

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592992

研究課題名(和文) 全身麻酔要素である鎮痛・筋弛緩・不動化における脊髄痛覚・運動ニューロンの役割解明

研究課題名(英文) The elucidation of role of motor neurons or pain pathways of the spinal cord in analgesia, muscle relaxation, and immobility as general anesthetic factors

研究代表者

入船 正浩 (IRIFUNE, MASAHIRO)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

研究者番号：10176521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：全身麻酔要素である不動化における脊髄サブスタンスP(SP)の役割について検討した。侵害刺激による脊髄後角C線維からのSP遊離は、モルヒネにより抑制される。一方、NMDAチャネル遮断薬であるMK-801が、高用量でもげっ歯類の正向反射を消失させないことは知られていた。私達は、MK-801の投与前に低用量のハロペリドールで処置しておくこと、MK-801は正向反射消失を引き起こすが、不動化は生じないことを明らかにした。さらに、MK-801とハロペリドールの併用により正向反射を消失させたマウスにモルヒネを併用すると不動化を生じることを示した。本研究により不動化と脊髄でのSP遊離抑制の関係が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The role of substance P (SP) of the spinal cord in immobility as one of the general anesthetic factors was studied. Dexmedetomidine and morphine inhibit SP release from primary afferent neurons in the spinal cord. The selective N-methyl-D-aspartate (NMDA) channel blocker MK-801 is known to induce no loss of the righting reflex (LORR) and to stimulate catecholaminergic neurons in rodents, playing a crucial role in arousal. MK-801 in combination with a small dose of the dopamine (DA) receptor antagonist haloperidol dose-dependently produced LORR, but not immobility. Dexmedetomidine and morphine induced immobility in animals treated with MK-801 plus haloperidol, which then lost their righting reflex. These findings suggest that the immobility involves the inhibition of SP release in the spinal cord.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：全身麻酔要素 正向反射 鎮痛 不動化 MK-801 ハロペリドール デクスメデトミジン モルヒネ

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔法の確立は医学史上最大の功績の一つといっても過言ではなく、医療において全身麻酔はいまや不可欠となった。全身麻酔薬によって引き起こされる麻酔状態は、健忘、鎮静、意識消失、鎮痛、筋弛緩、侵害刺激による体動の抑制(不動化)などの要素からなる。しかし、これらの各麻酔構成要素がどのような作用機序を介して生じているのかは今のところよくわかっていない。私達がこれまでに行ってきた、あるいはこれから行おうとしている一連の研究の全体構想は、個々の麻酔要素の作用機序をそれぞれ明らかにすることにある。

Sawamuraらは、麻酔要素のうち鎮静と鎮痛は異なる部位に作用して生じることを報告し、各要素は別々に探求されるべきであると指摘した(J Neurosci, 20, 9242-51, 2000)。私達は、これまでに受けた科学研究費による研究で、麻酔要素のうち意識消失は抑制性の神経伝達物質である - アミノ酪酸 (GABA) の脳内濃度を上げることにより濃度依存性に起こる一方で不動化は生じないこと、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体の選択的な遮断は意識消失も不動化も生じないこと、GABA神経刺激とNMDA受容体の遮断を併用しても不動化は起こらないことをすでに報告した。これらの結果から、意識消失はGABA神経刺激と関係するが、不動化にはこれら以外の神経系が関与していることが示唆された。事実、作用部位として多くの標的分子が *in vitro* の実験系で確認されている既存の全身麻酔薬では、用量(濃度)依存性に意識消失と不動化の両方を引き起こした。

また、whole cellパッチクランプ法を用いた電気生理学実験で、全身麻酔薬はアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させたサブスタンスP受容体を介する Cl⁻電流を抑制することが報告されている(Anesth Analg, 94, 79-83, 2002)。この知見は、麻酔作用にサブスタンスPが関係している可能性を窺わせる。しかし、この研究からは、脊髄後角でのサブスタンスPを介した侵害情報伝達を全身麻酔薬が抑制しているのかはわからない。侵害刺激によるC線維からのサブスタンスPの遊離は、オピオイドや α_2 アドレナリン受容体作動薬により抑制されることがマイクロダイアリシス実験により明らかにされた(Peptides, 10, 1127-31, 1989; Peptides, 14, 371-8, 1993)。私達は、科学研究費による研究で、GABA神経刺激による意識消失時にオピオイドのモルヒネや α_2 アドレナリン受容体作動薬のデクスメトミジンを併用すると不動化を起こすことを確認している。このことは、不動化が脊髄後角でのサブスタンスP神経の抑制を介して起きていることを予期させる。また、内因性GABA濃度の上昇は静脈内麻酔薬のペントバルビタールが引き起こす意識消失、筋弛緩、不動化のすべてを増

強する一方で、内因性グリシン濃度の上昇は不動化のみを増強することがわかった。しかし、これらの増強作用が脊髄と脳のどちらを介しているのかは未だ確認していない。本研究は、行動薬理学的手法を用いた実験により、全身麻酔薬による鎮痛・筋弛緩・不動化の作用部位・作用機序を明らかにし、さらに神経化学的手法を用いた実験により、全身麻酔薬が脊髄後角でのサブスタンスP神経を介した侵害情報伝達を抑制するかについて解明しようという初めての試みである。

2. 研究の目的

Rampilらは、外科的切開に対して体動しない(不動化)という現象は、全身麻酔薬の脊髄における作用であると報告した(Anesthesiology, 80, 606-10, 1994)。しかし、麻酔作用が脊髄のどの神経を介して生じているのかについては検討されていない。外科手術では、持続的な組織破壊を伴う。このような状態の時の比較的遅くて慢性的な痛みは、一次求心性C線維を介して脊髄に伝えられている。C線維はサブスタンスPやグルタミン酸を脊髄後角内へ遊離する。サブスタンスPとグルタミン酸は後角にある二次求心性線維や広作動域線維に作用して脱分極を起こす。さらに、介在ニューロンにも作用し、そこから遊離されたグルタミン酸がNMDA受容体や non-NMDA 受容体を活性化する(Textbook of Pain, 3rd edn, 165-200, 1994)。

一方、知覚情報は神経系のそれぞれの段階で統合され、各段階で適切な運動反応に変換される。脊髄では、知覚情報によって比較的単純な運動反応が生じている。痛覚が刺激されると、生体は刺激から逃れようとして必要な筋群を働かせる。これを逃避反射と呼んでいるが、この反射経路は直接前角運動ニューロンには到達せずに最初は介在ニューロン網を経由し、二次的に運動ニューロンに達する。この過程で介在ニューロンは重要な役割を果たしていると考えられ、GABAやグリシンは脊髄介在ニューロンの代表的な抑制性伝達物質である。本研究の目的は、全身麻酔要素である鎮痛・筋弛緩・不動化の発現におけるこれら脊髄サブスタンスP、GABAおよびグリシンの機能的な役割を解明し、その作用機序を応用した新しい麻酔法を開発することにある。

3. 研究の方法

(1) 行動薬理学実験

1) 実験材料

実験動物として、ddY系成熟雄性マウス(7-11週齢)を使用した。明/暗12時間(8:00-20:00)室温25±1、固形飼料および飲料水は自由に摂取できる環境下で飼育した。すべての実験においてマウスは一回のみ使用した。

2) 使用薬物

本実験では薬物として、MK-801、SCH-23390、ハロペリドール、プラゾシン、プロプラノロール、デクスメトミジン、モルヒネを使用

した。

3) 実験方法

モルヒネ以外の全ての薬物は 0.9%生理食塩水に溶解し、マウスの体重 10g あたり 0.1 ml となるよう調整し、腹腔内に投与した。モルヒネは生理食塩水に溶解し、体重 10 g 当たり 0.05 ml となるように調整し、皮下に投与した。実験室内の温度は 25 ± 1 に調節し、ヘッドランプにより保温してマウスの体温を維持した。実験は午前 10 時から午後 6 時の間で行った。全身麻酔作用は、意識消失の指標として正向反射の消失の 50%有効量 (50% effective dose; ED_{50}) (righting-reflex ED_{50}) を、不動化の指標として侵害刺激に対する体動の有無の ED_{50} (immobility ED_{50}) を、また鎮痛作用の指標として Haffner 法による抗侵害効果の有無の ED_{50} (antinociceptive ED_{50}) を用いて評価した。

正向反射スコアは、記録時に手でピーカーを水平面から約 45° の角度に傾け、3度この操作を繰り返し、以下の正向反射スコアにより行った。スコア 0 はマウスを裏返そうとしてもすぐに正位に向き直る、すなわち正向反射が正常な状態、+1 は 3 回とも 2 秒以内に正向反射がある状態 (軽度正向反射障害)、+2 は 2 秒から 10 秒の間に少なくとも 1 回は正向反射がある状態 (中等度~高度正向反射障害)、+3 は 3 回とも 10 秒以内には正向反射がない状態 (正向反射消失) を示すものとした。この正向反射消失作用は意識消失作用と関係すると考えられる。

侵害刺激による体動の抑制の有無の判定では、侵害刺激の方法として tail-clamp を用いた。正向反射スコアがピークとなる時間に、動脈クレンメで尾の頭側から約 1 cm の部位を最大で 30 秒間挟み、この間体動のない場合を体動の消失とした。体動の有無のみを観察し、咳、過呼吸などの反応は除外した。この侵害刺激による体動の抑制は不動化と関係していると考えられる。

鎮痛作用の有無の判定では Haffner 法を用いた。侵害刺激として tail-clamp を 30 秒間加え、マウスが鳴いたり、頭を後ろに向けてクレンメを咬もうとしたりする反応 (仮性疼痛反応) が観察されなければ、鎮痛作用ありとした。

MK-801 を単独で高用量 (50 mg/kg) 投与してもマウスの正向反射は消失しなかった。また、NMDA 受容体の遮断はドパミン神経を刺激し、マウスなどの小動物を興奮 (覚醒) させることが報告されていることから、MK-801 の投与 30 分前に低用量のハロペリドール (0.2 mg/kg) を腹腔内投与してドパミン神経伝達を遮断した。ハロペリドール (0.2 mg/kg) を腹腔内投与後ただちにマウスを一匹ずつピーカーに入れ、30 分後に MK-801 (0.4-20 mg/kg) を腹腔内投与した。正向反射への影響は正向反射スコアを用いて評価し、MK-801 の投与後 2 分毎に正向反射スコアの判定を行っ

た。その結果から得られた正向反射スコアがピークとなる時間に侵害刺激をマウスに加え、体動の有無を 30 秒間観察した。30 秒間体動がないものを侵害刺激による体動なしと判定し、咳や過呼吸は除外した。また、SCH-23390 は MK-801 投与 30 分前に、プラゾシンあるいはプロプラノロールは 15 分前に投与し、MK-801 投与後正向反射を観察した。

ハロペリドールと MK-801 の併用に、さらに、デクスメトミジンあるいはモルヒネを併用投与して実験を行った。最初にハロペリドールの投与を行いすぐにマウスを一匹ずつピーカーに入れ、15 分後にデクスメトミジンあるいはモルヒネを投与し、さらにその 15 分後に MK-801 を腹腔内投与した。MK-801 投与 15 分後に侵害刺激による体動の有無の判定を行った。

4. 研究成果

MK-801 (0.4, 0.75, 1, 3, 5, 7 mg/kg) にハロペリドール (0.2 mg/kg) を併用すると、MK-801 は用量依存性にマウスの正向反射スコアを増加させ、正向反射を消失させた。正向反射スコアは、MK-801 の投与後すぐに増加し始め 6-20 分後にはそれぞれの投与量でのピークに達した。投与量に依存してピークに達するまでの時間は短くなった。ピークに達した後は経時的に正向反射スコアは減少し、投与 3 時間後にはいずれの投与量でもほぼスコアは 0 となった。ハロペリドール (0.2 mg/kg) を併用したときの MK-801 の righting-reflex ED_{50} は 1.6 (0.9-3.0) mg/kg であった。しかし、侵害刺激による体動は、20 mg/kg の高用量を投与したときでも抑制されず、immobility ED_{50} は決定されなかった。

一方、SCH-23390、プラゾシンあるいはプロプラノロールの前処置は MK-801 の正向反射にほとんど影響しなかった。

デクスメトミジンは用量依存性に侵害刺激による体動 (鎮痛作用) を抑制し、antinociceptive ED_{50} は 0.09 (0.03-0.23) mg/kg であった。一方、ハロペリドール (0.2 mg/kg) と MK-801 (5.0 mg/kg) の投与し正向反射を消失させて、デクスメトミジンを併用すると、デクスメトミジンは用量依存性に tail-clamp による体動を抑制し、そのときのデクスメトミジンの immobility ED_{50} は 0.26 (0.10-0.66) mg/kg と antinociceptive ED_{50} の約 3 倍高用量であった。同様に、モルヒネの antinociceptive ED_{50} は 4.4 (1.3-15.0) mg/kg であったのに対し、ハロペリドールと MK-801 の投与に、モルヒネを併用すると、モルヒネの immobility ED_{50} は 9.0 (2.9-28.2) mg/kg と約 2 倍必要であった。

以上より、MK-801 を単独で高用量 (50 mg/kg) 投与してもマウスの正向反射は消失しないが、低用量のハロペリドールを投与してドパミン神経伝達を遮断しておくことと MK-801 は用量依存性に正向反射は消失するが、不動化は起きないことを明らかにした。このことから、MK-801 の覚醒と関係のあるド

パミン神経刺激作用が NMDA チャネル遮断作用による正向反射消失作用をマスクしている可能性が示唆された。さらに、不動化にはデクスメトミジンやモルヒネの投与が必要であったことから、脊髄でのサブスタンス P 遊離抑制が関係しているのかも知れない。

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 1 件)

1: Kikuchi, Nobuhito; Irifune, Masahiro; Shimizu, Yoshitaka; Yoshida, Keita; Morita, Katsuya; Kanematsu, Takashi; Morioka, Norimitsu; Nakata, Yoshihiro; Sakai, Norio, Selective blockade of N-methyl-D-aspartate channels in combination with dopamine receptor antagonism induces loss of the righting reflex in mice, but not immobility, Psychopharmacology (in press)

〔学会発表〕(計 5 件)

1: 入船正浩: 選択的 NMDA チャネル遮断とドパミン受容体拮抗作用の併用はマウスの正向反射を消失させるが、不動化は生じない: 第 28 回中国・四国歯科麻酔研究会(広島), 2013 年 7 月 15 日.

2: 宮原 岳史, 入船正浩, 酒井 規雄, 齋藤尚亮: プロポフォル誘発性 PKC トランスロケーションにおける C1 ドメインの役割: 第 40 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会(福岡), 2012 年 10 月 6 日.

3: 宮原岳史, 関 貴弘, 秀 和泉, 田中 茂, 齋藤尚亮, 入船正浩, 酒井規雄: プロテインキナーゼ C のトランスロケーションと酵素活性に対するプロポフォルの効果: 第 120 回日本歯科薬理学会近畿部会(京都), 2011 年 11 月 11 日.

4: 向井明里, 入船正浩, 宮原岳史, 大植香菜, 石井裕明, 土井 充, 清水慶隆, 吉田啓太, 福島怜子, 西中村 亮: Pentobarbital が引き起こす麻酔要素における GABA、グリシン、神経性コリン作動性、グルタミン酸およびサブスタンス P 各神経の役割: 第 39 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会(神戸), 2011 年 10 月 9 日.

5: 宮原岳史, 酒井規雄, 入船正浩: プロテインキナーゼ C (PKC) のトランスロケーションと酵素活性に対するプロポフォルの影響: 第 39 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会(神戸), 2011 年 10 月 9 日.

〔図書〕(計 1 件)

1: 入船正浩, 医歯薬出版, 全身麻酔薬の作用機序、歯科麻酔学 第 7 版, 2011 年, pp254-257

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入船 正浩 (IRIFUNE MASAHIRO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(歯)・教授
研究者番号: 10176521

(2) 研究分担者

森田 克也 (MORITA KATSUYA)
広島文化学園大学・看護学部・教授
研究者番号: 10116684

(3) 連携研究者

()

研究者番号: