

機関番号：20101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19592093

研究課題名 (和文) 有機リン剤 (農薬・神経剤) 中毒に対する治療薬・予防薬の神経学的作用機序の解明

研究課題名 (英文) Effects of atropine and oximes on neuronal actions of organophospholus cholinesterase inhibitors.

研究代表者

成松 英智 (NARIMATSU EICHI)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70295343

研究成果の概要 (和文) : 本研究ではラット海馬ニューロンを用いて, グルタミン酸興奮性シナプス伝達および神経細胞興奮性に対するパラオキソン (有機リン系コリンエステラーゼ阻害薬) および治療薬であるアトロピンおよびプラリドキシムの影響を検証した. パラオキソンは, 興奮性シナプス伝達を抑制すると同時に神経細胞興奮性を増強させた. アトロピンおよびプラリドキシムは, これらのパラオキシソンの影響を投与時期が早期である程強力に抑制した.

研究成果の概要 (英文) : We investigated influences of paraoxon (an organophospholus cholinesterase inhibitor), atropine and pralidoxime (an oxime) on glutamatergic excitatory synaptic transmission and neuronal somatic excitability using rat hippocampal slices. Paraoxon depressed the excitatory synaptic transmission and facilitates the excitability. Pralidoxime and atropine prevent and depress the actions of paraoxon and are more effective with earlier treatment.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：救急医学・集中治療学・麻酔学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：海馬、シナプス伝達、有機リン剤、オキシム剤、アトロピン

## 1. 研究開始当初の背景

有機リン系コリンエステラーゼ (ChE) 阻害薬中毒は, 事故・自殺企図による農薬中毒や軍事・テロリズムによる神経剤散布等によ

り発生し, 全身組織のアセチルコリン (ACh) 作動性の異常亢進から痙攣重積, 徐脈, 流涎, 縮瞳, 気管支喘息, 腸管蠕動亢進, 呼吸停止, 等の多様かつ重篤な全身症状を引き起こす.

ChE 阻害薬中毒の治療法確立は重要な研究・対策課題である。この中毒に対する治療薬にはベラドンナ剤, オキシム剤, 抗痙攣剤, 等, 多様な作用機序のものが使用されるが, それら各々の作用性および治療機序の詳細には未解明の部分が多かった。特に後投与の治療薬が有機リン系 ChE 阻害薬によりすでに引き起こされた中枢神経機能失調を正常化させられるのか, また前投与の治療薬がその神経機能失調を予防できるのかという点の解明が不十分であった。以上から本研究代表者らは, 有機リン系 ChE 阻害薬中毒治療薬の中枢神経系における詳細な作用検証が不可欠と考え, 本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究の主目的は, ChE 阻害により生じた中枢神経機能失調に対する各種中毒治療薬の失調回復作用の機序解析と有効性評価である。

具体的には海馬ニューロンに対する有機リン系 ChE 阻害薬の影響を明らかにして, これを ChE 阻害薬中毒の中枢神経系モデルとし, 次にその影響に対する ChE 阻害薬中毒の治療・予防薬 (オキシム剤, ベラドンナ剤) の抑制効果を検証し, 治療的作用機序の詳細を明らかにする。特に有機リン系 ChE 阻害薬投与と治療薬投与の時間的關係と治療薬の中毒作用抑制効果の関連を明らかにし, それぞれの治療薬あるいは予防薬としての効果および効果に及ぼす時間的要因を評価する。

## 3. 研究の方法

麻酔下のラットから迅速に摘出した大脳半球から, 海馬スライス人工髄液中で作製した。本研究で使用する人工髄液は, 全て 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> 混合ガスで常時飽和し, PO<sub>2</sub> は 300mmHg 以上に, PCO<sub>2</sub> は 40mmHg 付近に, 温度は 33°C に, また pH は 7.40±0.05 に保つ

た。

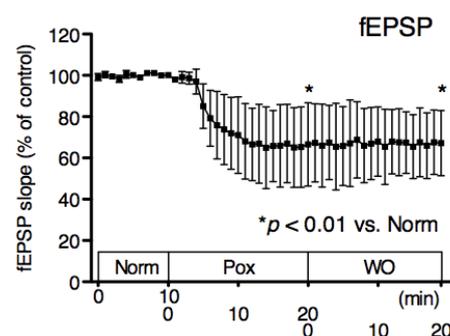
人工髄液を持続的に灌流 (3-4 ml / min.) した記録用液槽内に海馬スライスを移し, CA3 Schaffer-collateral 電気刺激により誘発した CA1-field EPSP (fEPSP, グルタミン酸興奮性シナプス後電位を反映) および CA1-population spike (PS, 神経細胞体活動電位を反映) を細胞外微小電極法で記録した。

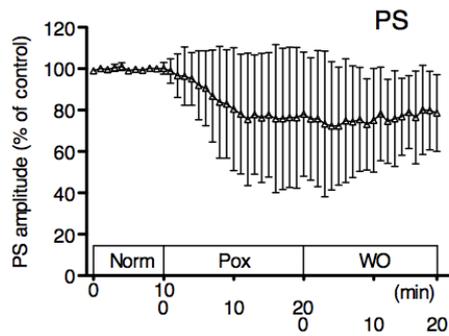
記録されたシグナルの数値化および波形解析にはコンピュータ波形解析プログラムを用いた。解析指標としては, PS の振幅および fEPSP の初期傾斜を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) fEPSP および PS に対する paraoxon の作用

Paraoxon (1 μM) は, fEPSP を抑制した (65.3 ± 19.5% of control,  $p < 0.01$ ,  $n = 6$ )。また paraoxon (1 μM) は PS を変動 (抑制あるいは増強) させたが, その変化は有意ではなかった (76.3 ± 34.0% of control,  $p < 0.01$ ,  $n = 6$ , 1-β error: 93.19%)。これら paraoxon による fEPSP 抑制および PS 変動 (非有意) は wash out では回復せず非可逆的であった。



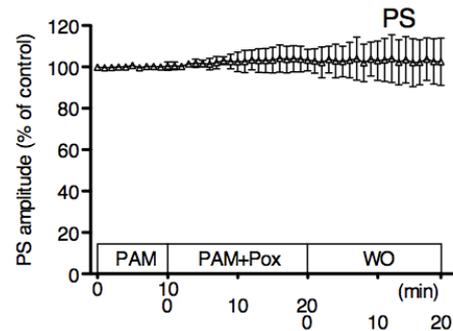
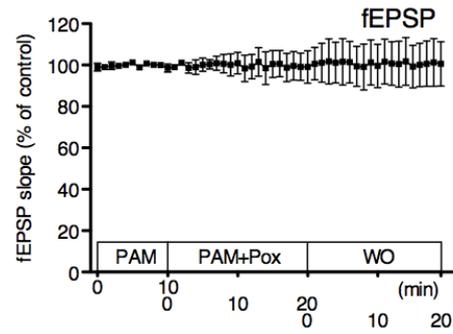


薬物非投与下およびparaoxon, pralidoxime, atropine投与下において, fEPSPとPSは平行して変動し, 直線的相関を示した. また physostigmine (10  $\mu$ M, カーバメート系ChE阻害薬)によるfEPSPおよびPSの変化は, paraoxon (1  $\mu$ M)によるそれらと同様であった.

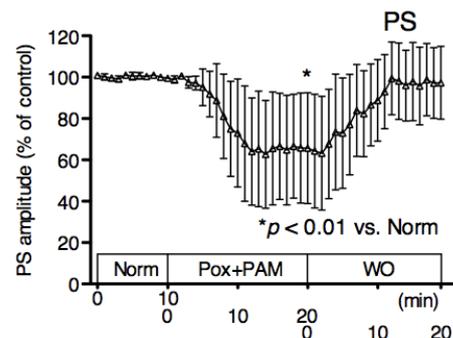
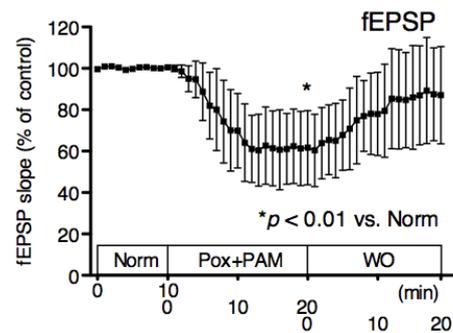
これらの成績から, paraoxonのChE阻害作用により海馬スライス中に蓄積・増加したAChは, ムスカリン型ACh (mACh) 受容体を介してグルタミン酸興奮性シナプス後電位 (fEPSPで反映される) を抑制するが, 同時に神経細胞体興奮性を増強するため, これら2者のバランスの結果として錐体細胞体での活動電位 (PSで反映される) は変動 (増強あるいは抑制の一方) を示すという機序が考えられる.

(2) fEPSP および PS に対する paraoxon の作用に対する pralidoxime の影響

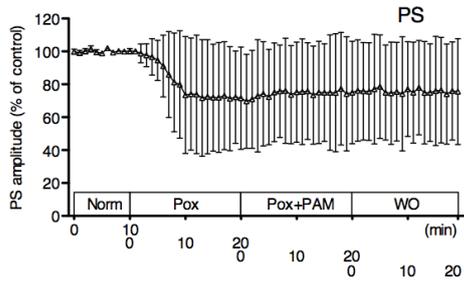
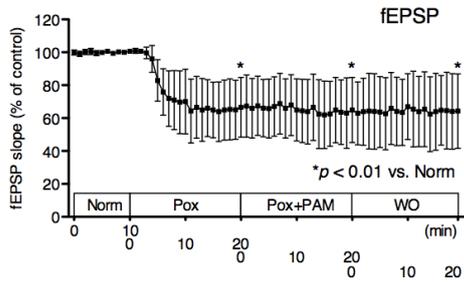
Pralidoxime (10  $\mu$ M)前投与は, paraoxon (1  $\mu$ M)によるfEPSP抑制および非有意性PS変動を抑制した.



Pralidoxime (10  $\mu$ M)同時投与は, paraoxon (1  $\mu$ M)によるfEPSP抑制および非有意性PS変動を抑制しなかったが, その後のwashoutはそれらを回復させた.



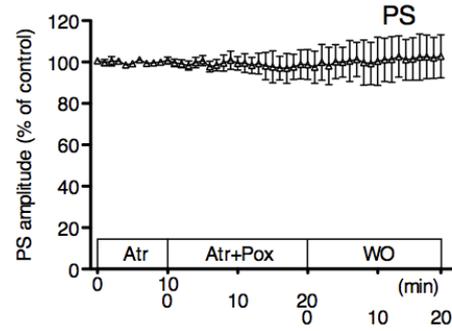
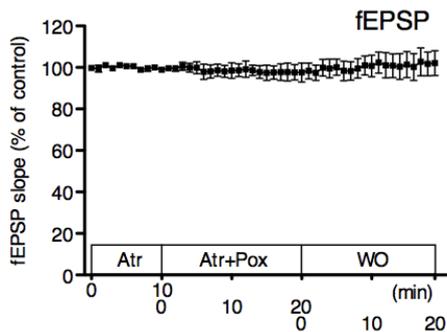
Pralidoxime (10  $\mu$ M) 後投与は, paraoxon (1  $\mu$ M) による fEPSP 抑制および非有意性 PS 変動に影響しなかった。



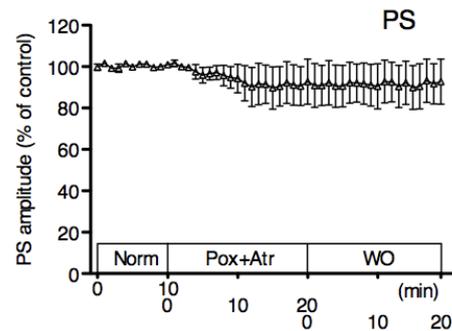
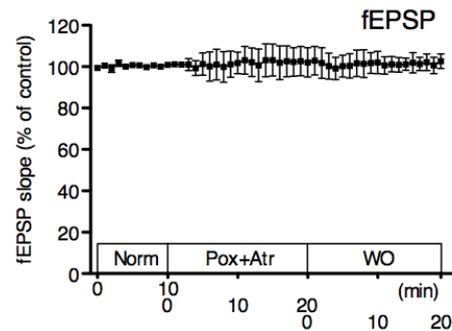
これらの実験結果は, pralidoxime は早期に作用させた方がより強く paraoxon の ChE 阻害作用を抑制できることを示しており, 有機リン中毒に対する pralidoxime の治療的投与が早期の方がより有効という臨床的事実と矛盾しない。

(3) fEPSP および PS に対する paraoxon の作用に対する atropine および選択的 mACh 受容体遮断薬の影響

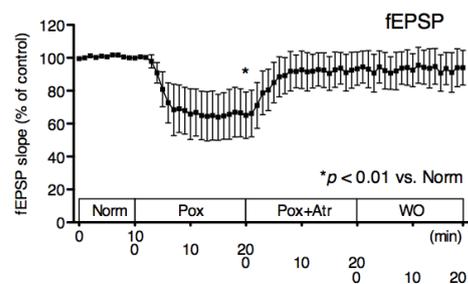
Atropine (10  $\mu$ M, 非選択的 mACh 受容体遮断薬) 前投与は, paraoxon (1  $\mu$ M) による fEPSP 抑制および非有意性 PS 変動を抑制した。

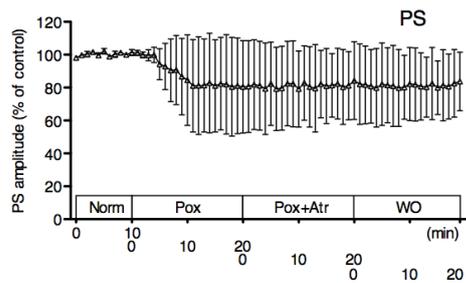


Atropine (10  $\mu$ M) 同時投与は, paraoxon (1  $\mu$ M) による fEPSP 抑制および非有意性 PS 変動を抑制した。



Atropine (10  $\mu$ M) 後投与は, paraoxon (1  $\mu$ M) による fEPSP 抑制を回復させたが, 非有意性 PS 変動を変化させなかった。





これらは、paraoxonによるグルタミン酸興奮性シナプス伝達抑制および神経細胞体興奮性増強がmACh受容体を介することを示す。これらの実験結果は、atropineは早期に作用させた方がより強くparaoxonによるChE阻害の影響を抑制できることを示している。

Paraoxon (1  $\mu$ M) による fEPSP 抑制は、pirenzepine (1  $\mu$ M, M1-mACh 受容体遮断薬) 前投与で完全に、また p-f-HHSiD (0.3  $\mu$ M, M3-mACh 受容体遮断薬) 前投与では部分的に抑制された。これらは、paraoxon によるグルタミン酸興奮性シナプス伝達抑制が M1-および M3-mACh 受容体を介することを示す。また pirenzepine (1  $\mu$ M), methoctramine (0.1  $\mu$ M, M2-mACh 受容体遮断薬), p-f-HHSiD (0.3  $\mu$ M), tropicamide (0.5  $\mu$ M, M4-mACh 受容体遮断薬) の前投与は、PS 増強を消失させ、fEPSP 変動と PS 変動を平行化させた。これらは、paraoxon による神経細胞体興奮性増強が M1-, M2-, M3-および M4-mACh 受容体を介することを示す。

##### 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6件)

1) Narimatsu Eichi, Niiya Tomohisa, Kawamata Tomoyuki, Kawamata Mikito, Yamakage Michiaki. Effects of atropine and pralidoxime on neuronal actions of paraoxon in rat hippocampal slices.

Neurosci Res 2010;68:276-84. 査読有。

2) Nishikawa Kouki, Narimatsu Eichi, Igarashi Motohiko, Namiki Akiyoshi. Effects of sepsis on the neuromuscular blocking actions of d-tubocurarine on rat adductor and abductor laryngeal muscles. J Anesth 2009; 23: 520-525. 査読有。

3) 成松英智, 新谷知久. 筋弛緩薬の基礎 - 神経筋接合部に対する非脱分極性筋弛緩薬の作用-. Pharmacesthesiology 2009, 20: 22-28. 査読有。

4) 成松英智, 新谷知久, 並木昭義. 神経筋接合部を意識した筋弛緩投与方法とモニタリング - 種々の病態での神経筋接合部の変化と筋弛緩モニタリングの留意点-. 日本臨床麻酔学会誌 2009, 29:23-34. 査読有。

5) Narimatsu Eichi, Niiya Tomohisa, Kawamata Mikito, Namiki Akiyoshi. Adenosine and adenosine uptake inhibitors potentiate the neuromuscular blocking action of rocuronium mediated by adenosine A<sub>1</sub> receptors in isolated rat diaphragms. Acta Anesth Scand 2008; 52: 1415-22. 査読有。

6) Narimatsu Eichi, Niiya Tomohisa, Kawamata Mikito, Namiki Akiyoshi. Lack in Effects of Therapeutic Concentrations of Dexmedetomidine and Clonidine on the Neuromuscular Blocking Action of Rocuronium in Isolated Rat Diaphragms. Anesth Analg 2007; 104: 1116-20. 査読有。

[学会発表] (計8件)

1) Narimatsu Eichi, Niiya Tomohisa, Kawamata Tomoyuki, Kawamata Mikito, Yamakage Michiaki. Effects of atropine and pralidoxime on neuronal actions of paraoxon in rat hippocampal slices. In: 2010 Annual Meeting, American Society of

Anesthesiologists: 2010 Oct. 16-20: San Diego, USA.

2) 成松英智. 救急医療における

Dexmedetomidineの有効な使用法(ランチョンセミナー). 第29回日本蘇生学

会:2010.9.10-11:宇都宮

3) 成松英智. -筋弛緩拮抗はどのようにすればいいの-筋弛緩拮抗時の神経筋伝達(シンポジウム). 第56回日本麻酔科学会学術集会:2009.8.16-18:神戸.

4) Narimatsu Eichi, Niiya Tomohisa, Kawamata Tomoyuki, Namiki Akiyoshi, Asai Yasufumi. Effects of an organophosphate and an oxime on the neuromuscular blocking action of rocuronium. In: 2008 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists: 2008 Oct. 18-22: Orlando, USA.

5) 成松英智. 筋弛緩薬を正しく理解しようーロクロニウムの臨床的有用性ー筋弛緩薬の基礎(シンポジウム). 第30回日本麻酔・薬理学会:2008.6.21:京都

6) 成松英智, 新谷知久, 並木昭義. 神経筋接合部を意識した筋弛緩投与法とモニタリング種々の病態での神経筋接合部の変化と筋弛緩モニタリングの留意点(シンポジウム). 第27回日本臨床麻酔学会:2007.10.25-27:東京.

7) Narimatsu Eichi, Niiya Tomohisa, Kawamata Mikito, Kiya Tomohiro, Namiki Akiyosi. Effects of Adenosine and Adenosine Uptake Inhibitors on the Action of Rocuronium In Vitro. In: 2007 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists: 2007 Oct. 13-17: San Francisco, USA.

8) 成松英智, 窪田生美, 橋本功二, 和田武志, 井上弘行, 岡本博之, 宮田 圭, 浅井康文. ICUせん妄に対する dexmedetomidine の

有用性と患者精神状態(パネルディスカッション). 第34回日本集中治療医学会総会:2007.3.1-3:神戸

[図書](計5件)

1) 成松英智, 新谷知久. 基礎編2. 神経筋伝達の解剖と生理. B シナプス伝達. 岩崎 寛編. 筋弛緩薬. 克誠堂出版, 2010, 50-63.

2) 成松英智, 新谷知久. 基礎編3. 筋弛緩薬の作用機序. 岩崎 寛編. 筋弛緩薬. 克誠堂出版, 2010, 80-100.

3) 新谷知久, 成松英智. 基礎編2. 神経筋伝達の解剖と生理. Cシナプス伝達後の筋線維収縮. 岩崎 寛編. 筋弛緩薬. 克誠堂出版, 2010, 64-79.

4) 成松英智, 新谷知久. 第6章-特殊な状態・病態におけるロクロニウムの使い方と留意点, (2)重症筋無力症・筋疾患などの神経筋疾患. 大下修造, 他編, すぐに役立つロクロニウムの上手な使い方. 日本臨床麻酔学会誌編集室, 2008, 110-119.

5) 成松英智. 第3章 プレセデックスの適応外使用 (5)救急領域. デクスメデトミジン. 真興交易医書出版部, 2007, 217-223.

6. 研究組織

(1)研究代表者

成松 英智 (NARIMATSU EICHI)

研究者番号: 70295343

札幌医科大学・医学部・准教授

(2)研究分担者

川真田 樹人 (KAWAMATA MIKITO)

研究者番号: 90315523

信州大学・医学部・教授

川股 知之 (KAWAMATA TOMOYUKI)

研究者番号: 80336388

信州大学・医学部・准教授

新谷 知久 (NIIYA TOMOHISA)

研究者番号: 80510312

札幌医科大学・医学部・助教