

学位論文題名

オピオイドと延髄呼吸リズム形成中枢

(新生ラット脳幹脊髓標本による検討)

学位論文内容の要旨

モルヒネ、フェンタニルなどのオピオイド類は麻酔、疼痛治療において鎮痛薬として非常に重要な薬物であるが、最大の欠点は時に重大な呼吸抑制を生じることである。いかにオピオイドの鎮痛作用を損なうことなしに、その呼吸抑制を除去するかということは、オピオイド研究の重要な到達点の一つである。しかし、オピオイドによる呼吸抑制はよく知られているが、その呼吸作用の責任部位、作用機序の詳細は未だ明らかではない。1984年に導入された新生ラット脳幹脊髓標本は、脳幹における正常呼吸リズム形成中枢についての生理学的、薬理的解析のために適した *in vitro* モデルと考えられ、1990年代には延髄呼吸中枢解析のための最も一般的な標本となった。延髄の呼吸リズム形成中枢でのオピオイドの作用を解明するため、新生ラット脳幹脊髓標本を用い、以下の実験を行った;(1) 内因性オピオイドの一次呼吸リズム形成への関与の有無を明らかにする目的で、オピオイド受容体拮抗薬のナロキソン単独投与が及ぼす延髄呼吸リズム形成中枢への影響を調べた。(2) 延髄の μ 、 δ 、 κ -オピオイド受容体のサブタイプを介してのオピオイドの呼吸作用を明らかにする目的で、各受容体選択的作動薬 (μ -受容体作動薬 DAGO, δ -受容体作動薬 DPDPE, および κ -受容体作動薬 U50,488) の呼吸リズム、呼吸振幅に及ぼす影響を検討した。また、 μ 1-オピオイド受容体選択的拮抗薬ナロキサジン前処置後の μ -オピオイド受容体作動薬 DAGO の濃度-反応曲線に対する影響を調べた。(3) 新生ラット *in vitro* 標本は、25-28°C以下の低温環境にあり、また幼若動物を使用するため、これらの要因が、新生ラット脳幹脊髓標本でのオピオイドの作用を修飾するかについて検討した。(4) 延髄呼吸リズム形成中枢での、モルヒネと他の神経作動物質 (アセチルコリン、サブスタンス P、thyrotropin releasing hormone (TRH)、ドバミン、アデノシン、cAMP、プロスタグランジン、ロイコトリエンといったアラキドン酸代謝物) との相互作用、およびこれら物質のオピオイドの作用機序への関与の可能性について検討した。結果と結論は以下に示す通りである。(1) ナロキソン単独投与では、呼吸パラメータに有意な変化を生じず、内因性オピオイドは延髄における一次呼吸リズム形成に対しては、大きな関与はないと結論された。(2) μ -オピオイド受容体作動薬 DAGO は、新生ラット *in vitro* 標本において呼吸回数を減少させた。背側呼吸神経細胞群 (孤束核) を含む延髄背側半分を除去した標本でも同様の結果を得た。したがって、延髄腹側に位置する呼吸リズム形成中枢の μ -オピオイド受容体が、オピオイドの呼吸回数減少作用に関与していることが明らかとなった。 μ 1-オピオイド受容体拮抗薬のナロキサジンの前処置では、*in vitro* での DAGO の濃度一

反応曲線を右方移動させた。このことは、従来の定説とは異なり、 μ 1-オピオイド受容体(ナロキサジン感受性受容体)も呼吸回数減少に関与していることを示すものである。

また、延髄の κ -オピオイドはオピオイドの呼吸回数減少作用と呼吸振幅減少作用に関与していることも明らかとなった。しかし、 δ -受容体は、新生ラットにおいては呼吸作用には関与していないことが示された。(3) モルヒネ、 μ -受容体作動薬の DAGO の延髄呼吸リズム形成中枢での作用は、実験を施行した 22.5°C-31.5°C の範囲で温度依存性であり、温度が高いほど、モルヒネおよび、DAGO の呼吸回数減少作用は大きかった。 κ -オピオイド受容体作動薬の U50,488 に対する反応に温度依存性は認められなかった。新生ラット呼吸リズム形成中枢のモルヒネに対する感受性は、検討した日齢 0-4 日の間で異なっていた。日齢 0 では、日齢 1-4 日と比較しモルヒネに抵抗性を示した。日齢 1-4 日の間では、モルヒネに対する感受性に差はなかった。したがって、新生ラット *in vitro* 標本を用いたオピオイド研究を解釈する場合、温度と日齢による影響を考慮しなければならない。

(4) アセチルコリン、サブスタンス P、および TRH は、延髄呼吸リズム形成中枢内での相互作用を介してモルヒネの呼吸回数減少作用に拮抗することが明らかとなった。また、延髄呼吸リズム形成神経細胞の細胞内 cAMP 濃度の上昇は、モルヒネの呼吸回数減少作用に拮抗することも示された。今回の実験プロトコールは、延髄呼吸中枢でのモルヒネの作用機序に、これらの神経作動物質が関与しているか否かについては明らかにすることはできなかった。しかし、これらの神経調節物質が、完全にはモルヒネの呼吸抑制作用を拮抗できなかったことより、相互に別々のシステムを介して拮抗的に作用している可能性が高いと考えられる。一方、ドバミン、アデノシンの呼吸抑制神経伝達/修飾物質、プロスタグランジ、ロイコトリエンといったアラキドン酸代謝物は、延髄呼吸リズム形成中枢でのモルヒネの作用機序に関与していないことが明らかとなった。

本研究により、新生ラット脳幹脊髓標本は、呼吸リズム形成中枢の神経回路網、神経細胞レベルでの μ -、 κ -オピオイド受容体研究のための有用なモデルとなることが示された。

今後、電気生理学的手法、光学的計測法による呼吸関連神経細胞の膜電位等の機能的解析と免疫組織化学、*in situ* ハイブリダイゼーション法、バッチ RT-PCR 法などの形態学的解析を組み合わせることにより、オピオイドの呼吸作用の責任部位、作用機序の解明は一層進展することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 劔 物 修
副 査 教 授 吉 岡 充 弘
副 査 教 授 丸 藤 哲

学 位 論 文 題 名

オピオイドと延髄呼吸リズム形成中枢

(新生ラット脳幹脊髓標本による検討)

本学位論文は、新生ラット脳幹脊髓標本を用い、延髄の呼吸リズム形成中枢でのオピオイドの作用について検討したものである。新生ラット脳幹脊髓標本は、末梢の求心性入力、上位中枢の影響、呼吸抑制に伴う高二酸化炭素血症の影響を除外でき、薬物の延髄呼吸中枢に対する直接作用を評価でき、呼吸中枢の研究のために有用なモデルであることが説明された。通常本標本による実験は 26-28°C の低温環境下で行われるが、オピオイドの実験に関しては、灌流液の温度が重要であり、28°C が至適温度であることが強調された。また、選択的オピオイド受容体作動薬を用いた実験により、延髄腹側の μ 、 κ 受容体が、新生ラットにおいて、オピオイドの呼吸回数減少作用に関与しているという結論を得、さらに、 μ -1 受容体選択的拮抗薬により μ 作動薬による呼吸回数減少作用が拮抗されたことより、従来の定説とは異なり延髄呼吸リズム形成中枢の μ -1 受容体も、オピオイドの呼吸作用に関与していることが明らかとなった。一方、 δ 受容体は新生ラットでは、呼吸作用に関与していなかった。また、オピオイド受容体拮抗薬単独では、呼吸回数に影響を及ぼさないことより、内因性オピオイドの延髄における一次呼吸リズム形成への関与については大きくないものと考えられた。さらに、モルヒネと他の神経調節物質の延髄呼吸リズム形成中枢における相互作用も調べられた。アセチルコリン、サブスタンス P、Thyrotropin releasing hormone (TRH) は、延髄呼吸リズム形成中枢内において、モルヒネの作用に拮抗的に作用することが明らかとなった。また、延髄において呼吸リズム形成に関与する神経細胞内 cAMP の濃度上昇もモルヒネの作用を拮抗することが示された。しかし、これらが、モルヒネの呼吸抑制機序に対する関与については、本実験プロトコールからは、明らかにすることはできなかった。一方、アデノシン、ドパミン、アラキドン酸代謝物は、モルヒネの呼吸作用には関与していないことが示された。質疑応答において、オピオイド受容体作用薬の使用濃度は、濃度反応曲線を作成し

決定したこと、また呼吸中枢は標本表面から 300-500 μm の深さにあり薬物は浸透して効果を表すため、若干高濃度を必要とする可能性があること、他の研究者 (Greer JJ) の実験結果と異なり、 κ 受容体作用薬で呼吸回数が減少した理由については、Greer らは薬物投与後 5 分後に呼吸回数を測定したが、 κ 受容体作用薬の作用発現には 20 分程度要するため、この薬物投与後の測定ポイントの差によると考えられると説明された。また、呼吸抑制のないオピオイドの可能性については、鎮痛作用にのみ関与する受容体に対する選択的拮抗薬が理想のオピオイドとなるが、現時点では、分子生物学的にそのような受容体は見つかっていないと回答した。オピオイド受容体の分布、内因性オピオイドの呼吸作用に対する役割についても質問がなされ、延髄におけるオピオイド受容体の分布は、免疫組織化学、*in situ hybridization* 法により調べられており、孤束核、疑核、脳幹網様体の呼吸機能と関係する部位に高密度に存在し、内因性オピオイドの呼吸に関する生理作用については、本研究結果から一次リズム形成には関与しておらず、低酸素、高二酸化炭素状態で何らかの役割を担っている可能性があるとして回答した。また、本標本のため新生ラットを用いる理由について、成熟ラットでは、延髄呼吸中枢は、300-500 μm より深い場所に存在し、灌流液により酸素の拡散では呼吸中枢を好氣的に保てないため、新生ラットを使用すると回答した。本研究結果と小児麻酔、低体温麻酔におけるオピオイド必要量との関連については、小児の場合、受容体数だけではなく、血液脳関門、呼吸中枢の未熟性を考慮することが必要で必ずしも *in vitro* での結果は当てはまらないこと、また低体温時は、臨床においてもオピオイドの作用が減弱する可能性があるとして回答した。

この論文は、オピオイドの呼吸作用の責任部位、作用機序解明のために大きな貢献を与えたものとして高く評価され、今後、オピオイドの呼吸作用機序の解明は、新生ラット脳幹脊髄標本による機能的、形態学的解析を組み合わせることにより、一層進展することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。