

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11313

研究課題名(和文) 下行性鎮痛系の増強を応用した新しい全身麻酔法の開発：5-HT受容体リガンドの活用

研究課題名(英文) Development of a novel general anesthetic method applying the enhancement of descending pain suppression system: Utilization of 5-HT receptor ligands

研究代表者

入船 正浩 (Irifune, Masahiro)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・教授

研究者番号：10176521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの脊髄後角組織からのサブスタンスP(SP)遊離を選択的セロトニン受容体リガンドが抑制し、全身麻酔薬が増強するか、in vitro実験を行った。その結果、脊髄後角組織に対するcapsaicin刺激によりSP遊離量は濃度依存性に増加したが、この増加作用はmorphineにより有意に抑制された。PropofolによりSP遊離量は高濃度で増加したが、ketamineは影響しなかった。一方、選択的セロトニン取り込み阻害薬のimipramineは濃度依存性にSP遊離量を増加させたことから、これらの部位ではセロトニン神経刺激による抗侵害刺激効果を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Whether the selective serotonin receptor ligands inhibit or whether the general anesthetics enhance substance P (SP) release from cultured rat dorsal root ganglion (DRG) neurons or rat spinal cord chopped tissues was examined. Capsaicin increased SP release from cultured DRG cells in a concentration-dependent fashion. The intravenous general anesthetics propofol and ketamine and the opioid receptor agonist morphine did not affect the capsaicin-induced SP release. Also, capsaicin concentration-dependently increased SP release from rat spinal cord chopped tissues. Morphine concentration-dependently inhibited the capsaicin-induced SP release. High concentrations of propofol enhanced the SP release, but ketamine did not. As the selective serotonin uptake inhibitor imipramine concentration-dependently increased the SP release, this drug did not have antinociceptive action in this region.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：サブスタンスP 脊髄後角組織 イミプラミン モルヒネ プロポフォル ケタミン マイクロダイアリシス法

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔薬によって引き起こされる麻酔状態は、健忘、鎮静、意識消失、鎮痛、筋弛緩、侵害刺激による体動の抑制(不動化)などの要素からなる。Sawamuraらは、麻酔要素のうち鎮静と鎮痛は異なる部位に作用して生じることを報告し、各要素は別々に探求されるべきであると指摘した(J Neurosci, 20, 9242-51, 2000)。われわれは、これまでに受けた科学研究費による研究で、麻酔要素のうち(1)意識消失は抑制性の神経伝達物質である - アミノ酪酸(GABA)の脳内濃度を上げることにより濃度依存性に起こる一方で不動化は生じないこと、(2)興奮性アミノ酸受容体サブタイプの一つである N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体の選択的な遮断は意識消失も不動化も生じないこと、(3)GABA神経刺激とNMDA受容体の遮断を併用しても不動化は起こらないことを明らかにした。

また、外科手術では、持続的な組織破壊を伴う。このような状態の時の比較的遅くて慢性的な痛みは、一次求心性神経のうちC線維を介して脊髄に伝えられると考えられている。C線維はサブスタンスP(SP)を脊髄後角内へ遊離する。SPは後角にある二次求心性神経や広作動域線維に作用して脱分極を起こさせる。この侵害刺激によるC線維からのSPの遊離は、オピオイドや α_2 アドレナリン受容体作動薬により抑制されることがマイクロダイアリシス実験で明らかにされている(Peptides, 10, 1127-31, 1989; Peptides, 14, 371-8, 1993)。われわれは、これまでの研究で、GABA神経刺激やNMDAとドパミン両受容体の遮断による意識消失時にオピオイドのモルヒネや α_2 アドレナリン受容体作動薬のデキスメドミジンを併用すると不動化を起こすことを確認している。さらに、不動化を起こすのに必要としたモルヒネやデキスメドミジンの用量は、鎮痛に必要な用量よりも有意に高いことを報告した。われわれによるこれらの発見から、GABA神経刺激やNMDA受容体の遮断は下行性鎮痛系を抑制すると推測された。既存の全身麻酔薬もGABA神経を促進することやNMDA受容体に拮抗することは報告されているが、これらの麻酔薬が下行性鎮痛系を抑制するのか、抑制するにしてもどのような機序で抑制しているのか全くわかっていない。本研究は、神経生化学的および行動薬理学的手法を用いた実験により、全身麻酔作用における下行性鎮痛系の役割を解明しようとする初めての試みである。

2. 研究の目的

Antogniniらは、ヤギの脳循環の特性を利用した実験系を用いて、前脳のみを麻酔すると全身を麻酔した場合に比べ吸入麻酔薬イ

ソフルランのMAC(外科的切開などの侵害刺激に対し50%の動物が体動を起こさなくなる、つまり不動化を起こす濃度)は2倍以上に増加することを示した(Anesthesiology, 79, 1244-9, 1993)。また、ラットのイソフルランMACは、視床や海馬を含む両側の除脳を行っても正常ラットと変わらないが、胸髄を高位で離断し脊髄と脳の機能を分断すると正常ラットに比べ減少傾向にあった(Anesthesiology, 80, 606-10, 1994)。これらのことから、麻酔要素のうち健忘や意識消失は脊髄より上位の中枢に、鎮痛や不動化は脊髄に関与することが示唆された。しかし、われわれは、不動化には全身麻酔薬の脊髄への作用が重要な役割を果たしているが、麻酔薬の上位中枢への作用は脊髄での不動化作用に抑制的に働くかと推測している。

ごく初期の電気生理学的研究で、痛覚との関連が明らかでなかった様々な脳の領域を電気刺激すると強力な鎮痛作用が得られることがわかり、これを下行性鎮痛系と呼んだ。この痛覚抑制系は、大きく3つの連結した経路からなる。(1)中脳水道周囲灰白質領域のニューロンは、信号を神経伝達物質であるエンケファリンを介し(2)縫線核および傍巨大細胞網様核へと伝える。これらの核から二次信号が(3)脊髄後角へと送られ、5-hydroxytryptamine(5-HT; セロトニン)を遊離させる。セロトニンは、脊髄の介在ニューロンからエンケファリンを遊離させる。エンケファリン神経は、脊髄後角でシナプスを形成し痛みの伝導路である一次求心性神経のA線維とC線維からの入力をシナプス前およびシナプス後抑制すると考えられている。このように、生理的痛覚抑制系は脊髄への最初の入力点で侵害刺激により引き起こされる痛み信号を阻止することが可能である。

しかし、全身麻酔薬がこの生理的痛覚抑制系にどのような影響を与えているのか検討した研究はこれまで全くなされていない。本研究の目的は、全身麻酔薬など薬物により引き起こされる麻酔状態下で下行性鎮痛系は抑制されるのか、また、その抑制がどのような機序で生じるのか、セロトニン受容体リガンドが下行性鎮痛系を促進するのか解明し、その機序を応用した全く新しい全身麻酔法を開発することにある。

3. 研究の方法

(1) DRG 初代培養細胞での検討

1) 実験材料

実験動物として Wistar 系成熟ラット(6週齢, Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan)を使用した。明/暗 12 時間サイクル(明; 8:00-20:00), 室温 25 ± 1 , 湿度 50%, 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。

2) 使用薬物

DRG 初代培養には以下のものを用いた。ダ

ルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan), ウマ血清, ペニシリン/ストレプトマイシン (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA), 2.5% トリプシン (Invitrogen Co., Burlington, Ontario, Canada), コラゲナーゼ (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), ^{125}I -Tyr8-SP (81.4 TBq / mmol) (New England Nuclear, Boston, MA, USA).

サブスタンス P 遊離実験には, capsaicin, potassium chloride (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), morphine, propofol および ketamine を使用した.

3) 実験方法

DRG 細胞初代培養

Wistar 系成熟ラットを断頭した後, 氷冷した Hank's buffer 中で脊髄を速やかに摘出し, 実体顕微鏡下で DRG のみを無菌的に単離した. 採取した DRG を Hank's buffer で 3 回洗浄し, 5 分間, 1000 rpm で遠心分離した. 次に 0.125% コラゲナーゼ溶液を加え, 37, 90 分間, 震盪恒温槽にて酵素処理を 2 回行い, 1000 rpm で 10 分間遠心分離した後, 再度 Hank's buffer で洗浄した. さらに, 0.25% トリプシン溶液を加え, 37 で 30 分間, 震盪恒温槽にて酵素処理した後, 再度 1000 rpm で 10 分間遠心分離した. その後, 10% 非働化処理済ウマ血清, 1% ペニシリン/ストレプトマイシン, 30 ng/ml の神経栄養因子 (NGF) を添加した DMEM に細胞を分散させ, ラミニン処理した 35 mm dish を用いて, 37, 5%CO₂ の条件下で 7 日間培養した.

サブスタンス P 遊離実験

培養 DRG 細胞からのサブスタンス P の遊離は, 100 nM の capsaicin もしくは 50 mM の高濃度カリウムイオンで刺激することにより行った. Krebs-HEPES buffer で DRG 細胞を 2 回洗浄した後, ペプチダーゼインヒビターと 0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含有させた Krebs-HEPES buffer で調整した本章で検討する薬物を溶解させ 10 分間処置した. その後, capsaicin (100 nM) もしくは高濃度カリウムイオン (50 mM) を加え, 10 分後に release 液を回収した. 5000 rpm で 5 分間遠心分離し, 得られた上清をサブスタンス P 遊離サンプルとした.

試薬は morphine (10 μM , 100 μM , 1 mM), propofol (1 mM) および ketamine (10 μM , 100 μM , 1 mM) で検証した.

ラジオイムノアッセイ法

サブスタンス P 遊離サンプルに抗サブスタンス P 抗体を加え, さらに 0.1% Triton X を添加した BSA 含有 Krebs-HEPES buffer で希釈した ^{125}I -Tyr8-サブスタンス P を加え, 4 で 18 時間処置した. 抗体と結合していない遊離型 ^{125}I -Tyr8-サブスタンス P を 0.9% BSA 含有 2% チャコール溶液に吸着させ, 2500 rpm で 10 分間遠心分離した後, 上清中の結合型 ^{125}I -Tyr8-サブスタンス P の放射能活性を カウンターにより測定した.

(2) 脊髄後角組織での検討

1) 実験材料

DRG 初代培養細胞実験で使用した動物に準じた.

2) 使用薬物

DRG 初代培養細胞実験で使用した薬物に加え, imipramine を使用した.

3) 実験方法

脊髄後角からの組織の採取

Wistar 系成熟ラットを断頭した後, L4-L5 相当部の脊髄後角部位を速やかに摘出した. この脊髄組織をシャーレ上で細かく刻み, 生理食塩水で 2 回洗浄を行った. この組織を用いて実験を行った.

サブスタンス P 遊離実験

脊髄後角組織からのサブスタンス P の遊離は, 100 nM の capsaicin もしくは 50 mM の高濃度カリウムイオンで刺激することにより行った. ペプチダーゼインヒビターと 0.1% ウシ血清アルブミンを含有させた Krebs-HEPES buffer 中に薬物を溶解させ 37 で 10 分間処置した. その後, buffer を回収しサブスタンス P 遊離液のサンプルとした. そのサンプルを 4, 13,000 回転で 10 分間遠心し, 得られた上清をサブスタンス P 遊離サンプルとした.

ラジオイムノアッセイ法によるサブスタンス P 遊離量の測定

ラジオイムノアッセイ法は前述の方法と同様に行った.

(3) 脊髄マイクロダイアリシス法での検討

1) 実験材料

DRG 初代培養細胞実験で使用した動物に準じた.

2) 使用薬物

脊髄後角組織実験で使用した薬物を使用する予定である.

3) 実験方法

ラットをチオペンタールで麻酔した後, 脳定位固定装置を用いて透析膜プローブを脊髄後角に挿入する. この外科手術から少なくとも 24 時間経過した後にマイクロダイアリシス実験を行う. 回収したサンプル中のサブスタンス P 量は前述のラジオイムノアッセイ法を用いて測定する.

4. 研究成果

DRG 培養細胞を capsaicin で刺激すると, 無刺激ではサブスタンス P の遊離は平均 59 ± 36 pg/dish であるのに対し, 100 nM で刺激すると平均 249 ± 74 pg/dish のサブスタンス P が遊離された. また, 高濃度 (50 mM) のカリウムイオン溶液 (50 mM K⁺) で刺激すると平均 201 ± 57 pg/dish のサブスタンス P が遊離された. そこで, DRG 細胞刺激は, 100nM capsaicin もしくは 50 mM K⁺で行うことにした.

Capsaicin もしくは高濃度 K⁺ で刺激した

ときのサブスタンス P 遊離に及ぼす全身麻酔関連薬の影響を調べたところ,高濃度(1 mM)の morphine, propofol および ketamine は capsaicin あるいは高濃度 K⁺ 刺激によるサブスタンス P 遊離のいずれにも影響しなかった。

脊髄後角組織に対する capsaicin 刺激あるいは高濃度 K⁺ 刺激によりサブスタンス P 遊離量は有意に増加し, この遊離促進作用は morphine により有意に抑制された。高濃度の propofol によりサブスタンス P 遊離量は増加した。一方, ketamine はサブスタンス P 遊離に全く影響しなかった。選択的なセロトニン取り込み阻害薬である imipramine は濃度依存性にサブスタンス P 遊離量を増加させた。

脊髄後角でのマイクロダイアリシス実験はこれまで手技的にかなりの困難を伴ったが, 最終年度の実験でサブスタンス P の基礎遊離量(約 0.35 pg/ μ l) が測定可能となったため今後は前述の薬物の影響を検討する。

以上の結果から, DRG 培養細胞を用いた実験では, capsaicin 刺激により遊離量は濃度依存性に増加したが, 静脈麻酔薬の propofol や ketamine および麻薬性鎮痛薬の morphine はサブスタンス P 遊離に影響を及ぼさなかった。脊髄後角組織に対する capsaicin 刺激によりサブスタンス P 遊離量は有意に増加したが, この増加作用は morphine により抑制された。Propofol によりサブスタンス P 遊離量は高濃度で増加したが, ketamine は影響しなかった。一方, 選択的セロトニン取り込み阻害薬の imipramine は濃度依存性にサブスタンス P 遊離量を増加させたことから, これらの部位ではセロトニン神経刺激による抗侵害刺激効果は認めないことが明らかになった。

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 5 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.

2: Phospholipase C-related catalytically inactive protein is a new modulator of thermogenesis promoted by α -adrenergic receptors in brown adipocytes, Oue K, Zhang J, Harada-Hada K, Asano S, Yamawaki Y, Hayashiuchi M, Furusho H, Takata T, Irifune M, Hirata M, Kanematsu T: *J Biol Chem*. 291(8), 4185-96, 2016.

3: General anesthetic actions on GABA_A

receptors in vivo are reduced in phospholipase C-related catalytically inactive protein knockout mice, Hayashiuchi M, Kitayama T, Morita K, Yamawaki Y, Oue K, Yoshinaka T, Asano S, Harada K, Kang Y, Hirata M, Irifune M, Okada M, Kanematsu T, *J Anesth* 31(4), 531-538, 2017.

4: Phospholipase C-related catalytically inactive protein-knockout mice exhibit uncoupling protein 1 upregulation in adipose tissues following chronic cold exposure, Oue K, Yamawaki Y, Asano S, Mizokami A, Hirata M, Irifune M, Kanematsu T, *J Oral Biosci* 59(2), 108-112, 2017.

5: A case with deteriorating palmoplantar pustulosis and hyperthyroidism after simultaneous bimaxillary orthognathic surgery, Oda A, Yoshida K, Uno T, Yoshinaka T, Mukai A, Irifune M, *Anesth Prog* 64(3), 173-174, 2017.

[学会発表](計 13 件)

1: PRIP modulates α -adrenergic receptor-mediated thermogenesis in brown adipocytes, Oue K, Irifune M, Kanematsu T, 第 48 回広島大学歯学会総会(広島), 2015 年 6 月 27 日.

2: Analyses of systemic inflammatory responses in Prip-knockout mice: Maetani Y, Yamawaki Y, Irifune M, Kanematsu T: 第 48 回広島大学歯学会総会(広島), 2015 年 6 月 27 日.

3: Pharmacological effects of general anesthetics altered by the change of subunit composition of GABA_A receptors: Hayashiuchi M, Yamawaki Y, Oue K, Harada K, Asano S, Irifune M, Okada M, Kanematsu T, 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, Hiroshima, Japan, October 23, 2015.

4: The differences of electroencephalogram (EEG) pattern during sleep between human beings and mice: Yoshinaka T, Irifune M: 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, Hiroshima, Japan, October 23, 2015.

5: マウスの脳波と筋電図に及ぼすプロポフォルの影響: 好中 大雅, 入船 正浩: 第 43 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会(東京), 2015 年 10 月 31 日.

6: GABA_A 受容体サブユニット構成の違いと全身麻酔薬の効果について, 林内 優樹, 山脇 洋輔, 大植 香菜, 原田 佳枝, 浅野 智志, 前谷 有香, 入船 正浩, 岡田 貢, 兼松 隆, 第 54 回広島県歯科医学会・第 99 回広島大学歯学会(広島), 2015 年 11 月 8 日.

7: The analgesic effect of flurbiprofen with fentanil or with acetaminophen,

Yoshida M, Shimizu Y, Yoshida K, Mukai A, Doi M, Irifune M, 94th General Session & Exhibition of The IADR, Seoul, Republic of Korea, June 24, 2016.

8: 鎮静や全身麻酔中の侵害刺激時に脳内で何が起きているか? 入船正造, 好中大雅, 石井裕明, 第 31 回中国・四国歯科麻酔研究会(広島), 2016 年 7 月 31 日.

9: Prip 遺伝子欠損マウスにおける GABA 作動性麻酔薬の作用変化, 林内 優樹, 岡田 貢, 兼松 隆, 入船 正造, 第 33 回日本障害者歯科学会総会・学術大会(大宮), 2016 年 10 月 2 日.

10: GABA_A 受容体サブユニット構成の違いによる全身麻酔薬の薬理効果の相違, 林内 優樹, 好中 大雅, 大植 香菜, 尾田 友紀, 入船 正造, 第 44 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会(札幌), 2016 年 10 月 29 日.

11: GABA_A 受容体作動薬投与による全身麻酔下では, 痛み刺激は脳波を覚醒へ向わせる, 好中 大雅, 菊池 友香, 小川 雄也, 林内 優樹, 入船 正造, 第 44 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会(札幌), 2016 年 10 月 29 日.

12: ラット脊髄後角神経からのサブスタンス P 遊離に及ぼす静脈麻酔薬の影響, 向井 友宏, 小川 雄也, 入船 正造, 第 32 回中国・四国歯科麻酔研究会(徳島), 2017 年 7 月 23 日.

13: カラゲナン誘発性ラット慢性咬筋筋痛モデル, 吉田 充広, 向井 明里, 吉田 啓太, 土井 充, 清水 慶隆, 入船 正造, 第 32 回中国・四国歯科麻酔研究会(徳島), 2017 年 7 月 23 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔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

入船 正造 (IRIFUNE MASAHIRO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科
(歯)・教授
研究者番号: 10176521

(2) 研究分担者

兼松 隆 (KANEMATSU TAKASHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科
(歯)・教授
研究者番号: 10264053

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()