

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670858

研究課題名(和文)健忘作用獲得のための新しい精神鎮静法の確立

研究課題名(英文)Establishment of new psychosedation that can effectively acquire amnesia

## 研究代表者

富岡 重正(TOMIOKA, Shigemasa)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号：70188770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：記憶に強く関与するとされているシナプス外に存在するGABAA受容体の1つである、 $\alpha 5 \beta 3$  GABAA受容体をアフリカツメガエル卵母細胞膜上に発現させ、静脈内鎮静法に頻用されているミダゾラムとプロポフォールを作用させその反応について検討した。その結果、ミダゾラムとプロポフォールは $\alpha 5 \beta 3$  GABAA受容体のGABAによる反応を増強したが、その増強はミダゾラムの方がプロポフォールよりも大きかった。また、ミダゾラムとプロポフォールを同時投与した反応は、ミダゾラム単独およびプロポフォール単独の反応を加算した反応よりも大きく相乗作用がみられた。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of midazolam and propofol on the function of extrasynaptic GABAA receptor,  $\alpha 5 \beta 3$  GABAA receptor, that appear to play an important physiological role in the memory process, using Xenopus oocytes expression system. We suggest that midazolam or propofol increased the currents evoked by GABA in oocytes expressing  $\alpha 5 \beta 3$  GABAA receptor but the currents induced by midazolam was high as compared with that induced by propofol, and that the currents induced by the combination of midazolam and propofol were higher than the sum of each current induced by administration of midazolam alone and propofol alone.

研究分野：医歯薬学(歯学)

キーワード：健忘作用 シナプス外GABA受容体

## 1. 研究開始当初の背景

精神鎮静法は、口腔外科手術や一般歯科治療、最近ではインプラント手術の麻酔法としても行われているが、使用する麻酔薬の選択および投与方法は施設によって様々であり、歯科医の経験に基づいて行われているのが現状である。一方、精神鎮静法を受けた患者さんの満足度は、手術中の健忘が得られれば非常に高いことが報告されている。つまり、手術中の患者さんの健忘を効率良く獲得できれば、患者さんの満足度の高い精神鎮静法が確立する。

麻酔薬の主な作用部位であるGABA<sub>A</sub>受容体には、これまで言われてきたsynaptic GABA<sub>A</sub>受容体以外にextrasynaptic GABA<sub>A</sub>受容体が存在することが明らかとなった。麻酔薬がsynaptic GABA<sub>A</sub>受容体に作用した場合、期待する抗不安作用以外に呼吸抑制が生じることがあり手術中の呼吸抑制が問題となる。

一方、extrasynaptic GABA<sub>A</sub>受容体は、 $\gamma_5$ サブユニットなどを含んだ5量体で構成され、脳内の海馬に特異的に分布しており、健忘作用の発現などに関与することが報告されている。したがって、このextrasynaptic GABA<sub>A</sub>受容体に選択的あるいは効率良く作用する麻酔薬を選択すれば、患者満足度が高く、また呼吸抑制のないより安全な精神鎮静法が確立できる。

そこで本研究では、現在日本で使用可能な麻酔薬を用いてこのextrasynaptic GABA<sub>A</sub>受容体による健忘作用を効率的に増強できる条件を基礎的研究により検討し、新しい精神鎮静法として臨床応用につなげたい。

## 2. 研究の目的

精神鎮静法を受ける患者さんの満足度を高めるために、術中の健忘作用を効率良くしかも確実に得ることができ、新しい精神鎮静法を確立することを目的とする。本研究では、アフリカツメガエルの蛋白発現系実験法を用いて、アフリカツメガエル卵母細胞膜上に発現させた extrasynaptic GABA<sub>A</sub>受容体、 $\alpha_5\beta_3\gamma_2$  GABA<sub>A</sub>受容体に対する麻酔薬の作用に対する基礎的研究をおこなう。

## 3. 研究の方法

(1) GABA<sub>A</sub>受容体 subunit mRNA の調整  
ヒト GABA<sub>A</sub>受容体 subunit( $\alpha_5, \beta_3, \gamma_2$ ; Copenhagen 大学より委譲)の cDNA を含む発現ベクター-pcDNA3.1 を LB 培地で培養し DNA 精製した後、制限酵素により linearization した。その後、T7 polymerase を用いて in vitro 転写反応を行い mRNA を合成した。

(2) アフリカツメガエル卵母細胞への mRNA 注入

雌アフリカツメガエルを氷中で低温麻酔

し、下腹部より卵巣を摘出し卵母細胞を採取した。マイクロインジェクターを用いて1μg/μlに調整した  $\alpha_5, \beta_3, \gamma_2$  mRNA を卵母細胞内に定量注入した。各種抗生物質を含むBarth 変法溶液にて2~3日間培養を行った。

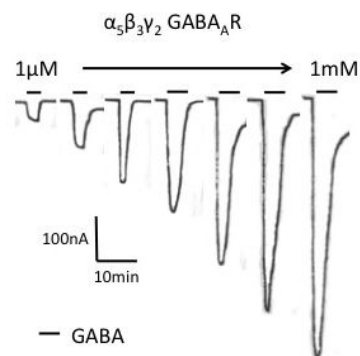
(3) ボルテージクランプ法による測定

$\alpha_5\beta_3\gamma_2$  GABA<sub>A</sub>受容体を発現した卵母細胞をチャンパー上に置き、MBS溶液を灌流させた。ガラス管微小電極を作成し、先端の電気抵抗値を2MΩ前後に調整しガラス管内を3M塩化カリウム液で満たした。このガラス管微小電極をアフリカツメガエル卵母細胞内に2本刺入し、Oocyte Clamp Amplifier(Model OC-725C, Warner Instruments, Inc. USA)を用いて-60mVに電圧固定した。MBS溶液に溶解した各麻酔薬にてプレインキュベーションを行なった後、各濃度GABAにて誘発された内向き電流を測定し記録した。

## 4. 研究成果

(1)  $\alpha_5\beta_3\gamma_2$  GABA<sub>A</sub>受容体の機能的特性

アフリカツメガエル卵母細胞膜上に発現した  $\alpha_5\beta_3\gamma_2$  GABA<sub>A</sub>受容体が GABA 受容体としての機能を有するか否かについて調べた。LigandであるGABAを0.5μMから1, 3, 5, 10, 50, 100, 1000μMへと上昇させ作用させた場合の current を測定した結果、GABA濃度が上昇するに従い反応する電流量も増え濃度依存性効果がみられた(図)。また、GABA<sub>A</sub>受容体の拮抗薬である picrotoxin(10μM)を作用させると、GABAによる反応は完全に消失したことから、アフリカツメガエル卵母細胞膜上に発現した  $\alpha_5\beta_3\gamma_2$  GABA<sub>A</sub>受容体は GABA 受容体としての機能を有することが明らかとなった。

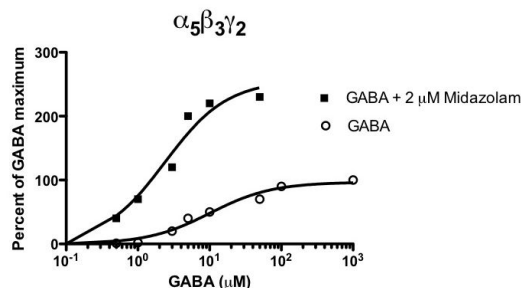


(2) 麻酔薬の  $\alpha_5\beta_3\gamma_2$  GABA<sub>A</sub>受容体への作用  
アフリカツメガエル卵母細胞膜上に発現した  $\alpha_5\beta_3\gamma_2$  GABA<sub>A</sub>受容体に対して、鎮静薬として使用されるミダゾラムとプロポフォールがどのように作用するか検討した。また、ミダゾラムとプロポフォールの併用により相乗効果があるか否かについても検討した。

ミダゾラム

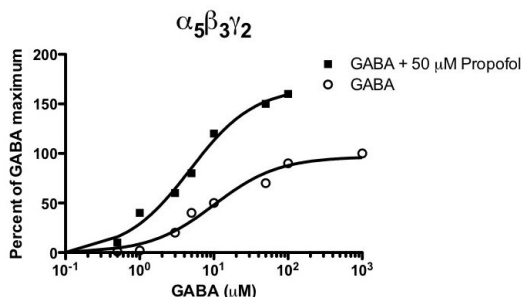
静脈内鎮静薬として最も頻用されてい

ミダゾラムを 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M の濃度でプレインキュベーションした後、GABA を 0.5, 1, 3, 5, 10, 50, 100, 1000  $\mu$ M を作用させ誘発された電流を記録した。その結果、ミダゾラムは各濃度 GABA による反応を最大で 250% も増強した。GABA と 2  $\mu$ M ミダゾラムによる濃度反応曲線を図に示す。



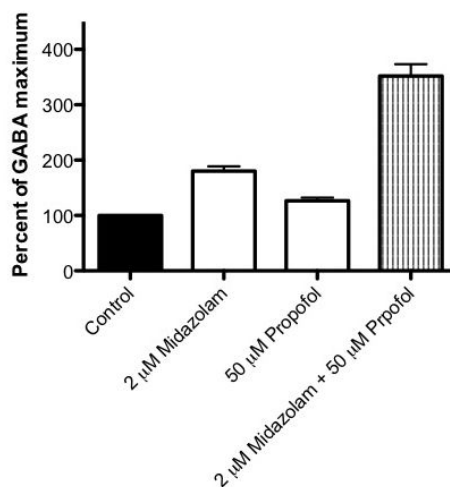
### プロポフォール

作用時間が非常に短く調節性が良いため全身麻酔薬以外に静脈内鎮静薬としても使用されているプロポフォールを 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M の濃度でプレインキュベーションした後、GABA を 0.5, 1, 3, 5, 10, 50, 100, 1000  $\mu$ M を作用させ誘発された電流を記録した。その結果、プロポフォールは各濃度 GABA による反応を最大で 150% 増強したが、その増強の程度はミダゾラムよりも少なかった。GABA と 50  $\mu$ M プロポフォールによる濃度反応曲線を図に示す。



### ミダゾラムとプロポフォールの併用

最近、臨床ではミダゾラムとプロポフォールを併用して静脈内鎮静法をおこなうことが多い。そこで、ミダゾラムとプロポフォールを併用して投与した場合の  $\alpha_5\beta_3\gamma_2$  GABA<sub>A</sub> 受容体への作用について調べた。2  $\mu$ M ミダゾラムと 50  $\mu$ M プロポフォールを同時にプレインキュベーションし 100  $\mu$ M GABA を作用させ誘発された電流を記録した。その結果、2  $\mu$ M ミダゾラム単独、50  $\mu$ M プロポフォール単独の電流量を加算したもののよりも、2  $\mu$ M ミダゾラムと 50  $\mu$ M プロポフォールを併用した場合の電流量の方が大きく、相乗効果が見られることが明らかとなった (図)。



以上の結果から、ミダゾラムはより催眠作用を惹起する血中濃度よりも低い濃度で強い健忘作用を持つ可能性が示唆された。また、プロポフォールの  $\alpha_5\beta_3\gamma_2$  GABA<sub>A</sub> 受容体に対する作用はミダゾラムよりも弱く、プロポフォールの健忘作用はミダゾラムよりも弱いことが示唆された。また、ミダゾラムとプロポフォールを併用することにより相乗効果が得られ、健忘作用はさらに増強される可能性が示唆された。このことから、臨床では低濃度のミダゾラムと調節性の良いプロポフォールを併用することにより高い健忘効果が期待でき、さらに高濃度のミダゾラム、プロポフォールを使用しないため呼吸抑制などの合併症も生じることもなく安全な静脈内鎮静法が可能になると考えられる。

しがしながら、シナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体には  $\alpha_5\beta_3\gamma_2$  GABA<sub>A</sub> 受容体以外の extrasynaptic GABA<sub>A</sub> 受容体の存在も報告されている。今後、その他の extrasynaptic GABA<sub>A</sub> 受容体に対する麻酔薬の作用についても検討し総合的に判断すべきと考えられる。

### 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7件)

Momota Y., Takano H., Kani K., Matsumoto F., Aota K., Yamanoi T., Kondo C., Takase N., Miyamoto Y., Tomioka S., Azuma M. Significance of Time-Domain Measurements of Heart Rate Variability in Burning Mouth Syndrome. IOSR J Dent Med Sci. 査読有、15(1) VIII, 25-33, Jan. 2016.

www.iosrjournals.org

Hayashi T, Higuchi H, Tomoyasu Y, Ishii-Maruhama M, Maeda S, Miyawaki T. Effect of carbamazepine or phenytoin therapy on blood level of intravenously administered midazolam: a prospective cohort study. J Anesth.

査読有、30(1):166-169. 2016.  
doi: 10.1007/s00540-015-2063-3.  
Tomioka S., Enomoto N., Momota Y.:  
Hyperventilation syndrome after  
general anesthesia. Journal of  
Anaesthesiology Clinical Pharmacology,  
査読有、31 (2), 284-285, April-June  
2015.  
doi: 10.4103/0970-9185.155219.  
Maeda S, Tomayasu Y, Higuchi H,  
Ishii-Maruhama M, Yamane A, Yabuki A,  
Honda Y, Egusa M, Miyawaki T.  
Independent factors affecting  
recovery time after sedation in  
patients with intellectual  
disabilities. Open Dent J.査読有、  
31;9:146-149, 2015.  
doi: 10.2174/1874210601509010146.  
Takaishi K, Kawahito S, Tomioka S.,  
Eguchi S, and Kitahata H : Cuffed  
Oropharyngeal Airway for Difficult  
Airway Management. Anesthesia Progress.  
査読有、Vol.61, No.3, 107-110, 2014.  
doi: 10.2344/0003-3006-61.3.107.  
Jinzenji A, Sogawa C, Miyawaki T., Wen  
XF, Yi D, Ohyama K, Kitayama S, Sogawa  
N, Morita K. Antiallodynic action of  
1-(3-(9H-Carbazol-9-yl)-1-propyl)-4-  
(2-methoxyphenyl)-4-piperidinol  
(NNC05-2090), a betaine/GABA  
transporter inhibitor. J Pharmacol Sci.  
査読有、125(2):217-226 2014.  
Doi: 10.1254/jphs.13146FP  
Momota Y., Takano H., Kani K.,  
Matsumoto F., Motegi K., Aota K.,  
Yamamura Y., Omori M., Tomioka S.,  
Azuma M.: Frequency Analysis of Heart  
Rate Variability: A Useful Assessment  
Tool of Linearly Polarized  
Near-Infrared Irradiation to Stellate  
Ganglion Area for Burning Mouth  
Syndrome. Pain Medicine, 査読有、14 :  
351-357, 2013.  
doi: 10.1111/pme.12008.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

富岡 重正 (TOMIOKA, Shigemasa)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授  
研究者番号：70188770

### (2)研究分担者

宮脇 卓也 (MIYAWAKI, Takuya)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：00219825