

平成22年 5月24日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591787
 研究課題名（和文） 一酸化窒素の非シナプス型神経伝達に注目した麻酔薬の作用機序の解明
 研究課題名（英文） The searching a mechanism of general anesthesia modulated by non-synaptic communication of nitric oxide in the brain.
 研究代表者
 足立裕史（ADACHI YUSHI）
 浜松医科大学 医学部附属病院 助教
 研究者番号：80420355

研究成果の概要（和文）：全身麻酔は日常臨床の場において広く用いられているにも関わらず、その麻酔作用発揮のメカニズムは未知のままである。我々は、近年注目されている神経伝達物質である一酸化窒素と、その非シナプス型神経伝達に注目し、麻酔薬の作用機序解明を目指した。これまでに、麻酔薬が非シナプス型神経伝達をも抑制し、他の神経伝達物質の制御にも関わっている事を発見した。

研究成果の概要（英文）：General anesthesia is popular and practical medical intervention, however, exact mechanism is unknown until now. We investigated the change in the release of nitric oxide and it's non-synaptic neural communication in the rat brain. The results indicated that general anesthetics might reduce the non-synaptic extracellular neural communication and modulate other neural transmissions in the brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学：麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔学

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔という医療行為は極めて広く一般的に行われているが、未だに麻酔薬の作用機序は不明のままである。中枢神経系における神経伝達への影響がもっとも大きいと考えられており、各種神経伝達物質の放出量変

化、神経細胞やその受容体における電気活動の変化などが実験により解明されている。また、シナプス間神経伝達にも注目が集まっているが、単一の機序で麻酔作用を説明しうる理論は存在しない。

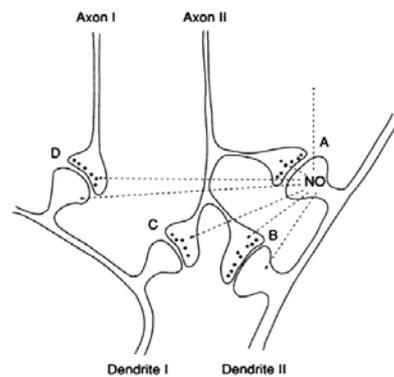
一酸化窒素（NO）は非常に反応性が高く不安定なフリーラジカルであるが、血管内皮由来の平滑筋弛緩作用の他、中枢神経系、あるいは末梢神経系に於いて神経伝達、神経保護などの多彩な作用を担っていることが近年示されてきた(1)。幾つかの研究(2,3)は、覚醒時及び麻酔時の鎮痛、鎮静の機序にNOが関与する可能性を報告している。NOは中枢神経のネットワーク内において、シナプス結合に関わらず速やかに拡散する特性があるため(3)、解剖学的に見た神経系ネットワークの中で、より広い範囲で緩徐な変化をもたらしていると考えられる。そして、細胞外スペースは特定のシナプス間隙に比較して相対的にはるかに大きな空間を持つため(4)、麻酔薬はこの部位に変化を生じさせ、脳全体にその効果を及ぼして麻酔作用を発揮している可能性がある。

研究代表者はこれまで、自由行動下のラット脳内線条体に注目し、現在臨床の場面で用いられている吸入麻酔薬が脳内中枢神経伝達物質（ドパミン）の放出、代謝に与える影響を調査、検討してきた(5 - 10)。非麻酔時からの連続的かつ安定した測定は手技的な困難を伴うため、世界的にも報告は少なく、独創的な方法で多くの成果を挙げてきた。臨床の場面でも広く普及している吸入麻酔薬はドパミン濃度を変化させないが、一方でドパミンの酸化代謝産物を著しく増加させた(5, 6)。この変化はテトロドトキシンで減弱するため神経活動の一部と考えられる一方、カルシウムを除去しても変化せず(9)、シナプス前性に吸入麻酔薬が作用し、シナプス小胞内のドパミンを神経終末内で放出、代謝を亢進させる機序の存在が示唆された。

2. 研究の目的

このドパミンの酸化過程(7)においては大量のフリーラジカルが発生していると考えられるが、その内の一つであるNOは直ちに細胞外スペースへ拡散し（下図にシエーマを示す）、シナプスを介さずに細胞間の神経伝達に関与している可能性がある。実際にNOは神経終末のドパミン再吸収を阻害することが示されており(11)、麻酔薬がNO合成酵素に作用する結果が細胞を用いた実験系などで報告されていることを考慮すると、NOを介した神経伝達系の変化は麻酔作用発現に於いても大きな要因になっていると推測される。

本研究ではNOが関与する非シナプス型神経伝達に注目し、麻酔作用発現の機序の解明を目指した。



3. 研究の方法

実験には280~320gの雄SDラットを用い、実験動物飼育会社(SLC、東京)より購入した。対照群、セボフルラン群、イソフルラン群と、それぞれにアポモルフィン、ハロペリドール、ロメフェンシンを前処置した群について、各群6匹ずつ測定を行った。ラットは温度管理された部屋で12時間毎の明暗周期で飼育し(午前6時—午後6時:明期)、自由に食事、飲水ができるようにする。本実験に関して本校動物実験施設倫理委員会の承認を得る予定である。

マイクロダイアライシスプローベは外径0.22mm、膜長3mmのもの(エイコムA-I-8-03、京都)を用いた。実験に先立ち、セボフルラン麻酔下に局所麻酔薬を併用し、ステレオタキ

シック装置を用いて約3mmの穴を頭蓋骨にあげ、ガイドカニューレ(エイコムAG-8、京都)をラット脳の線条体、海馬、皮質、視床下部に挿入する。麻酔から覚醒させ、少なくとも2日間の回復期間をおいて明らかな異常を認めないラットを実験に用いた。

実験は午前7時より開始し、5分間程度のセボフルラン麻酔下に前回埋め込んだカニューレをガイドとしてマイクロダイアライシスプローベを挿入した後、ラットを床敷のひかれたアクリル性の透明ケージにおいた。運動、食事、飲水は自由にできるようにする。プローベ挿入直後より、還流用の修正リンゲル液($145.4 \text{ mEq L}^{-1} \text{ Na}^+$, $2.8 \text{ mEq L}^{-1} \text{ K}^+$, $2.3 \text{ mEq L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$, $150.5 \text{ mEq L}^{-1} \text{ Cl}^-$) $2.0 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ を、マイクロシリンジポンプを用いて流した。3時間後より、オートインジェクターを用いて15分毎に還流液 $30 \mu\text{l}$ をオンラインHPLCシステムに注入し、還流液中の一酸化窒素濃度(NO_2^- 及び NO_3^-)を測定した。HPLCにはENO-20システム(エイコム、京都)を用い、分離カラムは逆相ODS(NO-PAK, $4.6 \times 50\text{mm}$ 、エイコム、京都)、還元カラムは銅処理カドミウムを主成分としたカラム(NO-RED、エイコム、京都)を使用した。移動相は10%メタノールに塩化アンモニウム塩、EDTAを添加して $330 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ で流す。分離、還元した後グリース試薬を加え、反応コイル内で紫色のアゾ化合物を合成し、540nmの赤外分光で検出した。還流液の測定前に各測定物質を $100\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 含む標準溶液 $10 \mu\text{l}$ を注入し、外部標準として校正に用いた。

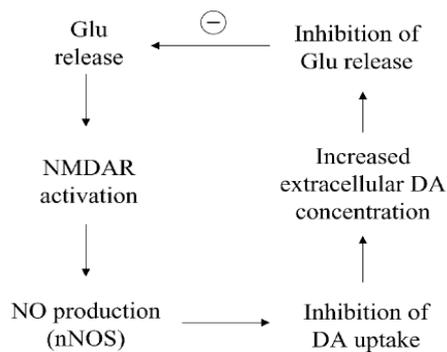
麻酔薬投与前に5回の測定を行い、直前の3回について測定物質濃度が安定しているのを確認した後(3回の測定が5%内に収束するのを確認)、それぞれの麻酔群では半閉鎖ケージ内において $3\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ の約23%酸素をキャリアガスに用いながらセボフルラン、及びイソフルランを60分間吸入させた。吸入麻酔薬の濃

度は赤外分光ガス分析装置(Ultima、Datex、Finland)で確認した。麻酔直前に薬理学的前処置を行う。麻酔中は直腸に体温計を挿入し、電気式ヒーティングパットで直腸温を37度に維持した。麻酔終了から3時間後まで経過を観察し、16時の実験終了後、ラットを高濃度のイソフルラン吸入で死亡させ、脳を摘出して切り出し、プローベが線条体に留置されていたことを組織学的に確認した。

得られたクロマトグラムはエアリアンダーカーブをパワークロム(ADInstrument、東京)で計算し、各実験毎に外部標準と校正して定量した。実験結果の統計的処理は、群内での経時的变化は毎回採取した還流液 $30 \mu\text{l}$ 中に含まれる各物質の重量を用いた反復測定分散分析を、群間の比較は、薬物投与直前3回の測定値の平均を100%とする相対値を用いた2元分散分析を行い、有意差($p < 0.05$)のある組み合わせに対してNewman-Keuls multiple comparison testを用いてpost hoc多重比較検定を行った。

4. 研究成果

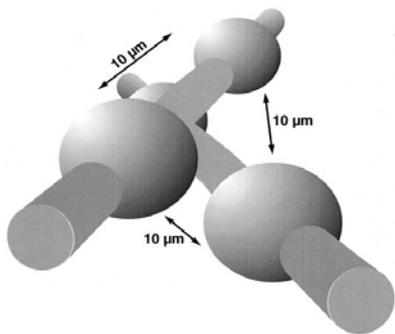
Viziら(11)は2004年に下図のような神経伝達の非シナプス型フィードバックシステムが神経細胞間に存在する仮説を提唱している。興奮性グルタミン酸による刺激がシナプス、受容体を介してNO産生を促進し、増加したNOは細胞外スペースに拡散して他の神経細胞終末のドパミン輸送体を阻害し、ドパミンの再吸収を抑制する(非シナプス型神経伝達)。少なくとも線条体においてはグルタミン酸作動性神経線維とドパミン作動性神経線維との間に明らかなシナプス結合は認められていないが、ドパミン濃度が上昇すると、細胞外スペースに増加したドパミンはグルタミン酸の放出を抑制する。



このフィードバックシステムの中で、NOの測定は困難が多く、大部分の研究はNOを増加させると考えられるアルギニンの投与、あるいは減少させると考えられるL-NG-ニトロ化Lアルギニンメチルエステルの投与で実施されている。今回、新しいNO供給体を用い、全身麻酔による変化を確認した。

本研究においては0.1pmol⁻¹の検出感度を達成し、脳内の複数の部位で直接NOの変化を測定して、(1)神経終末でのドパミン代謝を変化させると考えられるNOを直接測定し、(2)このシステムに及ぼす麻酔薬の影響を解明して(3)麻酔作用発現の因子である可能性を確認し得た。

以上は全くの新しい試みであり、他に研究の例は無い。



上図は上記仮説に従った神経細胞軸索のイメージ図であるが、シナプスとは異なり、10μm前後の比較的離れた神経細胞の間で情報伝達が行われると考えられる。

今回の実験から、麻酔薬が広く細胞外スペースに拡散することによってこのネガティブフィードバックシステムを変化させ、神経細胞の活動を

広範に抑制する所見が得られると予想する。

参考文献

- 1) Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991; 14: 60-7.
- 2) Johns RA, Moscicki JC, DiFazio CA. Nitric oxide synthase inhibitor dose-dependently and reversibly reduces the threshold for halothane anaesthesia: a role for nitric oxide in mediating consciousness? *Anesthesiology* 1992; 77: 779-84.
- 3) Gally JA, Montague PR, Reeke GN, Edelman GM. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3547-51.
- 4) Vizi ES. Role of high-Affinity receptors and membrane transporters in nonsynaptic communication and drug action in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 63-89.
- 5) Adachi Y, Uchihashi Y, Watanabe K, Satoh T. Halothane anesthesia decreases the extracellular level of dopamine in rat striatum: a microdialysis study in vivo. *J Anesth* 2000; 14: 82-90.
- 6) Adachi YU, Watanabe K, Satoh T, Vizi ES. Halothane potentiates the effect of methamphetamine and nomifensine on extracellular dopamine levels in rat striatum: a microdialysis study. *Br J Anaesth* 2001; 86: 837-45.
- 7) Adachi YU, Watanabe K, Higuchi H, Satoh T, Vizi ES. Oxygen inhalation enhances striatal dopamine metabolism and monoamineoxidase enzyme inhibition prevents it: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol*

2001; 422: 61-8.

8) Adachi YU, Watanabe K, Higuchi H, Satoh T, Zsilla G. Halothane enhances acetylcholine release by decreasing dopaminergic activity in rat striatal slices. *Neurochem Int* 2002; 40: 189-93.

9) Adachi YU, Satomoto M, Higuchi H, Watanabe S, Yamada S, Kazama T. Halothane enhances dopamine metabolism at presynaptic sites in a calcium-independent manner in rat striatum. *Br J Anaesth* 2005; 95:485-94.

10) Adachi YU, Yamada S, Satomoto M, Higuchi H, Watanabe K, Kazama T. Isoflurane anesthesia induces biphasic effect on dopamine release in the rat striatum. *Brain Res Bull* 2005; 67: 176-81.

11) Kiss JP, Zsilla G, Vizi ES. Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: interneuronal communication without receptors. *Neurochem Int* 2004; 45: 485-9.

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) Adachi YU, Obata Y, Suzuki K, Katoh H, Itagaki T, Doi M, Sato S. Nafamostat prevents hypothermia and improves survival time after administration of lipopolysaccharide. *J Anesth* 2008; 23: 624-7

2) 足立裕史, 山口昌一, 中島芳樹, 五十嵐寛, 佐藤重仁 アミトリプチリンとパロキセチンとともにセロトニン症候群が生じたと考えられた1例 日本ペインクリニック学会誌 査読有 2009; 16: 23-25.

3) Adachi YU, Yamada S, Satomoto M,

Higuchi H, Watanabe K, Kazama T, Mimuro S, Sato S. Isoflurane anesthesia inhibits clozapine- and risperidone-induced dopamine release and anesthesia-induced changes in dopamine metabolism was modified by fluoxetine in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurochem Int* 査読有 2008; 52: 384-91.

4) 足立裕史, 鈴木かつみ, 小幡由佳子, 土井松幸, 佐藤重仁 術後の覚醒時、フルマゼニルの投与によって再び就眠を来した1症例 麻酔査読有 2008; 57: 901-3.

[学会発表] (計7件)

1) Adachi YU, Kimura K, Mimuro S, Itagaki T, Sato S. The nitroglycerine-induced nitric oxide release was enhanced by propofol not by sevoflurane in rats. *Anesthesiology* 査読有 2009; 111: A106.

2) Adachi YU, Kimura K, Mimuro S, Doi M, Sato S. The nitroglycerine-induced nitric oxide release was enhanced by propofol in rats striatum - in vivo microdialysis study. *Eur J Anaesthesiol* 査読有 2009; 26 Supple 45: 100.

3) Adachi YU, Kimura K, Mimuro S, Doi M, Sato S. The release of nitric oxide was enhanced by GABAergic inhibition and NMDAergic potentiation and the both effects were antagonized by propofol and sevoflurane anesthesia in rats striatum. *Eur J Anaesthesiol* 査読有 2009; 26: Supple 45: 100-1.

4) Adachi YU, Itagaki T, Obata Y, Shiraishi Y, Sato S.

Pentobarbital-induced reduction of nitric oxide in the rat brain striatum was antagonized by nicotine and NMDA. Eur J Anaesthesiol 査読有 2008; 25: 44: Supple 129-30.

5) Adachi YU, Kimura K, Mimuro S, Doi M, Sato S. Propofol-induced reduction of nitric oxide in rat brain was antagonized by neostigmine and arginine. Anesthesiology 査読有 2008; 109: A1522.

6) Adachi YU, Mimuro S, Uraoka M, Shiraishi Y, Sato S. Ketamine Increased Nitric Oxide Release in the Rat Striatum Independent from Acetylcholine Release. Anesthesiology 査読有 2007; 107: A144.

7) Adachi YU, Mimuro S, Doi M, Sato S. Pentobarbital inhibits the release of nitric oxide and the effect is antagonized by the application of neostigmine and magnesium-free perfusion in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. Eur J Anaesthesiol 査読有 2007; 24: Supple 39: 82-3.

[図書] (計1件)

1) 足立裕史、土井松幸 訳 稲田英一 監訳 精神機能の異常 in ICUブック 第3版 メディカル・サイエンス・インターナショナル 東京 2008 pp 789-803.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 裕史 (ADACHI YUSHI)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80420355

(2) 研究分担者

佐藤 重仁 (SATO SHIGEHITO)
浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：30143176

(3) 連携研究者
()

研究者番号：