

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006 年度～2008 年度

課題番号：18591693

研究課題名（和文） in vivo パッチクランプ法による吸入麻酔薬の脊髄における
不動化作用機序の解析研究課題名（英文） The analysis of the mechanism for immobilization effect of
inhaled anesthetics using in vivo patch clamp recording

研究代表者

馬場 洋 (BABA HIROSHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00262436

研究成果の概要：揮発性吸入麻酔薬の不動化作用が脊髄後角から大脳までの感覚系の抑制のためか、運動系の抑制によるものかを明らかにするために痛覚情報を脳に中継する脊髄後角細胞と大脳皮質一次感覚野細胞の電気的活動性に対する揮発性吸入麻酔薬の影響を検討した。ラットの後肢に与えた痛み刺激による脊髄細胞や大脳感覚野細胞の興奮は揮発性吸入麻酔薬では抑制されず、揮発性吸入麻酔薬の不動化作用は感覚系の抑制のためではないことがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔学

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔は意識の消失・健忘、鎮痛、不動化、自律神経反応の抑制の 4 要素から構成されている。これらのうち意識の消失に関する作用部位が脳であることは間違いないが、不動化作用の作用部位は脳ではなく脊髄であることが明らかになりつつある。例えば、除脳した動物でも MAC が変化しないことや、ヒツジを用いた脳分離灌流実験において脳だけに麻酔をかけた場合はイソフルランの MAC が全身に麻酔をした場合と比べると 2 倍以上も大きくなるという Antognini らの報告等がある。これらの事実は全身麻酔の不動化作用は脊髄機能の抑制

であることを示している。しかしながら、脊髄の後角機能（感覚系）が抑制されるのか、前角機能（運動系）が抑制されるのか（つまり、痛くないから動かないのか、痛くても動けない状態なのか）は明らかになっていない。一方、吸入麻酔薬のみでの全身麻酔では外科的侵襲に対する各種ストレスホルモンやサイトカインの上昇を抑制することはできず、揮発性吸入麻酔薬の鎮痛作用自体を疑問視する意見もある。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、本研究ではラット脊髄後角細胞から in vivo パッチクランプ記

録を行い、実際臨床の現場で最も用いられている揮発性吸入麻酔薬であるセボフルランの不動化作用における作用点が脊髄後角であるかどうかを検討する。もし脊髄後角が揮発性吸入麻酔薬の主たる作用点でないならば、どこが作用点であるのかを検討する。特に、脊髄後角における鎮痛作用が吸入麻酔薬の不動化作用の機序となり得るかどうかを明らかにすることが本研究の最大の目的である。

3. 研究の方法

吸入麻酔薬が感覚系（大脳皮質感覚野細胞、後角細胞）に対して有効な抑制作用（鎮痛作用）を持っているかどうかを明らかにするために、ラット脊髄後角細胞及び大脳皮質一次感覚野細胞から *in vivo* パッチクランプ記録を行い、細胞の電気的活動を膜電位固定または膜電流固定下に測定した。

(1) 脊髄後角細胞からの *in vivo* ホールセルパッチクランプ記録

週齢 8 週以上の Wistar 系成熟ラットをウレタンで麻酔した後、気管挿管を施行し、ハーバード動物用ベンチレーターを用いて人工呼吸を行った。大腿静脈から薬剤投与用の静脈カテーテルを、大腿動脈から血圧測定用のカテーテルを挿入した。動物の呼吸状態は下肢大腿部または下腿部に装着したパルスオキシメーターと気管挿管カニューレからサンプリングしたカプノグラムを用いてモニターした。脊髄表面への薬剤投与は腰部脊柱の椎弓切除を施行し脊髄を露出した後、吸入麻酔薬を含んだ Krebs 液で脊髄表面を灌流することによって行った。吸入麻酔薬の吸入投与は通常動物用麻酔器を用いて人工呼吸用のカニューレを通して行った。もし、疼痛刺激によって体動が生じ、パッチクランプ記録に支障があるようならば適宜筋弛緩薬（パンクロニウム）を投与する。記録電極はプレー(P-97、Sutter Instruments)を用いて作成し、信号の増幅は Axopatch200-B (Axon Instruments)を用いて行った。データは全てコンピューターで記録保存し、データの解析は P-CLAMP 9.0 (Axon Instruments)を用いて行った。その他、電極刺入やパッチクランプ記録の詳細に関しては Yoshimura らの方法に従って行った。

(2) 大脳皮質一次感覚野細胞からの *in vivo* ホールセルパッチクランプ記録

ラットを脳固定装置にセットし、さらに後頭蓋部もクランプ器具を用いて、頭蓋骨を確実に固定する。体性感覚野の部分に相当する頭蓋骨をリユーターを用いて切除した後、硬膜を切開し、大脳皮質を露出した。その後、まず機械式の粗動マニピュレーターを用いて電極を表面から約 750 μm まで進め、その次に水圧式微動マニピュレーター

で電極を表面から約 800 μm (大脳皮質第 3-5 層：視床からの直接入力を受ける層) 付近で後肢に受容野を持つ細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。

(3) 痛覚刺激に対する反応の記録

ホールセルパッチの状態が完成した後、膜電位は -70mV に固定し、自発性および後肢刺激で誘発される興奮性シナプス後電流 (EPSC: excitatory postsynaptic current)、抑制性シナプス後電流 (IPSC: inhibitory postsynaptic current) さらに膜電流固定下に細胞の活動電位発生頻度を測定した。後肢に機械的侵害刺激（痛み刺激）を与え、記録細胞における反応を記録した後にイソフルランを吸入投与または脊髄後角表面に灌流投与し、侵害的刺激に対する影響を観察した。定量的評価は後肢刺激で誘発される EPSC、IPSC の発生頻度、振幅の大きさ及び刺激中の総電流量によって行った。また、細胞の総合的な興奮性は膜電流固定下で発生する活動電位の発生頻度によって評価した。

4. 研究成果

本研究ではまず *in vivo* パッチクランプ法を用いて腰部脊髄後角第 2 層（膠様質）細胞からパッチクランプ記録を行い、ラットの後肢に与えた痛み刺激で膠様質細胞に誘発される興奮性反応に対する揮発性吸入麻酔薬の作用を観察した。興奮性シナプス伝達の記録は膜電位 -70mV に固定して行った。膜電位 -70mV では後肢に刺激を与えなくても発生する自発性興奮性シナプス後電位 (EPSC) が記録された。後肢に痛み刺激（pinch 刺激）を与えると痛み刺激を与えている間は膠様質細胞に連続した大きな興奮性シナプス後電流 (EPSC) が記録された。これは刺激している間は減弱することはなかった。ラットの 1MAC 相当の濃度のイソフルラン(1.5%)の吸入投与を開始して 10 分後に同様の刺激を与えると、投与前と同様の連続した EPSC が記録され、その発生頻度、平均振幅や刺激中の総電流量に有意な変化はなかった。

次に 1.5%イソフルランを含んだ Krebs 液で脊髄表面を灌流投与することによって同様の実験を行った。灌流投与を開始して 10 分後に同様の刺激を与えると、やはり投与前と同様の連続した EPSC が記録され、その発生頻度、平均振幅や刺激中の総電流量に有意な変化はなかった。このことから、少なくとも臨床で用いられている 1MAC 程度の濃度のイソフルランは痛みを伝える一次求心性線維から脊髄後角細胞への興奮性シナプス伝達にほとんど影響しないと考えられた。

次に、同様の方法で膠様質細胞から *in vivo*

パッチクランプ記録を行い、後肢の痛み刺激で誘発される GABA や glycine を介する抑制性伝達に対する 1 MAC イソフルランの影響を観察した。膠様質細胞からパッチクランプ記録を行い、膜電位を 0mV に固定し、抑制性シナプス後電位のみが記録されるようにした状態でラットの 1 MAC 相当の濃度のイソフルラン(1.5%)の吸入投与及び 1.5% イソフルランを含んだ Krebs 液の脊髄表面への灌流投与を行った。

膜電位 0mV では後肢に刺激を与えなくても発生する自発性抑制性シナプス後電位 (IPSC) が記録された。この IPSC には GABA 作動性 IPSC と glycine 作動性 IPSC の両方が混在していた。後肢皮膚の痛み刺激により、膠様質細胞に自発性 IPSC より振幅の大きい連続する IPSC が誘発された。この誘発性 IPSC は刺激をしている間は減弱することはなかった。イソフルラン(1.5%)の吸入投与を開始して 10 分後に同様の痛み刺激を与えるとやはり投与前と同様の連続した IPSC が記録され、その発生頻度には有意な変化はなかった。しかし、個々の IPSC の持続時間が延長し、刺激中の IPSC の総電流量は増加した。1.5%イソフルランを含んだ Krebs 液の脊髄表面への灌流投与によっても同様の結果が得られた。これらの結果から、イソフルランは痛み刺激による興奮性伝達には影響しないが、抑制性伝達には若干の増強効果があることがわかった。

最後に脊髄後角膠様質細胞と大脳皮質一次感覚野細胞から膜電流固定下の in vivo パッチクランプ記録を行い、後肢の痛み刺激で誘発される活動電位の発生頻度に対する 1 MAC イソフルランの影響を観察した。膜電流固定下に活動電位発生頻度に対する作用を調べることにより、細胞の電気的活動性に対する総合的な作用を調べることができると考えた。また、脊髄膠様質細胞だけでなく、脊髄からの情報を受け取る大脳皮質一次感覚野細胞の膜電位を連続記録し、ラットの 1 MAC 相当の濃度のイソフルラン(1.5%)の吸入投与及び 1.5%イソフルランを含んだ Krebs 液の脊髄表面への灌流投与を行った。膜電流固定下では脊髄後角膠様質細胞と大脳皮質一次感覚野細胞の静止膜電位は約 -65mV 付近であり、脊髄後角と大脳の両方の細胞で後肢に刺激を与えなくても発生する自発性興奮性シナプス後電位 (EPSC) が記録された。後肢皮膚の痛み刺激 (pinch 刺激) により、両方の細胞に自発性 EPSP より振幅の大きい連続する EPSC が誘発され、連続する活動電位が発生した。この活動電位は痛み刺激をしている間は減弱することはなかった。イソフルラン(1.5%)の吸入投与を開始して 10 分後に同様の痛み刺激を与えるとやはり投与前と同様の連続

した活動電位が記録され、その発生頻度には有意な変化はなかった。1.5%イソフルランを含んだ Krebs 液の脊髄表面への灌流投与によっても同様の結果が得られた。

以上、2006 年度～2008 年度の結果から、イソフルランは痛み刺激による抑制性伝達には若干の増強効果があるが、その作用は非常に小さいものであり、脊髄後角膠様質細胞と大脳皮質一次感覚野細胞の痛み刺激による興奮性にはほとんど影響しないことがわかった。従って、イソフルランは少なくとも臨床濃度では脊髄後角から脳への痛覚伝達を抑制することができず、イソフルランの不働化作用は脊髄の後角以外の部位に対する作用であることがわかった。残念ながら本研究では不働化作用の作用点を厳密には決定することはできなかったが、作用点が脊髄の後角以外の部位であるとするれば、皮質脊髄路 (錐体路) と脊髄前角細胞の間の興奮性シナプス伝達が作用点として最も可能性が高いと思われる。

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 14 件)

- ①若井綾子、岡本学、馬場洋、術後神経障害をきたした 10 症例の検討、ペインクリニック、査読有、29、2008、1653-9
- ②Petrenko AB、Kohno T、Wu J、Sakimura K、Baba H、Spontaneous hyperactivity in mutant mice lacking the NMDA receptor GluRepsilon1 subunit is aggravated during exposure to 0.1 MAC sevoflurane and is preserved after emergence from sevoflurane anaesthesia、Eur J Anaesth、査読有、25、2008、953-60
- ③Ishii H、Kohno T、Yamakura T、Ikoma M、Baba H、Action of dexmedetomidine on the substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord、Eur J Neurosci、査読有、27、2008、3182-90
- ④Wu J、Kohno T、Georgiev SK、Ikoma M、Ishii H、Petrenko AB、Baba H、Taurine activates glycine and gamma-aminobutyric acid receptors in rat substantia gelatinosa neurons、Neuroreport、査読有、19、2008、333-7
- ⑤Georgiev S、Kohno T、Ikoma M、Yamakura T、Baba H、Nitrous oxide inhibits glutamatergic transmission in spinal dorsal horn neurons、Pain、査読有、134、2008、24-31
- ⑥石井秀明、河野達郎、馬場洋、脊髄後角におけるデクスメトミジンの作用、脊髄機能診断学、査読無、1、2008、34-9
- ⑦Georgiev S、河野達郎、生駒美穂、馬場洋、亜酸化窒素の脊髄第 II 層における作用、

- 脊髄機能診断学、査読無、1、2008、27-33
- ⑧ Petrenko AB, Tsujita M, Kohno T, Sakimura K, Baba H, Mutation of alpha1G T-type calcium channels in mice does not change anesthetic requirements for loss of the righting reflex and minimum alveolar concentration but delays the onset of anesthetic induction, *Anesthesiology*, 査読有、106、2007、1177-85
 - ⑨ Ikoma M, Kohno T, Baba H, Differential presynaptic effects of opioid agonists on Delta- and C-afferent glutamatergic transmission to the spinal dorsal horn, *Anesthesiology*, 査読有、107、2007、807-12
 - ⑩ 平石舞、大黒倫也、飛田俊幸、馬場洋、赤血球輸血用カリウム吸着フィルター使用中に高度の低血圧をきたした5例、*日本臨床麻酔学会誌*、査読有、27、2007、684-8
 - ⑪ 佐藤剛、岡本学、本間隆幸、馬場洋、周術期抗凝固療法・抗血小板治療中の硬膜外麻酔に関する意識調査アンケート、*日本臨床麻酔学会誌*、査読有、27、2007、332-8
 - ⑫ 生駒美穂、河野達郎、馬場洋、一次求心性線維を介した脊髄におけるオピオイド受容体の作用の違いについて、*脊髄機能診断学*、査読無、1、2007、32-40
 - ⑬ Ogawa M, Takamatsu M, Okamoto M, Baba H, Seo K, Fujiwara N, Iteration of high-frequency stimulation enhances long-lasting excitatory responses in the spinal dorsal horn of rats: Characterization by optical imaging of signal propagation, *Neurosci Res*, 査読有、57、2006、467-72
 - ⑭ Petrenko AB, Yamakura T, Askalany AR, Kohno T, Sakimura K, Baba H, Effects of ketamine on acute somatic nociception in wild-type and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor epsilon1 subunit knockout mice, *Neuropharmacology*, 査読有、50、2006、741-7

[学会発表] (計 10 件)

- ① 馬場洋、臨床医のための痛みの電気生理学的基礎研究、第 43 回青森県臨床麻酔研究会、2008.10.18、弘前市
- ② 馬場洋、痛みの電気生理学的基礎研究、第 6 回整形外科痛みを語るプログラム、2008.7.5、新潟市
- ③ 古谷健太、脊髄での興奮性伝達に対する塩酸ピバカインの作用、日本麻酔科学会第 55 回学術集会、2008.6.14、横浜市
- ④ 馬場洋、麻酔科医が求める麻酔メカニズム研究のあり方について、日本麻酔科学会第 54 回学術集会、2007.5.31、札幌市
- ⑤ 生駒美穂、脊髄後角における一次救心性線維を介した痛覚伝達に対するオピオイドの作用の比較、第 28 回日本疼痛学会、2006.7.15、神戸市

- ⑥ 若井綾子、脊髄電気刺激装置のトラブルを生じた 2 症例、日本麻酔科学会第 53 回学術集会、2006.6.2、神戸市
- ⑦ 生駒美穂、ラット脊髄膠様質における σ (シグマ) 受容体アゴニストの作用について、日本麻酔科学会第 53 回学術集会、2006.6.2、神戸市
- ⑧ 石井秀明、脊髄後角におけるデクスメトミジンの作用、日本麻酔科学会第 53 回学術集会、2006.6.2、神戸市
- ⑨ 安宅豊史、マウス脊髄後角におけるシナプス性および非シナプス性抑制性伝達に対するサブスタンス P の作用、日本麻酔科学会第 53 回学術集会、2006.6.2、神戸市
- ⑩ 高松美砂子、神経因性疼痛モデルラットではケタミンによる脊髄後角痛覚伝達抑制作用が増強する、日本麻酔科学会第 53 回学術集会、2006.6.1、神戸市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬場 洋(BABA HIROSHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00262436

(2)研究分担者

若井 綾子(WAKAI AYAKO)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：70419331

(3)連携研究者

なし