

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21791477

研究課題名（和文）オピオイドおよび吸入麻酔薬が神経情報伝達制御に与える影響と作用機序に関する研究

研究課題名（英文）Study of mechanism of opioid and volatile anesthetics on intracellular signaling and neural transmission.

研究代表者

工藤 治 (KUDO OSAMU)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80365600

研究成果の概要（和文）吸入麻酔薬は、意識の消失とともに不随運動、嘔吐、心拍数以上などを併発する。この不随運動発生メカニズムの解析による神経ネットワークにおける麻酔機序の解明を目的とした。本研究は大脳基底核の入力部である線条体での不随運動に関する情報処理異常に起因すると考え、主にホールセルパッチクランプ法にて線条体投射ニューロンの電気整理学的变化を記録分析した結果、一過性に大脳皮質からの興奮性入力が増加すると同時に、線条体では抑制性入力により強く抑制されることで、線条体神経回路が興奮状態に傾くことを明らかとなった。線条体での不均衡抑制がセボフルラン麻酔導入時にみられる興奮期の発生の一つのメカニズムと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Suppression of movement during induction of anesthesia is mediated through subcortical structures. We studied the effects of a brief 5-min application of a clinically relevant concentration of sevoflurane (2MAC: minimum alveolar concentration) on the electrophysiological activities of the medium spiny neurons of the stratum in brain slice preparations, using a whole-cell patch-clamp technique. We found that sevoflurane slightly depolarized principal neurons in the cortex and the stratum without a significant alteration in spike threshold. Furthermore, it depressed the peak, as well as the net, charge transfer of intrastriatally evoked inhibitory postsynaptic currents much more strongly than those of excitatory postsynaptic currents. And this inhibition was accompanied by an elevated paired-pulse ratio. The strong suppression of eIPSCs paralleled a significant suppression of the spontaneous EPSCs.

These results suggest that, in contrast to its effects on other brain structures, sevoflurane shifts the balance between synaptic excitation and inhibition in the direction of excitation in the stratum, thereby causing involuntary movements during induction of anesthesia by sevoflurane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：麻酔科

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：吸入麻酔薬, 麻酔興奮期, MEP モニタリング

1. 研究開始当初の背景：作用機序が未だ解明 | されていない吸入麻酔薬であるが、私たちは

この吸入麻酔薬は線条体を中心とした大脳皮質→基底核→視床ループにおける情報伝達回路に乱れが生じることを見いだした。そこで、その“乱れ”の解析をもとに、吸入麻酔薬が脳内神経ネットワーク活動に与える影響を評価する。これらの結果により吸入麻酔薬の機序解明と副作用のない麻酔薬開発に寄与することを目的とする。

2. 研究の目的：全身麻酔導入時に意識消失に続いて不随意的な筋肉運動や自律神経を介した様々な反応が生じ、ほんの少しの外部刺激でも激しい反応を引き起こす誘因となることがあり、気管支痙攣などの重篤な合併症発生が懸念されている。今回はマウスの大脳皮質-線条体の細胞内電極により大脳基底核の入力中継点である線条体における情報処理状態を観察し、興奮期の発生メカニズムの解析を目的とした。

3. 研究の方法：スライス標本を用いた whole-cell パッチクランプ記録法を用いた。まずは Current clamp において膜電位の変化および Spike 閾値を測定し、のち吸入麻酔薬であるセボフルラン：2 MAC 濃度を投与して変化を観察した。次に、paired-pulse facilitation (2発刺激増強)をはじめ誘発性の IPSC (inhibitory postsynaptic current: 抑制性シナプス後電流) および EPSC (excitatory postsynaptic current: 興奮性シナプス後電流) の観察、さらに自発性 IPSC, EPSC, 加えて微小シナプス後電流の頻度測定を行い、吸入麻酔薬の脳内神経伝達に与える影響に関して実験を行った。

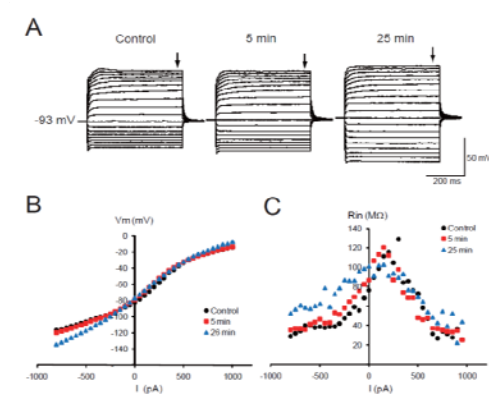
4. 研究成果：吸入麻酔薬は、手術可能な麻酔深度に達する前に興奮期を経由する。ここでは意識消失に伴い、不随運動、呼吸抑制、心拍数異常など引き起こすが、運動に関する脳内処理系統は大脳皮質-大脳基底核系が強く関与していることから、この興奮期の運動症状は大脳基底核の入力部である線条体での情報処理変化を観察することにした。

#### 1) Current clamp における大脳皮質と線条体との比較結果

Spike 閾値に関してはセボフルラン投与により上昇したが、5分間では約 1mV、10-15分では約 3mV であり、統計学的に 10-15分間に有意差が見られた。さらに内向きおよび外向き整流性に与える影響を I-V グラフより検討したが、同様に 10-15分では整流性に変化がみられた。

Fig 1 : セボフルラン 2 MAC 添加による線条体 MS ニューロンの膜抵抗変化と整流性に関する

#### 解析

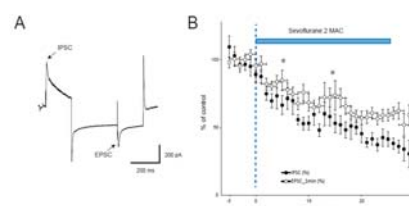


A, B, C: 線条体細胞のうち約 90% を占める投射ニューロンである MS ニューロン (Medium Spiny Neuron) に対するセボフルランの効果を Current clamp 法により観察した。セボフルランの作用は 5 分では明らかではないが、10-15 分さらには 25 分と経過するに従い、閾値の増大、内向き整流性の漸減、静止膜電位の変化が見られた。これらの結果から 15 分と時間経過を経て作用し、Na チャネルや K チャネルへ作用することが示された。

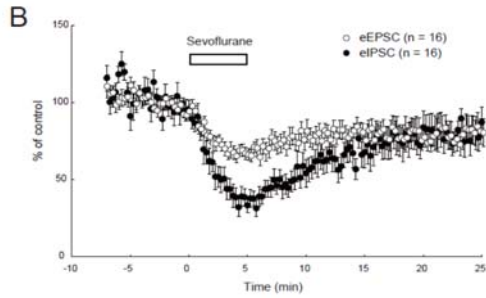
#### 2) 線条体 Medium Spiny Neuron における誘発性の抑制性および興奮性シナプス後電流 (eIPSC, eEPSC) 変化

eIPSC および eEPSC は 500ms ごとに分割し、+10mV と -60mV の静止膜電位に固定して記録した。セボフルランの投与により eIPSC, eEPSC の両方の電流は減少したが、eIPSC の方が eEPSC に比べてより強く減少した。さらに興奮期を想定して 5 分間という時間に限ってセボフルランを投与して EPSC, IPSC を観察した。その結果もやはり統計学的有意をもって eIPSC は抑制された。また、paired Pulse 比は eEPSC に変化はなく、eIPSC で変化が見られた。これらの結果より抑制よりも興奮が凌駕しており、eIPSC の抑制は線条体 GABA ニューロンのシナプス前ターミナルから放出される GABA の放出確率の減少に起因するものではないかと思われた。

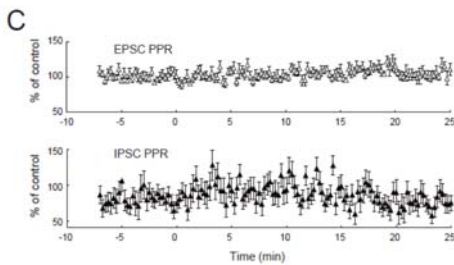
Fig 2 : セボフルランによる誘発性 evoked EPSC と IPSC の変化と Paired Pulse Ratio.



A: 大脳皮質および線条体内刺激を行い、長時間にわたるセボフルラン添加による eEPSC, eIPSC の変化ではより-IPSC がより抑制されている。



B: セボフルラン5分投与で EPSC の薬 30%に対して、IPSC では約 65%の抑制が観察。明らかに抑制系と興奮系の効果にアンバランスが生じている。

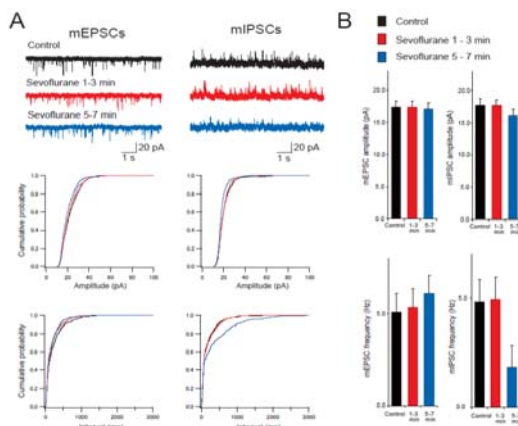


C: EPSC では PPR(Paired pulse ratio)に変化がないのに対して、IPSC では PPRが増大。よって、GABA の放出確率が低下していることが考えられる。

### 3) 微小 (m:miniature) IPSC と EPSC 変化

テトロドトキシン存在下に mIPSC, mEPSC を観察した。その結果、mEPSC の頻度増加は見られず、mIPSC の頻度減少のみが見られた。

Fig 3 : 微小シナプス後電流



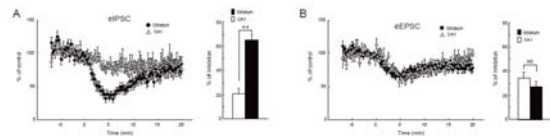
A, B: テトロドトキシン (TTX) を添加し、外界からの入力を遮断した状態での EPSC, IPSC (miniature Post Synaptic Current, 微小シナプス後電流) の変化を観察した。セボフルランの 2 MAC 投与 (約 4%) により導入期にあたる 1-3 分では mEPSC のみならず、mIPSC に影響を与えない

が、5分を過ぎたあたりから7分までに mIPSC の頻度 (Interval) のみが有意に低下した。なお、mEPSC には変化がなかった。

このことから GABA の放出確率の低下が示唆された。これは PPR (Paired Pulse Ratio) の結果とよく一致した。

### 4) 海馬との比較

海馬については多くの研究報告があり、吸入麻酔薬は IPSC を軽度抑制もしくは増強するとの報告が多くある。一方、線条体では海馬とは異なり eIPSC は強力に抑制されていた。なお、eEPSC は海馬とほぼ同程度であった。このように IPSC がより強く抑制されるのは線条体特有の現象であることをつきとめた。また従来の研究結果と同様に海馬では放出確率を下げるような変化は見られていない。脳内において海馬と線条体では異なる働きをしており、脳内神経ネットワークのユニークさに起因すると考えられた。



A: EPSC における比較では海馬と線条体では明らかな違いが観察された。すなわち、線条体はより抑制されている。

B: IPSC では海馬、線条体ともほぼ同じ変化であった。

### 5) GABA 放出確率低下の原因解析

GABA 放出抑制は線条体の GABA からのものであるのかを検証した。このため Ca イオンチャネルの阻害薬であるカドニウム (Cd) を添加して微小 IPSC, EPSC を観察したところ、セボフルラン投与でも IPSC での頻度に減少はみられなかった。また K チャネルブロッカーを添付して同様の実験を行ったが、IPSC の頻度に減少がみられていた。このことからセボフルランによる線条体ではカルシウムを介して作用したと考えられた。

### 6) セボフルラン麻酔にみられる興奮期の発現に対する考察

一過性に大脳皮質からの興奮性入力が増加すると同時に、線条体では抑制性入力により抑制されることで、いわゆる興奮状態に傾くものと思われた。この線条体での不均衡な抑制がセボフルラン麻酔導入時にみ

られる興奮期の発生のひとつのメカニズムと考えられた。海馬での結果と線条体での作用が異なることから吸入麻酔薬は神経ネットワーク間でのそれぞれの変化が起こり、結果的に高次脳機能に影響を与えるものと思われる。この神経ネットワークには複数の核が関与していると思われる。またこの変化が脳発育に悪い影響を与えるかに関しては今後の研究が待たれる。

#### 7) セボフルラン麻酔における MEP モニタリングと側彎症に対する周術期管理

側彎症では、手術操作により脊髄損傷の可能性があるため様々な誘発電位を用いた脊髄機能もモニタリングが行われている。そしてこれに伴い、通常の麻酔臨床で多様されている吸入麻酔薬や筋弛緩薬の使用が制限されるため“特殊な”かつ“繊細な”患者管理が要求される。我々の症例経験をもとに側彎症手術での運動誘発電位 (MEP: Motor Evoked Potential) モニタリングや覚醒試験 (Wake-Up Test) を行う際の麻酔管理を検討した。一般に吸入麻酔薬による MEP 導出が得られない症例を経験する。このため現在、レミフェンタニル (オピオイド) を用いた麻酔管理を行っており、MEP モニタリングはほぼ導出に至っている。これは運動路を刺激した場合、MEP 波形は麻酔薬により著明に抑制される。そこで単発刺激ではなく、500Hz 程度の速さの 3～5 連のトレインパルスを用いた刺激が行われている。これにより MEP 波形の導出が可能となった。興奮性シナプス後電位 excitatory postsynaptic potential: EPSP) の持続時間が 7～10msec であるため、この持続時間よりも短い速さで次の刺激を与え、麻酔薬によって抑制された電位を蓄積させ、発火閾値に到達させることで描出させている。なお刺激であるが、経頭蓋的電気刺激を行った。主に C3-4 を、500Hz、5 連の刺激を用いた。

全身麻酔中の運動機能をモニタリングする目的でその麻酔管理法を検討した。セボフルランを始めとする吸入麻酔薬は強く MEP 波形を抑制するためオピオイドを用いることにより MEP 波形を得ることができた。これが患者の機能的予後の改善に寄与するものと思われた。

#### 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 3 件)

1. 渡辺朝香, 工藤 治, 西村欣也, 他: 新生児, 乳児の肥厚性幽門狭窄症の麻酔管理におけるレミ

フェンタニル併用時の麻酔薬投与量, 抜管時間の検討, 日本臨床麻酔学会誌, Vol, 31, 5411-5412, 2011. 査読有

2. 西村欣也, 工藤 治, 渡辺浅香, 他: MEP モニタリングと側彎症に対する周術期管理. 臨床麻酔, 35:81-87, 2011. 査読有

3. 工藤 治, 西村欣也, 稲田英一: 脳内神経ネットワークからみた吸入麻酔薬の作用機序の解析. 臨床麻酔, In Press, 2012. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 工藤 治, 西村欣也, 稲田英一, 他: 神経ネットワークへの吸入麻酔薬の影響, 2010 年 6 月 3 日 兵庫県神戸市, 第 57 回日本麻酔学会.

2. 工藤 治, 西村欣也, 稲田英一, 他: 神経ネットワークへの吸入麻酔薬の影響, 2011 年 11 月 12 日 石川県金沢市, 第 14 回日本医療ガス学会.

3. 工藤 治, 西村欣也, 稲田英一, 他: 神経ネットワークへの吸入麻酔薬の影響, 2011 年 5 月 20 日 兵庫県神戸市, 第 58 回日本麻酔学会.

4. 工藤 治, 山本牧子, 稲田英一, 他: 心拍動下冠動脈バイパス術が腎機能に及ぼす影響の検討, 2011 年 10 月 8 日, 北海道旭川市, 第 16 回日本心臓血管麻酔学会.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

工藤 治 (KUDO OSAMU)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 80365600