

令和元年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20499

研究課題名(和文) 脳内ATPaseに対する全身麻酔薬の作用に関する研究

研究課題名(英文) Study of the effect of anesthetics on intracerebral ATPase

研究代表者

長谷 由理 (Hase, Yuri)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：20626121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：全身麻酔薬のラット脳内ATPaseに対する作用を測定する系の開発と、作用の検討を行った。

水系溶媒中でATPase反応に対する揮発性麻酔薬の作用を定量的に解析するため、VOCセンサーを使用して麻酔薬濃度を簡便に測定する系を確立し、臨床応用可能であることを示した。また、沸点の低い揮発性麻酔薬のATPase活性に対する作用を、低温槽にて測定した。Desflurane、sevoflurane、isofluraneは37℃と同様に4℃でもNa⁺、K⁺-ATPase活性を阻害し、isofluraneで最大であった。また、局所麻酔薬により可逆的に抑制されるCa²⁺及びMg²⁺-ATPase活性の存在が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身麻酔の作用機序が解明されていないなか、酵素活性に対する薬理的な作用を検討する本研究は、機能に対する作用を検討する点で有用である。全身麻酔薬および麻酔関連薬の脳内ATPaseに対する作用について新たな情報を提供することができた。また、簡便に水溶液中の吸入麻酔薬濃度を正確に決定する方法を確立したことにより、ATPase活性に対する吸入麻酔薬の作用をより定量的に解析できるようになった。今後臨床へ応用していく道筋ができた点でも有意義であったと考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the effect of general anesthetics on intracerebral ATPase in rat brain and to develop the quantitative evaluation system. To quantify the effect of volatile anesthetics to intracerebral ATPase in aqueous solutions, we established the convenient method for quantitation of the anesthetic concentration by using VOC sensing and showed that it may be useful for clinical application. Moreover, we established the method to examine the effect of volatile anesthetics, of which boiling point is low, on ATPase activity at 4℃ by using cryostat. Our results indicated that all of desflurane, sevoflurane, and isoflurane inhibited Na⁺,K⁺-ATPase activity at 4℃ as well as 37℃, and that above all, the effect of isoflurane was largest. Additionally, we showed Ca²⁺- and Mg²⁺-ATPases in rat brain, inhibited reversibly by local anesthetics.

研究分野：麻酔科学

キーワード：全身麻酔薬 ATPase 麻酔薬濃度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身麻酔薬はその臨床的重要性から膨大な量の研究が積み上げられてきているが未だにその作用機構については不明な点が多い。作用機構の確定は、全身麻酔薬の有効性、安全性、有害作用を評価する基準として、新規全身麻酔薬の開発の指標として不可欠である。そこで、報告の少ない脳内の ATPase を対象として全身麻酔薬の作用を研究することとした。

(2) ATPase 反応は水系溶媒中で解析する必要があるが、水溶性の低い麻酔薬の濃度を簡便に正確に決定することができず、得られた結果を定量的に評価することが困難であった。ガスクロマトグラフィー (GC) や ^{19}F -核磁気共鳴 (NMR) などの大型測定機器を用いると濃度決定が可能であるが、これらの装置は高額であり、また、高度な知識と技術を必要とするため、一般の研究室あるいは臨床家が簡単に採用することは困難である。そこで、VOC センサー (volatile organic compound sensing) を使用した、ATPase 活性測定における水溶液中の吸入麻酔薬の濃度決定法を模索した。

(3) 脳には Na,K-ATPase の他、数種類の Ca あるいは Mg で活性化される ATPase が存在し脳内の情報伝達に参与するものもあると考えられるが、それらに対する麻酔関連薬の作用に関してはほとんど報告が見られない。

2. 研究の目的

(1) ATPase 活性に対する吸入麻酔薬の作用を定量的に解析するため、VOC センサーを使用することにより、水系溶媒中の sevoflurane 濃度を決定する系を確立する。

(2) ラットの脳を材料として、脳内に存在する ATPase のうち Na,K-ATPase、Ca-ATPase 及び Mg-ATPase 活性に対する、バルビツール酸系薬物、局所麻酔薬、その他麻酔関連薬の作用を検討する。

(3) desflurane と他の吸入麻酔薬との ATPase 系に対する作用を比較検討して、薬理的な評価を行う。

3. 研究の方法

(1) VOC センサーによる水中および血中麻酔薬濃度の測定：水およびヒト血漿成分の構成要素を加えた試料を作成後、sevoflurane を加え一定時間攪拌した後、サンプルとして採取し、VOC 測定センサー (VOC-121H、OSP 社製) を用いて、容器内の sevoflurane の気化濃度を測定する。 ^{19}F -NMR 法によっても水溶液中セボフルラン濃度を測定し、VOC センサーにより測定した濃度との相関を求める。さらに、全身麻酔下のウサギに sevoflurane を段階的に投与し、その血液中の麻酔薬濃度を同様の手順で測定する。

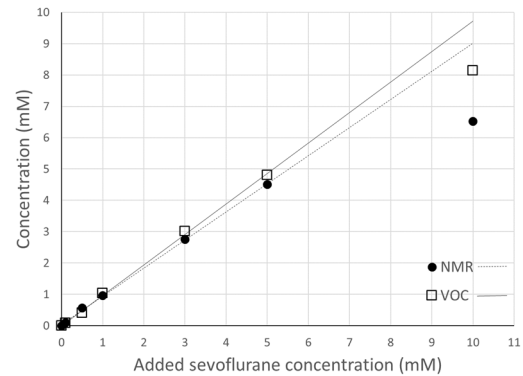
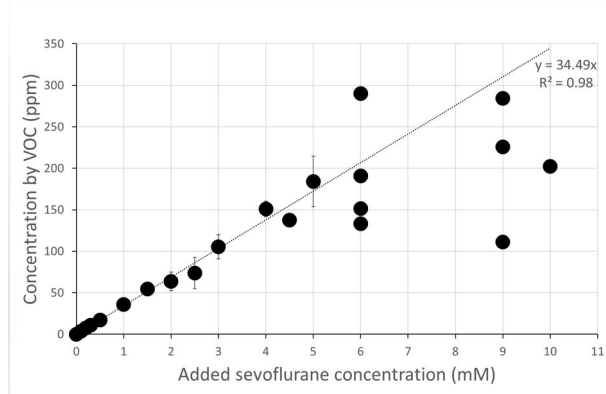
(2) ATPase 活性測定：ラット脳から膜分画を調整する。Na,K-ATPase 活性測定の際には、Postらの方法に従い Na,K-ATPase の精製を行う。Ca-ATPase 及び Mg-ATPase 活性測定の際には、Pottorf の方法に従って、形質膜 (P) 及びミクロソーム (P) 分画を調整し、活性測定材料とする。各種 ATPase と活性発現に必要なイオン及び緩衝液を含んだ反応液に 37 °C で ATP を添加して ATPase 反応を行う。反応により生じた無機リンを Chifflet 法により発色させ、分光光度計で測定することにより ATPase 活性を測定する。

(3) Na,K-ATPase 活性に対する desflurane、sevoflurane、isoflurane の作用の測定：揮発性麻酔薬の濃度を維持して測定するため、低温での活性測定法あるいは揮発を少なくする溶媒系を開発する。

4. 研究成果

(1) VOC センサーを使用した sevoflurane の簡便な濃度決定法の開発 :

VOC センサーは、揮発性有機物質 (VOC) 成分を干渉増幅反射原理により大気中で簡易・迅速に検出可能な測定器であり、GC や ^{19}F -NMR などと比較してはるかに安価であり、操作も容易である。VOC センサーを用いて水系溶媒のセボフルラン濃度を再現性よく測定し (下図、左)、 ^{19}F -NMR にて測定した濃度との相関 (下図、右) も確認した。さらに、ウサギの血中セボフルラン濃度の測定も可能であることを示し、その有用性を確認し論文として報告した。今後麻酔臨床への応用を目指している。



(2) バルビツール酸系薬物の脳内 Na,K-ATPase 活性に対する作用 :

過去の報告では、麻酔関連薬は、Na,K-ATPase 活性を濃度依存的に抑制するという結果がほとんどであるが、バルビツール酸系薬物の pentobarbital と phenobarbital は、Na,K-ATPase の分子構造を E1 型に変化させることによりその活性を促進すること、thiamylal にはその作用がないことを明らかにし、論文に報告した。

(3) Ca-ATPase 及び Mg-ATPase 活性に対する局所麻酔薬の作用 :

脳内 Ca-ATPase 及び Mg-ATPase 活性に対する 6 種の局所麻酔薬 (procaine、tetracaine、lidocaine、prilocaine、bupivacaine、dibucaine) の阻害作用と、阻害が可逆的か否かを検討した。6 種の局所麻酔薬は、pH 7.4 で最大活性を示す P₁ 及び P₂ の 4 種類の Ca- 及び Mg-ATPase 活性に対する明らかな阻害作用を示さなかった。しかし、pH 9.5 で最大活性を示す P₃ の Ca-ATPase 及び Mg-ATPase 活性を各局所麻酔薬の濃度に依存して抑制した。また、6 種類のうち麻酔作用あるいは副作用が強いとされる dibucaine や tetracaine は、他の 4 種類と比較して強い Ca-ATPase 及び Mg-ATPase 活性の抑制を示した。また、この抑制は可逆的であった。以上の結果は、ラット脳には、局所麻酔薬により可逆的に抑制される Ca- 及び Mg-ATPase 活性が存在し、脳内に局所麻酔薬が到達するとこれらの ATPase の機能は抑制されることを示唆する。現在これらの結果の論文公表に向けて準備中である。

(4) 揮発性麻酔薬の酵素活性に対する作用の測定法の開発 :

Desflurane の ATPase 系に対する作用の検討を計画したが、desflurane は標準沸点が 22.8 であり、他の揮発性麻酔薬と同様に室温あるいは体温に近い 37 °C で取り扱うことは困難であった。そこで、揮発を抑えて ATPase 活性に対する desflurane の作用を測定するために 4 °C で活性を測定することにした。低温槽を使用して酵素量を増加し、2 ないし 3 日間の反応を行って活性を測定する系を確立した。その結果、desflurane、sevoflurane、isoflurane はすべて 37 °C と同様に 4 °C でも Na、K-ATPase 活性を阻害することが確認できた。また、阻害作用は isoflurane で最も強いことがわかった。概ねプロトコルを確立したので、今後詳細に検討する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Hase Y、 Suzuki K、 Kamekura N、 Shibuya M、 Takahashi Y、 Namba K、 Fujisawa T、
Quantitation of sevoflurane in whole blood and aqueous solutions by volatile
organic compound sensing、 Journal of pharmacological and toxicological methods、
94、 71-76、 2018、 査読有、 DOI: org/10.1016/j.vascn.2018.05.005

M. Shibuya、 T. Hojo、 Y. Hase、 T. Fujisawa、 Conscious sedation with midazolam
intravenously for a patient with Parkinson's disease and unpredictable chorea-
like dyskinesia、 British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery、 56、 546-
548、 2018、 査読有、 DOI: org/10.1016/j.bjoms.2018.05.013

古賀瑞之、鈴木邦明、長谷由理、渋谷真希子、木村幸文、藤澤俊明、Na、K-ATPase 活性
の基質阻害に対するバルピツール酸系薬剤の作用、北海道歯学雑誌、査読有、38、2018、
81-88

Hase Y、 Kamekura N、 Nitta Y、 Fujisawa T、 Anesthetic management of a patient
with 15q tetrasomy for dental treatment、 Brazilian journal of anesthesiology、
68、 392-395、 2017、 査読有、 doi.org/10.1016/j.bjane.2016.09.002

鈴木邦明、渋谷真希子、長谷由理、平沖敏文、木村幸文、藤澤俊明、全身及び局所麻
酔薬の作用機序、北海道歯学雑誌、査読有、37、2017、116-123

岩本理恵、鈴木邦明、長谷由理、渋谷真希子、木村幸文、藤澤俊明：ラット脳の Ca- 及び
Mg-ATPase 活性の局所麻酔薬による可逆的な抑制、北海道歯学雑誌、査読有、in press、
2015

〔学会発表〕(計 4 件)

Hase Y、 Suzuki K、 Shibuya M、 Koga M、 Fujisawa T、 Inhibition of Na、 K-ATPase
activity by propofol、 lidocaine、 and procaine and the reversal of sedation、 14th
International Federation of Dental Anesthesiology Societies、 2015

Shibuya M、 Hiraoki T、 Suzuki K、 Hase Y、 Honma S、 Fujisawa T、 The effects of
general anesthetics on ESR spectra of spin labels in multilamellar and small
unilamellar vesicles、 14th International Federation of Dental Anesthesiology
Societies、 2015

岩本理恵、鈴木邦明、長谷由理、渋谷真希子、木村幸文、藤澤俊明、ラット脳の Ca 及び
Mg ATPase 活性に対する局所麻酔薬の作用、日本歯科麻酔学会、2015 年

長谷由理、亀倉更人、新田幸絵、藤澤俊明、15qtetrasomy 患者の歯科治療時における全身
麻酔経験、日本歯科麻酔学会、2015 年

〔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 :

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。