

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20105

研究課題名(和文) 神経筋伝達が変化する病態における筋弛緩薬・拮抗薬の投与方法と筋力評価法の検討

研究課題名(英文) Examination of optimal administration method of muscle relaxant and its antagonist and evaluation method of muscle relaxant state in neuromuscular diseases

研究代表者

高橋 和伸 (Takahashi, Kazunobu)

札幌医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：40530605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経筋伝達の特徴的な変化を示す病態(重症筋無力症、イートン・ランバート筋無力症、敗血症)モデルラットを用いて、各病態の重症度が筋肉の単収縮力と、従来用いられている筋弛緩状態の回復指標である四連反応比の関係性に与える影響を検討した。それぞれ、重症度が高くなると四連反応比の回復が単収縮力の回復を反映しない可能性が示唆された。その機序として、重症筋無力症においては、神経筋接合部の一次シナプス間隙が、重症度が高くなるほど大きくなることが一因と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経筋伝達に変化する病態において、筋弛緩状態の評価指標として、臨床現場で用いられている四連反応比による評価が適しているかは不明であり、特徴的な神経筋伝達変化を示す病態モデルを用いて、単収縮力と四連反応比の相関性の変化を検討し、その機序を解明し、最適な評価方法を明らかにすることで、周術期管理の安全性が格段に向上するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the severity of each pathological condition affected the relationship between train of four ratio and twitch tension in model rats (myasthenia gravis, Lambert-Eaton myasthenic syndrome, sepsis), which were pathological models showing characteristic changes in neuromuscular junction. Severity of pathological condition affected the relationship between train of four ratio and twitch tension. Severity of myasthenia gravis influences the relationship between train of four ratio and twitch tension, together with changes in the run-down of endplate potentials caused by widening of primary synaptic clefts at postsynaptic regions in rats.

研究分野：麻酔科学

キーワード：筋弛緩薬 敗血症 重症筋無力症 イートン・ランバート筋無力症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経筋遮断の程度は単収縮力 (T1: 筋肉を反復刺激した際に初めに得られる単収縮力) によって判断されるが、この方法は筋弛緩薬投与前のコントロール値が必要で、手術中の体位変換による値の変化やモニタリング部位の厳密な固定が必要なため、測定に時間と厳密さを要し、正常に評価できないことが多い。このため、臨床現場では TOF 比が評価指標として用いられている。TOF 比と T1 は良く相関し、正常患者においては有用だが、神経筋伝達に変化している病態での相関性は明らかでなく、筋弛緩状態について TOF 比を用いた正確な評価できるかは分かっていない。実際に TOF 比の十分な回復を認めても、筋力の回復が不十分なため周術期に呼吸不全が生じたとする報告は数多く、筋弛緩状態の評価が不十分な可能性が示唆され、神経筋伝達に変化する病態において、TOF 比に代わる筋弛緩状態の評価方法の解明が望まれる。また、2010 年から使用可能となったスガマデクスは非脱分極性筋弛緩薬の一つであるロクロニウムと複合体を形成し、その機能を失活させるという特徴的な薬理作用を持つ拮抗薬である。有害な生理活性を持たないとされ、深い筋弛緩状態からの拮抗も可能なため、これまで用いられてきた拮抗薬であるネオスチグミン (抗コリンエステラーゼ阻害薬) に取って代われようとしており、申請者は重症筋無力症患者 9 名において、手術後にスガマデクスを用いて筋弛緩薬からの拮抗を行い安全に周術期管理をなし得た臨床報告をしている。しかし、临床上十分な安全域を加えた推奨投与量のスガマデクスを投与されたにも関わらず、筋力低下により呼吸不全をきたした症例が報告されている。神経筋伝達に変化する病態において、スガマデクスが確実に筋弛緩薬を拮抗させ筋力を回復させることができるかは不明であり、このような病態においてスガマデクスやネオスチグミンの拮抗作用について検討された報告は、本研究チームによる重症筋無力症モデルや敗血症モデルのラットにおける報告のみである。他にも神経筋伝達に変化する病態は数多く、筋弛緩薬や筋弛緩拮抗薬の作用性が変化する機序の解明、および最適な筋弛緩拮抗薬と拮抗方法を明らかにすることは、臨床現場で致命的である術後の残存筋弛緩を防ぐ観点から多大な意味を持ち、周術期管理の安全性が格段に向上するものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究計画は、重症筋無力症、イートン・ランバート筋無力症、敗血症など神経筋伝達の特徴的な変化を示す病態で、筋弛緩状態の評価指標に及ぼす影響、筋弛緩薬および筋弛緩拮抗薬の作用性に及ぼす影響、及びそれらのメカニズムを解明し、これらの病態における最適な筋弛緩状態の評価方法および筋弛緩薬の投与方法と拮抗方法を明らかにすることで、数十年以上の間、筋弛緩に関して画一的な管理方法となっている臨床現場へ提言するために計画されたものである。具体的な研究項目は、神経筋伝達に変化する各種病態において、①筋肉の単収縮力と、従来用いられている筋弛緩状態の回復指標である四連反応比 (train of four ratio : TOF 比) の関係性、および臨床現場で簡便に用いることができる筋弛緩状態の新たな評価方法の解明、②筋弛緩薬および筋弛緩拮抗薬の作用性変化の原因となる神経筋接合部における機序と最適な筋弛緩拮抗方法の解明の 2 つである。

特徴的な神経筋伝達変化を示す病態モデルを用いて、T1 と TOF 比の相関性の変化を検討し、その機序を解明することで、T1 の変化をより反映する新たな筋弛緩状態の評価方法を明らかにする。また、筋弛緩薬と筋弛緩拮抗薬の作用性とその変化の機序を解明し、適切かつ安全な筋弛緩拮抗方法を確立する。具体的には、重症度の異なる重症筋無力症、イートン・ランバート筋無力症、敗血症モデルのラットを作製し、横隔膜の収縮力を測定する方法で、各病態における TOF 比の信頼性を評価する。同時に非脱分極性筋弛緩薬および拮抗薬の作用性変化と、重症度の関係性を同定する。また、各病態の重症度の違いが、TOF 比と T1 の関係性に与える影響や、筋弛緩薬と筋弛緩拮抗薬の作用性に及ぼす影響の機序を電気生理学的側面と病理学的側面から解明する。具体的には、細胞内微小電極法を用いて終板電位の変化、及び神経終末からのアセチルコリン放出量を測定し、横隔膜の神経筋接合部を電子顕微鏡で観察することにより、終板膜、及びアセチルコリン含有小胞の変化を形態学的に同定する。これら機序の解明から、各病態の重症度が神経筋接合部に及ぼす変化を病理組織学的に解明することができ、臨床現場での安全な筋弛緩薬の使用法、拮抗方法、および筋弛緩状態の評価方法について提言することが可能となることで、神経筋伝達に変化する病態における周術期管理の安全性が飛躍的に向上すると考えられた。

3. 研究の方法

①病態モデルの作製

Lewis 系ラット (6~8 週) を用いて、

1. 非脱分極性筋弛緩薬の作用性が増強し、神経筋接合部のシナプス後領域で変化をきたす代表的な病態モデルとして、抗アセチルコリン受容体抗体を尾静脈より投与し、重症筋無力症モデルを作製する。
2. 非脱分極性筋弛緩薬の作用性が増強し、シナプス前領域で変化をきたす代表的な病態モデルとして、神経筋接合部のシナプス前領域に存在する電位依存性 Ca チャネルに対する自己抗体を投与し、イートン・ランバート筋無力症モデルを作製する。
3. 非脱分極性筋弛緩薬の作用性が減弱する病態モデルとして、神経筋接合部の吸入麻醉下に開

- 腹し盲腸を結紮し、3カ所の穿孔を加え (CLP法: cecal ligation and perforation technique)、穿孔性腹膜炎から敗血症を発生させることで、敗血症モデルを作製する。
4. 各病態モデルで自己抗体の投与量・投与後からの経過時間を調整し、筋力が有意に異なる sham 群、中等度症状群、重度症状群の3群を作製する。
 5. 各病態モデル、各群において、横隔神経付き横隔膜標本を作製する。

②収縮生理学的研究 (TOF比の信頼性と筋弛緩薬、筋弛緩拮抗薬の作用性変化を評価する。)

クレブス液を満たしたチャンバー内において、最大上刺激で横隔神経を刺激し、得られた筋収縮力をコンピュータ解析することにより、T1とTOF比の関係性、収縮力の基準値、およびそれに影響を及ぼす各種薬剤の効果を測定する。これにより、重症度の違いが、TOF比の信頼性と筋弛緩薬ロクロニウム、筋弛緩拮抗薬スガマデクス、ネオスチグミンの作用性変化に与える影響を収縮生理学的に評価することが可能となる。

③電気生理学的研究 (各病態の重症度の違いが、TOF比とT1の関係性に与える影響や、筋弛緩薬と筋弛緩拮抗薬の作用に及ぼす影響の機序を解明する。)

各病態モデルで sham 群、中等度症状群、重度症状群のラットから横隔神経付きの横隔膜を摘出し、クレブス液を満たしたチャンバー内で、細胞内微小電極法を用いて単刺激に対する神経終末からのアセチルコリン放出量を間接法によって求める。具体的には自発的な終板電位の放出が認められる領域に微小電極を留置し、カットファイバー法により神経刺激に対する横隔膜収縮が消失した時点で横隔神経を刺激し、得られた終板電位をコンピュータ解析し、2分毎の4回連続刺激、および10分毎の50回連続刺激による終板電位の平均値、分散値からアセチルコリン放出量を求める。また、同様に微小電極を終板に留置し、活動電位が発生するまで段階的に細胞内に電流を流し活動電位発生閾値を求める。具体的には、アンプ (AxoClamp-2B) から膜電位が1mVずつ脱分極するように電流を与え、活動電位が発生する直前の値と静止膜電位との差から閾値を求める。これらを筋弛緩薬ロクロニウムによる筋弛緩を得た後、およびスガマデクス、ネオスチグミンを加算投与し値を測定していく。

④病理組織学的研究 (神経筋接合部の観察により、終板膜の変化およびアセチルコリン含有小胞の変化を形態学的に評価する)

各病態モデルで sham 群、中等度症状群、重度症状群のラットから横隔神経付きの横隔膜を摘出し、実体顕微鏡を用いて、筋終板が集中している神経筋接合部を含んだ1mm四方の標本を作製する。2.5%グルタルアルデヒドで組織固定した後、0.1Mリン酸バッファー液で3回洗浄し、コリンエステラーゼ染色を行う。その後、50nm以下にトリミングした薄切片を電子顕微鏡で観察し、神経終末に存在するアセチルコリン含有小胞の大きさ・密度、神経終末と終板の間隙距離、シナプス後膜の面積・長さを測定する。この結果から、各病態の重症度が神経筋接合部に及ぼす変化を病理組織学的に測定することができ、神経筋伝達能に及ぼす影響の機序を病理組織学的に解明することが可能となる。

⑤最適な筋弛緩薬、筋弛緩拮抗薬の投与方法と、TOF比よりT1の変化を反映する筋弛緩状態の評価方法を解明する。

上記研究により、神経筋接合部におけるシナプス前機能、後機能の変化や、アセチルコリンへの感受性から、筋弛緩薬の使用法、最適な筋弛緩拮抗薬の選択と投与方法、TOF比よりT1の変化を反映する筋弛緩状態の評価方法を検討し、収縮生理学的実験により証明する。

4. 研究成果

重症筋無力症モデル (myasthenia gravis:MG) ラットについて

①重症度評価

重症MG群では中等度MG群、およびsham群と比較して、有意に高い臨床症状尺度を示した。

②TOFRとT1の関係性について

IC50投与下で、T1の減弱率は3群間で差は見られなかったが、TOFRは重症MG群でsham群および中等度MG群より有意に高かった。MGが重症になるほどTOFRはT1の回復を反映しない可能性があることが示唆された。この結果は、MGの重症度がTOFRとT1の関係性に及ぼす影響についての初めての知見である。

③TOFRとT1の関係性変化の機序について

ROC非投与下でMEPPを測定した。重症MG群においてMEPPの振幅は他の2群より有意に低く、頻度は3群間で有意な差は見られなかった。MEPPの振幅はT1に強く影響する postsynaptic functionを反映し、MEPPの頻度はTOFRに強く影響する presynaptic functionを反映する。この結果はMGの重症度が高くなる程、ROC非投与下では presynaptic functionより postsynaptic functionが強く障害されることを表している。重症MG患者ではROC非投与下におけるTOFRの減弱は、より大きなT1の減弱が存在する可能性が示唆された。

ROC非投与下およびIC50でEPPを測定した。IC50でのEPPの振幅はROC非投与下のEPPの振幅に比べ、全ての群で有意に減弱した。sham群と中等度MG群において、IC50でのEPPのrundownとACh放出素量 (QC: quantal content) は、ROC非投与下のそれらと比べ有意に低かったが、

重症 MG 群では有意な差を認めなかった。このことは、IC50 における ROC が EPP の振幅を減弱させる作用性は 3 群で同程度に認めるが、ROC が rundown を強調させる、または QC を減少させる作用性に関しては重症 MG 群で他の 2 群に比べ有意に小さいことを示す。EPP の振幅の減弱は ROC による postsynaptic function の低下作用を示し、EPP の rundown の強調および QC の減少は presynaptic function の低下作用を反映するため、これらの結果は、重症 MG において ROC が presynaptic function より postsynaptic function に強く作用することを示している。これが、ROC 投与下において、重症 MG 群で TOFR の回復が T1 の回復を反映しない現象の一因であると考えられた。

NMJ を電子顕微鏡で形態学的に評価した。中等度 MG 群、および重症 MG 群の NMJ で、シナプス膜の破壊によるシナプス後膜の平板化が観察された。1 次シナプス間隙は重症 MG 群において、sham 群および中等度 MG 群より有意に拡大していた。

シナプスの間隙の拡大は postsynaptic function の低下に強く影響するため、シナプスの間隙の拡大が重症 MG 群で ROC 非投与下において presynaptic function より postsynaptic function が強く障害される現象、および ROC が presynaptic function より postsynaptic function に強く作用する現象の一因であると考えられた。

イートン・ランバート筋無力症モデルラットについて

①重症度評価

重症イートン・ランバート筋無力症群では中等度イートン・ランバート筋無力症群、および sham 群と比較して、有意に高い臨床症状尺度を示した。

②TOFR と T1 の関係性について

IC50 投与下で、T1 の減弱率は 3 群間で差は見られなかったが、TOFR は重症イートン・ランバート筋無力症群で sham 群および中等度イートン・ランバート筋無力症群より有意に高かった。イートン・ランバート筋無力症が重症になるほど TOFR は T1 の回復を反映しない可能性があることが示唆された。この結果は、イートン・ランバート筋無力症の重症度が TOFR と T1 の関係性に及ぼす影響についての初めての知見である。

③TOFR と T1 の関係性変化の機序について

イートン・ランバート筋無力症群における電気生理学的実験において、微小ガラス電極による電位測定に難渋している。電極の形状、穿刺方法の改善を試みている。

敗血症モデルラットについて

①重症度評価

重症敗血症群では中等度敗血症群、および sham 群と比較して、有意に高い臨床症状尺度を示した。

②TOFR と T1 の関係性について

IC50 投与下で、T1 の減弱率は 3 群間で差は見られなかったが、TOFR は重症イートン・ランバート筋無力症群で sham 群と比べ、有意に高かった。重症敗血症では、TOFR は T1 の回復を反映しない可能性があることが示唆された。この結果は、敗血症が TOFR と T1 の関係性に及ぼす影響についての初めての知見である。

③TOFR と T1 の関係性変化の機序について

敗血症群における電気生理学的実験において、微小ガラス電極による電位測定に難渋している。電極の形状、穿刺方法の改善を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Kazunobu, Niiya Tomohisa, Takada Yukimasa, Narimatsu Eichi, Yamakage Michiaki	4. 巻 124
2. 論文標題 Severity of Myasthenia Gravis Influences the Relationship between Train-of-four Ratio and Twitch Tension and Run-down of Rat Endplate Potentials	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 369 ~ 377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ALN.0000000000000949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazunobu Takahashi, Tomohisa Niiya, Yukimasa Takada, Eichi Narimatsu, Michiaki Yamakage	4. 巻 85
2. 論文標題 Severity of Myasthenia Gravis Influences the Relationship Between Train-of-four Ratio and Twitch Tension and Run-down of Rat Endplate Potentials	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 札幌医学雑誌	6. 最初と最後の頁 64-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Kazunobu, Sawada Atsushi, Iwasaki Soshi, Yama Naoya, Takashima Hiroyuki, Onodera Maki, Hatakenaka Masamitsu, Yamakage Michiaki	4. 巻 31
2. 論文標題 Three cases of implantation of a SureScan? system and MRI for investigating causes of pain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 915 ~ 917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-017-2413-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋和伸
2. 発表標題 手術中の筋弛緩モニタリングと重症筋無力症
3. 学会等名 第19回北海道機能神経外科研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋和伸
2. 発表標題 重症筋無力症の重症度がTOF比と単収縮力の相関関係に及ぼす影響
3. 学会等名 北海道麻酔研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋和伸, 山蔭道明	4. 発行年 2016年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 304
3. 書名 1-6 機器管理のポイント・麻酔科医のための周術期危機管理と合併症への対応・森田潔 監修. p269-80	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	成松 英智 (narimatsu eichi)	札幌医科大学・救急治療医学講座・教授 (20101)	
研究協力者	山蔭 道明 (yamakage michiaki)	札幌医科大学・麻酔科学講座・教授 (20101)	