

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791609

研究課題名(和文) 麻酔薬の耐性とカンナビノイド関連薬剤

研究課題名(英文) The relationship between the tolerance to several anesthetics to Cannabinoids.

研究代表者

箱崎 貴大 (Takahiro, Hakozaki)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60595429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：亜酸化窒素投与によるラット脳CB1受容体遺伝子発現量をRT-PCR法で測定した結果、線条体におけるCB1受容体遺伝子の発現が減少した。CB1受容体はProtein kinase C(PKC)を活性化するGs蛋白に共役する可能性があり、亜酸化窒素の吸入でCB1受容体が減少し、PKC活性や急性耐性形成に関与することが示唆された。セボフルラン(Sev)投与ラットの鎮静作用の変化をロータロッド試験で観察した。今回の研究ではSevの鎮静作用に対する急性耐性形成は確認できなかった。ロータロッド試験は脊髄での無動化作用を観察していると考えられ、その作用は長時間のSev投与でも変化しないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：RT-PCR assays demonstrated that cannabinoid CB1 receptor gene expression in the rat brain striatum was reduced by nitrous oxide inhalation. Although the relationship between CB1 receptor reduction in the striatum and nociception is still unclear, this result suggests that CB1 receptors are reduced by nitrous oxide inhalation, and this reduction of CB1 receptors is involved in acute tolerance and PKC activity.

The tolerance to anesthetic effect of sevoflurane, there is a possibility that tolerance to anesthetic effect is formed in 60 min in the brain EEG activity, did not develop by 270 min inhalation in the motor behavioral assessment by the rotarod test. The rotarod test can observe immobilization effect in the spinal level, and this effect did not change in relatively long time sevoflurane inhalation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：全身麻酔薬 亜酸化窒素 急性耐性 カンナビノイド受容体 鎮痛作用 吸入麻酔薬

## 1. 研究開始当初の背景

現在臨床使用されている麻酔薬の中には、連用投与によりその鎮静作用や鎮痛作用に耐性を形成することが临床上、動物実験双方で報告されているものがある。古くから臨床使用されている吸入麻酔薬である亜酸化窒素は、比較的短時間でその鎮痛作用に対する耐性が形成される。他の吸入麻酔薬では、その鎮静作用に対する急性耐性が確認できるといった報告と、確認できないといった報告の双方があり、結論は不明である。

全身麻酔薬の作用に対する耐性形成のメカニズムはいまだ明らかでない点が多いが、亜酸化窒素の鎮痛作用に対する急性耐性のメカニズムとして、1)亜酸化窒素によって放出された脳内内因性オピオイドペプチドの枯渇 (Enkephalinase inhibition prevented tolerance to nitrous oxide analgesia in rats. Ruprecht J, et al. Acta Anaesthesiol Scand. 1984 Dec;28(6):617-202)。脳内 PKC 増加が仮説として報告されている (Involvement of brain protein kinase C in nitrous oxide-induced antinociception in mice. Ishikawa M et al. Neuroscience. 2006 Jun 19;140(1):227-33)。

下の図はラットにおける亜酸化窒素の鎮痛作用の種差を示した論文から抜粋した (Strain differences in the antinociceptive effect of nitrous oxide on the tail flick test in rats.

Fender C et al. Anesth Analg. 2000 Jan;90(1):195-9)

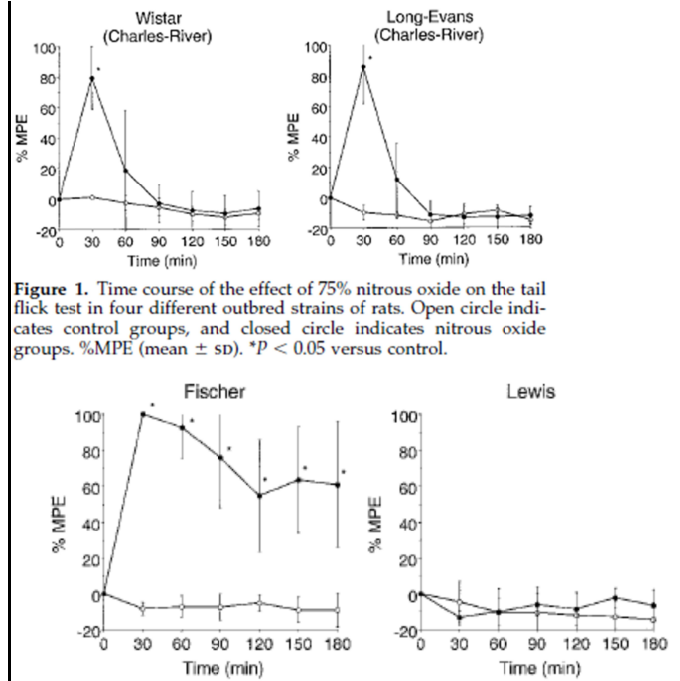


Figure 1. Time course of the effect of 75% nitrous oxide on the tail flick test in four different outbred strains of rats. Open circle indicates control groups, and closed circle indicates nitrous oxide groups. %MPE (mean  $\pm$  SD). \* $P < 0.05$  versus control.

Lewis 種では鎮痛作用が見られず、Fischer 種では鎮痛作用が強く発現する。Wistar 種では鎮痛作用は発現するが急性耐性を形成することが示されている。

一方、プロポフォールの鎮静作用に対する耐性形成はウサギによるモデルが確立されている。(Tolerance to propofol's sedative effect in mechanically ventilated Rabbits Ypsilantis P et al. Anesth Analg. 2006 Aug;103(2):359-65)。この論文では投与後 5 - 6 時間で血中濃度の上昇を伴う耐性が認められているが、我々のラットによる予備実験では投与後 3 時間程度で角膜反射が現れるなど明らかな耐性形成を観察している。

我々はこれまでの研究で、カンナビノイド受容体拮抗薬の腹腔内投与が亜酸化窒素の鎮痛作用に対する急性耐性形成を阻害する可能性を指摘した。(図 1)

図 1 結果 腹腔内投与

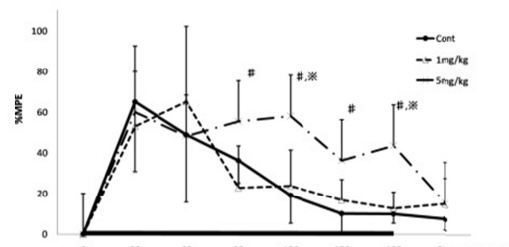


Fig1.  $N_2O$  の鎮痛効果を tail flick test で評価した。ラットにそれぞれ異なる量の rimobant を腹腔内投与した。Control では 30 分後に最大効果が出現し、90 分まで baseline と有意差を認めず。1mg/kg も Control と同様であったが、5mg/kg 群で鎮痛効果が持続した。#、※  $P < 0.05$  Control vs 5mg/kg, 1mg/kg vs 5mg/kg。

また、プロポフォールは脳内の GABA<sub>A</sub> 受容体を賦活することでその作用を発揮すると考えられていたが、近年の報告でプロポフォールの投与により、内因性カンナビノイドであるアナンダマイドが脳内で増加することが報告された (The general anesthetic propofol increases brain N-arachidonyl ethanolamine (anandamide) content and inhibits fatty acid amide hydrolase. Patel S et al. Br J Pharmacol 2003;139:1005-13)。

この効果はプロポフォールがアナンダマイドの代謝酵素である FAAH を阻害することで起きていると考えられている。また、カンナビノイド作動薬である

Delta9-tetrahydrocannabinol の投与により、プロポフォールの作用が阻害されるという報告もある (Propofol sedation is reduced by delta9-tetrahydrocannabinol in mice. Brand PA et al. Anesth Analg 2008;107:102-6)。さらに、内因性カンナビノイドがプロポフォール投与後の記憶にも関与すると報告されている (Propofol enhances memory formation via an interaction with the endocannabinoid system. Hauer D et al. Anesthesiology. 2011 Jun;114(6):1380-8)。

一方、吸入麻酔薬であるセボフルランの投与で、内因性カンナビノイドは速やかに減少することが報告されている (Effects of general anesthesia on anandamide blood levels in humans. Schelling G et al. Anesthesiology. 2006; 104: 273-7)。これらの研究結果から、内因性カンナビノイドが全身麻酔薬の種々の作用に関連していることは明らかであり、内因性カンナビノイドと全身麻酔薬の関連を研究することが、急性耐性形成機構の解明につ

ながるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

(1) 亜酸化窒素の鎮痛作用に対する急性耐性形成のメカニズム：亜酸化窒素の鎮痛作用に対する急性耐性形成をカンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である rimonabant の脳室内投与で拮抗することができた。この急性耐性形成に、実際に内因性カンナビノイドが関与しているかを確認するために、亜酸化窒素投与時の脳内での内因性カンナビノイド作用分子の発現を観察した。

(2) プロポフォール、セボフルランの鎮静作用に対する急性耐性のラットにおける基礎的研究：ラットにおいて、プロポフォール持続投与によって、その鎮静作用に対して耐性が形成されるかは不明である。そのため、プロポフォールの鎮静作用に対する急性耐性の動物モデルを、ラットを用いて作成する予定であったが、薬物投与ラインの不具合が多く、実験が遂行できなかった。また、セボフルランの長期投与によって鎮静作用に耐性が形成されるかは不明である。そのため、セボフルラン投与によって、その鎮静作用に耐性が形成されるかを観察した。

## 3. 研究の方法

(1) 亜酸化窒素の鎮痛作用に対する急性耐性形成のメカニズム：本研究では、亜酸化窒素の投与によって、CB<sub>1</sub> 受容体発現量に変化を認めるかを、PCR 法で確認した。雄性 Wistar ラットを用いた。セボフルランを 1 分間投与したラットをコントロールとした。ラットに 75% 亜酸化窒素を 60、120、240 分投与した後に断頭し脳を取り

出し、速やかに大脳皮質、小脳、海馬、線条体、脳幹の 5 部位に分割した。リアルタイム PCR 法で CB1 受容体遺伝子の発現量を測定した。

統計処理：測定値は CB1 受容体発現量とグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ発現量の差を取り、その平均値 ± 標準偏差で表した。統計処理は t 検定を用い、 $P < 0.05$  を有意とした。

- (2) プロポフォール、セボフルランの鎮静作用に対する急性耐性のラットにおける基礎的研究：今回のもう一方の研究では、セボフルラン投与によって、鎮静作用に対して耐性が形成されるかを検討した。

雄性 Wistar ラット ( $n = 6$ ) にロータロッド試験を行い、落下するまでの時間を測定した。ロータロッド試験は、学習効果も観察されるため、その効果を最小限にするため、1 週間連日ロータロッドを行ってから試験を行った。回転数は初速 4 rpm で開始し、60 秒後に 11.2 rpm となるよう設定した。60 秒をカットオフとした。30 分毎に 1 回ずつ測定を行い、300 分まで観察した。麻酔薬を投与せず、コントロール値を測定したのち、セボフルランを投与した。セボフルランは酸素 5 l/min, 空気 6 l/min, セボフルラン 0.6 % を、ラットをいれる密閉された容器と、ロータロッドの入るアクリル製の密閉容器に投与した。酸素濃度とセボフルラン濃度はガスモニターで持続的に測定し、セボフルラン濃度が 0.5 ~ 0.6% になるようにした。270 分の測定の後、セボフルランを 0 % として、300 分の測定を行った。

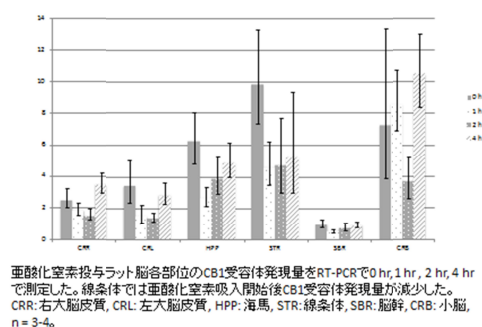
統計処理：測定値はそれぞれのコントロー

ル値を 100 % とした百分率とし、各測定時間での平均値 ± 標準偏差で表した。統計処理は反復測定による分散分析を行い多重比較は Turkey 法を用い、 $P < 0.02$  を有意とした。

#### 4. 研究成果

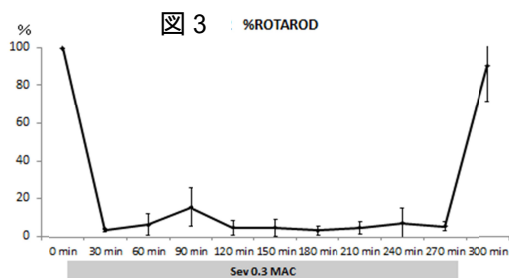
- (1) 亜酸化窒素の鎮痛作用に対する急性耐性形成のメカニズム(図 2)：亜酸化窒素の投与によって、コントロールと比較し、線条体における CB1 受容体遺伝子の発現量が減少する傾向が確認された。近年、PKC 阻害薬を脳室内投与すると、マウスにおける亜酸化窒素の鎮痛作用に対する耐性形成が阻止されることが報告された。CB1 受容体は PKC を活性化する Gs タンパクに共益している可能性があり、今回の結果は、線条体における変化が鎮痛作用とどのように関連しているかは不明であるが、亜酸化窒素の吸入によって CB1 受容体が減少し、PKC 活性や急性耐性形成に関与していることを示唆した。

図 2 CB1 ラット脳各部位の CB1 受容体発現量



- (2) プロポフォール、セボフルランの鎮静作用に対する急性耐性のラットにおける基礎的研究(図 3)：セボフルランの吸入によってロータロッド試験の測定値はコントロール値と有意差を持って低下した

(3.6 ~ 16 %)。その効果はセボフルラン吸入中変化しなかった。セボフルラン吸入中止で速やかに測定値は上昇し、コントロール値と有意差を認めなかった。



%ロータロッド 30~270分で0分と有意差あり。反復測定による分散分析。多重比較としてTurkeyを使用。P < 0.02で有意差あり。n = 6

即ち、ラットに 270 分のセボフルラン吸入を行ったが、ロータロッド試験からは耐性形成は確認できなかった。デスフルランを用いた過去の報告 (The cerebral Functional, Metabolic, and Hemodynamic Effects of Desflurane in Dogs. Lutz JL et al. Anesthesiology 73: 125-131, 1990) では、30 分で脳波上鎮静効果の減弱、即ち耐性形成を確認しているが、今回セボフルランではそのような効果を確認することはできなかった。揮発性麻酔薬は、脳及び脊髄に効果を発揮することが知られている。今回脳波は測定しなかったが、過去の報告のように脳波では鎮静効果の減弱が現れた可能性は否定できない。今回のように運動機能を評価する方法で鎮静レベルを評価すると、脊髄レベルでの無動化作用が持続していれば、脳での鎮静効果に対し耐性が形成されていてもそれを確認することはできなかった。今後の課題として、脳の鎮静状態の指標として脳波を、脊髄での電気活動抑制の指標として運動誘発電位を経時的に記録し、吸入麻酔薬の鎮静効果に対する耐

性形成を確認したい。

## 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)

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  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

箱崎 貴大 (Hakozaki Takahiro)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：60595429

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：