

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670671

研究課題名(和文) 麻酔薬の鎮痛作用におけるダイノルフィンとノシセプチンの役割の解明

研究課題名(英文) Roles of dynorphin and nociceptin in the analgesic action of anesthetics

研究代表者

福田 和彦 (Fukuda, Kazuhiko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90199224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：亜酸化窒素の鎮痛作用にオピオイド受容体が関与することは従来報告されていたが、どのオピオイド受容体が関与するかは明らかではなかった。本研究では、オピオイド受容体欠損マウスにおける亜酸化窒素の作用を検討した。亜酸化窒素の鎮痛作用を酢酸ライジング試験、ホットプレート試験により検討した結果、いずれの方法においてもオピオイド受容体欠損マウスでは亜酸化窒素の鎮痛作用がほとんど消失していた。一方、亜酸化窒素の鎮静作用はオピオイド受容体欠損マウスでも変化がなかった。以上の結果は、亜酸化窒素の鎮痛作用はオピオイド受容体を介すること、鎮静作用は別の機序によることを示している。

研究成果の概要(英文)：It has been previously reported that the opioid receptor is involved in the analgesic action of nitrous oxide, but it has not been clarified which type of the opioid receptor is involved. In this study, we have analyzed the pharmacological action of nitrous oxide in the kappa-opioid receptor (KOP)-knockout mice. The analgesic action of nitrous oxide was analyzed by acetic acid writhing test and hot-plate test, and was shown to be abolished in KOP-knockout mice. In contrast, the hypnotic action of nitrous oxide was not significantly different between the KOP-knockout mice and the wild-type mice. These results suggest that the analgesic action of nitrous oxide is mediated by KOP and that its hypnotic action is mediated by the other mechanism.

研究分野：麻酔科学

キーワード：亜酸化窒素 オピオイド受容体 鎮痛 鎮静

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、cDNA クローニングにより世界に先駆けてオピオイド受容体 (μ 、 δ 、 κ) とノシセプチン受容体の一次構造を明らかにした。これらの受容体のアミノ酸配列は 50-60%の相同性を有し、オピオイド受容体ファミリーを構成している[Fukuda, K. et al.(1994) FEBS Lett. 343, 42]。一方、オピオイド受容体 (μ 、 δ 、 κ) ノシセプチン受容体のそれぞれに対して、選択的に作用するアゴニストとして、 β -エンドルフィン、ダイノルフィン、エンケファリン、ノシセプチンが生体内に存在することが知られている。ノシセプチンはダイノルフィンと相同性を有する 17 アミノ酸から成るペプチドである。ノシセプチンおよびノシセプチン受容体の生理的機能については、多くの報告がなされているが、完全に解明されたとは言えない。

申請者らの研究室は、代表的な吸入麻酔薬である亜酸化窒素の鎮痛作用がノシセプチン受容体欠損マウスにおいて有意に減弱することを報告し[Himukashi, S. et al.(2006) Anesth Analg 103, 738]、ノシセプチン受容体拮抗薬が亜酸化窒素の鎮痛作用を抑制することを明らかにした[Koyama, T. et al.(2009)J Anesth 23, 301]。さらに、 μ オピオイド受容体欠損マウスでは亜酸化窒素の鎮痛作用は野生型と有意差がないこと[Koyama, T. et al.(2009)Br J Anaesth 103, 744]、 κ オピオイド受容体選択的アンタゴニストの投与により亜酸化窒素の鎮痛作用が有意に抑制されること[Koyama, T. et al.(2010)J Anesth 24, 297]を示した。これらの結果は、ノシセプチン受容体と κ オピオイド受容体が亜酸化窒素の鎮痛作用に必須であることを始めて明らかにしたものであり、

さらにノシセプチン系とダイノルフィン- κ オピオイド受容体系が体外から投与された薬物により活性化される可能性を初めて示したものである。

2. 研究の目的

本研究は、亜酸化窒素及び NMDA 受容体拮抗作用を有する全身麻酔薬 (ケタミン、キセノン) の鎮痛機構に κ オピオイド受容体系が関与する可能性について検討することを目的とする。さらに、亜酸化窒素の鎮痛作用以外の薬理作用、すなわち鎮静作用に κ オピオイド受容体系が関与する可能性についても検討する。

3. 研究の方法

野生型マウスと オピオイド受容体欠損マウスを用いた。

揮発性麻酔薬セボフルランとイソフルランの力価の指標となる最小肺胞濃度 (MAC) を亜酸化窒素存在下及び非存在下で求めた。マウスに一定濃度の揮発性麻酔薬を吸入させ、痛覚刺激 (尾をクリップで挟む) に対して体動を生じるか否かを判定し、吸入麻酔薬濃度を変化させて、体動を生じる最高濃度と体動を抑制する最低濃度を求め、その平均を MAC とした。

亜酸化窒素の鎮痛作用を酢酸ライジング試験とホットプレート試験によって評価した。酢酸ライジング試験では、麻酔ガスを吸入させたマウスに 0.7%酢酸 (体重 10g あたり 0.1ml) を腹腔内に投与し、10 分間に生じるライジング反応回数を計測した。ホットプレート試験では、30 分間麻酔ガスを吸入させたマウスを 55 °C のホットプレート上に置き、後肢をなめる、あるいは飛び上がる反応を示す

までの潜時を計測した。組織損傷を避けるためにカットオフ時間を 30 秒とした。

亜酸化窒素の鎮静作用については、半数のマウスにおいて立ち直り反射消失を生じるセボフルラン濃度 (EC50-LORR) が亜酸化窒素により低下することを指標にして評価した。亜酸化窒素吸入群および非吸入群マウスにセボフルランを吸入させ、チャンバーを回転させた際にマウスが立ち直り反射 (righting reflex) をおこすか否かを判定し、セボフルラン濃度を変化させて、立ち直り反射が観察される最高濃度と立ち直り反射が抑制される最低濃度を求め、その平均を EC50-LORR とした。

亜酸化窒素の薬理作用に下行抑制系が関与するか否かを評価するために、免疫組織化学的解析により腰髄切片における c-Fos 陽性細胞数を計測した。亜酸化窒素吸入群および非吸入群マウスをペントバルビタール腹腔内投与により致死させ、腰髄 (L4/L5) を摘出して固定し、切片を作成した。さらに、抗 c-Fos 抗体を一次抗体とするウェスタンブロットを行い、顕微鏡下に陽性細胞数を腰髄後角の層別に計測した。

4. 研究成果

亜酸化窒素の鎮痛作用にオピオイド受容体が関与することは従来報告されていたが、どのオピオイド受容体が関与するかは明らかではなかった。本研究では、オピオイド受容体欠損マウスにおける亜酸化窒素の作用を野生型マウスと比較した。

揮発性麻酔薬セボフルラン、イソフルランの力価の指標である最小肺泡濃度 (MAC) は野生型マウスでそれぞれ $2.57 \pm 0.04 \%$ 、 $1.25 \pm 0.13 \%$ であるのに対して、オピオイ

ド受容体欠損マウスでは $2.70 \pm 0.31 \%$ 、 $1.27 \pm 0.08 \%$ で、有意の差はなかった。この結果は、これらの麻酔薬に MAC が μ オピオイド受容体欠損マウスで変化しないという私たちの従来の結果と併せて、揮発性麻酔薬の作用にオピオイド受容体は直接関与しないという従来の結果、報告を裏付けるものである。

亜酸化窒素の MAC は大気圧下では求めることができないので、セボフルラン MAC に対して亜酸化窒素がどのように影響するかを検討して、間接的に評価した。野生型マウスでは 70% 亜酸化窒素存在下でセボフルランの MAC は約 30% 低下するが、オピオイド受容体欠損マウスでは有意な変化がなく、亜酸化窒素の揮発性麻酔薬の MAC を低下させる作用はオピオイド受容体を介することが示唆された。オピオイド受容体選択的アゴニストである U-50488 の作用を検討したところ、野生型マウスではセボフルラン MAC が有意に低下するのに対して、オピオイド受容体欠損マウスでは MAC に変化がなかった。これは、オピオイド受容体が活性化されると揮発性麻酔薬の MAC を低下させる作用を示すことを意味している。

亜酸化窒素の鎮痛作用を酢酸ライジング試験、ホットプレート試験により検討した。野生型マウスでは、亜酸化窒素吸入により酢酸ライジング試験において 10 分間に観察されるライジング反応の回数が有意に減少し、ホットプレート試験における潜時が有意に延長した。一方、オピオイド受容体欠損マウスでは、いずれの方法においても亜酸化窒素吸入群と非吸入群で有意の差は見出されず、亜酸化窒素の鎮痛作用がほとんど消失していることが明らかになった。これらの試験

により オピオイド受容体選択的アゴニストである U-50488 の作用を検討したところ、オピオイド受容体欠損マウスでは有意な鎮痛作用が消失しており、オピオイド受容体欠損マウスにおいて オピオイド受容体活性化による薬理作用が消失しておることが確認された。

野生型マウスでは 70%亜酸化窒素吸入により腰髄後角 - 層における c-Fos 陽性細胞数が増加していた。腰髄後角 - 層は下行抑制系からの入力により活性化される神経細胞が存在することが知られている。これまでも亜酸化窒素によりこの部位に c-Fos 陽性細胞が増加することが報告され、亜酸化窒素はノルアドレナリン系下行抑制系の活性化を介して脊髄における GABA 作動性介在神経細胞を活性化することの証拠とされている。一方、オピオイド受容体欠損マウスでは亜酸化窒素を吸入させても c-Fos 陽性細胞数増加は認められなかった。この結果は、亜酸化窒素による下行抑制系の活性化にはオピオイド受容体が必須であることを示している。

全身麻酔は鎮痛、鎮静、不動化の 3 要素が必要とされており、吸入麻酔薬の薬理作用にもこの 3 要素が含まれると考えられている。そこで、鎮痛作用以外の亜酸化窒素の作用にも オピオイド受容体が関与する可能性を検討するために、野生型マウスと オピオイド受容体欠損マウスにおける亜酸化窒素の鎮静作用を比較した。70%亜酸化窒素存在下及び非存在下で立ち直り反射抑制に要するセボフルランの濃度を評価したところ、野生型マウスと オピオイド受容体欠損マウスいずれにおいても 70%亜酸化窒素により EC50-LORR は約 30%低下し、両者間に有意差

はなかった。この結果は、亜酸化窒素の鎮静作用は鎮痛作用と異なり、オピオイド受容体の活性化を必要としないことを示唆している。

以上の結果は、亜酸化窒素の鎮痛作用はオピオイド受容体を介して下行抑制系が活性化されることによって生じること、亜酸化窒素の鎮静作用は オピオイド受容体を介さない機序によることを示唆するものである。

本研究における問題点と今後の課題として、以下の 3 点が考えられる。

本研究では オピオイド受容体欠損マウスを用いており、亜酸化窒素による オピオイド受容体の活性化を直接示していない。今後は、亜酸化窒素により オピオイド受容体発現神経細胞の活性化、あるいは オピオイド受容体を活性化する内因性ペプチドの分泌増加が生じる可能性について検討する必要がある。

本研究では亜酸化窒素の鎮痛作用に オピオイド受容体が関与することが明らかになったが、亜酸化窒素の薬理作用に関与すると報告されてきた NMDA 受容体拮抗作用などと オピオイド受容体活性化の関係は不明で、今後検討する必要がある。

亜酸化窒素の鎮静作用は オピオイド受容体を介さないことが示唆されたが、どのような機序に基づくのかは不明で、今後の検討が必要である。

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)

Fukagawa, H., Koyama, T. and Fukuda, K.
κ-Opioid receptor mediates the
antinociceptive effect of nitrous oxide in
mice
Br J Anaesth 113, 1032 (2014)

〔学会発表〕(計 1 件)

深川博志、小山智弘、福田和彦
亜酸化窒素の鎮痛作用機序における オピ
オイド受容体の役割
日本麻酔科学会第 59 回学術集会 2012.6.8
神戸

〔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：
出願年月日：
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

福田 和彦 (KAZUHIKO FUKUDA)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90199224

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：