

平成 21 年 3 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591778

研究課題名 (和文) オレキシン系を介した静脈麻酔作用の解明

研究課題名 (英文) Intravenous anesthetics effects through orexins.

研究代表者

山本 純偉 (YAMAMOTO SUMII)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：50402376

研究成果の概要：

オレキシンは神経ペプチドで正常な睡眠サイクルの形成、特に覚醒の維持に重要であると考えられている。オレキシンが麻酔作用にどのように関わっているかをオレキシン神経が特異的に脱落するマウスに静脈麻酔薬のミダゾラムとクロニジンを投与し、入眠・覚醒に与える影響を調べた。ミダゾラムとクロニジンともオレキシン神経欠損マウスでは入眠までの時間と覚醒までの時間が優位に延長し、両薬剤の麻酔作用にオレキシンが関与していることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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：オレキシン、麻酔、ミダゾラム、クロニジン、覚醒

## 1. 研究開始当初の背景

オレキシンは 1998 年にオーファン G タンパク質共役型受容体に対する内因性リガンドとして同定された神経ペプチドで、オレキシンを産生するオレキシンニューロンは、古くから摂食中枢や飲水中枢として知られている視床下部外側野とその周辺にのみ少数が散在している。

OX1 受容体はラットの脳において海馬、扁桃核、大脳皮質、視床、視床下部、脳幹など広く分布し、OX2 受容体は視床下部、大脳皮質、脳幹などで発現している。

OX1R は青斑核に最も強い発現がみられ、OX2R は視床下部後部に位置する結節乳頭核でもっとも強い発現がみられる。青斑核はノルアドレナリン神経、結節乳頭核はヒスタミンの起始核であり、オレキシン神経は脳幹と視床下部のモノアミン神経系に投射し、活性を制御していると考えられている。

また、これまでの研究からオレキシンはナルコレプシーと深く関わっていることが明らかになっている。オレキシンニューロンのみを特異的に脱落させた orexin/ataxin-3 マウスおよびオレキシン 2 受容体欠損マウスは

ナルコレプシー様の症状を呈する。さらに、ナルコレプシー患者の脳では、オレキシンニューロンが特異的に脱落している。これらのことから、オレキシンが正常な睡眠覚醒サイクルの形成、特に覚醒の維持に重要な役割を果たすと考えられている。実際オレキシンニューロンの軸索は睡眠覚醒の制御に重要な役割をもつとされるモノアミン神経起始核やコリン作動性神経起始核などに強く投射し、それらを活性化することが分かっている。

睡眠や覚醒に関係が深いことから、オレキシンが麻酔の鎮静や覚醒にも関与していることが予想される。オレキシン神経と麻酔との関係については、これまでにイソフルランイソフルラン麻酔下のラットの脳室内にオレキシン A を投与したところ、脳波が burst suppression から覚醒脳波に変化した (Yasuda et al., 2003)。オレキシン A と B のラットの脳室内投与がペントバルビタール、チオペンタール、フェノバルビタールの麻酔時間を短縮した (Kushikata T et al., 2003)。Ataxin マウスでイソフルラン及びセボフルラン麻酔からの覚醒時間が優位に延長した (Kelz M et al., 2007) など、いくつか報告がされているが、未だ麻酔とオレキシンの関係はよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

そこで今回われわれは、オレキシンが麻酔に与える影響を明らかにするために、生後 4 - 6 週でオレキシン神経のみが特異的に脱落する orexin/ataxin-3 マウス (つまりオレキシンが欠損している) と、オレキシン 1 受容体ノックアウトマウスを用いて麻酔薬の鎮静・覚醒に与える影響を脳波・筋電図及び赤外線モニターを用いて調べた。使用した麻酔薬は実際に臨床で人の麻酔や鎮静に用いられている静脈麻酔薬で、主に GABA<sub>A</sub> 受容体に作用するベンゾジアゼピン系静脈麻酔薬のミダゾラムと  $\alpha 2$  受容体作動薬であるクロニジンを使用した。

## 3. 研究の方法

マウスは 12 時間の明暗サイクルで飼育をおこない、すべての実験は light phase におこなった。

### (1) 電極の装着

体重が 25 g 以上のオスの成体マウスを使用した。静脈麻酔薬投与の実験に先立ち脳波、筋電図記録用の電極の装着を行った。

ペントバルビタール腹腔投与で麻酔をし、さらに局所麻酔をしたのち、頭皮を切開し頭蓋骨に穴を開け、脳波記録用の電極と筋電図記録用の電極を付け固定した。

静脈麻酔薬投与実験は手術からの回復を待つために電極装着手術から 1 週間以上経過し、電極装着前に比べ、体重の減少がみられ

ないマウスのみを使用した。

### (2) 薬剤の投与および記録

静脈麻酔薬の腹腔内投与に先立ち、ジメチルエーテル麻酔下に記録用電極を接続し、記録用ゲージに移した。

ジメチルエーテル麻酔からの回復のため 1 時間まち、その後、ミダゾラム 1 mg/kg またはクロニジン 100  $\mu$ g/kg を腹腔内投与した。

脳波、筋電図および赤外線センサーにより 2 分間体動がなく脳波が 12 秒以上変化しないことを入眠とした。

腹腔内投与から入眠までの時間と入眠から覚醒までの時間を測定し、同腹のマウスまたは同じ月齢の C57BL/6 マウスをコントロールとし、比較した。

検定は t 検定で行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

## 4. 研究成果

ミダゾラムとクロニジンの腹腔内投与によりマウスは鎮静された。それぞれの薬剤投与後の実際の脳波の変化を示す (図 1 ミダゾラム、図 2 クロニジン)。

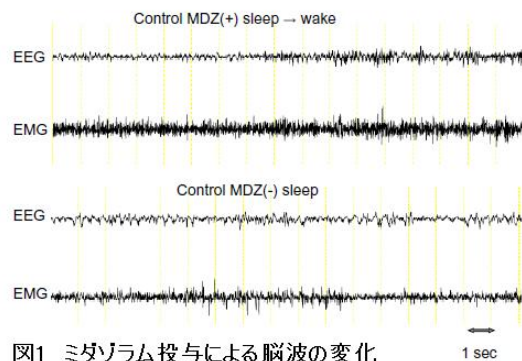


図1 ミダゾラム投与による脳波の変化

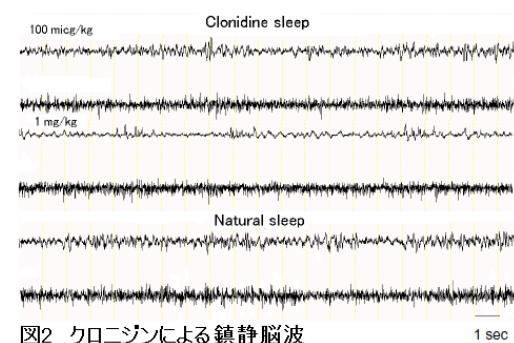


図2 クロニジンによる鎮静脳波

### (1) ataxine マウスへのミダゾラムの投与

ミダゾラム投与により orexin/ataxin-3 マウスでは入眠までの時間 (平均±標準誤差: コントロール 199±58 秒, ataxin マウス 500±83 秒) と覚醒までの時間 (平均±標準誤差: コントロール 2002±201 秒, ataxin マウス 3323±452 秒) がともに有意に延長した(コ

コントロール;n=6, ataxin マウス;n=8, 図 3)。

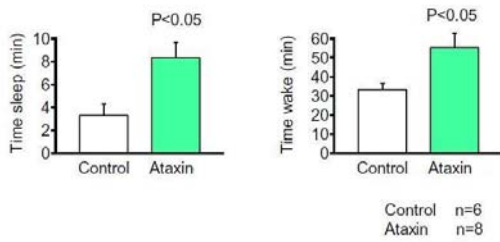


図3 Ataxin マウス投与

(2) オレキシン1受容体ノックアウトマウスへのミダゾラムの投与

オレキシン1受容体ノックアウトマウスではミダゾラムの投与により入眠までの時間は有意に延長した(平均±標準誤差: コントロール 137±39 秒, ataxin マウス 345±83 秒)が、覚醒までの時間には有意差はなかった(平均±標準誤差: コントロール 2082±346 秒, オレキシン1受容体ノックアウトマウス 2639±353 秒)(コントロール; n=6, オレキシン1受容体ノックアウトマウス; n=5, 図 4)。

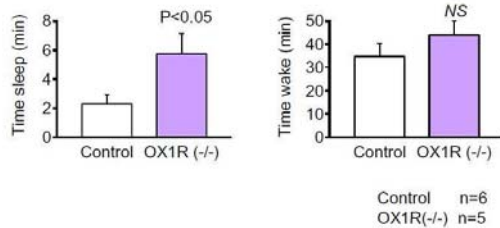


図 4 オレキシン1受容体ノックアウトマウスへのミダゾラムの投与

(3) ataxine マウスへのクロニジンの投与

クロニジン投与により orexin/ataxin-3 マウスでは入眠までの時間平均±標準誤差: コントロール 429±97 秒, ataxin マウス 671±43 秒)と覚醒までの時間平均±標準誤差: コントロール 3841±139 秒, ataxin マウス 5659±572 秒)が有意に延長した(コントロール; n=5, ataxin マウス; n=8, 図 5)。

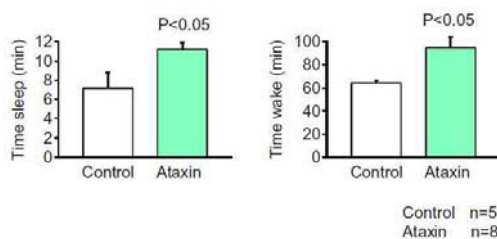


図 5 Ataxin マウスへのクロニジン投与

以上の結果から、orexin/ataxin-3 マウスではオレキシンが欠損しているため代償機転が働き入眠までの時間が長くなったと考えられる。また、オレキシンが欠損しているために覚醒を維持できず覚醒までの時間が延長したと考えられた。

一方、オレキシン1受容体ノックアウトマウスではオレキシン2受容体を介している系が働いているために覚醒時間が伸びなかったことが考えられる。

今回の実験の limitation としてはマウスの活動性が低い Light phase で行った実験であり、同じ実験を dark phase では異なった結果が得る可能性があること。orexin/ataxin-3 マウスはナルコレプシー様の症状を呈することが知られている。そのため、カタブレプシーの状態や睡眠のリズムの異常を麻酔作用としている可能性があることがあげられる。

今回の実験結果から、オレキシンが麻酔の覚醒にも関与していることが明らかになった。臨床報告でもナルコレプシーと診断されずに5回の全身麻酔を受けた患者で、すべての麻酔で覚醒が遅延した(Anesthesiology 2000; 92: 1194-6)という報告や、37人のナルコレプシーの患者の retrospective chart review で、治療されている27人では抜管までの時間および PACU 滞在時間は正常患者と差がなかった(J of Clin Anesth 2005; 17:21-25)との報告もあり、人においてもオレキシンが麻酔からの覚醒に関与していることが示唆される。

今回、当初予定していた特異的なブロッカーがないオレキシン2受容体のノックアウトマウスとトランスジーンを用いてオレキシンを持続的に異所性に発現させた CAG/orexin マウス(オレキシン過剰発現マウス)での同様の実験が、マウスが予定数生まれなかったため期間内に実験を行うことができなかった。

今後、これらのマウスでも同様の実験を行うことで、さらに麻酔作用とオレキシンの関係が明らかになると考えられる。特にオレキシン2受容体には特異的なブロッカーがないために、ノックアウトマウスを使った実験以外での実験が困難である。今後、これらの実験を追加で行うことにより、自然な睡眠と麻酔薬による眠りとのメカニズムの差が明らかになり、麻酔薬の作用機序の解明にも大いに役立つと考えられる。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

①山本 純偉、ミダゾラムの入眠・覚醒時間

へのオレキシンの影響、第 15 回日本静脈麻酔学会、2008 年 9 月 6 日、大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 純偉 (YAMAMOTO SUMII)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

**研究者番号：50402376**

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし