

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32644
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24592359
研究課題名(和文) 吸入麻酔薬セボフルランの鎮痛作用に関する研究

研究課題名(英文) The antinociceptive effect of sevoflurane

研究代表者

金澤 正浩 (KANAZAWA, Masahiro)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：60276847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラット髄腔内に投与されたセボフルラン原液は、用量依存的(0.2～10 μ l)に抗侵害作用を示した(ED50: 0.7 μ l)。なお、投与前にbeam-balance testを施行したが、運動失調は認められなかった。全身麻酔中(1MAC)のラットにおける脳脊髄液(CSF)中セボフルラン濃度は0.9 mMであった。セボフルランを気化器にて気化させ、2.6 mMの人工脳脊髄液(CSF内最終濃度は推定約 0.26 mM)をラット髄腔内に投与した結果、投与後60分にわたり鎮痛効果が現れた。なお、投与前にbeam-balance testを施行したが、運動失調は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Intrathecal administration of sevoflurane induced dose-dependently (0.2-10 μ l) antinociceptive effects using tail flick test (ED50: 0.7 microlitter). The contents of sevoflurane was 0.9 mM in the cerebral spinal fluids of rats under sevoflurane anesthesia (1 MAC). The artificial cerebral spinal fluids containing sevoflurane (2.6 mM) induced antinociceptive effects, but not motor dysfunction.

研究分野：麻酔科学

キーワード：セボフルラン 鎮痛効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 揮発性吸入麻酔薬は鎮痛作用を示す

Fernandez らはイヌの髄腔内にセボフルラン液を投与した結果、鎮痛効果を示すことを報告している (Fernandez et al, 2005, Br J Anesthesiology)。揮発性吸入麻酔薬のひとつであるセボフルランが逃避行動と侵害受容を伝達するラット脊髄後角での Fos の発現を抑制し、この結果は侵害刺激伝達を抑制している可能性を示唆している。この作用の一部は少なくともオピオイド受容体を介していると報告されている (Hao S et al, 2002, Life Sciences)。脊髄パッチクランプ法により、セボフルランが臨床濃度でラット脊髄後角介在ニューロンの抑制系シナプス伝達を増強することにより脊髄レベルでの鎮痛作用を有することが示唆された (高橋亜矢子他、2003, 第21回麻酔メカニズム研究会)。また、セボフルランが脊髄の NMDA 受容体活性を低下させることで鎮痛効果を生じていることが示唆された (Matute E, 2003, Neuropharmacology)。

(2) 揮発性吸入麻酔薬は鎮痛作用を示さない

従来行われていた揮発性吸入麻酔薬単独による麻酔管理では、手術侵害刺激による血圧や心拍数の上昇に対して吸入濃度を上げて対処していた。しかし近年では吸入濃度上昇による循環動態の抑制は吸入麻酔薬の鎮痛作用ではなく、それは単に血管拡張や心収縮力の抑制による結果であり、揮発性吸入麻酔薬の鎮痛作用は弱いと認識されている。さらに、揮発性吸入麻酔薬の最小肺泡濃度 (MAC) の概念である体動の抑制は、脊髄後角からの侵害刺激が前角からの運動ニューロンを抑制する (脊髄反射の抑制) 結果であって、侵害刺激自体の有意な抑制ではないと考えられている (Antognini JF et al, 1998, Anesthesiology)。

以上のことから、揮発性吸入麻酔薬の鎮痛作用を明らかにするには運動神経を抑制しない条件下で直接的にセボフルランを髄腔内投与することによって薬理的解析を行う必要がある。

2. 研究の目的

動物を用いた実験で揮発性吸入麻酔薬セボフルランが、脊髄のオピオイド受容体の機能亢進あるいは N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体の機能減弱により、鎮痛作用を現すとの報告がある。しかし、揮発性麻酔薬の鎮痛効果は運動ニューロンを抑制するために逃避行動ができない結果であり侵害刺激に対する鎮痛効果ではない、との報告があり不明な点が多い。本研究では、運動ニューロンを抑制しない条件のもとでセボフルランの鎮痛効果、およびその作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

セボフルランの鎮痛効果の解析

(1) カテーテル挿入 (金澤、吉川)

ラットを全身麻酔し、ポリエチレンチューブ (PE10) を環椎後頭骨間から髄腔内に髄腔膨大部まで挿入する。1週間後に運動機能の正常なラットのみ実験に供する。

(2) 鎮痛試験 (金澤)

熱刺激: ラットを 52 のホットプレート上にのせ後肢足底に刺激を与え、逃避までの潜時を測定する。

手術後痛モデル: ラットの後肢足底の 1cm の長さで筋膜まで切開、筋肉を剥離し、皮膚を 5-0 ナイロン糸にて 2カ所マツレス縫合する。

炎症性刺激: ラットの後肢皮下に 5%ホルマリン (50 μ l) を注射し、flinch 数 (逃避行動) を測定する。

(3) 運動神経の抑制評価 (Balance Beam 試験) (金澤)

セボフルラン髄腔内投与による鎮痛効果が運動ニューロンの抑制によらないことを確認するために行う。直径 3.5cm 長さ 30cm の平均台にラットを乗せ、落下までの時間を測定する。

(4) セボフルラン濃度の定量 (吉川)

投与する人工脳脊髄液 (ACSF) 中のセボフルラン濃度、及び投与後の脳脊髄液中のセボフルラン濃度をガスクロマトグラフィー (GC-2010 Plus, 島津製作所) を用いてヘッドスペース法により行う。検出には炎光光度検出器 (FPD-2010) を用いる。

(5) mRNA 量の定量 (吉川)

定量的リアルタイム RT-PCR 法により、mRNA の発現量の解析を行う。リアルタイム PCR は、DyNAmo SYBER Green qPCR Kit (Finnzyme 社) を用い、DNA Engine Opticon 2 System (BioRad 社) で行う。各遺伝子に特異的なプライマーの配列および PCR の増幅条件などは予備実験により決定済みである。

(6) タンパク質量の定量 (金澤)

タンパク質量の解析は Western Blot 法により行う。ECL Plus Western Blotting System を用いて化学発光法により検出する。CCD camera system (Cool Saver : ATTO Corporation) により画像を取り込み、CS Analyzer (ATTO Corporation) を用いてバンド強度を定量する。Western blot の条件などは予備実験により決定済みである。

(7) -セリン濃度の定量 (吉川)

D セリン濃度の測定は HPLC 法で行う。すなわち、各脳部位をトリクロロ酢酸で抽出する。抽出したサンプルに o-phthalaldehyde と N-tert-butylloxycarbonyl-L-cysteine を加えて蛍光誘導体化反応を行い、Nova-Pak C18 (3.9 mm i.d. X 300 mm : Waters 社) により分離し、検出には 530 nm の蛍光

発光 (励起波長 470 nm)を用いる。

(8) In situ hybridization (ISH) (吉川) 申請者らは、ISH による検出方法を確立している (Yoshikawa et al, 2007b)。本方法に従い ISH を行う。すなわち、T7 RNA polymerase によりリボプローブを作成する。DIG-RNA プローブをホースラディッシュパーオキシダーゼ (HRP) 標識抗 DIG 抗体と反応させる。tyramide signal amplification (TSA) 増感法によりビオチン化チラミドを加えてパーオキシダーゼによりチラミドをラジカル化させて、近傍の組織と共有結合により多数のビオチン分子を局所に固定する。固定化されたビオチンに対してアビジン-HRP 複合体を結合させ、DAB を基質とした呈色反応で検出する。

(9) 免疫組織化学 (IHC) (金澤)

ISH と同様に TSA 増感による IHC を用いる。一次抗体は、Western Blot 法で用いた抗体と同様のものを用いる。HRP 標識抗マウス、あるいは抗ヤギ抗体を 2 次抗体として用いて、ビオチン化チラミドを加えてパーオキシダーゼによりチラミドをラジカル化させる。アビジン-HRP 複合体を結合させ、DAB を基質とした呈色反応で検出する。

4. 研究成果

(1) セボフルラン原液髄腔内投与後に鎮痛効果

セボフルラン原液を溶解した ACSF 中のセボフルラン濃度をガスクロマトグラフィー (GC) にて定量後、髄腔内に投与し鎮痛効果を解析した。Wistar 系雄性ラット (200-250g) の髄液量は約 90-120 μ l である。仮にセボフルランが水系に完全に溶解し CSF 量が 90 μ l とすると、先行研究の最大投与量 10 μ l の髄腔内投与によって (10% v/v) CSF 中のセボフルラン濃度は約 800 mM となった。ラット髄腔内に投与されたセボフルラン原液は、用量依存的 (0.2 ~ 10 μ l) に抗侵害作用を示した (ED50: 0.7 μ l)。なお、投与前に beam-balance test を施行したが、運動失調は認められなかった。

(2) 全身麻酔中(1MAC)のラットにおける脳脊髄液(CSF)中セボフルラン濃度の測定

全身麻酔開始から 30 分後に環椎後頭骨間の硬膜を切開し漏出した髄液をシリンジで吸引採取した。検体をキャップ付きバイアル瓶に入れ、ヘッドスペース法によるガスクロマトグラフィー (GC) で測定 (n=11) した結果、182.9 \pm 7.8 μ g/ml (Mean \pm SEM) すなわち 0.9 mM であった。

(3) セボフルランをバブリングした人工脳脊髄液(ACSF)を投与後の鎮痛効果

セボフルランを気化器にて気化させ、37 $^{\circ}$ C で 90 分間バブリングさせた ACSF 中のセボフルラン濃度を GC にて定量した結果、532.9 μ g/ml すなわち約 2.6 mM であった。本溶液 10 μ l をラット (体重 200-250g) 髄腔

内に投与すると CSF 内最終濃度は推定約 0.26 mM である。投与後 60 分にわたり鎮痛効果が現れた。なお、投与前に beam-balance test を施行したが、運動失調は認められなかった。

(4) 全身麻酔中(1MAC)ラットにおける D-セリン量、D-セリン代謝関連酵素発現

1MAC 麻酔で 1 時間後のラット脳内 D-セリン量を測定した結果、前脳部において有意に増加した。また、D-セリン合成酵素 (セリンラセマーゼ) 遺伝子、D-セリン分解酵素 (D-アミノ酸酸化酵素) 遺伝子発現も増加した。

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 10 件)

1. Kanazawa M, Watanabe M, Suzuki T. Yellowing of desflurane in the vaporizer. J. Anesthesia 2015 Epub ahead
2. Ajimi J, Yoshikawa M, Takahashi S, Miura M, Tsukamoto H, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Effect of three peptidase inhibitors on antinociceptive potential and toxicity with intracerebroventricular administration of dynorphin A (1-17) or (1-13) in rat. J. Anesthesia 2015, 29(1), 65-77
3. Murata T, Yoshikawa M, Watanabe M, Takahashi S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Potentiation of [Met5]enkephalin-induced antinociception by mixture of three peptidase inhibitors in rat. J. Anesthesia 2014, 28(5), 708-715
4. Ito M, Yoshikawa M, Ito K, Matsuda M, Jin X.L., Takahashi S, Kobayashi H, Suzuki T. Antinociceptive effect of intracerebroventricular administration of d-serine on formalin-induced pain. J. Anesthesia 2014, 28(2), 228-234
5. Miura, M, Yoshikawa M, Watanabe M, Takahashi S, Ajimi J, Ito K, Ito M, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Increase in antinociceptive effect of [Leu5]enkephalin after intrathecal administration of mixture of three peptidase inhibitors. Tokai J Exp Clin Med 2013, 38 (2), 62-70.
6. Okubo M, Yoshikawa M, Shinomiya T, Kawaguchi M. Methamphetamine-withdrawal stress activates PACAP-DBI pathway in rat salivary gland, resulting in

- inhibition of salivary secretion. Tokai J Exp Clin Med 2013, 38 (2), 55-61.
7. Takeda J, Namiki A, Ozaki M, Fukuda K, Morita K, Kanmura Y, Yamakage M, Komatsu T, Inada E, Kawate R, Kanazawa M, Sakamoto A, Uezono S, Sato S, Nishiwaki K, Miyamoto Y, Nakatsuka H, Yasuda N. A prospective randomized multicenter comparative study of BLM-240 (desflurane) versus sevoflurane in Japanese patients. J. Anesthesia, 2013, 27(3), 468-71.
 8. Cotrim P. A*, Yoshikawa M*, Sunshine N. A, Zheng C, Sowers L. A, Thetford D. A, Cook J. A, Mitchell B. J, Baum J. B. Pharmacological protection from radiation- and chemoradiation-induced oral mucositis. International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics 2012, 83 (4), 1284-1290, *These authors contributed equally to this work.
 9. Ando S, Kanazawa M, Tsuda M, Suzuki T. Effects of intravenous amino acids on anesthesia-induced hypothermia in ovariectomized rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2012;58(2):143-8.
 10. 成田湖筈, 金澤正浩, 鉄周平, 安藤智子, 福山東雄, 鈴木利保. 麻酔導入時に冠動脈攣縮で発症したロクロニウムによるアナフィラキシーショック(Kounis 症候群)の 1 例. 日本臨床麻酔学会誌, 2012, 32 (7), 923-928.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 渡邊真理子, 金澤正浩, 鈴木利保. 超高齢者の腹部緊急手術における周術期リスク評価～E-PASS scoring system の有用性. 日本臨床麻酔学会第 34 回大会. 2014 年 11 月 1 日 グランドプリンスホテル新高輪 (東京都・港区)
2. Masanobu Yoshikawa, Miho Ito, Kenji Ito, Xing Lu Jin, Shigeru Takahashi, Hiroyuki Kobayashi, Toshiyasu Suzuki. ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF INTRACEREBROVENTRICULAR ADMINISTRATION OF D-SERINE ON THERMAL- OR FORMALIN-INDUCED PAIN. The 2nd International Conference of D-amino Acid Research. 2014 年 09 月 2 日 栃木県総合文化センター (栃木県・宇都宮市)
3. Masanobu Yoshikawa, Chieko Murayama, Ana P. Cotrim, Ryuichi Hirayama, Hideo Tsukada, Yoshiya Furusawa, Bruce J. Baum. D-METHIONINE AS A PROTECTOR FOR IRRADIATION-INDUCED ORAL MUCOSITIS OR SALIVARY GLANDS

HYPOFUNCTION. The 2nd International Conference of D-amino Acid Research. 2014 年 09 月 3 日 栃木県総合文化センター (栃木県・宇都宮市)

4. Masanobu Yoshikawa, Migiwa Okubo, Yurika Miyoshi, Kenji Hamase, Ryuichi Konno, Mitsuru Kawaguchi. D-AMINO ACID AS A PROMOTER FOR SALIVATION. The 2nd International Conference of D-amino Acid Research. 2014 年 09 月 4 日 栃木県総合文化センター (栃木県・宇都宮市)
5. 金澤正浩, 鈴木利保. 全身麻酔導入前の短時間加温が中枢温に及ぼす影響. 日本麻酔科学会第 61 回学術集会. 2014 年 05 月 15 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
6. 吉川正信, 大久保みぎわ, 三次百合香, 濱瀬健司, 村山千恵子, 金野柳一, 小林 広幸, 川口充. D-アミノ酸と唾液腺. 第 87 回日本薬理学会日本薬理学会年会. 2014 年 03 月 19 日 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
7. 金澤正浩. 周術期体温管理における連続測定型耳式体温計の有用性. 日本麻酔科学会第 60 回学術集会. 2013 年 05 月 24 日 ロイトン札幌 (北海道・札幌)
8. 金澤正浩, 鈴木利保. ラット卵巣摘出モデルを用いた全身麻酔中の体温低下に対するアミノ酸輸液とエストロゲンの効果の検討. 第 59 回日本麻酔科学会学術集会. 2012 年 06 月 7 日 神戸ポートピアホテル (兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金澤 正浩 (KANAZAWA, Masahiro)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号: 60276847

(2) 研究分担者

吉川 正信 (YOSHIKAWA, Masanobu)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号: 90276791