

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591808

研究課題名 (和文) 麻酔薬のオレキシン放出に及ぼす影響

研究課題名 (英文) Effects of anesthetics on the release of orexin in conscious rats.

研究代表者：白阪哲朗

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：00274788

研究成果の概要:最初に、各脳神経核:前脳皮室(BF),青斑核(LC),視床下部室傍核(PVN),縫線核(RN),隆起乳頭体核(TMN)のうち内因性オレキシン(ORX)放出が測定可能な部位を調べた。BF,LC,PVNにおいて内因性ORX放出を認めたので、これらの部位で測定した。内因性ORX放出の多い時間帯は、17:00-24:00だった。意識下のラットに静脈麻酔薬であるプロポフォール(P)を静脈内投与するとBF,LCでのORX放出は濃度依存性に抑制され(BF:1mg/kg $8.6 \pm 3\%$, 2mg/kg $15.3 \pm 13\%$, 3mg/kg $25.8 \pm 13.1\%$, LC:1mg/kg $2.5 \pm 10\%$, 2mg/kg $10.4 \pm 13.1\%$, 3mg/kg $12 \pm 6.4\%$)、脳波上高振幅徐波化を認めるとともに筋電図上体動も減少した。BFとLCでのPによるORX放出抑制作用は、BFの方が有意に大きかった。次に吸入麻酔薬のイソフルラン(1~3%)に1時間暴露すると、前脳皮質(FC)および青斑核(LC)からのオレキシン(ORX)放出は用量依存性に抑制($1\% 6 \pm 5\%$, $2\% 11 \pm 8\%$, $3\% 19 \pm 7\%$)された。その程度は、FCの方が大きかった。 $\alpha 2$ 受容体作動薬であるデクスメドミジン(DEX)は、PVNおよびLCからのORX放出を濃度依存性に抑制した(PVN $2 \mu\text{g}/\text{kg} 10.4 \pm 13.1\%$, $5 \mu\text{g}/\text{kg} 21.4 \pm 17.1\%$, $10 \mu\text{g}/\text{kg} 35.4 \pm 22.1\%$, LC $2 \mu\text{g}/\text{kg} 7.4 \pm 10.6$, $5 \mu\text{g}/\text{kg} 13.5 \pm 5.9\%$, $10 \mu\text{g}/\text{kg} 23.1 \pm 8.6\%$)。LCよりもPVNでORX放出はより強く抑制された。この抑制作用は、 $\alpha 2$ 受容体遮断薬(ヨヒンビン)の前投与で有意に抑制された。次にこれらの麻酔薬によるORX放出抑制作用がGiタンパク質共役型受容体を介しているか調べるために拮抗薬である百日咳毒素をマイクロダイアリシスプローベに灌流してその影響を調べた。その結果、DEXとイソフルランによる抑制作用は、百日咳毒素の灌流によって有意に抑制された。次にRNの5-HT放出に及ぼす麻酔薬の影響を調べた。ORXを投与してもRNからの5-HT放出には影響しなかった。また、BFからのヒスタミン放出にも影響しなかった。

交付額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

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：麻酔学

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景 オレキシシン (ORX-A, B) は 1998 年に視床下部から発見された神経ペプチドで、その機能は特に覚醒の維持に重要である。ORX をラットの脳室内に投与すると、チオペンタール等の静脈麻酔薬による麻酔時間を短縮し吸入麻酔薬投与下で脳波に覚醒反応をもたらす。また、ORX 拮抗薬である SB-334867 をラットの脳室内に投与するとチオペンタールの麻酔時間を延長する。ORX を覚醒と関連のある視床下部室傍核 (PVN) に投与すると脱分極反応をもたらし、細胞の興奮性は増大する。 α_2 受容体作動薬で、鎮静薬として使用されるデクスメドミジンを PVN ニューロンに投与すると膜電位は過分極し、細胞の興奮性は低下する。また、デクスメドミジンを ORX-A 投与前に PVN ニューロンに灌流すると ORX-A による脱分極反応は消失する (Preliminary data)。このように麻酔薬と ORX 系との間で *in vivo* および *in vitro* で相互作用が認められる。ORX は覚醒系ばかりでなく痛覚系にも関与しており、脳室内に投与しても、髄腔内に投与しても鎮痛作用を発現する。これらの事実より、麻酔薬による鎮静・鎮痛作用発現過程において中枢の ORX 系に変化が生じることが予想される。つまり麻酔薬は覚醒と関連のある ORX 系を抑制することで麻酔作用を発現すると考えられる。局所の内因性 ORX 放出に関しては、視床下部や前脳基底部 (BF) で覚醒期および REM 睡眠期の ORX 放出は徐波睡眠期より多いことは知られているが、ORX がいつ何のために放出促進され、抑制されるのか明らかでない。ORX 放出に影響する外的要因については、麻酔を含めて

全く不明である。また、麻酔薬および ORX 系は神経伝達物質放出にも影響する。覚醒、特に大脳皮質の覚醒に関わる重要なアセチルコリン作動性ニューロン群の 1 つは BF に存在し、そこには ORX ニューロンが密に投射している。PVN にはノルアドレナリン作動性ニューロンや ORX 含有細胞および ORX-2 受容体が豊富に存在する。橋背側部の青斑核 (LC) にはノルアドレナリン作動性ニューロンが豊富に存在する。セロトニン (5-HT) は行動を活性化する役割を担っている。ほとんど全ての脳内 5-HT ニューロンの細胞体は縫線核 (RN) にあり、そこには ORX-1 受容体が存在する。視床下部の隆起乳頭体核 (TMN) は覚醒や意識の制御に関与するヒスタミン作動性ニューロンの細胞体が存在し、軸索は大脳皮質等に投射し、TMN を刺激すると直接的に皮質を活性化させ覚醒を促す。また ORX-A による覚醒作用は H1 受容体を介したヒスタミン神経伝達の活性化を介する。このように ORX 系は覚醒に関与する神経伝達物質放出に影響する。このような事実を踏まえて、本研究では覚醒および麻酔中の前述した神経核における内因性 ORX-A 放出の変化を調べる。また、覚醒と関連した脳神経核における神経伝達物質放出への麻酔薬の影響とその ORX 系の関与について調べ、麻酔薬による麻酔作用と ORX による覚醒作用との関係を明らかにしたい。

2. 研究の目的

覚醒状態でラットに静脈麻酔薬あるいは吸入麻酔薬を投与し、覚醒および麻酔中の BF、PVN、LC、RN および前脳皮質 (FC) における内因性 ORX-A の放出を微量透析 (マイクロダイ

アリシス)法で測定する。同時に脳波を測定して麻酔薬による ORX 放出への影響と脳波との関係を調べる。麻酔薬によってどの部位の ORX-A 放出がどのような影響を受けるか明らかにする。麻酔薬による ORX-A 放出に影響が認められる場合は、その作用の濃度依存性の有無を調べる。そして麻酔薬による ORX 放出に及ぼす作用に Gi タンパク質共役型受容体を介するかどうかを調べるために百日咳毒素を各神経核に灌流した時の麻酔薬の ORX 放出に及ぼす影響を調べる。麻酔前後の各部位における ORX-A の放出を分析して麻酔薬の覚醒系に及ぼす影響とその作用部位および作用機序を明らかにする。次に ORX の惹起した神経伝達物質放出に及ぼす麻酔薬の影響を調べる。最初に覚醒状態から静脈麻酔薬あるいは吸入麻酔薬を投与した時の RN における 5-HT 放出および FC のヒスタミン放出の変化を微量透析法で調べる。これでは 5-HT およびヒスタミン放出が少なく変化が生じない可能性がある。ORX-A を脳室内に投与すると、血圧、心拍数および交感神経活動が増大するとともに身体の活動性が増すことから ORX-A を脳室内や TMN に投与すると、RN の 5-HT 放出および FC のヒスタミン放出は促進されると予想される。よって ORX-A を脳室内投与した時の RN における 5-HT 放出および TMN に ORX-A を投与した時の FC のヒスタミン放出に及ぼす各麻酔薬の影響を調べる。麻酔薬による各神経伝達物質放出に影響を認めた場合にはその濃度依存性も調べる。次にこの麻酔薬の作用が Gi タンパク質共役型受容体を介するかどうかを調べるために、百日咳毒素を各神経核に灌流したときの各麻酔薬の作用についても調べ明らかにする。

3. 研究の方法

覚醒の神経制御に関与する脳神経核における内因性オレキシンA(ORX-A)放出に及ぼ

す麻酔薬の影響を調べる。動物は雄のウィスターラット(500-600g)を用いる。ネンブター麻酔下でラットの頭部を脳定位固定装置(Narishige 現有)に固定して皮質脳波を測定するためのステンレス製のネジ(ユニクロ;+Aナベ)を前頭部の頭蓋骨に固定する。次に微量透析に使用するガイドカテーテル(NG-8;Eicom)をいずれかの標的部位(BF, PVN, LC, RN, FC, TMN)の2mm上部に一箇所挿入する(吉村安広が施行)。挿入時に頭部血管から出血しやすいためバイポーラピンセット(V-10;BRC)で止血する。その位置は、BF: anteroposterior(AP) bregma から -12mm, Lateral(L) midline から 2.5mm 外側, dorsoventral(DV)硬膜表面から深さ6.5mm, PVN: AP -1.7mm, L 0.3mm, DV 4.7mm, LC: AP -12mm, L 1.3mm, DV 5.3mm, RN: AP +1.2mm, L 4mm 32° angle, DV 1mm, FC: AP +3.2mm, L 1.0mm, DV 4.8mm, TMN: AP -4.5mm, L 8mm, DV 5.2mmである。ORX-Aを投与するための脳室カテーテルのガイドは24Gステンレス針(長さ19mm)とし、50 μ lマイクロシリンジ(Hamilton)とカテーテル(PE-10)と連結した30Gステンレス針(長さ20mm)を挿入してマイクロシリンジポンプ(ESP-64;Eicom)で投与する。ネジおよびガイドカテーテルは、頭蓋骨に歯科用セメント(Quick Resin;SHOFU)で固定する。

約10日間の回復期において、再度ネンブター麻酔下で左の大腿動静脈に血圧測定(SP-31+SP-50)および薬物投与(PE-50)に用いるカテーテルをそれぞれ挿入する(吉村安広が施行)。カテーテルは皮下を通して頸背部から外に出す。動脈圧カテーテルは血圧測定のために圧変換器(Could;現有)に連結し、心拍数は血圧波形から算出する。板状筋から筋電図を記録するために頸背部に電極を挿入する。脳波と筋電図信号は増幅(ML135;BRC)して血圧とともにパワーラプシステム(ADIML785;現有)を介してPC(VCGRM70DPL4;SONY)でモニターおよび記録を行う(吉村安広、白阪哲朗、國武孝人が施行)。ラットは専用のケージに入れて麻酔から完全に覚醒した自由行動下で記録する。内因性ORX-A放出は日内変動の影響を受けるので、決まった時間に脳波上覚醒期に実験を施行する。最初に内因性ORX放出の活発な時間帯を調べる。AM7:00-PM7:00とPM7:00-AM7:00の間でのORX-A放出量を調べ、放出量の多い時間帯に実験を行う。透析物採取(サンプリング)は微量透析プローブ(NDP-8-015;Eicom)挿入から6時間以上経過後に行う。プローブはマイクロシリンジポン

プ (ESP-64;Eicom) を用いてプッシュプル法で人工脳脊髄液 (aCSF) (140mM NaCl, 3mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 1.0mM MgCl₂, 0.27mM NaH₂PO₄, 1.5mM Na₂HPO₄, pH 7.4) を灌流し、20 μ l マニュアル サンプル インジェクタ (EAS-20;Eicom) で 2 μ l/min の速度で採取する。

最初にコントロールとして1時間測定し、次に麻酔薬を投与する。

静脈麻酔薬はプロポフォール (Maruishi) を静脈カテーテルから投与する。投与量で以下の3群に分ける。S群 0.5mg/kg + 5mg/kg/hr, M群 1.0mg/kg + 10mg/kg/hr, L群 2.0mg/kg + 15mg/kg/hr とし、初回投与量を約3分間で投与し、その後は微量注入ポンプで持続投与する。呼吸抑制等の問題が生じた場合は投与量を適宜変更する。

吸入麻酔薬はイソフルラン (Abbott) を用いて酸素 3l/min と気化器 (Vapor19.3;Dräger 現有) で混合して投与する。投与濃度で次の3群に分ける。1群:1%, 2群:2%, 3群:3% とし、持続投与する。吸入麻酔薬を投与するときのラットケージは気密性のあるケージにする。ケージ内のイソフルランおよび酸素濃度は持続モニター (Datex;IMI 現有) する。

透析物 (ORX-A) はラジオイムノアッセイ (RIA) で分析する。採取物を1%トリフルオロアセトン酸 (TFA) で酸化し、C18 Sep-カラム (Waters Corp) に詰める。ペプチドを1%TFA/40%アセトニトリルで抽出する。抽出物は乾燥させ、分析前に再度RIAで懸濁する。ORX-A, ヨウ素化ORX-A, ORX-A抗血清, 百日咳毒素はSigma Chemicals, St. Louis, MO, USA から購入。ORX-AとORX-Bは同じ前駆体から得られ、通常同一ニューロンに認められる (Sakurai et al, Cell 1998;92:573-85)。ORX-BはORX-Aより安定性が悪いためにこの研究では測定しない。RNからセロトニン (5-HT) を微量透析法で測定する (吉村安広、白阪哲朗が施行)。RNに留置した微量透析プローブは、aCSF (140mM NaCl, 3mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 1.0mM MgCl₂, 0.27mM NaH₂PO₄, 1.5mM Na₂HPO₄, pH 7.4) を 2 μ l/min の速度で微量注入ポンプ (KDS-100;LMS) を用いて灌流する。5-HT測定のために、各透析物 (20 μ l) は20分間隔で採取して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析する (HTEC-500; Eicom 現有)。移動相 (0.1M 燐酸緩衝液 PH 6.0、500mg/l 1-デカンスルホン酸、50mg/l EDTA、1%メタノール) は、0.5ml/分の速度でポンプ (AS-10;Eicom) を用いて注入する。5-HTの分析カラムはEICOMPAK SC-30DSを使用する。

脳室内投与するORX-AはaCSFに溶解し、最初

に3種類の濃度 (1, 5, 25pmol/ μ l) を 0.33 μ l/min の速度で投与を試みて5-HTが最高に増加した濃度を使用する。ORX-A投与開始60分前からコントロールとして採取し、ORX-Aは60分間投与する。麻酔薬の投与はORX-A投与開始40分後から20分間投与して、サンプリングは麻酔終了から60分後まで行う。麻酔薬の作用が弱い場合は、濃度あるいは投与時間を適宜変更する。

次はFCからヒスタミン測定を微量透析法で行う (國武孝人、白阪哲朗が施行)。TMNおよびFCに留置したプローブはaCSFを灌流 (2 μ l/min) する。ORX-AはaCSFに溶解してTMNに灌流し、3種類の濃度 (1, 5, 25pmol/ μ l) を 0.33 μ l/min の速度で投与を試みてFCのヒスタミン放出が最高に増加した濃度を使用する。ORX-A投与開始1時間前からコントロールとしてFCのサンプリングを開始し、ORX-Aは透析プローブで80分間灌流する。麻酔薬の投与はORX-A灌流開始40分後から40分間投与して、サンプリングは麻酔終了から1時間後まで行う。透析物は、HPLCおよび蛍光分光検出器 (GL-7453;Eicom 現有) で分析するまで -20°C で保存する。

各実験終了時にラットはネブタール麻酔下で10%ホルマリンを心臓内に灌流し、断頭器 (RG-100;BRC) を用いて断頭後50 μ m の脳切片をマイクロスライサー (DTK-1500;Dosaka 現有) で作製してクレシルバイオレットで染色しプローブの位置を顕微鏡 (E-600FN;Nikon 現有) で確認する (吉村安広が施行)。

4. 研究成果

最初に、各脳神経核：前脳皮室 (BF), 青斑核 (LC), 視床下部室傍核 (PVN), 縫線核 (RN), 隆起乳頭体核 (TMN) のうち内因性オレキシン (ORX) 放出が測定可能な部位を調べた。BF, LC, PVNにおいて内因性ORX放出を認めたので、これらの部位で測定した。内因性ORX放出の多い時間帯は、17:00-24:00だった。意識下のラットに静脈麻酔薬であるプロポフォール (P) を静脈内投与するとBF, LCでのORX放出は濃度依存性に抑制され (BF: 1mg/kg 8.6 \pm 3%, 2mg/kg 15.3 \pm 13%, 3mg/kg 25.8 \pm 13.1%, LC: 1mg/kg 2.5 \pm 10%, 2mg/kg 10.4 \pm 13.1%, 3mg/kg 12 \pm 6.4%)、脳波上高振幅徐波化を認めるとともに筋電図上体動も減少した。BFとLCでのPによるORX放出抑制作用は、BFの方が有意に大きかった。次に吸入麻酔薬のイソフ

ルラン(1~3%)に1時間暴露すると、前脳皮質(FC)および青斑核(LC)からのオレキシン(ORX)放出は用量依存性に抑制(1% $6 \pm 5\%$, 2% $11 \pm 8\%$, 3% $19 \pm 7\%$)された。その程度は、FCの方が大きかった。 $\alpha 2$ 受容体作動薬であるデクスメデトミジン(DEX)は、PVNおよびLCからのORX放出を濃度依存性に抑制した(PVN $2 \mu\text{g/kg}$ $10.4 \pm 13.1\%$, $5 \mu\text{g/kg}$ $21.4 \pm 17.1\%$, $10 \mu\text{g/kg}$ $35.4 \pm 22.1\%$, LC $2 \mu\text{g/kg}$ $7.4 \pm 10.6\%$, $5 \mu\text{g/kg}$ $13.5 \pm 5.9\%$, $10 \mu\text{g/kg}$ $23.1 \pm 8.6\%$)。LCよりもPVNでORX放出はより強く抑制された。この抑制作用は、 $\alpha 2$ 受容体遮断薬(ヨヒンビン)の前投与で有意に抑制された。次にこれらの麻酔薬によるORX放出抑制作用がGiタンパク質共役型受容体を介しているか調べるために拮抗薬である百日咳毒素をマイクロダイアリンスプローベに灌流してその影響を調べた。その結果、DEXとインフルランによる抑制作用は、百日咳毒素の灌流によって有意に抑制された。次にRNの5-HT放出に及ぼす麻酔薬の影響を調べた。ORXを投与してもRNからの5-HT放出には影響しなかった。また、BFからのヒスタミン放出にも影響しなかった。

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 2件)

Shirasaka T, Qiu DL, Kannan H, Takasaki M: The effects of centrally administered dexmedetomidine on cardiovascular and sympatrhetic function in conscious rats. Anesth. Analg. 105:1722-1728 (2007)

Shirasaka T, Kannan H, Takasaki M: Activation of a G-protein coupled inwardly rectifying K current and suppression of I_h contribute to dexmedetomidine-induced inhibition of rat hypothalamic paraventricular nuleus neurons. Anesthesiology 107:605-615 (2007)

[学会発表] (計 1件)

Tetsuro Shirasaka, Masahiko Taniguchi, Isao Tsuneyoshi. The effects of

Dexmedetomidine on the rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. Annual meeting of American Society of Anesthesiologist 2008. Florida, Orland, U. S. A.

[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

白阪哲朗

(2) 研究分担者

國武孝人

(3) 連携研究者