

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：21601  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24592307  
 研究課題名(和文)脳内アナンダミドが全身麻酔に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文)The brain anandamide and general anesthesia

## 研究代表者

村川 雅洋 (Murakawa, Masahiro)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90182112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳内カンナビノイドCB1受容体の選択的拮抗薬リモナバンを投与したラットに全身麻酔薬亜酸化窒素を吸入させ、テイルフリックテストで鎮痛作用の変化を検討した。リモナバンの腹腔内、脳室内投与では、亜酸化窒素の鎮痛作用に影響を及ぼさなかったが、髄腔内投与では、鎮痛作用に拮抗した。アナンダミドは脊髄において亜酸化窒素の鎮痛作用に関与していることが示唆された。  
 亜酸化窒素投与によるラットCB1受容体遺伝子発現量の変化をRT-PCR法を用いて検討した。亜酸化窒素投与によって、大脳皮質、海馬、線条体、小脳でCB1受容体の発現量が低下した。亜酸化窒素が内因性カンナビノイドの作用を増強させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The analgesic effects of nitrous oxide(N<sub>2</sub>O) were investigated using tail flick test in Wistar rats received cannabinoid 1(CB1) receptor antagonist, rimonabant. In the rats injected rimonabant intrathecally, the percent of maximal possible effect(%MPE) did not increase with N<sub>2</sub>O inhalation. However, in the group administered rimonabant intraperitoneally and intraventricularly, %MPE did not decrease from the peak level. The anandamide might interact with N<sub>2</sub>O in spinal level.  
 RT-PCR assays demonstrated that CB1 receptor expression in rat reduced after 2 hours of exposure of N<sub>2</sub>O. CB1 receptor is known to have decreased its expression when exposed to a ligand for a long time: desensitization. It is suggested that N<sub>2</sub>O itself indicate the cannabinoids-like action or reinforce the action of endogenous cannabinoids.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：アナンダミド 全身麻酔 亜酸化窒素 カンナビノイド受容体 リモナバン テイルフリックテスト RT-PCR

## 1. 研究開始当初の背景

全身麻酔の要素として催眠鎮静と鎮痛が挙げられる。最も古くから臨床使用されている全身麻酔薬である亜酸化窒素は、催眠作用は弱いものの、ある程度の鎮痛作用を有する。鎮痛作用の神経学的機序として、亜酸化窒素は麻薬性鎮痛薬と同様に脳内オピオイド受容体に作用すると考えられている。また、亜酸化窒素の中樞神経作用に対して急性耐性が生じることが知られており、麻薬性鎮痛薬や大麻などの薬物と類似の現象である。一方、全身麻酔薬でも静脈麻酔薬チオペンタールやプロポフォール麻酔作用の機序はGABA<sub>A</sub>受容体の賦活作用であり、亜酸化窒素とは異なり、催眠作用は強いが鎮痛作用は弱い。また、同様に全身麻酔薬として古くから使用されてきたジエチルエーテルの誘導体であるハロゲン化炭化水素は強い催眠作用を持つが鎮痛作用は弱く、プロポフォールなどと同様にGABA<sub>A</sub>受容体を賦活すると考えられている。さらに、静脈麻酔薬であるケタミンは、NMDA受容体拮抗薬であり強い鎮痛作用を有する。以上のように、全身麻酔薬の催眠作用の機序は薬物によって様々であり、鎮痛作用も催眠作用と異なる神経経路に作用することによって生じている可能性がある。

近年、大麻の主成分であるカンナビノイドの受容体が脳内に存在することが明らかにされ、内因性のカンナビノイド受容体作動物質であるアナンダミドが発見された。アナンダミドは、向精神作用のほか、体温調節や記憶にも影響を及ぼし、鎮痛作用も有している。また、麻薬の鎮痛作用に対する急性耐性形成にもアナンダミドが関与し

ている。静脈麻酔薬プロポフォールをマウスに投与すると、脳内のアナンダミド含量が増加し、アナンダミド拮抗薬の投与によってプロポフォールの麻酔作用が減弱することが明らかにされている (Patel S, et al. The general anesthetic propofol increases brain N-arachidonyl-ethanolamine (anandamide) content and inhibits fatty acid amide hydrolase. Br J Pharmacol 139;1005-13,03)。この知見は、脳内アナンダミドが全身麻酔薬の催眠鎮静作用にも関与していることを示唆するものであり、脳内アナンダミドと他の全身麻酔薬の作用との関連を検討することが必要であるとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、各種全身麻酔薬投与時の脳内アナンダミド系の活動とアナンダミド受容体の拮抗薬投与による各種全身麻酔薬の催眠鎮静作用および鎮痛作用の変化を検討し、全身麻酔薬の催眠鎮静作用および鎮痛作用におけるアナンダミドの役割を明らかにしようとするものである。

## 3. 研究の方法

(1)雄性 Wistar ラットを用い、アナンダミドの中樞神経における主な受容体であるCB1受容体の選択的拮抗薬であるリモナバンを腹腔内、側脳室内、くも膜下腔内の3経路から投与し、全身麻酔薬亜酸化窒素N<sub>2</sub>Oの鎮痛効果の変化をTail Flick testで評価した。

リモナバン：リモナバンは生理食塩水:DMSO 1:1の溶媒で溶解した。

腹腔内投与：無麻酔下にリモナバンを腹腔内投与した。投与量はそれぞれ1mg/kg群(n=10)、5mg/kg(n=10)とした。対照として

生理食塩水(n=5)、DMSO 単独(n=5)を投与したラットで Tail Flick test を行った。

脳室内投与：ペントバルビタール麻酔下で、脳定位的に薬液投与量のガイドカニューラをラット側脳室に植え込んだ。12 時間以上の回復期の後、生理食塩水(n=5)および DMSO(n=5)を投与し、Tail Flick test を行い、Tail Flick test を行い対照値とした。1 週間以上間隔を空けて、小穴人事管理委員会ラットにリモナバン 10 µg を投与した。実験の後断頭を行い、脳をスライスし、カテーテル先端が脳室内に留置されていたことを確認した。

くも膜下腔内投与：ペントバルビタール麻酔下に、環椎後頭関節部の硬膜とくも膜を切開し、細径のカテーテルを、先端が腰膨大部に到達するように尾側へ 10cm 挿入した。カテーテルの位置確認のため 2% リドカインを 10 µl 投与し、下肢麻痺が出現することを確認した。2 週間の回復期の後、生理食塩水(n=5)、DMSO(n=5)を投与し、Tail Flick test を行い対照値とした。1 週間以上間隔をあけてリモナバンを投与した。

N<sub>2</sub>O の吸入：薬剤投与後 30 分から、ラットを 1 匹ずつ、両端をゴムで栓をしたアクリル製の筒の中に入れ、筒内を O<sub>2</sub> 25%、N<sub>2</sub>O 75% で満たした。N<sub>2</sub>O は 180 分投与した。

Tail Flick test：Tail Flick analgesia meter (Muromachi Kikai Co LTD) を用いた。ラット尾部に熱線をあて、熱線から尾が逃避するまでの時間を測定値とした。ビームの強さは、N<sub>2</sub>O 投与前の段階で、測定値が 3 ~ 4 秒になるように調整した。熱傷を予防するため 10 秒を cut off time とした。N<sub>2</sub>O 吸入直前から吸入終了後 30 分まで、30 分おきに 3 回測定し、その平均を求めた。N<sub>2</sub>O

吸入直前の測定値を baseline とし、以下の計算で、maximal possible effect (%MPE) として表した。

$$(N_2O \text{ 投与中の測定値} - \text{baseline}) / (\text{cut off time} - \text{baseline}) \times 100$$

統計処理：各群の比較は繰り返し測定に対する分散分析 (Two way repeated ANOVA) および、多重比較として Fisher's PLSD を用い、有意差を認めた群間の各測定値に対して、対応のない t 検定を行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

(2) 雄性 Wistar ラットを用い、全身麻酔薬 N<sub>2</sub>O 投与による脳内カンナビノイド CB1 受容体の発現量の変化を RT-PCR 法を以て検討した。

ラットを 1 匹ずつ、両端をゴムで栓をしたアクリル製の筒の中に入れ、筒内に O<sub>2</sub> 25%、N<sub>2</sub>O 75% を 1 L/分 で流した。N<sub>2</sub>O は 60 分(n=6)、120 分(n=6)、240 分(n=6) 吸入させた。対照として、高濃度の揮発性麻酔薬セボフルランの短時間吸入で入眠させたラット(n=6)を使用した。

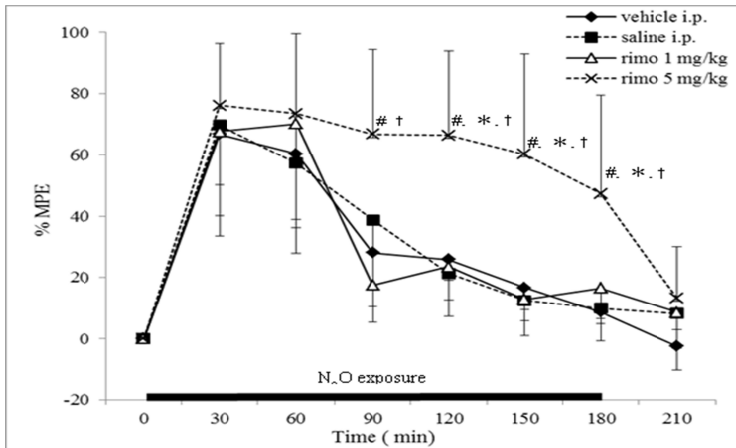
それぞれの麻酔薬投与後直ちに断頭し、ラットの脳を取り出し、大脳皮質(左右)、海馬、線条体、脳幹、小脳に切り分け各々の切片を凍結させ -80 °C で保存した。各切片 (3 mm × 3 mm × 3 mm 大の組織) から、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いてトータル RNA を抽出した。抽出したトータル RNA より High Capacity RNA-to-DNA Kit (Life technologies) を用いて cDNA を合成した。

得られた cDNA 200 µg を鋳型とし Power SYBR Green PCR Master Mix (Life technologies) を用いてリアルタイム PCR を行い、CB1 及び GAPDH 遺伝子発現量を

iQ5 リアルタイム PCR システムソフトウェア(Biorad)で解析を行った。

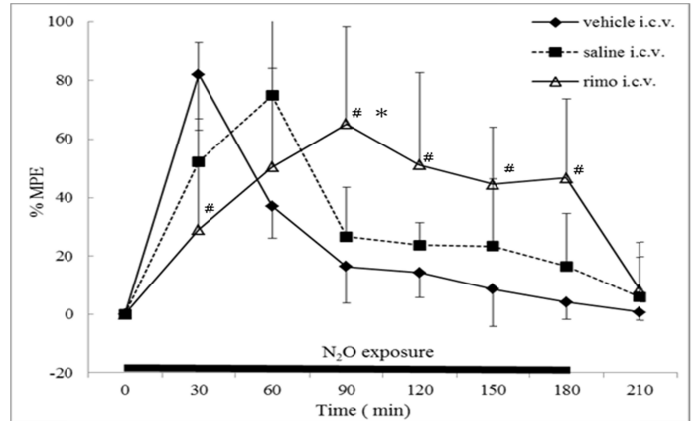
#### 4. 研究成果

(1)  $N_2O$  の鎮痛作用に及ぼすカンナビノイド CB1 受容体拮抗薬リモナバンの効果  
 腹腔内投与：%MPE は各群とも  $N_2O$  吸入30分で baseline から 50~60%上昇した。生食群、DMSO 群では 30 分で最大効果に達し、その後漸減したが、90 分まで baseline と有意差があった。1mg/kg 群でも 30~60 分で最大効果に達し、その後漸減して、90 分には baseline と有意差がなくなった。一方 5mg/kg 群では、30 分後の鎮痛効果発現からその後も baseline と有意差を持って鎮痛効果が持続した。群間を比較すると、生食群、DMSO 群、1mg/kg 群と 5mg/kg 群はそれぞれ 90~120 分で有意差があった。生食群、DMSO 群と 1mg/kg 群に有意差はなかった。

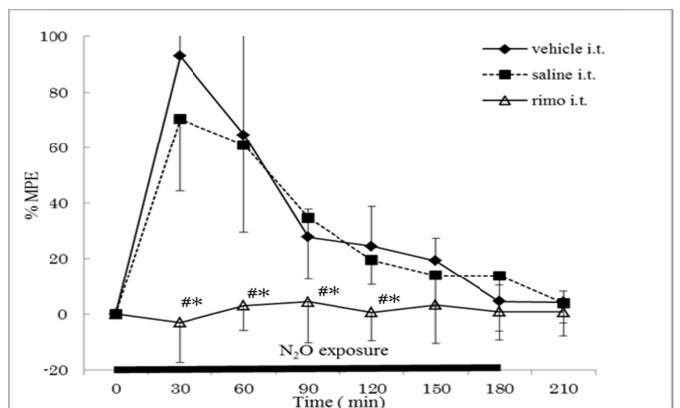


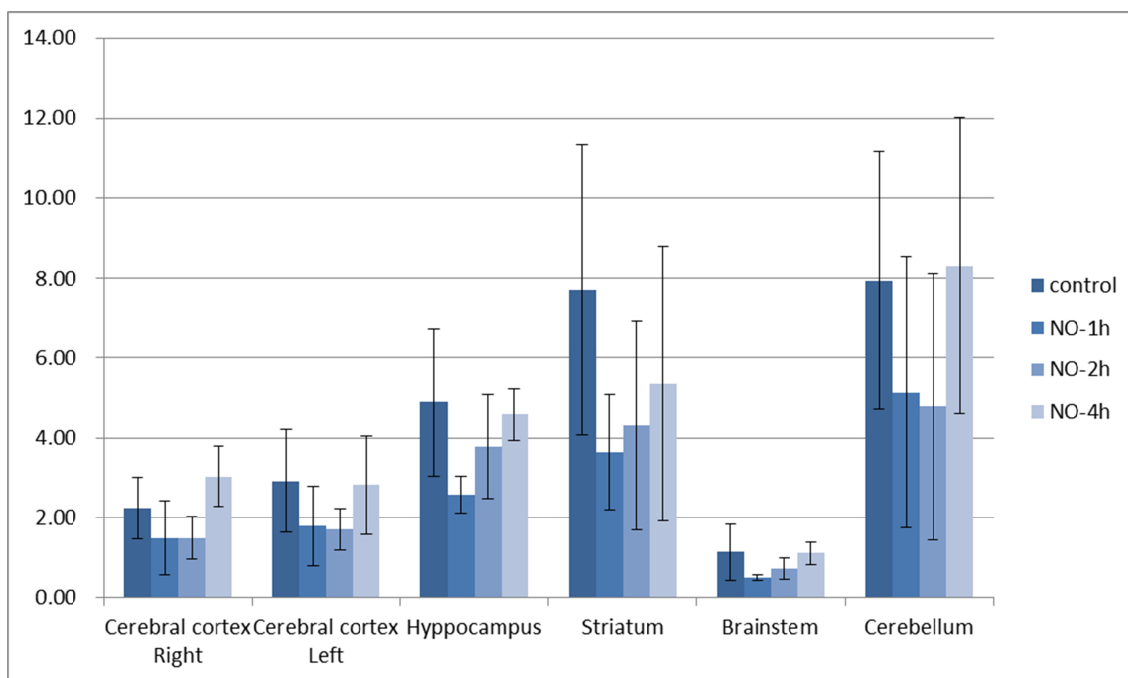
脳室内投与：生食群、DMSO 群では 60 分で最大効果に達した。リモナバン投与群では 90 分で最大効果に達した。生食群、DMSO 群ではその後漸減したが、150 分まで baseline と有意差があった。一方リモナバン投与群では  $N_2O$  吸入中は baseline と有意

差を持って鎮痛効果が持続した。群間を比較すると生食群、DMSO 群とリモナバン投与群に 60 分~180 分で有意差があった。



くも膜下腔投与：生食群、DMSO 群では 30 分で最大効果が出現し、baseline から 50% 増加した。その後漸減し、120 分には Baseline と有意差はなかった。一方リモナバン投与群では 150 分で最大効果に達し、Baseline から 15% 増加した。150 分の時点で Baseline と有意差があった。群間を比較すると、生食群、DMSO 群とリモナバン投与群で 30 分~120 分で有意差があった。





(2)  $N_2O$  投与の有無に関わらず、全ての処理区で海馬、線条体、小脳に CB1 受容体の発現量が多かった。この CB1 受容体発現様式は過去の報告とも一致していた。大脳皮質、海馬、線条体、小脳で 120 分間  $N_2O$  を投与すると、対照に比べ有意に発現量の低下がみられた ( $t$  検定  $p < 0.05$ )。また、240 分間  $N_2O$  を投与したものでは、各部位の CB1 受容体発現量が対照の発現量に近づいた。

CB1 受容体はリガンドに長く暴露されると脱感作が起きることや発現量が低下することが知られている。今回の結果から、 $N_2O$  の吸入によって CB1 受容体発現量の低下が生じることと、時間の経過とともにその影響が減じる可能性が示唆された。これは、 $N_2O$  自体がカンナビノイド様作用を示す、あるいは内因性カンナビノイドの作用を増強させる働きがあることを示している。

一方、腹腔内、脳室内への CB1 受容体拮抗薬リモナバン投与では、それぞれの対照

群と比較し、 $N_2O$  の鎮痛効果について有意差はなかった。これは、全身、または脊髄上へのリモナバン投与が  $N_2O$  の鎮痛効果に対し、影響を与えないことを示している。しかし、くも膜下腔投与では、 $N_2O$  の鎮痛効果が出現しなかった。つまり、リモナバンのくも膜下腔投与で、 $N_2O$  の鎮痛効果が拮抗される可能性を示している。

$N_2O$  は主に、中脳中心灰白質において内因性オピオイドペプチドを放出し、GABA 作動性ニューロンを抑制することで下行性ノルアドレナリン作動性抑制系を活性化すると考えられている。また、 $N_2O$  の麻酔作用は、NMDA 受容体の拮抗が関与するとの報告もある。一方内因性カンナビノイドの鎮痛効果については、様々な報告があり、後根神経節、脊髄後角、中脳中心灰白質(PAG)や吻側延髄内側部(RVM)で、カンナビノイドが疼痛の情報伝達を抑制するといわれている。また、下行性抑制系の活性化も関与するといわれている。脊髄レベルでのカンナビノイ

ドの鎮痛効果には、NMDA 受容体が関与するともいわれる。マウスのくも膜下にリモナバンを投与した研究では、熱刺激に対し反応時間の短縮を認め、またその効果は、NMDA 受容体作動薬の投与により、容量依存的に阻害された。この反応時間短縮効果は短く、リモナバン投与後 20 分以内に消失した。この研究では脊髄レベルでのカンナビノイド系の不活化が、NMDA 関連の痛覚過敏を引き起こす可能性がある」と結論付けている。また、脊髄レベルでのカンナビノイド系の活性化は、NMDA 関連の痛覚過敏や疼痛を抑制する可能性を示している。このように、N<sub>2</sub>O とカンナビノイド系の脊髄レベルでの鎮痛効果は、類似する点が多い。

次に、N<sub>2</sub>O の鎮痛効果に対する急性耐性だが、高用量のリモナバンの全身投与により、N<sub>2</sub>O の鎮痛効果に対する急性耐性形成が阻害された。また、脳室内リモナバン投与でも腹腔内投与と同様の結果が得られた。ラットを用いた、種の違いによる N<sub>2</sub>O に対する急性耐性を検討した研究では、Fischer ラットでは強い鎮痛効果が出現し、急性耐性を生じなかった。一方 Lewis ラットでは N<sub>2</sub>O による鎮痛効果は出現しなかった。この 2 種類のラットは、アルコールやコカインなどの依存性を形成する研究においても違いがあり、さらに Lewis ラットは Fischer ラットより脳内の内因性オピオイドペプチドの基礎量が少なく、モルヒネ投与によっても、Fischer ラットと比較し、内因性オピオイドペプチドの増加作用が弱かった。そしてこの脳内内因性オピオイドペプチドの減少が、急性耐性の出現に関与していると推測している。この内因性オピオイドペプチドの減少に、CB1 受容体が関与する可

能性がある。オピオイド受容体とカンナビノイド受容体の相互作用については様々な報告がある。ラットの側座核でオピオイド受容体とカンナビノイド受容体の相互作用を調べた研究では、ナロキソンは μ オピオイド受容体を拮抗するのはもちろん、CB1 受容体でリモナバンの拮抗作用をさらに拮抗し、リモナバンも同様、CB1 受容体拮抗と共に、ナロキシソンの作用も打ち消していた。CB1 受容体とオピオイド受容体のアロステリック効果が認められた。この効果が、側座核のみならず、他の部位にも共通ならば、リモナバン投与によって、CB1 受容体は拮抗されるが、内因性オピオイド受容体が活性化されるため、急性耐性が出現しなかったのかもしれない。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕ホームページ等  
なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

村川雅洋(Murakawa Masahiro)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90182112