

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20791096

研究課題名（和文） 吸入麻酔薬による興奮の分子機構の解明

研究課題名（英文） Identification of molecular mechanism of excitement with inhalational anesthetics

研究代表者

安井 豊 (YASUI YUTAKA)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80459651

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、吸入麻酔薬による興奮の分子機構を解明することである。スライスパッチによりセボフルレンによって誘発されるラット青斑核の興奮に PKC が関与していることが示された。また、行動実験解析装置を作成し、ラットの行動を数値化した。各吸入麻酔薬に対するラットの興奮反応と誘発される青斑核の興奮の強度はセボフルレンで最も高度であったことから、吸入麻酔薬の興奮に青斑核が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the present study is to identify the molecular mechanism of the excitement with the inhalational anesthetics. According to the membrane potential recordings of locus coeruleus neurons, it was shown that PKC took part in the excitement of locus coeruleus caused by sevoflurane. Moreover, the behavioral analysis device was made, and the behavior of the rat was expressed numerically. Interestingly, the order in generating inward current for three volatile anesthetics (sevoflurane, isoflurane and halothane), especially the fact that the inward current with sevoflurane was larger than that with halothane, is in complete accord with the behavioral studies showing that sevoflurane provokes the agitation at the strongest in the rat among these anesthetics. The excitatory current activated by sevoflurane in LC neurons might be one of the potential cellular mechanisms underlying paradoxical excitatory effect of sevoflurane.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：吸入麻酔薬・青斑核・興奮

## 1. 研究開始当初の背景

吸入麻酔薬は臨床上最も広く用いられ、また、最も確実にその作用を現す中枢神経作用薬である。近年の電気生理学的及び分子生物学的技術の進歩によって、吸入麻酔薬の分子

機構の一部が明らかにされてきたが、それらの報告は全て吸入麻酔薬の中枢神経系の興奮性を抑制する作用として同定されてきた。一方、19世紀後半に吸入麻酔薬が使用されて以来、抑制作用と同時に吸入麻酔による一過

性の興奮が動物及びヒト、特に小児領域で多数報告されてきた。小児領域においては吸入麻酔覚醒時の一過性の興奮を過興奮、覚醒時興奮および覚醒時不穏と称しており、臨床上重要な問題となっている。このような吸入麻酔薬による興奮の分子機構は明らかにされていない。申請者は、現在までに、ラット急性脳幹スライスを作成し、青斑核ニューロンをセボフルレンが直接興奮性電流を誘発させるという事実を証明し論文報告を行った (Yasui Y et al., Sevoflurane Directly Excites Locus Coeruleus Neurons of Rats. *Anesthesiology*: 2007. in press)。申請者は以下の理由から青斑核に注目し吸入麻酔薬の影響を検討することとした。第一に、青斑核は中枢神経系の広い領域にノルアドレナリン作動性神経線維を投射しており、中枢神経系の興奮性をコントロールし、意識水準の維持および下行性疼痛抑制に関与していること (Aston-Jones G, *Nat Neurosci* 2001)。第二に、セボフルレンとイソフルレンが視索前野のノルアドレナリン放出を増加させる報告から、吸入麻酔薬が中枢神経系のノルアドレナリン系を刺激する可能性が示唆されること (Anzawa N, *Can J Anaesth* 2001)。第三に、青斑核の  $\alpha 2A$  受容体の活性化を通して青斑核ニューロンの興奮性を抑制するデクスメドミジンの前投与によってヒトにおける吸入麻酔薬による興奮の発生率が減少すること (Vlajkovic GP, *Anesth Analg* 2007) である。セボフルレンによって誘発される青斑核興奮性電流と行動における興奮との関連について検討することは、日常の臨床における興奮発生率を減少させる治療戦略の開発に繋がる有意義な研究であると判断し、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、吸入麻酔薬による興奮の分子細胞機構を解明することである。具体的には吸入麻酔薬によって誘発される青斑核の興奮が、行動上の興奮を引き起こすという新たな事実を証明することにある。以上の目的を遂行するために、本研究計画では、3年間で以下の2項目の実験を行う。1) 現在までに証明したセボフルレンによる青斑核の興奮性電流が関与する分子機序を薬理学的手法を用いて同定する。2) 吸入麻酔薬による興奮を評価する動物モデル・実験系を確立させる。

## 3. 研究の方法

本研究は、スライスパッチによる *ex vivo* と行動計測による *in vivo* の2点からなる。(1) スライスパッチ：若年ラットの急性脳幹スライスを作成し、パッチクランプ法により青斑核ニューロンに吸入麻酔薬を投与し、

電気生理学的応答を解析するというアプローチを採用する。記録の対象として申請者は青斑核を選択した。青斑核は中枢神経系の広い領域にノルアドレナリン作動性神経線維を投射しており、青斑核の  $\alpha 2A$  受容体の活性化を通して青斑核ニューロンの興奮性を抑制するデクスメドミジンの前投与によってヒトにおける吸入麻酔薬による興奮の発生率が減少することから、青斑核での吸入麻酔薬に対する電気生理学的応答を検討することは、吸入麻酔薬による一過性興奮を担う分子機構を証明できると仮説を立て、下記の実験計画を進める。

青斑核ニューロンにおいて、セボフルレンによって誘発される興奮性電流にどのような分子メカニズムが関与しているかを証明するため、①麻酔下の Wistar 系ラット (2-3週) から脳幹を摘出し、青斑核を含む脳幹冠状切断スライス (400  $\mu\text{m}$ ) を作成し、人工脳脊髄液によって維持する。②スライスを記録チェンバーに移し、人工脳脊髄液の灌流によってその活性を維持する。③近赤外線ビデオ顕微鏡システム (現有設備) による青斑核の視認下にホールセル法による膜電流を行う。パッチクランプ膜電流記録システム一式は現有設備を用いる。④人工脳脊髄液にセボフルレンを気化器を用いて溶解させ環流し、膜電流の変化を記録する。⑤同様の実験を諸所の細胞内代謝酵素阻害剤 (KT5720 など)、細胞内代謝酵素活性剤 (PMA; forskolin など) を追加投与し、十分にスライス環流した後、同様の実験 (④) を行う。⑥実験終了後、記録された膜電流の変化を解析する。

(2) 行動計測：吸入麻酔薬による一過性の興奮は動物およびヒト特に小児において観察・報告されているが、具体的な数値として計測する実験系は確立されていない。本研究は動物行動を記録する装置、及び解析プログラムを作成し、吸入麻酔薬に対する反応を計測する実験系を確立させ、青斑核破壊動物を使用することにより、青斑核の一過性興奮への関与を証明することを目的とする。

動物の行動を計測するための実験装置の開発と解析プログラムの確立。実験 (1) は吸入麻酔薬が青斑核に誘発する興奮性の分子機序を解明する実験である。実際に青斑核の興奮が動物個体の興奮の原因となるかを直接的に検証するための準備段階として本実験計画2を行う。①2軸加速度センサをアクリル板に設置する。②アクリル板に各動物の重量に応じたバネを設置する。③アクリル板をファンの付いた箱の内部に設置する。箱は十分な大きさとする。④流量計と気化器を接続した回路に箱を接続する。⑤箱の中のアクリル板上に動物を入れる。⑥一定時間空気又は酸素で環流し、動物を慣れさせる。行動

は2軸加速度センサを通じて記録装置に入力される。⑦麻酔ガスを投与する。箱内の麻酔ガス濃度はファンを用いて一定に保ち、麻酔ガス解析器を用いて濃度を測定する。余剰ガスはガス吸着装置を用いて排気する。一定時間麻酔ガスを投与し中止する。⑧以上の実験(⑥、⑦)の期間の2軸加速度センサから入力された記録を解析する。解析にはノイズの除去等を考慮したプログラムを作成する。

#### 4. 研究成果

(1) スライスパッチ：セボフルレンによって誘発される青斑核の興奮は、cyclic AMPを増加させるforskolin存在下でも非存在下同様に誘発され有意差を認めなかった。(存在下:28.5 ± 5.2 pA vs 非存在下 33.1 ± 4.8 pA)。それに対し、protein kinase C(PKC)を活性化するPhorbol-12-myristate-13-acetate存在下では、青斑核の興奮は有意に抑制された(-3 ± 5.2 pA, n = 5, p<0.05)。セボフルレンによる青斑核の興奮にはPKCが関与していると考えられた。

(2) 行動実験：実際に青斑核の興奮が動物個体の興奮の原因となるかを直接的に検証するための準備段階として動物の行動を計測するための実験装置の開発と解析プログラムの確立を行った。方法として、まず2軸加速度センサをアクリル板に設置した。アクリル板に各動物の重量に応じたバネを設置した。アクリル板をファンの付いた箱の内部に設置した。箱は十分な大きさとした。流量計と気化器を接続した回路に箱を接続した。箱の中のアクリル板上に動物を入れた。一定時間空気又は酸素で環流し、動物を慣れさせた。行動は2軸加速度センサを通じて記録装置に入力された。麻酔ガスを投与し際、箱内の麻酔ガス濃度はファンを用いて一定に保ち、麻酔ガス解析器を用いて濃度を測定した。余剰ガスはガス吸着装置を用いて排気した。一定時間麻酔ガスを投与し中止した。

作成した装置より、動物の行動をデジタル信号に変換することに成功した。得られた信号の解析にはノイズの除去等を考慮したプログラムを作成した。結果として、動物の行動をデジタル信号に変換することに成功した。

麻酔ガス投与による動物の行動は吸入麻酔投与後、有意に増加した。各吸入麻酔薬間での差は有意差はないもののセボフルレン、イソフルレン、ハロタンの順序に吸入麻酔薬に対する反応が大きかった。また、反応の順序は各吸入麻酔薬によって誘発される青斑核の興奮の強度と同じ順序であったことから、吸

入麻酔薬の興奮に青斑核が関与している可能性を示唆するものであると考えている。

脳内薬物注入による青斑核破壊により、吸入麻酔薬に反応したラットの興奮行動が消失するかどうかは今後の実験課題として残された。

#### 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5件)

1. R. Aoyama, Y. Okada, S. Yokota, Y. Yasui, K. Fukuda, Y. Shinozaki, H. Yoshida, M. Nakamura, K. Chiba, Y. Yasui, F. Kato, Y. Toyama. Spatiotemporal and anatomical analyses of P2X receptor-mediated neuronal and glial processing of sensory signals in the rat dorsal horn. Pain. 2011 (in press). 査読有

2. Yasui, Y., Kida, K, Ohtani, N, Aida, S, Masaki, E. Treatment of particle-associated pulmonary aspiration with bronchoscopic lavage: report of two cases. Eur J Anaesthesiol. 2009 Jun.; 26(6):527-529. 査読有

3. K Kida, N Ohtani, K Shoji, Y Yasui, E Masaki. Postoperative pain status after intraoperative systemic dexmedetomidine and epidural neostigmine in patients undergoing lower abdominal surgery. European Journal of Anaesthesiology. 2008 Nov. 25: 869-75. 査読有

4. Ohtani N, Kida K, Shoji K, Yasui Y, Masaki E. Recovery profiles from dexmedetomidine as a general anesthetic adjuvant in patients undergoing lower abdominal surgery. Anesth Analg. 2008 Dec;107(6):1871-4. 査読有

5. 安井 豊 セボフルランによるラット青斑核ニューロンの直接的興奮 Anesthesia Network 2008 Vol. 12, 44-49. 査読無

[学会発表] (計7件)

1. 安井 豊、藤原 千江子、宮崎 愛佳、松田 祐典、飯田 瑠梨、根津 武彦 受傷時の呼吸停止から呼吸器離脱に至った高位頸髄損傷の一症例第 38 回日本集中治療医学会学術集会: DP-79-2, 横浜 2月26日 (2011)

2. N. Ohtani, Y. Tachibana, A. Aoi, Y. Yasui, E. Masaki. Efficacy of Intrathecal

Esmolol on Heat Evoked Responses in a Postoperative Pain Model; 2010 American society of anesthesiologists Annual Meeting: A288, October 18, 2010 San Diego, CA

3. 安井 豊 導入及び覚醒時興奮のメカニズムを求めて—セボフルレンによる青斑核ニューロンの興奮 Molecular and cellular mechanisms of anesthetic-induced agitation S03-06 日本麻酔科学会第 57 回学術集会 福岡 6 月 3 日 (2010)

4. 藤原 千江子、藤井 輝之、斉藤 千恵、小崎 佑吾、安井 豊、生田目 英樹、根津武彦 2 度の全身麻酔下手術後に味覚障害が生じた 1 症例 第 37 回日本集中治療医学会学術集会: DP-42-1, 横浜 3 月 4-6 日 (2010) 2 日目

5. N. Ohtani, K. Kida, Y. Yasui, K. Shoji, E. Masaki. Perioperative Infusion of Dexmedetomidine at High Dose Reduces Postoperative Analgesic Requirement; 2008 American society of anesthesiologists Annual Meeting: A552, October 22, 2008 Orlando, FL

6. K. Kida, Y. Yasui, N. Ohtani, N. Kuratani, E. Masaki. Intraoperative Infusion of Dexmedetomidine Decreases Postoperative Pain Scores: A Meta-Analysis; 2008 American society of anesthesiologists Annual Meeting: A1625, October 21, 2008 Orlando, FL

7. Y. Yasui, Y. Okamoto, K. Shoji, F. Kato, E. Masaki. Dexmedetomidine Counteracts the Excitatory Effect of Sevoflurane on LC Neurons of the Rat; 2008 American society of anesthesiologists Annual Meeting: A718, October 18, 2008 Orlando, FL

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安井 豊 (YASUI YUTAKA)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80459651