蛍光仕様システム顕微鏡下に左右脊髄後角における Fos 陽性ニューロンの数を計測、各全身麻酔薬の c-Fos 発現に対する影響を評価した。算出された各群の c-Fos の平均を *t* 検定あるいは一元配置分散分析法（one-way ANOVA）を用いて統計処理し、比較検討した。

4. 研究成果

1) NK1R internalization(NK1Ri)の評価

ホルマリンの後肢足底部皮下注射により同側脊髄後角表層（第 1 相）における NK1Ri の発現率が増加し、侵害受容によるサブスタンス P 放出の増加を認めた（ $P<0.05$ 、図 1、2）。

図 1 蛍光顕微鏡により観察された neurokinin 1 receptor internalization (NK1Ri)

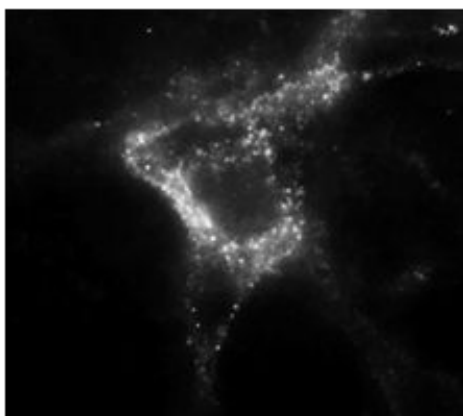
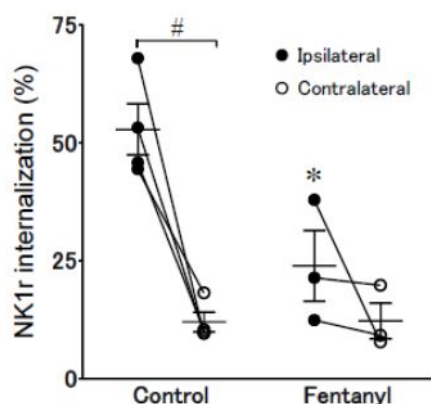
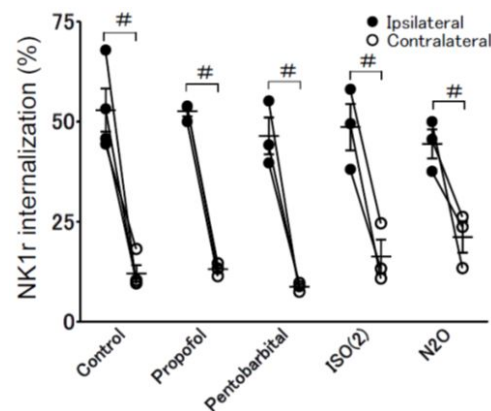


図 2 ホルマリン皮下注射による NK1Ri 発現増加（左）とフェンタニルの効果（右）



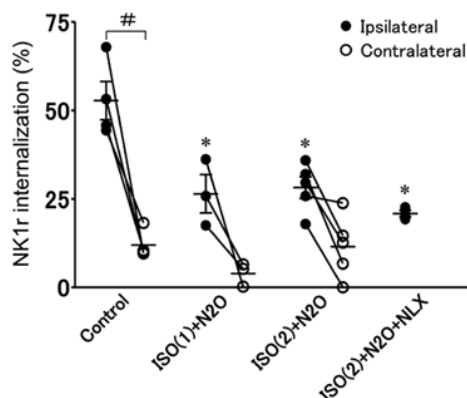
各全身麻酔薬の NK1Ri への効果を調べたところ、イソフルランおよびフェンタニルは、ホルマリン誘発性 NK1Ri を抑制せず、侵害受容性サブスタンス P 放出に影響を与えなかった（図 3）。

図 3 全身麻酔薬の NK1Ri に対する効果



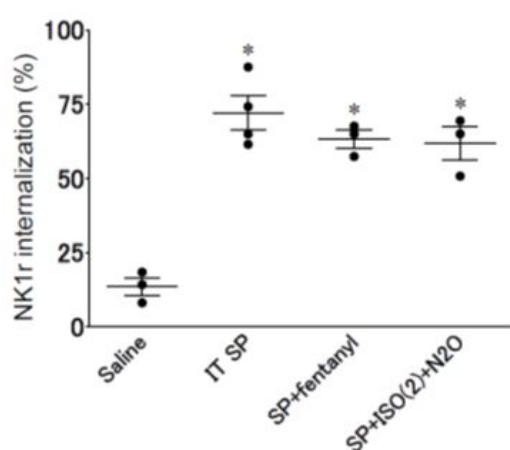
一方、イソフルラン + 亜酸化窒素およびフェンタニルの投与は、ホルマリン皮下注射と同側脊髄後角 NK1Ri を有意に抑制した（ $P<0.05$ 、図 2、4）。すなわちホルマリン誘発性脊髄後角サブスタンス P 放出がこれらの麻酔薬によって抑制されたことを示している。イソフルランは亜酸化窒素との併用により、単独投与とは異なる作用機序を示したと考えられる。この違いに関して現段階では明確な理由は分かっていない。さらに、ナロキソン（NLX）を投与したところ、NK1Ri に対する麻酔薬の作用は拮抗されなかった（図 4）。よって本研究において亜酸化窒素の鎮痛作用にオピオイド系の関与は認めなかった。

図4 イソフルラン（1-2MAC）+ 亜酸化窒素のNK1Ri に対する効果



さらにサブスタンス P のくも膜下投与により惹起された NK1Ri に対して、イソフルラン+亜酸化窒素、フェンタニルを投与したところいずれの麻酔薬も NK1Ri を抑制しなかった（図5）。このことから、これらの麻酔薬は NK1Ri 発現メカニズムには直接作用せず、第1次求心性線維シナプス前性作用によりサブスタンス P 放出を抑制したと考えられる。

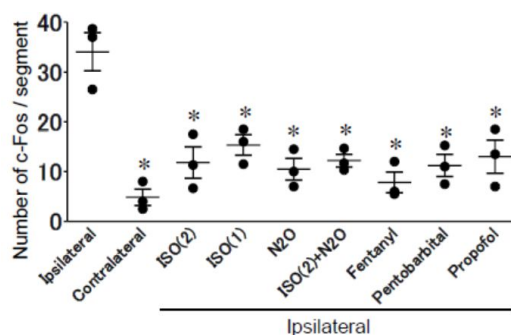
図5 外因性 NK1Ri に対する全身麻酔薬の効果



2) c-Fos 発現の評価

ホルマリン皮下注により脊髄後角表層 c-Fos 発現は有意に増加した ($P<0.05$)。そして - のいずれの麻酔薬もホルマリン誘発性 c-Fos 発現を有意に抑制した ($P<0.05$ 、図6)。これにより、いずれの麻酔薬も2次ニューロンにおける c-Fos 発現を抑制し、グルタミン酸受容体である NMDA 受容体に対するシナプス後性抑制作用を持つ可能性が示唆され、これらの麻酔薬の脊髄における作用機序のひとつと考えられた。

図6 各麻酔薬の脊髄 c-Fos 発現に対する効果



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 4 件)

1. Kouček M, Takasusuki T, Terashima T, Yaksh TL, Xu Q: Effects of intrathecal SNC80, a delta receptor ligand, on nociceptive threshold and dorsal horn substance P release. J Pharmacol Exp Ther 347: 258-64, 2013. 査読あり
2. Takasusuki T, Yamaguchi S, Hamaguchi S, Yaksh TL: Effects of general anesthetics on substance P release and c-Fos expression in the spinal dorsal horn. Anesthesiology 119: 433-42, 2013. 査読あり
3. Gregus AM, Doolen S, Dumlao DS, Buczynski MW, Takasusuki T, Fitzsimmons BL, Hua XY, Taylor BK, Dennis EA, Yaksh TL: Spinal 12-lipoxygenase-derived heptoxilin A3 contributes to inflammatory hyperalgesia via activation of TRPV1 and TRPA1 receptors. Proc Natl Acad Sci USA 109: 6721-6, 2012. 査読あり
4. 高薄敏史, 濱口眞輔, 山口重樹: 麻酔関連薬による脊髄サブスタンス P 放出制御. 臨床麻酔 37: 615-623, 2013. 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Takasusuki T, Terashima T, Ishikawa K, Fujii K, Yamaguchi S, Yaksh TL: Effects of voltage dependent calcium channels on spinal substance P release. 2nd Asian Congress on Pain, Taipei, March 28, 2014.
2. 高薄敏史, 寺島哲二, 山口重樹, 濱口眞輔, Tony L. Yaksh: 脊髄後角シナプス伝達における電位依存型カルシウムチャネルの役割について. 北関東・甲信越ペインクリニック学会第3回学術集会, 大宮, 2014, 3/9. 招請講演
3. 高薄敏史, 山口重樹, 大坪俊紀, 堀 雄

ー：脊髄シナプス伝達に対する電気生理学的アプローチ：ホールセル・パッチクランプ記録法を用いた研究について．日本ペインクリニック学会第47回大会，大宮，2013，7/13．リフレッシュコース

4. 高薄敏史，大坪俊紀，濱口眞輔，山口重樹，堀 雄一：全身麻酔薬が脊髄サブスタンス P 放出に与える影響．日本麻酔科学会第 60 回学術集会，札幌，2013，5/24.
5. Takasusuki T, Yamaguchi S, Saotome T, Kageyama M, Hori Y, Yaksh TL: Effects of general anesthetics on nociceptive synaptic transmission in spinal dorsal horn. International Anesthesia Research Society Annual Meeting, San Diego, May 6, 2013.
6. 高薄敏史，山口重樹，堀雄一，Tony L Yaksh: プロポフォール，ペントバルビタールが侵害受容シナプス伝達に与える影響．第 19 回日本静脈麻酔学会，札幌，2012，9/29．
7. Takasusuki T, Yamaguchi S, Kitajima T, Hori Y, Yaksh TL: Effects of general anesthetics on substance P release and c-Fos expression in spinal dorsal horn. 14th World Congress on Pain, Milan, Aug 30, 2012.
8. Takasusuki T, Nemoto K, Yamaguchi S, Yaksh TL: Role of spinal voltage sensitive calcium channels on nociceptive behavior and excitatory neurotransmission. International Anesthesia Research Society Annual Meeting, Boston, May 19, 2012.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高薄敏史 (TAKASUSUKI Toshifumi)
獨協医科大学麻酔科学講座・講師
研究者番号：80348052

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし