

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22591706

研究課題名（和文）

非シナプス型細胞外腔一酸化窒素・ドパミン系神経伝達から解析した麻酔作用機序の解明

研究課題名（英文）

The mechanism of general anesthesia investigated in the area of non-synaptic neural transmitting at the extracellular space in the brain: focusing on nitric oxide and dopaminergic system.

研究代表者

足立 裕史 (ADACHI YUSHI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：80420355

研究成果の概要（和文）：要約：全身麻酔薬の古典的代表ともいえるペントバルビタールやケタミンなどの静脈麻酔薬は脳内神経伝達物質の放出に影響を与える。今回、マイクロダイアリス法を用いて、アセチルコリン作動性神経の関与を調べた。ペントバルビタールがアセチルコリン作動性神経の作用を介して一酸化窒素放出を減少させるのに対し、ケタミンは直接一酸化窒素放出を増加させる機序の存在が示された。

今回の調査の予備実験として施行した各種研究の成果からは、麻酔薬がより多くの非シナプス型細胞外腔神経伝達に関与しており、従来から知られる GABA 受容体に対しても、GABA_A のみならず、GABA_B 受容体への作用の存在する可能性が、一酸化窒素放出の変化から推測された。

研究成果の概要（英文）：Pentobarbital (PB) and ketamine (Ket) influence the concentration of neurotransmitters in the brain. PB has been reported to decrease the extracellular nitric oxide (NO) concentration through a decrease in acetylcholine (ACh) release, while Ket has been shown to increase the NO concentration via an increase in ACh release. Here, we investigated effects of PB and Ket on NO release and the relationship between NO and ACh in the rat striatum by in vivo microdialysis experiments. Male Sprague-Dawley rats were used. A microdialysis probe was inserted into the right striatum and perfused with modified Ringer's solution. Samples were collected every 15 min and injected into an HPLC system. The rats were freely moving, and PB and Ket were administered intraperitoneally. Neostigmine (1 and 10 μ M) and mecamylamine (100 μ M) were added to the perfusate. Calcium and magnesium concentrations were modified for each anesthetic to influence ACh release. PB decreased NO products (NO_x) while Ket increased them. While perfusion with neostigmine showed no effect on baseline NO_x concentrations, it diminished the PB-induced NO_x reduction at low concentrations and abolished it at high concentrations. Magnesium-free perfusion had no effect on baseline NO_x concentrations, whereas perfusion at a low magnesium concentration antagonized the PB-induced NO_x reduction. Mecamylamine and calcium-free perfusion had no effect on baseline NO_x concentrations and Ket-induced NO_x increases. PB may decrease NO release through reduction in ACh release, whereas Ket may increase NO release independent of ACh regulation.

Moreover, we studied a series of preliminary investigations and the results suggested that general anesthetics could modify many pathways of neural transmitting in extracellular space as a non-synaptic neural transmission. Not only GABA_A, which is one of well-known target receptors of anesthetics, but also GABA_B receptor would be involved in as a target of general anesthetics with the current results of changing in releases of NO_x.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：非シナプス型細胞伝達、細胞外腔、一酸化窒素、ドパミン、麻酔作用、ラット、線条体、マイクロダイアリシス

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行われているが、19世紀半ばに亜酸化窒素、エーテルによる麻酔が成功してから150年を経た現在でも、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遮断作用が最も重要と考えられているが、特定の受容体が存在しない(あるいは発見されていない)気体(=ガス)が麻酔作用を示すことから、シナプスに代表される受容体が関与する典型的な神経伝達ではなく、広く細胞外腔に拡散する、非シナプス型細胞外腔シグナル伝達への作用が麻酔の本質と考えられる。一酸化窒素(NO)は、同様に受容体の存在しない気相の神経伝達物質であり、麻酔薬との相互作用を手掛かりに、麻酔機序の解明を図る事を目指した。

一酸化窒素(NO)は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おいて神経伝達、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。幾つかの研究は、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、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。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、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。

以前に研究代表者は自由行動下のラット脳内線条体の神経伝達に注目し、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。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た。

麻酔はドパミンの酸化過程を亢進し、大量

のフリーラジカルが発生させるが、この際に生じるNOは直ちに細胞外スペースへ拡散し、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はシナプス前性に神経終末のドパミントランスポーターの回転を阻害することが示されており、更にアセチルコリンを介した修飾作用も加わって、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フィードバックに及ぼす麻酔の影響は、作用発現においても大きな鍵を握っていると推測される。

2. 研究の目的

今回の研究では、これまでの研究に引き続いて、さらに発展した3年間の段階的な実験を計画した。ラット脳内の細胞外液中のNO濃度を測定し、各種麻酔薬を投与して線条体、海馬、腹側被蓋野の脳内各部位における影響を検討すると共に、各種のNOの供給体、NO合成酵素阻害薬を同時投与して、麻酔薬の主な作用部位が非シナプス的な神経伝達である可能性を確認する事を目的とした。

Vizi ら(Kiss JP, Zsilla G, Vizi ES. Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: interneuronal communication without receptors. *Neurochem Int* 2004; 45: 485-9.)は2004年に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供給体を用いた。

本研究においては0.1pmol \cdot l⁻¹の検出感度達成を目指し、脳内の複数の部位で直接NOの変化を測定して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、このシステムに及ぼす麻酔薬の影響を解明して麻酔作用発現の因子である可能性を確認した。本研究は全くの新しい試みであり、他に研究の例は無い。

非シナプス型神経伝達は、シナプスとは異なり、10 μ m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仮定した。

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、プロポフォル群と、それぞれに一酸化窒素供給体であるアルギニン、ニトログリセリン、その阻害薬を併用投与した群について、各群6匹ずつ測定を行った。ラットは自由に食事、飲水ができるようにした。本実験に関しては動物実験施設倫理委員会の承認を得た。

マイクロダイアライシスプローベは外径0.22mm、膜長3mm(エイコムA-I-8-03、京都、より購入)を用い、ステレオタキシク装置を用いてガイドカニューレ(エイコムAG-8、京都)をラット脳の線条体、海馬、皮質、腹側被蓋野に挿入した。

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し、プローベ挿入直後より、修正リング液をマイクロシリンジポンプ(実験室に現有)を用いて流す。3時間後より、オートインジェクター(実験室に現有)を用いて15分毎に還流液30 μ lをオンラインHPLCシステムに注入して、還流液中の一酸化窒素濃度(NO₂-及びNO₃-)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 50mm、

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 μ l \cdot min⁻¹で流し、分離、還元した後にグリニヤ試薬を加え、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100ng \cdot ml⁻¹含む標準溶液10 μ 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回の測定値が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3l \cdot 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、あるいはプロポフォルを用いて全身麻酔を導入した。吸入麻酔薬の濃度は赤外分光ガス分析装置(Ultima、Datex、Finland)で確認すし、麻酔直前に薬理学的前処置を行った。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とチオペンタール静脈内投与で死亡させ、脳を摘出して切り出し、プローベが脳内測定部位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リアアンダーカーブをワーククロム(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、群内での経時的変化は毎回採取した還流液40 μ 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多重比較検定を適応した。

4. 研究成果

in vivo マイクロダイアライシス法を用い、全身麻酔薬が脳内非シナプス性細胞外腔伝達情報系における一酸化窒素の放出、調整機序に及ぼす影響について、研究を遂行した。

一酸化窒素(NO)は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おいて神経伝達、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おり、幾つかの研究は、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、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。細胞外腔の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、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。

今回の一連の研究は、上記知見を新しい実験系から証明し、全身麻酔薬の作用発現が、単一のシナプス性神経伝達変化、或いは単純な受容体刺激・遮断型の薬理学的変化によるものではなく、より広範な神経系への作用の結果として生じる機序の存在を示唆した。

近年、遺伝子学的な実験手法が長足の進歩を遂げており、クローニングによる受容体の機能解析、メッセンジャーRNAの発現を軸としたタンパク合成の研究、細胞内情報伝達系の機能解析が進んでいるが、細胞間の具体的な神経伝達機序の解明に際して、細胞外腔の神経伝達物質濃度測定は欠かす事の出来ない課題であり、本研究の意義は極めて高いものと考えられた。

数多くの国際学会へ定期的な発表を行う事によって、学術的な基礎を確立した他、逐次英文論文等として報告を行い、本邦に於ける有意義な研究活動としての実績が蓄積された。

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 20件)

1. Adachi YU, Tanaka K, Suzuki S, Nishiwaki K, Matsuda N. Intravenous droperidol decreases the Bispectral index during general anesthesia with sevoflurane and remifentanil. Masui(麻酔) 2013; 62: 71-4. (査読有)

2. Kimura-Kuroiwa K, Adachi YU, Mimuro S, Obata Y, Kawamata M, Sato S, Matsuda N. The effect of aging on dopamine release and metabolism during sevoflurane anesthesia in rat striatum: An in vivo microdialysis study. Brain Res Bull 2012; 89: 223-40. (査読有)

3. Kimura-Kuroiwa K, Adachi YU, Obata Y, Kawamata M, Sato S, Matsuda N. Dexmedetomidine and hydroxyzine synergistically potentiate the hypnotic activity of propofol in mice. J Anesth 2012; 26: 422-8. (査読有)

4. Kimura-Kuroiwa K, Adachi YU, Mimuro S, Kawamata M, Sato S, Matsuda N. Pentobarbital decreased nitric oxide release in the rat striatum but ketamine increased the release independent of

cholinergic regulation. Exp Anim 2012; 61: 165-70. (査読有)

5. Yamauchi-Satomoto M, Adachi YU, Kurita T, Morita K, Sato S. Cross-clamping of the descending thoracic aorta leads to the asymmetrical distribution of propofol during cardiopulmonary bypass surgery. Korean J Anesthesiol 2012; 62: 327-31. (査読有)

[学会発表] (計 15件)

1. Adachi Y, Tochikubo J, Tamura T, Matsuda N. Co-Administration of JM-1232(-) and Propofol Produced Quick Emergence From Hypnosis and the Repeated Injections Demonstrated Minute Increases of Recovery Time From Anesthesia in ddY Mice. Annual meeting of American Society of Anesthesiologists 2012, A546, October 13-17, 2012, Washington D.C. USA.

2. Adachi Y, Tochikubo J, Tamura T, Matsuda N. Droperidol, But Not Haloperidol, Enhanced the Hypnotic Activity of Propofol and Co-administration of Haloperidol With Quinelorane Showed a Potentiation of Propofol-induced Hypnosis in ddY Mice. Annual meeting of American Society of Anesthesiologists 2012, A740, October 13-17, 2012, Washington D.C. USA.

3. Adachi Y, Tochikubo J, Tamura T, Matsuda N. Droperidol Decreases the Bispectral Index During General Anesthesia With Sevoflurane and Remifentanil. Annual meeting of American Society of Anesthesiologists 2012, A1196, October 13-17, 2012, Washington D.C. USA.

4. Adachi YU. Co-administration of JM-1232(-) synergistically enhanced the hypnotic activity of propofol and the combination shortened the recovery from anesthesia in ddY mice. Euroanaesthesia 2012, 9AP2-4, June 9-12, 2012, Paris, France. Eur J Anaesthesiol 2012; 29 Supple 50: 135-6.

5. Adachi YU, Matsuda N. GABA(B) receptor antagonist, saclofen, reduced nitric oxide release in the rat striatum, whereas, abolished the sevoflurane-induced nitric oxide release, using in vivo microdialysis experiment. Annual meeting of American Society of Anesthesiologists 2011, A323,

October 15 - 19, 2011, Chicago, IL, USA.

6. Adachi YU, Matsuda N. JM-1232(-) synergistically potentiated the hypnotic activity of propofol without delayed recovery from anesthesia in ddY mice. Annual meeting of American Society of Anesthesiologists 2011, A1211, October 15 - 19, 2011, Chicago, IL, USA.

7. Adachi YU, Matsuda N. Dexmedetomidine and hydroxyzine synergistically potentiated the hypnotic activity of propofol in ddY mice. Annual meeting of American Society of Anesthesiologists 2011, A1588, October 15 - 19, 2011, Chicago, IL, USA.

8. Adachi YU, Takada K, Sato S, Matsuda N. Large dose haloperidol decreased the extracellular concentration of nitric oxide products and propofol did not modify the change in the rat brain striatum: in vivo microdialysis experiment. Euroanaesthesia 2011, 7AP4-7, June 11-14, 2011, Amsterdam, The Netherlands. Eur J Anaesthesiol 2011; 28 Supple 48: 104-5.

9. Adachi YU, Kimura-Kuroiwa K, Kobayashi A, Sato S, Matsuda N. The propofol-induced inhibition of nitric oxide release in rats brain was antagonized by perfusion of saclofen, GABAA receptor antagonist, using in vivo microdialysis experiment. Euroanaesthesia 2011, 7AP4-8, June 11-14, 2011, Amsterdam, The Netherlands. Eur J Anaesthesiol 2011; 28 Supple 48: 105.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 裕史 (ADACHI YUSHI)
名古屋大学 医学部附属病院・病院講師
研究者番号：80420356

(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

なし