



Effect of the neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7nitroindazole on the righting reflex ED50 and minimum alveolar concentration during sevoflurane anaesthesia in rat

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 俊司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1249

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 396号	学位授与年月日	平成15年 3月26日
氏名	小林俊司		
論文題目	<p>Effect of the neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole on the righting reflex ED₅₀ and minimum alveolar concentration during sevoflurane anaesthesia in rat (神経性一酸化窒素合成酵素阻害薬、7-ニトロインダゾールがラットのセボフルラン立ち直り反射 50%有効量と最小肺胞濃度を与える影響)</p>		

博士(医学) 小林俊司

論文題目

Effect of the neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole on the righting reflex ED₅₀ and minimum alveolar concentration during sevoflurane anaesthesia in rat

(神経性一酸化窒素合成酵素阻害薬、7-ニトロインダゾールがラットのセボフルラン立ち直り反射50%有効量と最小肺胞濃度に与える影響)

論文の内容の要旨

[はじめに]

Nitric oxide(NO)は重要な情報伝達物質として知られているが、吸入麻酔薬の麻酔作用に及ぼす影響はあまり知られていない。そこで neuronal NO synthase(nNOS)に特異的な阻害薬、7-nitroindazole(7-NI)による、吸入麻酔薬 sevoflurane の立ち直り反射50%有効量(righting reflex ED₅₀; RR)と痛みに対して体動を起ささない最小肺胞濃度(minimum alveolar concentration; MAC)に及ぼす影響と、NOの代表的な効果物質である cyclic 3', 5'-guanosine monophosphate(cGMP)の中樞神経系における濃度変化を調べた。

[材料ならびに方法]

研究1: 雄の Sprague-Dawley ラット(250-350g)を各々急性、慢性投与群に分けた(各群 n=10)。急性投与群は 7-NI を 0, 50, 100mg/kg 腹腔内投与し、慢性投与群は 0, 75mg/kg を12時間毎に4日間経口投与した(各測定の間は一週間以上あけた)。麻酔は40%酸素と sevoflurane を用い、自発呼吸とした。MACとRR測定法は過去の文献に従った。すなわち、MACはプラスチックチャンバー内にラットを留置し、テールクランプ法にて測定、四肢、躯幹、頭部の動きを陽性反応とみなした。RRはプラスチックチャンバー内に設置したメッシュローター内にラットを置き、毎分4回転のスピードで5回転させ、2回以上仰臥位になれば立ち直り反射の欠如とみなした。

研究2: ラットを各々対照群と7-NI 100mg/kg 急性投与群に分けた(各群 n=6)。頸椎脱臼により屠殺、緩衝液を経左心的に灌流し、大脳、小脳、脊髄を速やかに摘出、直ちに液体窒素で凍結した。酵素抗体法にて、単位タンパク質量あたりの cGMP 濃度を測定した。

統計測定: paired-test 及び ANOVA と Bonferroni's multiple comparison test で行い、p<0.05 を有意とした。

[結果]

研究1: 急性投与群における MAC と RR の前値は、それぞれ 2.34 ± 0.19 (Mean \pm SD, vol%), 1.09 ± 0.07 。慢性投与群では 2.31 ± 0.20 , 1.04 ± 0.15 で、各プロトコル間に有意差はなかった。溶媒のみの投与後、MAC と RR は急性投与群で、それぞれ 2.40 ± 0.14 , 1.03 ± 0.09 、慢性投与群では 2.28 ± 0.18 , 0.98 ± 0.09 であり、前値に比して有意な変化はなかった。7-NI の 50, 100mg/kg 急性投与時、MAC は 1.41 ± 0.26 , 1.34 ± 0.29 と溶媒のみ投与時に比べ、有意に低下した (p<0.01)。RR も 0.28 ± 0.14 , 0.14 ± 0.10 と溶媒のみ投与時に比べ、低下した (p<0.01)。RR の値は 50 と 100mg/kg 投与の間に有意差があった (p<0.05) が、MAC では有意差はなかった。慢性投与時 MAC は 2.31 ± 0.18 と変化しなかったが、RR は 0.64 ± 0.15 と低下した (p<0.01)。MAC と RR の低下には、相関が認められなかった。

研究2: 対照群の cGMP 濃度は、大脳、小脳、脊髄の順に、 7.2 ± 2.1 (Mean \pm SD, pmol/mg protein)、 44.9 ± 14.5 , 8.5 ± 3.8 、7-NI 投与群で、 6.8 ± 2.1 , 20.0 ± 9.2 , 6.6 ± 4.4 であり、小脳においてのみ低下した

($p < 0.01$)。

[考察]

研究1：7-NIの急性投与によりMACとRRは低下した。過去の研究から、中枢神経系のcGMP濃度低下が中枢神経系の抑制と関係があること、吸入麻酔薬が中枢神経系のcGMP濃度を低下させることが知られている。したがってMACとRR低下の機序としては、7-NIによるNO-cGMP系の抑制により、中枢神経系におけるcGMP濃度が低下し、吸入麻酔薬の作用を増強した可能性が考えられる。一方、MACとRRに対する7-NIの効果は異なっていた。MACの低下には天井効果が認められたが、RRには認められず、それぞれの低下率は相関しなかった。また慢性投与において、RRは低下したが、MACは変化しなかった。7-NIの急性投与によりMACとRRがともに低下したことから、NO-cGMP系はMACとRRの両者に関わっていることがわかる。しかしMACに対する効果は急性投与で、7-NIの天井効果が出現し、慢性投与で低下が見られなかったことから、NO-cGMP系のMACへの関与が部分的で、弱いことを示唆している。一方RRに関しては、急性投与において天井効果がなく、慢性投与においても低下が見られたことから、NO-cGMP系の関与がMACより大きいことが示唆される。

研究2：研究1で示唆された、MACとRRに対するNO-cGMP系関与の程度の違いを裏付けるため、7-NI投与時の中枢神経系におけるcGMP濃度の変化を測定した。過去の研究から、MACは脊髄レベルの、RRは小脳を中心とした脊髄以上のレベルの関与が強いとされている。測定の結果、cGMP濃度は脊髄、大脳に比べ、小脳では極めて高く、7-NI投与時の低下率も大きかった。脊髄、大脳では濃度も低く、低下率も小さかった。研究1では、NO-cGMP系の関与がMACにおいては部分的で弱く、一方RRでは主体的で強いことが示唆されたが、小脳においてcGMP濃度の絶対値と、その低下率が大きく、脊髄で小さいことは、それを裏付ける結果となった。

[結論]

NO-cGMP系はMACよりRRに強く関与している。その機序はNO-cGMP系関与の程度が脊髄より小脳で強いためと思われる。

論文審査の結果の要旨

Nitric oxide(NO)は中枢神経系の重要な情報伝達物質の一つであるが、その吸入麻酔薬の作用に及ぼす影響はあまり知られていない。申請者らはneuronal NO synthase(nNOS)に特異的な阻害薬、7-nitroindazole(7-NI)によるNOの抑制下における、吸入麻酔薬sevofluraneの立ち直り反射50%有効量(righting reflex ED₅₀; RR)と痛みに対して体動を起こさない最小肺胞濃度(minimum alveolar concentration; MAC)の変化を調べた。また、NOの代表的な効果物質として知られているcyclic3',5'-guanosine monophosphate(cGMP)の中枢神経系における濃度変化を測定した。

雄性Sprague-Dawleyラット(250-350g)に7-NIを0,50,100mg/kg腹腔内投与(急性投与群、 $n=10$)または0,75mg/kgを12時間毎に4日間経口投与した(慢性投与群、 $n=10$)。麻酔は40%酸素とsevofluraneを用いた。プラスチックチャンバー内にラットを置き、尾をクランプしたとき四肢、躯幹、頭部の動きが認められなくなる最小濃度をMACとした。プラスチックチャンバー内に設置したメッシュローター内にラットを置き、毎分4回転のスピードで5回転させ、2回以上仰臥位になったとき立ち直り反射の欠如とみなし、50%有効量をRRとした。

7-NI の50、100mg/kg 急性投与では MAC は 1.41 ± 0.26 、 1.34 ± 0.29 (Mean \pm SD, vol%) であり対照群に比べ (2.34 ± 0.19) 有意に低下した ($p < 0.01$)。RR も 0.28 ± 0.14 、 0.14 ± 0.10 であり対照群に比べ (1.09 ± 0.07) 有意に低下した ($p < 0.01$)。RR の値は50と100mg/kg 投与の間にも有意差があった ($p < 0.05$)。慢性投与では MAC は 2.31 ± 0.18 と変化しなかったが、RR は 0.64 ± 0.15 と低下した ($p < 0.01$)。MAC と RR の低下には、相関が認められなかった。

次にラットに 7-NI 100mg/kg を急性投与した後、屠殺、灌流し、大脳、小脳、脊髄を速やかに摘出、凍結し、酵素抗体法にて、単位タンパク質量あたりの cGMP 濃度を測定した。対照群 ($n=6$) の cGMP 濃度は、大脳、小脳、脊髄の順に、 7.2 ± 2.1 (Mean \pm SD, pmol/mg protein)、 44.9 ± 14.5 、 8.5 ± 3.8 、7-NI 投与群 ($n=6$) では、 6.8 ± 2.1 、 20.0 ± 9.2 、 6.6 ± 4.4 であり、小脳においてのみ有意に低下した ($p < 0.01$)。

吸入麻酔薬が中枢神経系の cGMP 濃度を低下させることが知られており、この cGMP 濃度低下が中枢神経系の抑制そして麻酔効果と関係があると考えられている。今回の研究で認められた MAC と RR 低下の機序としては、7-NI による NO-cGMP 系の抑制により、中枢神経系における cGMP 濃度が低下し、吸入麻酔薬の作用を増強したと考えられる。しかし 7-NI の MAC に対する効果は急性投与で天井効果が見られ、慢性投与で低下が見られなかったことから MAC への NO-cGMP 系の関与は、RR に比し弱いことを示唆している。脳内 cGMP 濃度は対照群において脊髄、大脳に比べ、小脳では極めて高く、7-NI 投与により小脳の cGMP 濃度は有意に低下した。以上より NO-cGMP 系の関与が脊髄より小脳で強く、その結果 7-NI の効果が MAC より RR に強く現れたものと考察された。

吸入麻酔薬の作用機序については未だ不明な点も多いが、申請者は nNOS 阻害薬、7-NI の MAC、RR および中枢神経系内 cGMP 濃度に対する影響を検討し、NO-cGMP 系の関与を明らかにした。このことが審査委員会では高く評価された。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) nNOS と eNOS、iNOS の異なる点は何か
- 2) nNOS には全身に及ぼす作用はないのか
- 3) 7-NI の nNOS 阻害のメカニズムはどのようなものか
- 4) 実験で用いられた 7-NI はどの程度 NO を阻害するのか
- 5) 投与薬剂量が 2 種類のみで天井効果を証明できるのか
- 6) cGMP の測定法にはどのようなものがあるか
- 7) 脳を摘出する間に失われる cGMP はどの程度か
- 8) 小脳の cGMP は何故他の脳組織より高いのか
- 9) 小脳の long-term depression と NO にはどのような関係があるか
- 10) NO の関係するシナプスの可塑性について
- 11) Glutamate の神経毒性と NO の関係について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 難波宏樹
副査 福田敦夫 副査 渡邊裕司