

学位論文

Pentobarbitalが引き起こす麻酔要素における  
GABA, グリシン, 神経性コリン作動性, グル  
タミン酸およびサブスタンス P の各神経の役割

向井明里

2010年度

学位論文

Pentobarbital が引き起こす麻酔要素における  
GABA, グリシン, 神経性コリン作動性, グル  
タミン酸およびサブスタンス P の各神経の役割

学位申請者 向井明里

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科  
展開医科学専攻 病態制御医科学講座（歯科麻酔学）

（主指導教員：入船正浩 教授）

2010 年度

本論文の要旨は以下の学会において発表した。

第 38 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会 2010. 10 (横須賀)

第 I 章	緒論	3
第 II 章	麻酔要素である筋弛緩，意識消失，不動化に及ぼす各種薬物の影響	
第 1 節	各麻酔要素に及ぼす pentobarbital 単独の影響	
第 1 項	緒言	7
第 2 項	実験材料および方法	7
第 3 項	結果	10
第 4 項	考察および小括	10
第 2 節	各麻酔要素に及ぼす GABA ，グリシン，神経性ニコチン，グルタミン酸の各受容体リガンド単独の影響	
第 1 項	緒言	12
第 2 項	実験材料および方法	12
第 3 項	結果	13
第 4 項	考察および小括	14
第 3 節	Pentobarbital が引き起こす各麻酔要素に及ぼす各受容体リガンド併用の影響	
第 1 項	緒言	18
第 2 項	実験材料および方法	18
第 3 項	結果	22
第 4 項	考察および小括	24

第Ⅲ章 サブスタンス P 遊離に及ぼす pentobarbital と各受容体リガンド単独もしくは併用の影響

第 1 節 緒言 . . . . . 28  
第 2 節 実験材料および方法 . . . . . 28  
第 3 節 結果 . . . . . 31  
第 4 節 考察および小括 . . . . . 32

第Ⅳ章 総括および結論 . . . . . 35

謝辞 . . . . . 37

引用文献 . . . . . 38

図表 . . . . . 44

## 第 I 章 緒 論

全身麻酔下手術を世界で初めて成功させたのは、1804年、江戸時代の日本である。華岡青洲が60歳の患者にマンダラゲを主成分とする通仙散を服用させて乳癌の根治手術を行っている。その後、1846年にアメリカで、Mortonがエーテル麻酔による外科手術に成功した。以来、全身麻酔薬は200年以上にわたって臨床応用されており、全身麻酔法の確立は医学史上最大の功業の一つといっても過言ではない。今日に至るまで、様々な全身麻酔薬、全身麻酔法が開発され、全身麻酔は比較的安全に行われるようになった。しかし、一方で、現在使用されている吸入麻酔薬や静脈麻酔薬においても、本来の麻酔作用以外に多くの副作用を有している。全身麻酔薬には、一般的に循環抑制、呼吸抑制、肝・腎毒性、術後の悪心・嘔吐などの副作用があり、特に全身状態が不良な患者の周術期においては、これらの副作用によって重篤な状態に陥りかねない。したがって、全身麻酔薬の作用機序を究明することにより、副作用のない、安全な全身麻酔薬の開発につなげることが望まれる。

全身麻酔とは、全身麻酔薬が脳や脊髄に可逆的に作用することにより薬理的に生じた生理学的状態と定義される。それは、健忘、鎮痛、意識消失、侵害刺激による体動の抑制（不動化）、筋弛緩および有害な自律神経反射の抑制などの様々な要素が複合した状態である【1】。このような麻酔現象が単一の作用部位や作用機序を介しているとは考えにくく、麻酔を構成する各要素はそれぞれ異なった部位に作用し、異なった機序を介して生じていると推測される【2】。

全身麻酔薬は  $\gamma$  - アミノ酪酸 ( $\gamma$  - aminobutyric acid ; GABA) 神経やグリシン神経などの抑制性神経を促進するか、グルタミン酸神経などの興奮性神経を抑制するか、あるいはその両方の作用により麻酔状態を引き起こしていると考えられている。

全身麻酔薬の細胞レベルでの電気生理学的影響などを検討することにより、麻酔薬の分子レベルにおける作用部位の存在が指摘されており【3】，主に中枢神経系にある神経シナプスに作用しているといわれている。シナプス前・後部には、様々な受容体やイオンチャネル，トランスポーター，細胞内情報伝達系が存在し，いずれも全身麻酔薬の標的になり得る。

全身麻酔薬は，GABA に対する GABA<sub>A</sub> 受容体の感受性を高めることで抑制性神経伝達を促進し，神経活動を抑制すると考えられている【4】。しかし，麻酔要素のうちどの要素が麻酔薬の GABA<sub>A</sub> 受容体への作用と関連しているのかは未だ推測の域をでない。GABA は，中枢神経系における主な抑制性神経伝達物質であり，すべてのシナプスのうち 25 - 45% が GABA 作動性である【5】。GABA 受容体には，リガンド依存性イオンチャネル内蔵型の GABA<sub>A</sub> 受容体と G 蛋白を共役した代謝型の GABA<sub>B</sub> 受容体がある。GABA<sub>A</sub> 受容体が活性化されると，Cl<sup>-</sup>チャネルが開口し，細胞内に Cl<sup>-</sup>が流入し過分極となり，興奮性が抑制される。また，GABA<sub>A</sub> 受容体には鎮静薬のベンゾジアゼピン類や静脈麻酔薬のバルビツール酸の結合部位が存在し，多くの全身麻酔薬が GABA<sub>A</sub> 受容体を賦活化することが知られている。

GABA<sub>A</sub> 受容体やグリシン受容体，神経性ニコチン受容体，グルタミン酸受容体は，イオンチャネル内蔵型受容体スーパーフ

アミラーの一員である。グリシンは中枢神経系において主に抑制性神経伝達物質として働き，中枢神経系に広範囲に分布する GABA に比べて脊髄，延髄に豊富に存在し，より限定された機能を有する【6】。全身麻酔薬は，脊髄にあるグリシン受容体の活性化を介して侵害刺激反応を抑制している可能性がある。したがって，脊髄のグリシン受容体は，全身麻酔薬による不動化や筋弛緩と関連があるのかもしれない。

神経性ニコチン受容体は，自律神経系のみならず，中枢神経系にも広範囲に分布し，麻酔濃度以下の全身麻酔薬により抑制されることが報告されており，全身麻酔薬による健忘や鎮痛効果の発現に関与するといわれている【7】。

グルタミン酸は，中枢神経系での主たる興奮性神経伝達物質であり，すべてのシナプスの 50%以上がグルタミン酸作動性といわれている【5】。グルタミン酸は，運動系と関係する他，脊髄後角での痛覚伝達においても重要な役割を果たしている。グルタミン酸受容体のサブタイプの一つである N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体は，静脈麻酔薬である ketamine の主要な標的部位であり，NMDA 受容体の遮断を介して意識消失をもたらすと推測されている。

末梢組織に対する侵害刺激によって生じる一次知覚神経からの脊髄後角神経への侵害情報伝達にはサブスタンス P (SP) が重要な役割を果たしている。侵害刺激による一次知覚神経からの SP 遊離は，オピオイドや  $\alpha_2$  アドレナリン受容体作動薬により抑制されることがマイクロダイアリシス実験により明らかにされている【8, 9】。また，*in vitro* の実験系で全身麻酔薬がアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた SP 受容体機能を抑制することが報告されている【10】。当研究室においては，

GABA 分解酵素阻害薬である gabaculine の投与により内因性 GABA の脳内濃度を増加させると意識消失を生じるが，不動化は生じないことを明らかにした【11】．さらに，gabaculine によって生じた意識消失時にオピオイドや  $\alpha_2$  アドレナリン受容体作動薬を併用すると，不動化を起こすこともすでに確認している．このことは，不動化が脊髄後角での SP 神経の抑制を介して起きていることを予期させる．

このように，全身麻酔薬は，様々な神経系に作用して，麻酔要素を引き起こしていると考えられているが，各麻酔要素がどの神経と関係しているのかは明確にされていない．本研究では，バルビツール酸系の静脈麻酔薬である pentobarbital により生じる筋弛緩，意識消失，不動化の各麻酔要素に及ぼす GABA，グリシン，神経性ニコチン，グルタミン酸の各受容体リガンドの影響を行動薬理学的手法により検討した．さらに，脊髄後根神経節 (DRG) 培養細胞からの SP 遊離に及ぼす pentobarbital や各受容体リガンド単独もしくは併用の影響を *in vitro* で検討することにより，pentobarbital の麻酔作用機序の一端を解明することを目的とした．

## 第Ⅱ章 麻酔要素である筋弛緩，意識消失，不動化に及ぼす各種薬物の影響

### 第1節 各麻酔要素に及ぼす pentobarbital 単独の影響

#### 第1項 緒言

全身麻酔の麻酔構成要素には，鎮痛，筋弛緩，意識消失，不動化などが含まれ，吸入麻酔薬はそのすべてを兼ね備えているといわれている．一方，静脈麻酔薬であるバルビツール酸は健忘作用と意識消失作用を有するが鎮痛作用はないといわれている．したがって，静脈麻酔薬は吸入麻酔薬に比べ麻酔要素をより選択的に引き起こしている可能性がある．

本実験では，静脈麻酔薬である pentobarbital を全身投与し，各麻酔要素に及ぼす影響を行動薬理的に検討した．

#### 第2項 実験材料および方法

本実験において，動物の飼育と実験方法は，広島大学動物実験指針および広島大学自然科学研究支援開発センター動物実験施設内規にしたがって行った．

## 実験材料

実験動物として ddY 系成熟雄性マウス（6 - 9 週齢，Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan）を使用した．明／暗 12 時間サイクル（明；8：00 - 20：00），室温 25 ± 1℃，湿度 50%，固形飼料および飲料水は自由に摂取できる環境下で飼育した．すべての実験においてマウスは 1 回のみを使用した．

## 使用薬物

本実験では，薬物として pentobarbital sodium（Somnopentyl®，Kyoritsu Seiyaku Co., Tokyo, Japan）を使用した．

## 実験方法

Pentobarbital は 0.9% 生理食塩水に溶解し，マウスの体重 10 g あたり 0.1 ml となるよう調整した．Pentobarbital はマウスの腹腔内に投与した．実験室内の温度は 25 ± 1℃ に調節し，マウスをヘッドランプにより保温し体温が低下しないよう維持した．実験は午前 10 時から午後 6 時の間で行った．麻酔作用の評価は，筋弛緩の指標として握力試験，意識消失の指標として正向反射の消失の 50% 有効量（50% effective dose；ED<sub>50</sub>）を，不動化の指標として侵害刺激に対する体動の有無の ED<sub>50</sub> を用いた．

握力試験には，齋藤式マウス用握力測定装置（Muromachi Kikai Co. Ltd., Tokyo, Japan）を使用した．Pentobarbital 投与後，マウスを測定用グリッドにつかまらせ，尾を手で水平

に引いたとき，引かれた力に耐えきれずグリッドを離してしまうまでの最大の力 (g) を測定した．握力は pentobarbital 投与前と投与後 5 分毎に 1 時間測定した．

正向反射の有無の判定は，pentobarbital を投与した後，ただちにマウスを 1 匹ずつビーカー（直径 13.5 cm×高さ 19 cm）に入れ，2 分毎に正向反射の変化を観察した．正向反射の評価は，Boast ら【12】の方法にしたがい，記録時に手でビーカーを水平面から約 45° に傾け，この操作を 3 回繰り返す，以下の麻酔スコアにより判定した．スコア 0 はマウスを裏返そうとしてもすぐに正位に向き直る，すなわち正向反射が正常な状態，+1 は 3 回とも 2 秒以内に正向反射がある状態（軽度正向反射障害），+2 は 2 秒から 10 秒の間に少なくとも 1 回は正向反射がある状態（中等度 - 高度正向反射障害），+3 は 3 回とも 10 秒以内には正向反射がない状態（正向反射消失）とした．

不動化の判定には，侵害刺激として tail-clamp を用いた．Pentobarbital を投与して正向反射に対する作用が最大となる時間に，正向反射消失マウスの尾根部から約 1 cm の部分を動脈クレンメで最大 30 秒間挟み，この間体動がない場合を不動化と判定した．体動の有無のみを観察し，咳，過呼吸などの反応は除外した．

正向反射の消失および不動化の ED<sub>50</sub> は，マウス 5 - 7 匹を 1 群とし，5 投与群に対する正向反射の消失あるいは不動化を生じた動物の反応百分率（%）を対数確率紙にプロットし，特に 40% から 60% の間に一致するように用量反応曲線を描き，Litchfield and Wilcoxon 検定により算出した．また，それ以外の結果は平均値±標準誤差で示した．2 群間の比較は，Student の t 検定を用いて行い，危険率  $p < 0.05$  を有意差ありとした．

### 第 3 項 結果

握力試験において，pentobarbital (10, 15, 20, 25 mg/kg) は用量依存性に握力を低下させ，15 mg/kg 以上の投与量では有意な握力の低下を認めた．また，握力は投与 5 - 10 分後に最小となり，時間の経過とともに回復した (図 1) ．

Pentobarbital (20, 30, 40, 50 mg/kg) は，用量依存性に正向反射スコアを増加させ，投与 10 - 15 分後にはピークに達し，投与量に依存して作用発現開始時間は短くなった．ピークに達した後は，経時的に正向反射スコアは減少し，90 分後にはいずれの投与量でも投与前の状態に回復した．正向反射の消失の ED<sub>50</sub> は 35 (31 - 38; 95%信頼限界) mg/kg であった (図 2) ．

Pentobarbital の麻酔作用のピークは，投与から 10 分後であったことから，pentobarbital (45, 50, 55, 60, 80 mg/kg) を投与して 10 分後に tail-clamp 刺激を加え，体動の有無を判定した．Pentobarbital は，用量依存性に侵害刺激による体動を抑制し，その ED<sub>50</sub> は 56 (50 - 63) mg/kg であった (図 3) ．

### 第 4 項 考察および小括

Pentobarbital はバルビツール酸系の静脈麻酔薬であり，ヒトでは鎮静，催眠作用を引き起こすが，鎮痛作用はないといわれている．バルビツール酸の作用部位は，GABA<sub>A</sub> 受容体複合体の  $\beta$  サブユニットに存在するバルビツール酸結合部位にあり，ここに結合すると GABA の結合親和性を亢進させるとともに，直

接  $\text{Cl}^-$  を細胞内に流入させ過分極となり、シナプス後神経を抑制する。本実験により、pentobarbital は、用量依存性に本実験で行った筋弛緩、正向反射の消失、不動化作用のいずれの麻酔作用も生じることが分かった。

全身麻酔時に求められる筋弛緩効果には、神経筋接合部に作用する筋弛緩薬によってもたらされる末梢性の骨格筋弛緩と、全身麻酔薬により生じる中枢性の筋弛緩がある。中枢性の筋弛緩作用は、ベンゾジアゼピン類などでみられ、主に脊髄において単および多シナプス反射を抑制するとともに、 $\gamma$ 運動ニューロンの自発発射を減少させ、筋紡錘の感度を低下させることにより生じると考えられている。本実験で行った握力試験は、主としてこの中枢性の筋弛緩作用について高精度に検出できると思われる。

マウスなどの小動物の麻酔強度の評価法として、正向反射の消失や侵害刺激による体動の消失を検証する方法がある。正向反射とは、マウスの体を横向きあるいは仰向けにしたとき、マウスが体を正位に戻そうとする反射のことで、意識消失の指標と考えられている【13】。最小麻酔薬濃度 (minimum anesthetic concentration ; MAC) は、侵害刺激に対して 50% のヒトや動物が体動を起こさなくなるのに必要な最小麻酔薬濃度と定義されており、本実験で行った方法はこれに準じている。この状態は、臨床でみられる不動化をよく反映していると考えられる。

Pentobarbital は、受容体選択性が低いといわれており、GABA 神経だけでなくグルタミン酸神経やコリン作動性神経などの興奮性神経にも作用することが示されている【14】。そこで次節では、GABA、グリシン、神経性ニコチン、グルタミン酸の各受容体リガンドがそれぞれ単独で麻酔要素にどのように影響しているのか検討し、pentobarbital の作用と比較した。

## 第 2 節 各麻酔要素に及ぼす GABA , グリシン, 神経性ニコチン, グルタミン酸の各受容体リガンド単独の影響

### 第 1 項 緒言

本節では, GABA 分解酵素阻害薬である gabaculine, グリシントランスポーター1 阻害薬の sarcosine, 神経性ニコチン受容体拮抗薬の mecamylamine, グルタミン酸受容体のサブタイプの一つである NMDA 受容体拮抗薬の MK-801 を使用し, 各麻酔要素に及ぼすこれら受容体リガンド単独の影響を検討した.

### 第 2 項 実験材料および方法

#### 実験材料

実験動物は, 第 1 節で使用した動物に準じた.

#### 使用薬物

本実験では, 薬物として 3-amino-2,3-dihydrobenzoic acid (gabaculine) hydrochloride, sarcosine, mecamylamine hydrochloride, MK-801 hydrogen maleate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を使用した.

## 実験方法

Gabaculine, sarcosine, mecamlamine, MK-801 は 0.9% 生理食塩水（生食）に溶解した。Sarcosine はマウスの体重 10 g 当たり 0.05 ml になるように調整し，尾静脈内に投与した。それ以外の薬物は，マウスの体重 10 g 当たり 0.1 ml になるように調整し，腹腔内に投与した。実験室内の温度は  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  に調節し，マウスをヘッドランプにより保温して体温が低下しないよう維持した。Gabaculine は投与してその薬理効果が最大なる 17 時間後に，sarcosine は投与から 5 時間後に，mecamlamine と MK-801 は投与から 30 分後に，各麻酔要素を第 1 節に準じて評価した。結果は平均値±標準誤差で示した。2 群間の比較は Student の t 検定を用いて行い，危険率  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 第 3 項 結果

Gabaculine (50, 70, 100 mg/kg) は，100 mg/kg の用量で有意な握力の低下がみられた（図 4）。Gabaculine は用量依存性に正向反射を消失させ，その  $\text{ED}_{50}$  は 100 (75 - 134) mg/kg であったが，400 mg/kg の高用量でも不動化は生じなかった（図 5）。

Sarcosine (10 mg/kg) と mecamlamine (5 mg/kg) では，握力の低下，正向反射の消失，不動化のいずれも認めなかった（図 6, 7）。

MK-801 (0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2 mg/kg) は, 0.05 - 0.2 mg/kg において有意に握力が低下したが, 正向反射や侵害刺激による体動の消失には影響しなかった (図 8) .

#### 第 4 項 考察および小括

GABA は中枢神経系における主な抑制性神経伝達物質であるが, GABA 自体は血液脳関門を通過しないため, 最も純粋な GABA 受容体作動薬である内因性 GABA を脳内で増加させることにより, GABA 神経を促進させることを企図した. これを可能にするため, 本実験では, 血液脳関門を容易に通過することで全身投与ができ, 投与後に行動薬理学的な観察が可能で, 強力な選択性を有する GABA 分解酵素阻害薬の gabaculine を使用した. GABA 神経終末からシナプス間隙へ遊離された GABA は, GABA トランスポーターを介して神経終末やグリア細胞に取り込まれ, GABA トランスアミナーゼ (gaba-transaminase ; GABA-T) により代謝される. Gabaculine は, 最も選択的に GABA-T を阻害し GABA の分解を抑制する【15】. Gabaculine は, 細胞外および細胞内で GABA 濃度を上昇させ【16】, GABA<sub>A</sub> 受容体遮断薬である picrotoxin による痙攣誘発作用を用量依存性に抑制する【17】. しかし, gabaculine による GABA 濃度の上昇は GABA 受容体の感受性を低下させないといわれている【17】. これらのことから, 少なくとも gabaculine による抗痙攣作用は, GABA 神経の促進により引き起こされていると考えられる. これまでの当研究室の研究で, gabaculine は用量依存性に正向反射を消失させ, その ED<sub>50</sub> は 100 (75 - 134) mg/kg であったが, 高用

量投与しても不動化は起こらないことを明らかにした【11】(図5)。さらに、本実験において筋弛緩効果も確認された。したがって、GABA受容体刺激は、筋弛緩と意識消失をもたらすことが分かった。

グリシンは、構造的に最も単純なアミノ酸であり、生体内に相当量見出されるが、主に脊髄や延髄において抑制性の神経伝達物質として機能する【6】。グリシン神経のシナプス前神経終末に活動電位が到達すると、カルシウム依存性の情報伝達を開始され、シナプス間隙へグリシンが遊離される【18】。シナプス間隙からのグリシンの除去はグリア細胞とグリシン作動性神経終末に存在するグリシントランスポーター(GlyT)によって行われる。GlyTには2種類あり、GlyT-1は主にグリア細胞に発現してグリシン濃度の調節に関与し、GlyT-2はグリシン作動性神経終末に発現して神経細胞へのグリシンの補充に関与する【19】。GlyT阻害薬は、脊髄でのグリシンの貯留とグリシン受容体の活性化をもたらし、神経因性疼痛に対し鎮痛作用を有するといわれている。GlyT-1阻害薬により貯留したグリシンはまずNMDA受容体に作用し興奮性シナプスを増加させ、その後グリシン受容体を活性化させる。GlyT-2阻害薬により貯留したグリシンは、グリシン受容体のみに作用すると考えられている【20】。今回、GlyT-1阻害薬であるsarcosineの投与により、選択的にグリシン神経伝達を促進させた。Sarcosineは、先行実験によりいずれの麻酔要素も引き起こさなかったことから、本実験では、その投与量は高用量とされる10 mg/kgとした。しかし、高用量のsarcosineを投与して、グリシン神経伝達を促進してもいずれの麻酔要素も認めなかった。

神経性ニコチン受容体(nAChR)は、自律神経系のみならず、大脳皮質、海馬、脊髄後角などの中枢神経系に広く分布し、神

経筋接合部に存在する骨格筋型とは異なる性質を持つ。また、イオンチャネル一体型リガンド依存性受容体であり、GABA<sub>A</sub>受容体と構造的に類似している。シナプス前終末に存在するnAChRは、アセチルコリン、カテコラミン、セロトニン、GABA、グルタミン酸などの遊離に関与する。つまり、これはnAChRの活性化により神経終末が脱分極し、電位依存性カルシウムチャネルが開口して細胞内のカルシウムレベルが上昇し、シナプス小胞に貯蔵された神経伝達物質が遊離されたことによる【21】。また、麻酔濃度以下の全身麻酔薬によりnAChRが抑制されることから、全身麻酔薬による健忘や鎮痛効果の発現に関与している可能性が示唆されている【7】。Mecamylamineは、選択的にnAChRを遮断し、自律神経節などの末梢のnAChRよりも、中枢神経系のnAChRに拮抗作用を有するといわれている【22】。しかし、本実験では、高用量のmecamylamineにより神経性nAChRを選択的に遮断しても、いずれの麻酔要素も生じなかった。

グルタミン酸は脊髄介在ニューロン、一次求心性線維や皮質脊髄線維の主要な伝達物質であり、運動系や脊髄後角での痛覚伝達に重要な役割を果たしている。神経終末からカルシウム依存性に遊離されたグルタミン酸は受容体に結合してその作用を発現させた後、グルタミン酸トランスポーターにより不活性化される。グルタミン酸受容体はイオンチャネル型と代謝調節型に二別される。イオンチャネル型は、さらに、NMDA受容体、AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)受容体、カイニン酸受容体の3つのサブタイプに分けられている。KetamineはNMDA受容体チャネルを遮断して興奮性神経伝達を抑制するが、MK-801はketamineよりもさらに選択的にNMDA受容体チャネルを遮断する。また、MK-801は

イソフルランやハロタンの麻酔に必要な濃度 (MAC) を減少させるという報告もあり【23】，麻酔作用との関連が示唆されている。しかし，高用量の MK-801 (50 mg/kg) を投与しても失調性歩行を認めるのみで，正向反射の消失や不動化は生じなかったが【24】，本実験においては用量依存性に筋弛緩作用を生じることが確認された。脊髓反射の観点から，単シナプス H-反射は非 NMDA 受容体を介し，多シナプス屈曲反射は NMDA 受容体を介することがげっ歯類で確認されている。選択的な NMDA 受容体拮抗薬は，H-反射に影響せずに屈曲反射を抑制することが報告されており【25】，このことが NMDA 受容体拮抗薬の中枢性筋弛緩作用と関連すると考えられている。これらのことは，MK-801 が筋弛緩作用を有することを示した本実験での結果と一致する。

以上のことから，GABA 受容体刺激は意識消失を引き起こし，NMDA 受容体遮断は筋弛緩をもたらすことが明らかになった。

### 第 3 節 Pentobarbital が引き起こす各麻酔要素に及ぼす各受容体リガンド併用の影響

#### 第 1 項 緒言

本節では, pentobarbital により引き起こされる握力の低下, 正向反射の消失, 不動化に及ぼす gabaculine, sarcosine, mecamlamine, MK-801 の各受容体リガンド併用の影響について検討した.

#### 第 2 項 実験材料および方法

##### 実験材料

実験動物は, 第 1 節で使用した動物に準じた.

##### 使用薬物

本実験では, 薬物として第 1 節および第 2 節で使用した薬物を用いた.

##### 実験方法

薬剤の調整, 投与方法は前節と同様に行った. 実験室内の温度は  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  に調節し, マウスをヘッドランプにより保温して

体温が低下しないよう維持した。各受容体リガンドを投与して、その薬理効果が最大となる時間に pentobarbital を投与し、握力、正向反射、不動化を評価した。麻酔作用の評価法は、第 1 節に準じた。正向反射の消失および不動化の ED<sub>50</sub> は、マウス 5 - 7 匹を 1 群とし、4 - 6 投与群に対する正向反射の消失あるいは不動化を生じた動物の反応百分率 (%) を対数確率紙にプロットして用量反応曲線を描き、Litchfield and Wilcoxon 検定により算出した。それ以外の結果は平均値±標準誤差で示した。2 群間の比較は、Student の t 検定を用いて行い、危険率  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

Gabaculine の投与量は、正向反射消失の 5% 有効量 (ED<sub>5</sub>) に相当する 50 mg/kg とした。握力は、齋藤式マウス用握力測定装置を用いて、gabaculine の投与前、gabaculine の薬理効果が最大となる 17 時間後および筋弛緩に影響しない低用量の pentobarbital 10 mg/kg を投与してから 5 分毎に 1 時間測定した。対照群として、生食のみを投与する群、生食と pentobarbital (10 mg/kg) を投与する群および gabaculine (50 mg/kg) と生食を投与する群を用いて比較検討した。正向反射の消失の評価は、gabaculine (50 mg/kg) を投与してから 17 時間後に pentobarbital (1, 5, 10, 20, 30 mg/kg) を投与し、ただちにマウスを 1 匹ずつビーカーに入れ、第 1 節と同様に、2 分毎に正向反射スコアを観察記録した。対照群として、生食を投与してから 17 時間後に pentobarbital (25, 30, 35, 40, 45 mg/kg) を投与し、正向反射スコアを評価した。不動化は、gabaculine (50 mg/kg) を投与してから 17 時間後に pentobarbital (20, 25, 30, 35, 40 mg/kg) を投与し、正向反射が消失したマウスに pentobarbital の麻酔作用が最大となる時間に tail-clamp 刺激を加え、体動の有無を判定した。対照群として、生食を投与

してから 17 時間後に pentobarbital(45, 50, 55, 60, 70 mg/kg) を投与し, tail-clamp 刺激による体動の有無を判定した.

Sarcosine は, 単独ではいずれの麻酔要素も認めなかったことから, 投与量は高用量とされる 10 mg/kg を用いた. 握力は, sarcosine の投与前, sarcosine の薬理効果が最大となる 5 時間後および pentobarbital (10 mg/kg) を投与してから 5 分毎に 1 時間測定した. 対照群として, 生食のみを投与する群, 生食と pentobarbital (10 mg/kg) を投与する群および sarcosine (10 mg/kg) と生食を投与する群を用いて比較検討した. 正向反射は, sarcosine (10 mg/kg) を投与してから 5 時間後に pentobarbital (10, 20, 25, 30, 40 mg/kg) を投与し, 2 分毎に正向反射スコアを観察記録した. 対照群として, 生食を投与してから 5 時間後に pentobarbital(20, 25, 30, 35, 40 mg/kg) を投与して正向反射スコアを評価した. 不動化は, sarcosine (10 mg/kg) を投与してから 5 時間後に pentobarbital (30, 35, 40, 50, 55 mg/kg) を投与し, 正向反射が消失したマウスに対し, pentobarbital の麻酔作用が最大となる時間に, tail-clamp 刺激を加え, 体動の有無を判定した. 対照群として, 生食を投与してから 5 時間後に pentobarbital (45, 50, 60, 65, 70 mg/kg) を投与し, tail-clamp 刺激を加え, 体動の有無を判定した.

Mecamylamine の投与量は, 単独では麻酔作用を示さなかったことから, 高用量とされる 5 mg/kg を用いた. 握力は, mecamylamine の投与前, mecamylamine の薬理効果が最大となる 30 分後および pentobarbital (10 mg/kg) を投与してから 5 分毎に 1 時間測定した. 対照群として, 生食のみを投与する群, 生食と pentobarbital (10 mg/kg) を投与する群および mecamylamine (5 mg/kg) と生食を投与する群を用いて比較検

討した． 正向反射の評価は，mecamylamine (5 mg/kg) を投与してから 30 分後に pentobarbital (10, 20, 30, 40 mg/kg) を投与し，2 分毎に正向反射スコアを観察記録した． 対照群として，生食を投与してから 30 分後に pentobarbital (20, 25, 30, 35, 40 mg/kg) を投与して正向反射スコアを評価した． 不動化は，mecamylamine (5 mg/kg) を投与してから 30 分後に pentobarbital (35, 40, 45, 50, 55, 60 mg/kg) を投与し，正向反射が消失したマウスに対し，pentobarbital の麻酔作用が最大となる時間に，tail-clamp 刺激を加え，体動の有無を判定した． 対照群として，生食を投与してから 30 分後に pentobarbital (45, 50, 55, 60, 70 mg/kg) を投与し，tail-clamp 刺激に対する体動の有無を判定した．

MK-801 の投与量は，筋弛緩に影響しない 0.03 mg/kg と約 40% の握力低下率を示した 0.2 mg/kg を用いて比較した． 握力は，MK-801 投与前，MK-801 の薬理効果が最大となる 30 分後および pentobarbital (10 mg/kg) を投与してから 5 分毎に 1 時間測定した． 対照群として，生食のみを投与する群，生食と pentobarbital (10 mg/kg) を投与する群，MK-801 (0.2, 0.03 mg/kg) と生食を投与する群を用いて比較検討した． 正向反射の評価は，MK-801 (0.2, 0.03 mg/kg) を投与してから 30 分後に pentobarbital (10, 15, 20, 30, 35, 40 mg/kg) を投与した後，2 分毎に正向反射スコアを観察記録した． 対照群として，生食を投与してから 30 分後に pentobarbital (20, 25, 30, 35, 40 mg/kg) を投与した後，正向反射スコアを評価した． 不動化は，MK-801 (0.2, 0.03 mg/kg) を投与してから 30 分後に pentobarbital (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 mg/kg) を投与し，正向反射が消失したマウスに，pentobarbital の麻酔作用が最大となる時間に，tail-clamp 刺激を加え，体動の有無を

判定した。対照群として、生食を投与してから 30 分後に pentobarbital (45, 50, 55, 60, 70 mg/kg) を投与した後、tail-clamp 刺激による体動の有無を判定した。

### 第 3 項 結果

#### **Pentobarbital に gabaculine (50 mg/kg) を併用**

握力試験の結果は、gabaculine 単独や pentobarbital 単独で握力に変化がみられないのに対し、pentobarbital に gabaculine を併用した場合、握力は pentobarbital 投与 5 分後から有意に低下し始め、10 - 20 分後にピークとなり、その後経時的に回復していくものの 60 分を経過してもまだ握力の低下を認めた (図 9)。正向反射に対する作用では、本来であれば正向反射が消失しない低用量の pentobarbital でも正向反射スコアを増加させ、またその作用時間も延長した (図 10)。Gabaculine は、pentobarbital の用量反応曲線を左方移動させ、その ED<sub>50</sub> は 32 (23 - 45) mg/kg から 10 (7 - 16) mg/kg に有意に減少した ( $p < 0.05$ ) (図 11)。不動化においても、pentobarbital と gabaculine の併用は、用量反応曲線を左方移動させ、その ED<sub>50</sub> は 55 (49 - 62) mg/kg から 30 (27 - 34) mg/kg に有意に減少した ( $p < 0.05$ ) (図 12)。

#### **Pentobarbital に sarcosine (10 mg/kg) を併用**

握力試験では、pentobarbital に sarcosine を併用しても変化がみられなかった (図 13)。正向反射スコアは pentobarbital

単独のときとほぼ同様の変化を示した (図 14) . 正向反射の消失の  $ED_{50}$  は, pentobarbital と sarcosine の併用群で 28 (25 - 31) mg/kg, pentobarbital 単独投与群で 30 (27 - 34) mg/kg であり, 2 群間に有意差はなかった (図 15) . 一方, 不動化では, pentobarbital に sarcosine を併用すると, 用量反応曲線が左方に移動し, その  $ED_{50}$  は 57 (51 - 64) mg/kg から 38 (33 - 44) mg/kg に有意に減少した ( $p < 0.05$ ) (図 16) .

### **Pentobarbital に mecamlamine (5 mg/kg) を併用**

握力試験では, pentobarbital に mecamlamine を併用しても変化がみられなかった (図 17) . 正向反射スコアは, pentobarbital 単独のときとほぼ同様の変化を示した (図 18) . 正向反射消失の  $ED_{50}$  は pentobarbital と mecamlamine の併用群で 29 (20 - 41) mg/kg, 対照群で 32 (21 - 48) mg/kg であり, 2 群間に有意差はなかった (図 19) . 不動化の  $ED_{50}$  は, pentobarbital と mecamlamine の併用群で 51 (45 - 58) mg/kg, 対照群で 51 (46 - 57) mg/kg であり, 2 群間に有意差はなかった (図 20) .

### **Pentobarbital に MK-801 (0.03, 0.2 mg/kg) を併用**

握力試験の結果は, MK-801 0.2 mg/kg 単独でも握力を有意に低下させ, さらに pentobarbital を併用すると著明な握力の低下がみられた. また, MK-801 0.03 mg/kg 単独では握力に変化がみられなかったが, pentobarbital を併用すると有意に握力を低下させた (図 21) . Pentobarbital に MK-801 0.03 mg/kg を併用したときの正向反射スコアは, pentobarbital 単独のと

きとほぼ同様の变化を示した(図 22). Pentobarbital に MK-801 0.2 mg/kg を併用すると, 単独では正向反射が消失しない低用量の pentobarbital でも正向反射は消失し, その作用時間も延長した(図 25). 正向反射消失の  $ED_{50}$  は, pentobarbital と MK-801 0.03 mg/kg の併用群で 26 (19 - 34) mg/kg, pentobarbital と MK-801 0.2 mg/kg の併用群で 15 (11 - 21) mg/kg であり, 対照群では 32 (24 - 41) mg/kg であった. 不動化の  $ED_{50}$  は, それぞれ 39 (33 - 45) mg/kg, 48 (43 - 52) mg/kg, 51 (46 - 57) mg/kg であった. MK-801 0.2 mg/kg は pentobarbital の用量反応曲線を左方移動させ, 有意に正向反射の消失および不動化を増強した ( $p < 0.05$ ) (図 23, 24, 26, 27).

#### 第 4 項 考察および小括

本実験により, gabaculine は, 筋弛緩を生じない低用量の pentobarbital により引き起こされる今回検討したすべての麻酔要素を増強することが分かった. 高用量の sarcosine は, pentobarbital により生じる不動化のみを増強した. Mecamylamine は高用量でも pentobarbital による麻酔要素を増強しなかった. 筋弛緩作用のない低用量の MK-801 は, pentobarbital の筋弛緩のみを増強した. また, 高用量の MK-801 は, pentobarbital の麻酔作用すべてを増強したが, これは MK-801 の筋弛緩作用が影響したのかもしれない.

大脳皮質が除去され, 中脳, 脳幹網様体が最も上位中枢となった動物においても, 正向反射は正常に保たれることが明らかにされている【26】. さらに, Nelson らは, 行動薬理学的手法

と c-fos 免疫染色法を用いて、睡眠に関与する橋から視床下部を中心とする GABA 神経系が、全身麻酔薬による正向反射消失作用に重要な役割を果たすことを報告した【27】。これらの知見は、pentobarbital が橋、中脳から視床下部を中心とする GABA 神経系に作用して意識消失を引き起こした可能性を示唆している。

臨床濃度の吸入麻酔薬やバルビツール酸および propofol は、グリシン受容体を活性化することが報告されており、今回の実験からも、pentobarbital の不動化作用には GABA 神経に加え、グリシン神経の活性化も関与していることが示唆された。侵害刺激に対する体動反応の消失は、全身麻酔薬の麻酔強度を表す指標である MAC の決定に際し用いられている。MAC は皮膚切開などの侵害刺激を受けた 50% のヒトや動物が体動を示さなくなるのに必要な最小肺胞内濃度と定義されていることから、MAC は不動化の指標とされている。この MAC が脳だけではなく脊髄レベルでも決定されることが、視床や海馬を含めた両側の除脳を行ったラットを用いて示された【28】。さらに、ヒツジでの脳分離灌流による研究では、脳だけの麻酔では揮発性麻酔薬であるイソフルランの MAC は 2.9% であり、全身に麻酔を投与した場合の 1.2% に比べ 2 倍以上必要であることが報告された【27】。これらの報告は、麻酔薬による不動化が、脳レベルだけではなく、主に脊髄レベルで引き起こされることや、脊髄での運動ニューロンや疼痛伝達ニューロンの両方の抑制が不動化を引き起こすメカニズムである可能性を示している。したがって、不動化作用は、上位中枢だけでなく、脊髄の抑制、さらに感覚神経や運動神経など末梢神経も関与している可能性がある。脊髄における介在ニューロン群は、多シナプス性に運動ニューロンを刺激して脊髄反射を引き起こす。この反射経路

は、直接前角運動ニューロンには到達せず、まず介在ニューロン網を經由し、二次的に運動ニューロンに達する。また、脊髄における神経伝達には、疼痛を伝える神経伝達物質として、サブスタンス P のような神経ペプチドやグルタミン酸があり、運動ニューロンを調節する神経伝達物質としては、グルタミン酸、GABA、グリシンなどが存在する。GABA やグリシン神経の促進により pentobarbital の不動化が増強したことから、pentobarbital がこの脊髄介在ニューロン網の GABA やグリシン神経にも影響し、運動ニューロンが抑制された結果、不動化が起きた可能性もある。

中枢性の筋弛緩作用は、ベンゾジアゼピン類などでみられ、脊髄において単および多シナプス反射を抑制するとともに、 $\gamma$ 運動ニューロンのインパルスを減少させ、筋紡錘の感度を低下させることにより生じる。また、脊髄での多シナプス屈曲反射は NMDA 受容体を介しており、NMDA 受容体の遮断はこの屈曲反射を抑制し筋弛緩を生じると考えられている。本実験で示された GABA 神経の促進と NMDA 受容体の遮断により pentobarbital の筋弛緩作用が増強されたことは、以上の知見と一致する。

Patch clamp 法を用いた電気生理学実験により、ニコチン受容体作動薬の epibatidine は、脊髄内抑制性介在ニューロンを賦活化し、GABA やグリシンの遊離を増強し、この epibatidine が作用する nAChR は脊髄後角第 V 層に入力する GABA やグリシンを含有する抑制性介在ニューロンの神経終末にあることが報告されている【29】。しかし、本実験では、神経性ニコチン受容体の遮断は、pentobarbital により生じる麻酔要素には影響しなかったことから、この報告との関連性は見出せなかった。

以上のことから，pentobarbital により引き起こされる筋弛緩は主に脊髄における GABA 神経の促進と NMDA 受容体の遮断が関係し，意識消失は上位中枢における GABA 神経の促進によるもので，不動化は脊髄での GABA とグリシン神経の促進に関与しているのではないかと推察された．しかし，今回の実験では受容体リガンドを全身投与しているため，脊髄と脳のどちらを介しているのかまでは確認できておらず，脊髄腔内投与により脊髄の内因性 GABA やグリシン濃度を上昇させて麻酔要素にどのように影響するかなど，今後さらに検討を加えていく余地がある．

### 第Ⅲ章 サブスタンス P遊離に及ぼす pentobarbital と 各受容体リガンド単独もしくは併用の影響

#### 第 1 節 緒言

第Ⅱ章より，静脈麻酔薬である pentobarbital により引き起こされる筋弛緩，意識消失，不動化を GABA，グリシン，グルタミン酸受容体リガンドが増強することが明らかになった．緒論の部分でも述べたが，サブスタンス P (SP) は脊髄後角において痛みを伝える神経伝達物質であり，全身麻酔の構成要素である不動化の作用機序に重要な役割を果たしている可能性がある．そこで，本章では，一次知覚神経の解析モデルとして，DRG 初代培養細胞を用い，SP遊離に及ぼす pentobarbital と GABA，グリシン，神経性ニコチン，グルタミン酸の各受容体リガンド単独もしくは併用の影響を *in vitro* で検討した．

#### 第 2 節 実験材料および方法

##### 実験材料

実験動物として Wistar 系成熟ラット（6 週齢，Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan）を使用した．明／暗 12 時間サイクル（明；8：00 - 20：00），室温 25 ± 1℃，湿度 50%，固形飼料および飲料水は自由に摂取できる環境下で飼育した．

## 使用薬物

DRG 初代培養には以下のものを用いた。ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan), ウマ血清, ペニシリン/ストレプトマイシン (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA), 2.5%トリプシン (Invitrogen Co., Burlington, Ontario, Canada), コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA),  $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>8</sup>-SP (81.4 TBq / mmol) (New England Nuclear, Boston, MA, USA) .

SP 遊離実験には, capsaicin, muscimol (5-aminomethyl-3-hydroxyisoxazole) hydrobromide, gaboxadol hydrochloride (4,5,6,7,-tetrahydroisoxazole [5,4-c] pyridin-3-ol hydrochloride; THIP hydrochloride), baclofen hydrochloride, mecamlamine hydrochloride, MK-801 hydrogen maleate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), glycine (Kishida Chemical Co., Osaka, Japan), pentobarbital sodium (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。

## 実験方法

### DRG 細胞初代培養

Wistar 系成熟ラットを断頭した後, 氷冷した Hank's buffer 中で脊髄を速やかに摘出し, 実体顕微鏡下で DRG のみを無菌的に単離した。採取した DRG を Hank's buffer で 3 回洗浄し, 5 分間, 1000 rpm で遠心分離した。次に 0.125% コラゲナーゼ溶液を加え, 37°C, 90 分間, 震盪恒温槽にて酵素処理を 2 回行

い，1000 rpm で 10 分間遠心分離した後，再度 Hank's buffer で洗淨した．さらに，0.25%トリプシン溶液を加え，37℃で 30 分間，震盪恒温槽にて酵素処理した後，再び 1000 rpm で 10 分間遠心分離した．その後，10%非働化処理済ウマ血清，1%ペニシリン／ストレプトマイシン，30 ng/ml の神経栄養因子 (NGF) を添加した DMEM に細胞を分散させ，ラミニン処理した 35 mm dish を用いて，37℃，5%CO<sub>2</sub> の条件下で 7 日間培養した．

### サブスタンス P 遊離実験

培養 DRG 細胞からの SP の遊離は，100 nM の capsaicin で刺激することにより行った．Krebs-HEPES buffer で DRG 細胞を 2 回洗淨した後，ペプチダーゼインヒビターと 0.1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含有させた Krebs-HEPES buffer で調整した本章で検討する薬物を溶解させ 10 分間処置した．その後，capsaicin (100 nM) を加え，10 分後に release 液を回収した．5000 rpm で 5 分間遠心分離し，得られた上清を SP 遊離サンプルとした．

試薬は，pentobarbital (10 μM, 100 μM, 1 mM) 単独の場合，muscimol, THIP (GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニスト)，baclofen (GABA<sub>B</sub> 受容体アゴニスト)，glycine, mecamylamine, MK-801 のそれぞれ 1 mM 単独と pentobarbital 100 μM を併用した場合で検証した．

## ラジオイムノアッセイ法によるサブスタンス P 遊離量の測定

SP 遊離サンプルに抗 SP 抗体を加え、さらに 0.1% Triton X を添加した BSA 含有 Krebs-HEPES buffer で希釈した  $^{125}\text{I-Tyr}^8\text{-SP}$  を加え、 $4^\circ\text{C}$  で 18 時間処置した。抗体と結合していない遊離型  $^{125}\text{I-Tyr}^8\text{-SP}$  を 0.9% BSA 含有 2% チャコール溶液に吸着させ、2500 rpm で 10 分間遠心分離した後、上清中の結合型  $^{125}\text{I-Tyr}^8\text{-SP}$  の放射能活性を  $\gamma$  カウンターにより測定した。

### 第 3 節 結果

培養 DRG 細胞を capsaicin (100 nM) で刺激すると、無刺激では SP の遊離は平均  $85 \pm 32$  pg/dish であるのに対し、100 nM の capsaicin で刺激すると平均  $218 \pm 108$  pg/dish の SP が遊離された。そこで、DRG 細胞刺激は、100 nM の capsaicin で行うことにした。

Capsaicin 誘発サブスタンス P 遊離に及ぼす pentobarbital (10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM) の影響を検証したところ、capsaicin 刺激で誘発される SP の遊離量を 100% とした場合、pentobarbital の濃度が 10  $\mu\text{M}$  のとき 78% に、100  $\mu\text{M}$  のとき 54% に、1 mM のとき 42% に減少し、その作用は濃度依存性であった (図 28)。また、1 mM の muscimol, THIP, baclofen, glycine, mecamylamine, MK-801 単独ではいずれも SP 遊離に影響しなかった (図 29)。さらに、SP の抑制率が約 50% の pentobarbital 100  $\mu\text{M}$  と各受容体リガンド 1 mM を併用したときの SP 遊離の影響を検討したところ、各受容体リガンドは 1

mM の高濃度でも pentobarbital の SP 遊離抑制作用を増強しなかった (図 30) .

#### 第 4 節 考察および小括

末梢組織への侵害刺激は一次知覚神経の痛覚受容器 (自由神経終末) が受容し, 一次知覚神経によって脊髄後角で二次神経に伝達された後, 上位中枢である大脳皮質へと伝達され痛みと認識される. 一次知覚神経には径の大きさを分類される 3 種類の神経があり (太い方から AB, A $\delta$ , C 線維), そのうち A $\delta$  線維と C 線維が痛みの伝達を担っている. 痛みを伝達する一次知覚神経の一部には, SP をはじめとする神経ペプチドが存在する. SP は, 侵害刺激に応じて一次知覚神経から遊離され, 脊髄後角において二次神経に痛みを伝達すると同時に, 末梢組織で遊離された場合, 免疫担当細胞, 肥満細胞, 血管平滑筋に作用して, 血管拡張の結果, 発赤, 発熱, 血漿滲出による腫脹, 知覚神経の興奮性亢進などを主な症状とする神経因性炎症反応を生じる【30】. 末梢から脊髄後角に投射する一次求心性線維の細胞体は DRG に局在し, 痛みに関与する C 線維や A $\delta$  線維は capsaicin 感受性の小型細胞に由来する. SP は DRG で合成され, large dense core vesicle と呼ばれる比較的大きなシナプス小胞に封入され, カルシウムイオン依存性の開口分泌により遊離される. 唐辛子の辛みの成分である capsaicin は, DRG に存在する capsaicin 受容体 (transient receptor potential vanilloid receptor 1; TRPV1) を刺激する【31】ことにより SP 遊離を引き起こすことが知られている.

TRPV1は6回の膜貫通領域を持ち、外向き整流性を有するカルシウムイオン透過性の高い非選択性陽イオンチャネルである。Capsaicinの他に酸（プロトン）や43℃を超える熱によっても活性化される複数の有効刺激をもつ多刺激痛み受容体として機能している【31】。43℃というTRPV1の熱活性化温度閾値は、ヒトや動物に痛みを引き起こす温度閾値とほぼ一致しており、TRPV1が侵害性熱刺激受容に関与することを示唆している。TRPV1は後根神経節の無髄C線維の細胞体に発現することが遺伝子やタンパクレベルで確認されており、痛みや熱がポリマーダル受容器と呼ばれるC線維で受容され伝達されるとする理論に一致する。

今回の実験により、pentobarbitalがcapsaicin誘発SP遊離を濃度依存性に抑制することを確認した。このことはpentobarbitalがTRPV1を含めた受容体-細胞内情報伝達系に特異的に作用していると考えられ大変興味深い。TRPV1の活性化は、陽イオンチャネルを開口させ、電位依存性カルシウムチャネルを介して細胞内カルシウムイオンを増加させSPの遊離を誘導するが、吸入麻酔薬やpentobarbitalはこのカルシウムイオンのシグナル伝達系に何らかの形で作用して、SP遊離を抑制しているのではないかと考えられている【10, 32】。しかし、pentobarbitalがSPの遊離を抑制する機序についての明確な見解は未だ不明な点が多い。Whole cell patch clamp法を用いた電気生理学実験では、吸入麻酔薬がアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させたSP受容体を介するCl<sup>-</sup>電流を抑制し、protein kinase C (PKC) 阻害薬によりこの抑制効果は消失したという報告がある【10】。さらに、ketamineやpentobarbitalは、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させたSP受容体への[<sup>3</sup>H]SPの結合を非競合的に阻害するが、その抑制効果は

PKC 阻害薬により消失しないという報告もあり，pentobarbitalがSPの受容体への結合部位とは異なる部位に働いている可能性もある【32】。

DRGにもGABAやグリシン，グルタミン酸などの受容体が発現しているといわれている。また，脊髄後角深層細胞からpatch clamp記録を行うと，グルタミン酸を介する興奮性シナプス後電流(EPSC)ならびにGABAまたはグリシンを介する抑制性シナプス後電流(IPSC)が記録され，SPおよびNK1受容体作動薬を灌流投与すると，グルタミン酸を介するEPSCが有意に増強するだけでなく，GABAまたはグリシンを介するIPSCも著明に増強するという報告がある【33】。しかし，今回の実験では，高濃度の各受容体リガンドはSPの遊離に影響を及ぼさなかった(図29)。また，pentobarbitalがDRGのGABAやグリシン，グルタミン酸受容体に影響してSP遊離を抑制するということもなかった(図30)。

## 第IV章 総括および結論

今回、行動薬理学的手法を用いた *in vivo* 実験と、DRG 培養細胞を用いた *in vitro* 実験を行い、pentobarbital により引き起こされる筋弛緩、意識消失、不動化の各麻酔要素の作用機序を検討した。

行動薬理学実験では、pentobarbital により生じる各麻酔要素が GABA、グリシン、神経性ニコチン、グルタミン酸のどの神経を介して起こっているのかについてマウスを用いて検討した。麻酔作用は、筋弛緩の指標として握力低下の有無、意識消失の指標として正向反射の消失を、不動化の指標として侵害刺激に対する体動の有無を用いて評価した。

さらに、SP 神経に及ぼす pentobarbital や各受容体リガンドの影響について、一次知覚神経の解析モデルとしての DRG 初代培養細胞を用いて *in vitro* 実験を行い、以下のような結果および結論が得られた。

1. 静脈麻酔薬である pentobarbital は、用量依存性に握力の低下、正向反射の消失、不動化を引き起こした。正向反射の消失、不動化の ED<sub>50</sub> はそれぞれ 35 (31 - 38) mg/kg と 56 (50 - 63) mg/kg であった。15 mg/kg 以上の用量で握力低下が認められた。不動化の ED<sub>50</sub> は正向反射消失の ED<sub>50</sub> に比べ高用量が必要であった。

2. Gabaculine は，握力低下，正向反射の消失を引き起こしたが，高用量でも不動化は認めなかった．Sarcosine や mecamlamine は高用量においてもいずれの麻酔要素も示さなかった．MK-801 は，低用量で筋弛緩作用を引き起こしたが，高用量でさえその他の麻酔要素は生じなかった．
  
3. Gabaculine は，筋弛緩を生じない低用量で pentobarbital が引き起こすすべての麻酔要素を増強した．Sarcosine は pentobarbital の不動化のみを増強した．Mecamlamine は，高用量でも pentobarbital の麻酔作用に影響しなかった．MK-801 の筋弛緩を生じない低用量は pentobarbital の筋弛緩作用のみを増強した．
  
4. Pentobarbital は，濃度依存性に培養 DRG 細胞からの capsaicin 刺激による SP 遊離を抑制した．しかし，各受容体リガンドは 1 mM の高濃度でも SP 遊離を抑制しなかったし，pentobarbital (100  $\mu$ M) の作用を増強することもなかった．

本研究により，pentobarbital による筋弛緩は GABA 受容体刺激と NMDA 受容体遮断に関与し，意識消失は GABA 受容体の刺激と，不動化は GABA とグリシン受容体の両方の刺激と関係することが明らかになった．SP 遊離抑制作用は，鎮痛など他の麻酔要素と関係しているのかもしれない．

## 謝辞

本稿の撰筆にあたり、始終ご懇切なご指導・ご高閲を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻病態制御医科学講座（歯科麻酔学）入船正浩教授に心より深謝の意を表します。また、本研究の遂行および本論文の作成に際し、ご懇篤なるご教示を賜りました本学研究科創生医科学専攻病態探求医科学講座（歯科薬理学）兼松隆教授ならびに森田克也准教授、本学研究科薬学専攻医療薬学講座（薬効解析科学）仲田義啓教授ならびに森岡徳光講師、本学研究科創生医科学専攻病態探求医科学講座（口腔生理学）杉田誠教授に満腔の謝意を表します。

最後に、本研究の完遂に際して、多大なるご支援ならびにご協力を頂きました歯科麻酔学、薬効解析科学、歯科薬理学の研究室関係各位に心より奉謝いたします。

## 引用文献

- 【1】 Evers AS, Crowder CM. General anesthetics. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001: pp337-365.
- 【2】 Sawamura S, Kingery WS, Davies MF, Agashe GS, Clark JD, Kobilka BK, Hashimoto T, Maze M. Antinociceptive action of nitrous oxide is mediated by stimulation of noradrenergic neurons in the brainstem and activation of  $\alpha_{2B}$  adrenoceptors. *J Neurosci* 2000; 20: 9242-9251.
- 【3】 Krasowski MD, Harrison NL. General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 1278-1303.
- 【4】 Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* 1997; 389: 385-389.
- 【5】 Nicholls DG. Amino acids as neurotransmitters (Proteins, transmitters and synapses), Blackwell Science Oxford 1994; 155-185.

- 【6】 Becker CM. Disorders of the inhibitory glycine receptor: the spastic mouse. *The FASEB J* 1990; 4: 2767-2774.
- 【7】 Violet JM, Downie DL, Nakisa RC, Lieb WR, Franks NP. Differential sensitivities of mammalian neuronal and muscle nicotinic acetylcholine receptors to general anesthetics. *Anesthesiology* 1997; 86: 866-874.
- 【8】 Kuraishi Y, Hirota N, Sugimoto M, Satoh M, Takagi H. Effect of morphine on noxious stimuli-induced release of substance P from rabbit dorsal horn in vivo. *Life Sci* 1983; 33: 693-696.
- 【9】 Kendig JJ, Savola MKT, Woodley SJ, Maze M.  $\alpha_2$ -Adrenoceptors inhibit a nociceptive response in neonatal rat spinal cord. *Eur J Pharmacol* 1991; 192: 293-300.
- 【10】 Minami K, Shiraishi M, Uezono Y, Ueno S, Shigematsu A. The inhibitory effects of anesthetics and ethanol on substance P receptors expressed in xenopus oocytes. *Anesth Analg* 2002; 94: 79-83.
- 【11】 Katayama S, Irifune M, Kikuchi N, Takarada T, Shimizu Y, Endo C, Takata T, Dohi T, Sato T, Kawahara M. Increased  $\gamma$ -aminobutyric acid levels in mouse brain induce loss of righting reflex, but not immobility, in response to noxious stimulation. *Anesth Analg* 2007; 104: 1422-1429.

- 【12】 Boast CA, Pastor G, Gerhardt SC, Hall NR, Liebman JM. Behavioral tolerance and sensitization to CGS 19755, a competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 247: 556-561.
- 【13】 Campagna JA, Miller KW, Forman SA. Mechanism of action of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* 2003; 348: 2110-2124.
- 【14】 Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 1994; 367: 607-614.
- 【15】 Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. Amino acid transmitters. In: *The biochemical basis of neuropharmacology*. 8th ed. New York: Oxford University Press, 2003: pp105-150.
- 【16】 Pierard C, Peres M, Satabin P, Guezennec CY, Lagarde D. Effects of GABA-transaminase inhibition on brain metabolism and amino-acid compartmentation : an in vivo study by 2D <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy coupled with microdialysis. *Exp Brain Res* 1999; 127: 321-327.
- 【17】 Meldrum BS. GABAergic mechanisms in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Br J Clin Pharmacol* 1989; 27 Suppl 1: 3S-11S.
- 【18】 Huang H, Barakat L, Wang D, Bordey A. Bergmann glial GlyT1 mediates glycine uptake and release in mouse cerebellar slices. *J Physiol* 2004; 560: 721-736.

- 【19】 Eulenburg V, Armsen W, Betz H, Gomeza J. Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Biochemical Sci* 2005; 30: 325-333.
- 【20】 Morita K, Motoyama N, Kitamura T, Morioka N, Dohi T. Antinociceptive effects of glycine transporter inhibitors in neuropathic pain models in mice. *Folia Pharmacol Jpn* 2007; 130: 458-463.
- 【21】 Andoh T. Effects of general anesthetics on neuronal nicotinic acetylcholine receptors and their roles in the mechanism of anesthesia. *The Japanese journal of anesthesiology* 2001; 50: 1072-1084.
- 【22】 Domino EF. Significance of multiple nicotinic cholinergic receptors for tobacco use. In *Brain Imaging of Nicotine and Tobacco Smoking*, EF Domino, Ed, NPP Books, Ann Arbor, 1995: pp1-12.
- 【23】 Wagner AE, Walton JA, Hellyer PW. Use of low doses of ketamine administered by constant rate infusion as an adjunct for postoperative analgesia in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 221: 72-75.
- 【24】 Irifune M, Katayama S, Takarada T, Shimizu Y, Endo C, Takata T, Morita K, Dohi T, Sato T, Kawahara M. MK-801 enhances gabaculine-induced loss of the righting reflex in mice, but not immobility. *Can J Anesth* 2007; 54: 998-1005.

- 【25】 Block F, Schwarz M. N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated muscle relaxant action of dextromethorphan in rats. *Neuroreport* 1993; 4: 941-943.
- 【26】 Magnus R. Animal posture: Royal Society Croonian Lecture. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* 1925; 98: 339-353.
- 【27】 Nelson LE, Guo TZ, Lu J, Saper CB, Franks NP, Maze M. The sedative component of anesthesia is mediated by GABA<sub>A</sub> receptors in an endogenous sleep pathway. *Nat Neurosci* 2002; 5: 979-984.
- 【28】 Mashimo T. Mechanism of General Anesthesia. *Journal of Clinical Anesthesia (Japan)* 2003; 27: 295-311.
- 【29】 Maio K. Epibatidine, nicotinic acetylcholine receptor agonist, activates inhibitory synaptic transmission in spinal pain pathway. *J Wakayama Med Soc* 2003; 54(2): 74-80.
- 【30】 Inoue A, Nakata Y. Neurogenic inflammation facilitates neuropeptides release from primary afferent neurons. *Folia Pharmacol Jpn* 2006; 127: 137-140.
- 【31】 富永真琴. 生体はいかに温度をセンスするかーTRPチャネル受容体ー. *日生誌* 2003; 65: 130-137.

- 【32】 Okamoto T, Minami K, Uezono Y, Ogata J, Shiraishi M, Shigematsu A, Ueta Y. The inhibitory effects of ketamine and pentobarbital on substance P receptors expressed in xenopus oocytes. *Anesth Analg* 2003; 97: 104-110.
- 【33】 Sonobe H, Nakatsuka H, Takeda D, Taniguchi Y, Tamaki T, Yoshida M. Substance P induced enhancement of inhibitory synaptic transmission in deep dorsal horn. *Pain Research* 2004; 19: 9-16.

## 図 表

**図 1** Pentobarbital をマウス腹腔内に投与した後の握力を経時的変化で示す。握力は，pentobarbital 投与前と，pentobarbital (10, 15, 20, 25 mg/kg) 投与後 5 分毎に 1 時間測定した。Control として 0.9% 生理食塩水 (生食) を腹腔内に投与した。各点は，平均値 ± 標準誤差で示す (n = 5 - 7)。  
 \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 (Student's t-test).

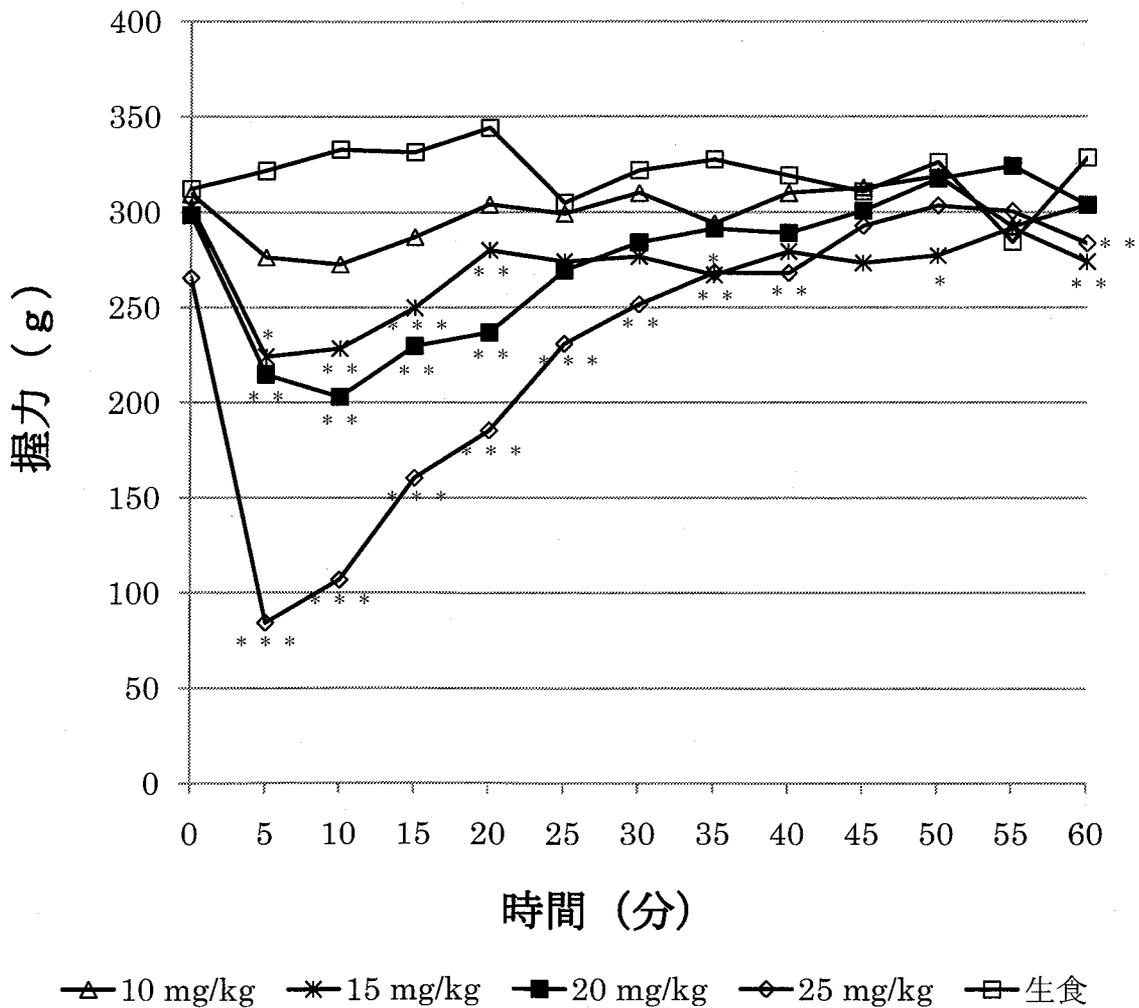


図2 正向反射スコアに及ぼす pentobarbital のマウス腹腔内投与の影響を経時的変化で示す. Pentobarbital (20, 30, 40, 50 mg/kg) をマウスに投与してから, 投与2分毎に正向反射スコアを用いて評価した. 正向反射スコア0は正常, +1は3回とも2秒以内に正向反射がある状態(軽度正向反射障害), +2は2秒から10秒の間に少なくとも1回は正向反射がある状態(中等度-高度正向反射障害), +3は3回とも10秒以内に正向反射がない状態(正向反射消失)を示す.

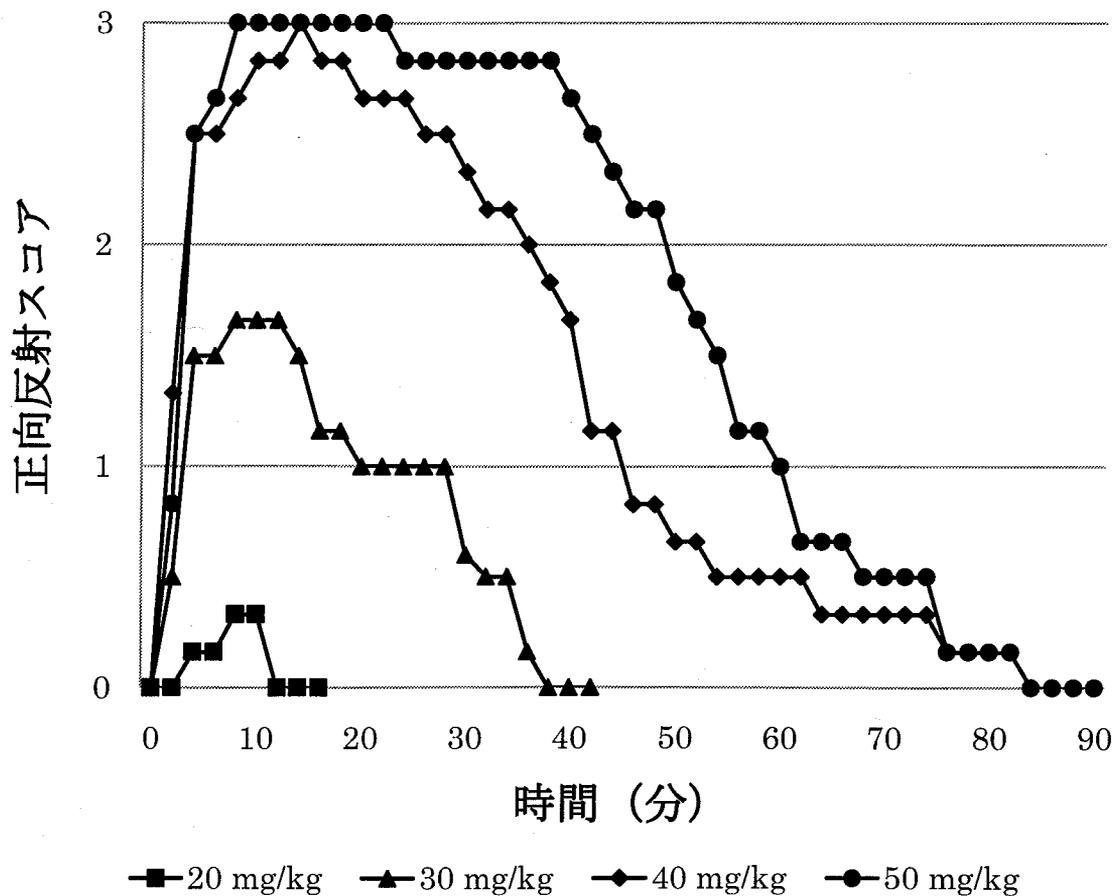


図 3 正向反射の消失および侵害刺激に対する体動の消失（不動化）に及ぼす pentobarbital の影響を示す。種々の用量の pentobarbital は、マウスの腹腔内に投与した。マウス 5 - 7 匹を 1 群とし、5 群に対する正向反射の消失（●）および不動化（▲）を生じた動物の反応百分率（%）を対数確率紙にプロットし、用量反応曲線を描いた。

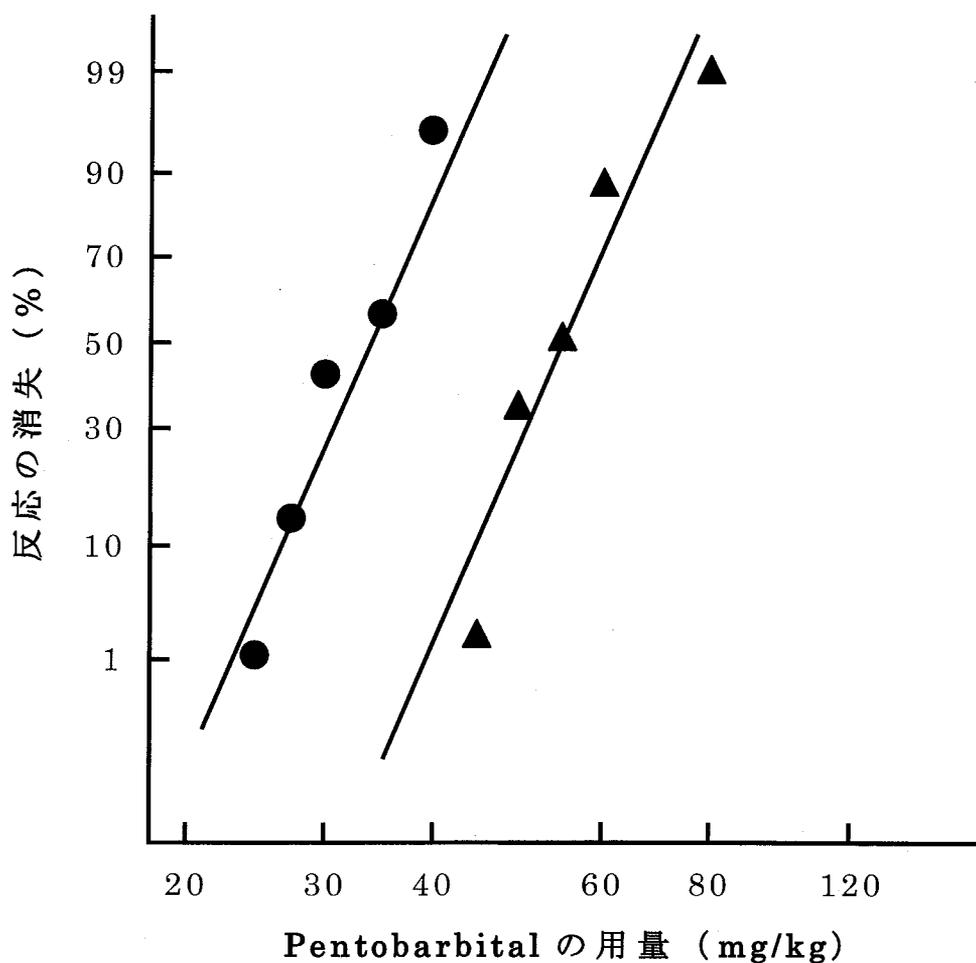
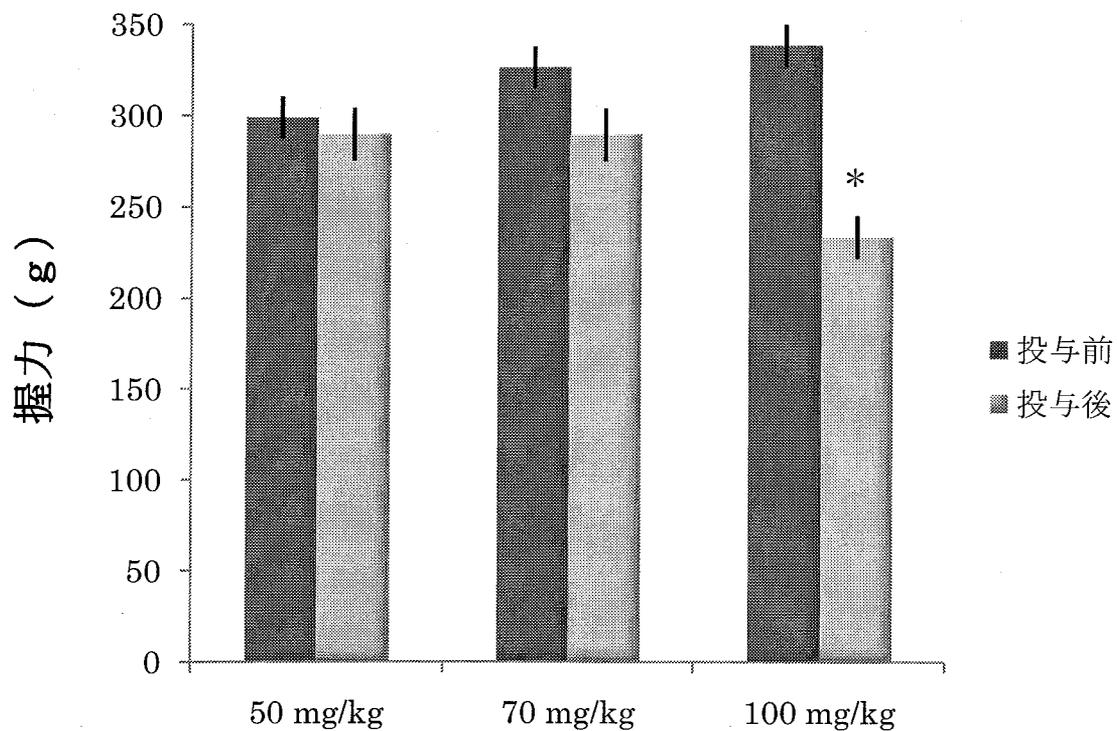


図 4 Gabaculine をマウス腹腔内に投与した後の握力の変化を示す。握力 (g) の測定は、gabaculine 投与前と、gabaculine (50, 70, 100 mg/kg) をマウスに投与して、その薬理効果が最大となる 17 時間後に行った。Gabaculine 100 mg/kg において有意な握力の低下がみられた。\*  $p < 0.05$  (Student's t-test)。



**図 5** 正向反射の消失および侵害刺激に対する体動の消失（不動化）に及ぼす gabaculine の影響を示す．種々の用量の gabaculine は，マウスの腹腔内に投与した．マウス 5 - 7 匹を 1 群とし，各用量反応曲線につき 5 - 6 群を用いた．Gabaculine（35 - 200 mg/kg）投与後 1 時間毎に 24 時間にわたり正向反射スコアを観察し，正向反射の消失を生じたマウスの反応百分率（%）を対数確率紙にプロットした（●）．また，不動化は，gabaculine（100 - 400 mg/kg）を投与後，正向反射の消失のピーク時に tail-clamp 刺激を加え，体動がない動物の反応百分率（%）を対数確率紙にプロットした（▲）．

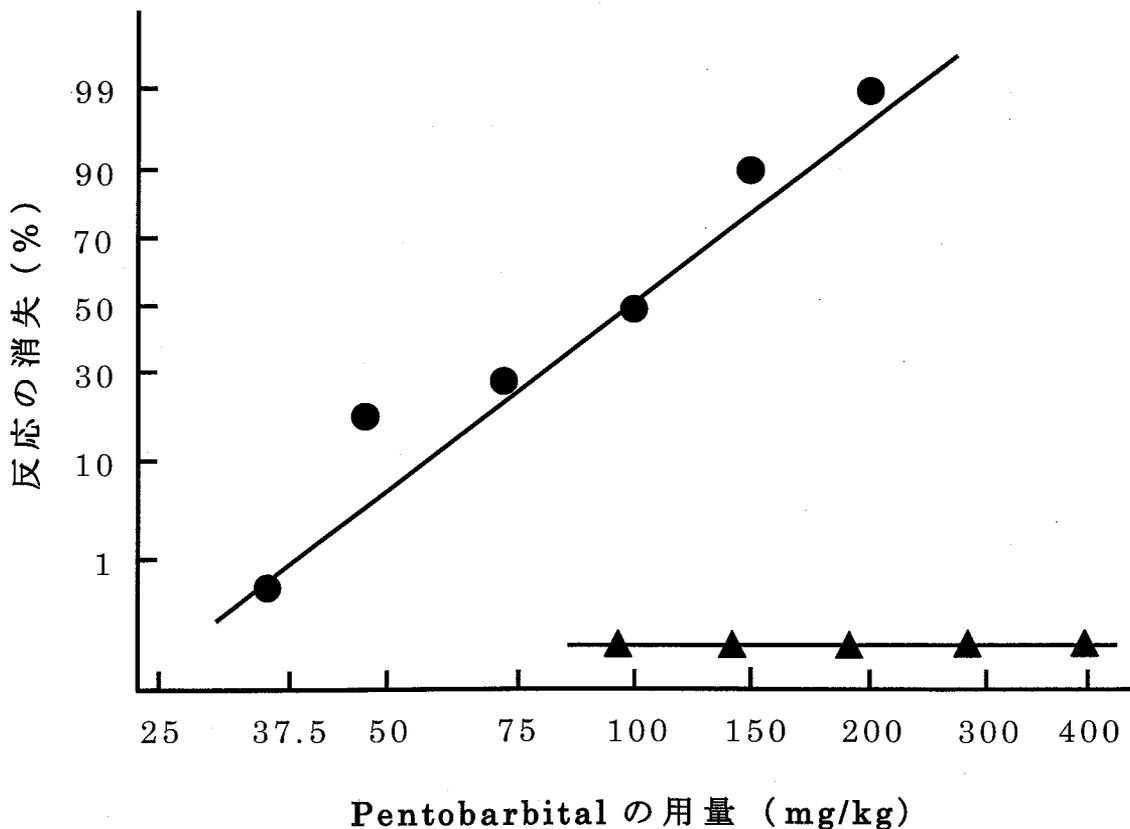


図 6 Sarcosine をマウス尾静脈内に投与した後の握力の変化を示す。握力 (g) の測定は, sarcosine 投与前と, sarcosine 10 mg/kg をマウスに投与して, その薬理効果が最大となる 5 時間後に行った。

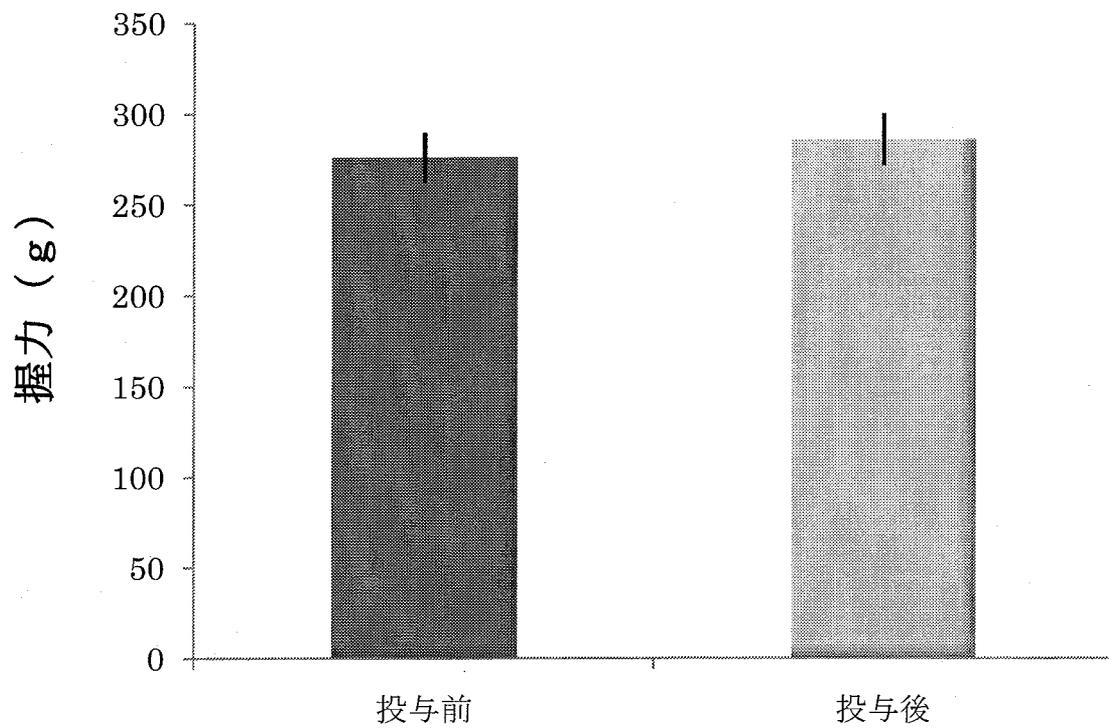


図 7 Mecamylamine をマウス腹腔内に投与した後の握力の変化を示す。握力 (g) の測定は, mecamylamine 投与前と, mecamylamine 5 mg/kg をマウスに投与して, その薬理効果が最大となる 30 分後に行った。

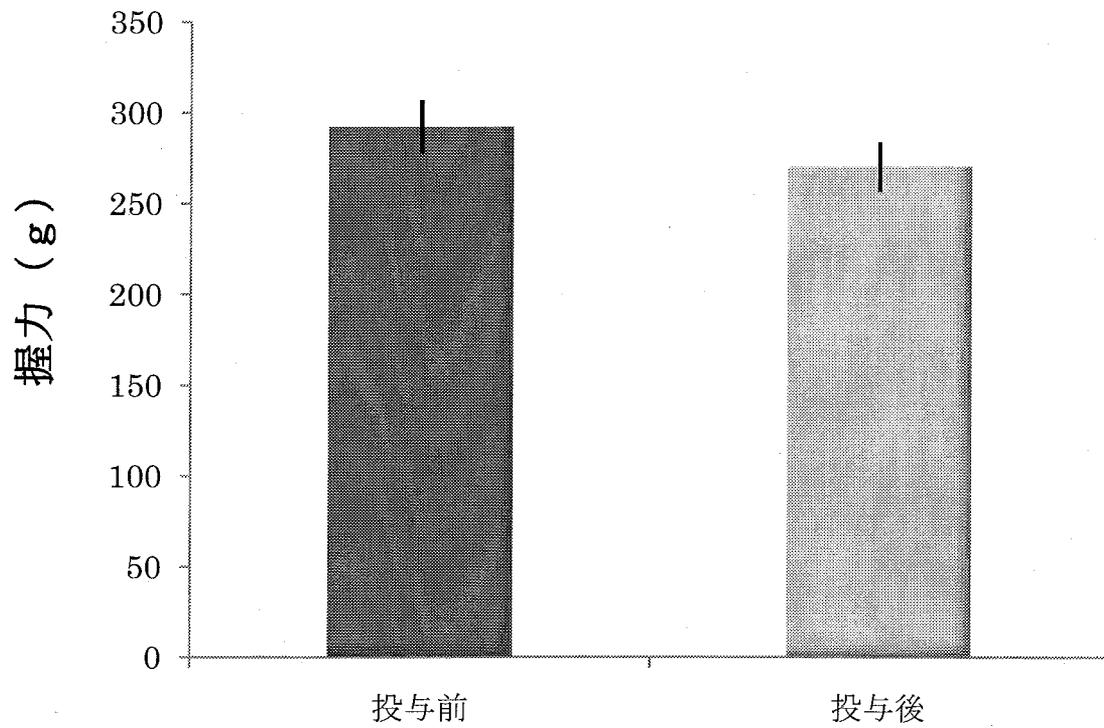
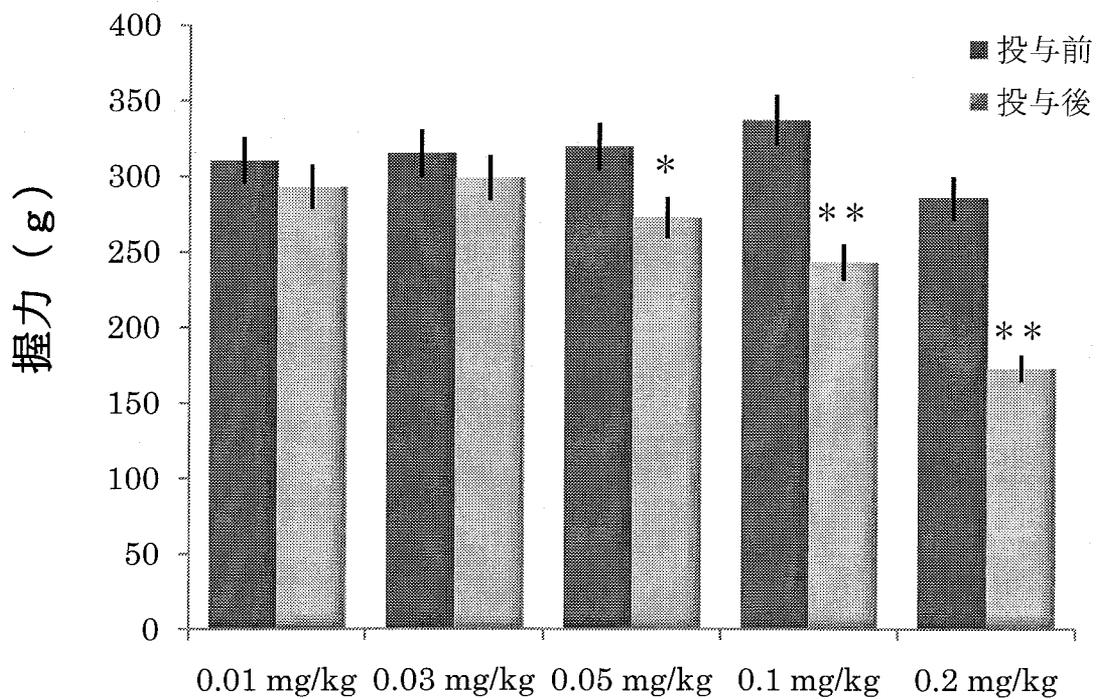
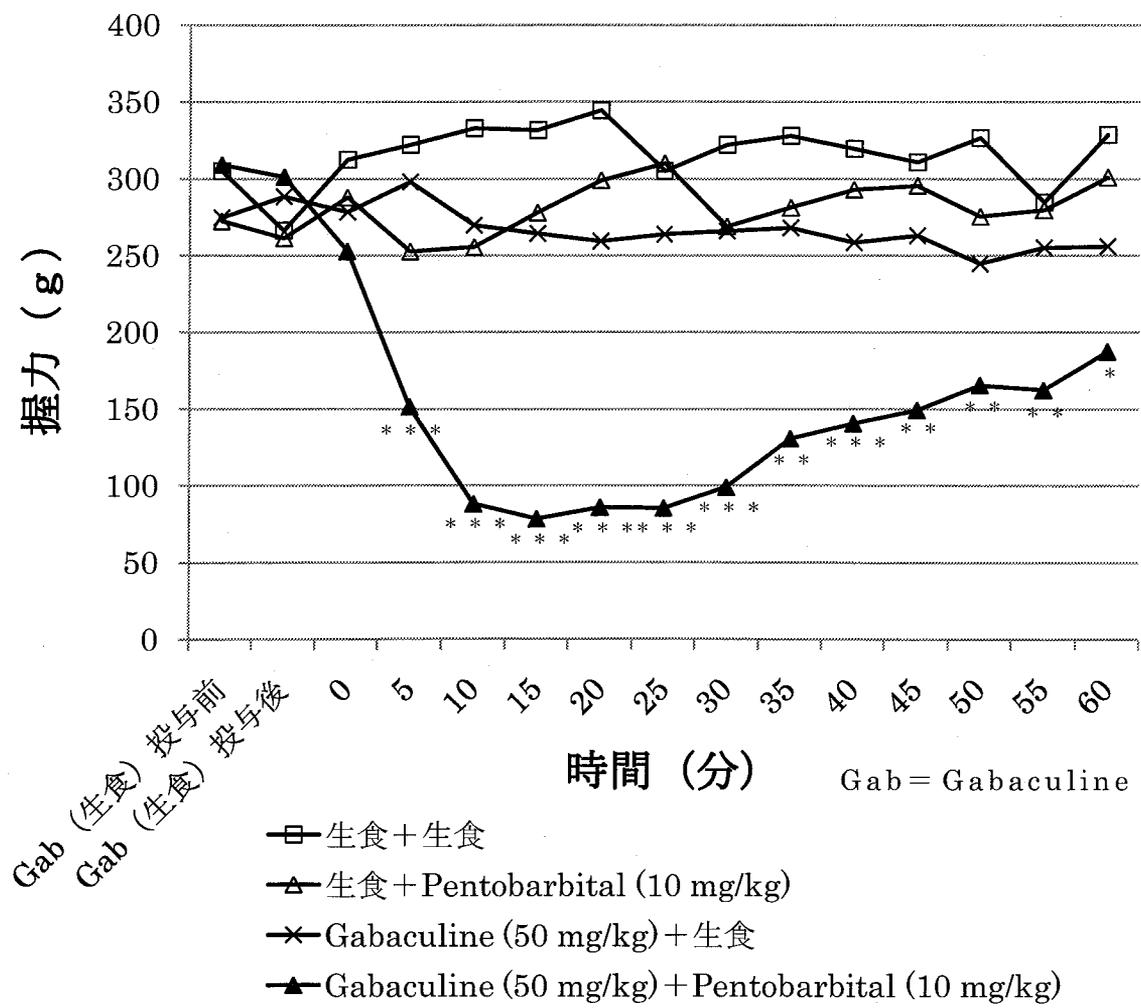


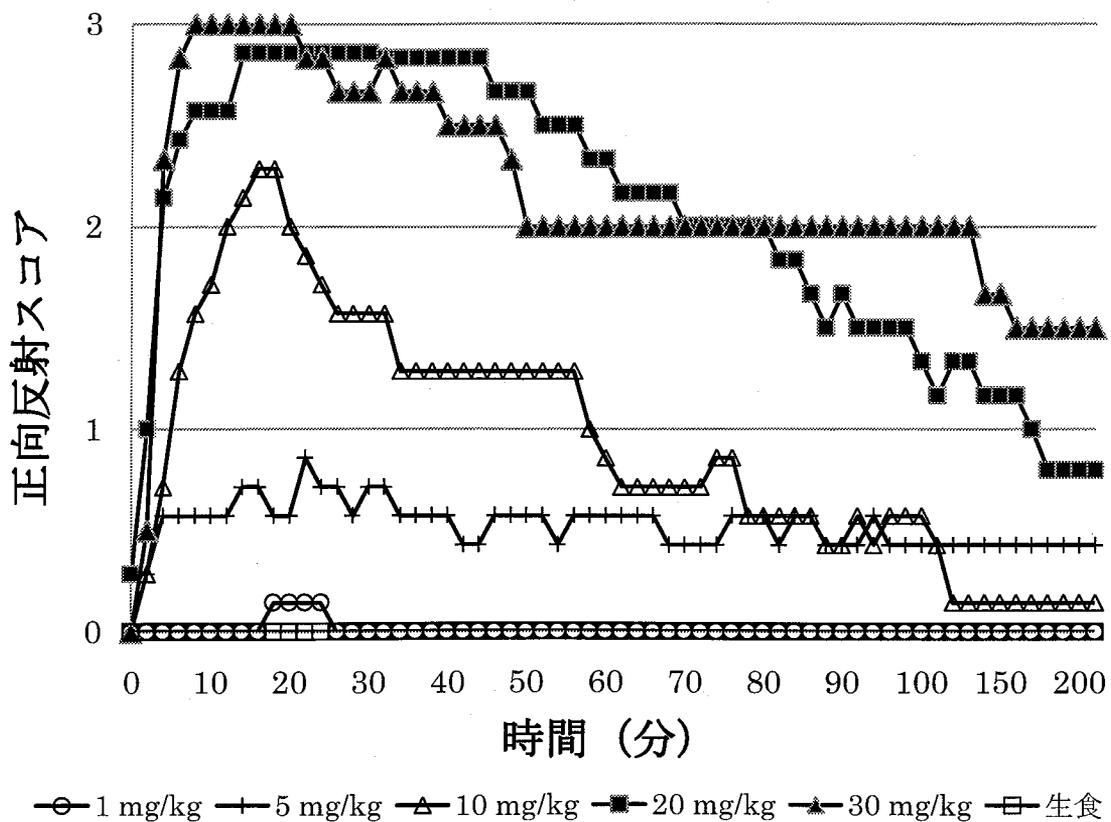
図 8 MK-801 をマウス腹腔内に投与した後の握力の変化を示す。握力 (g) の測定は、MK-801 投与前と、MK-801 (0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2 mg/kg) をマウスに投与して、その薬理効果が最大となる 30 分後に行った。MK-801 の 0.05 - 0.2 mg/kg では、有意な握力の低下がみられた。\* \*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  (Student's t-test)。



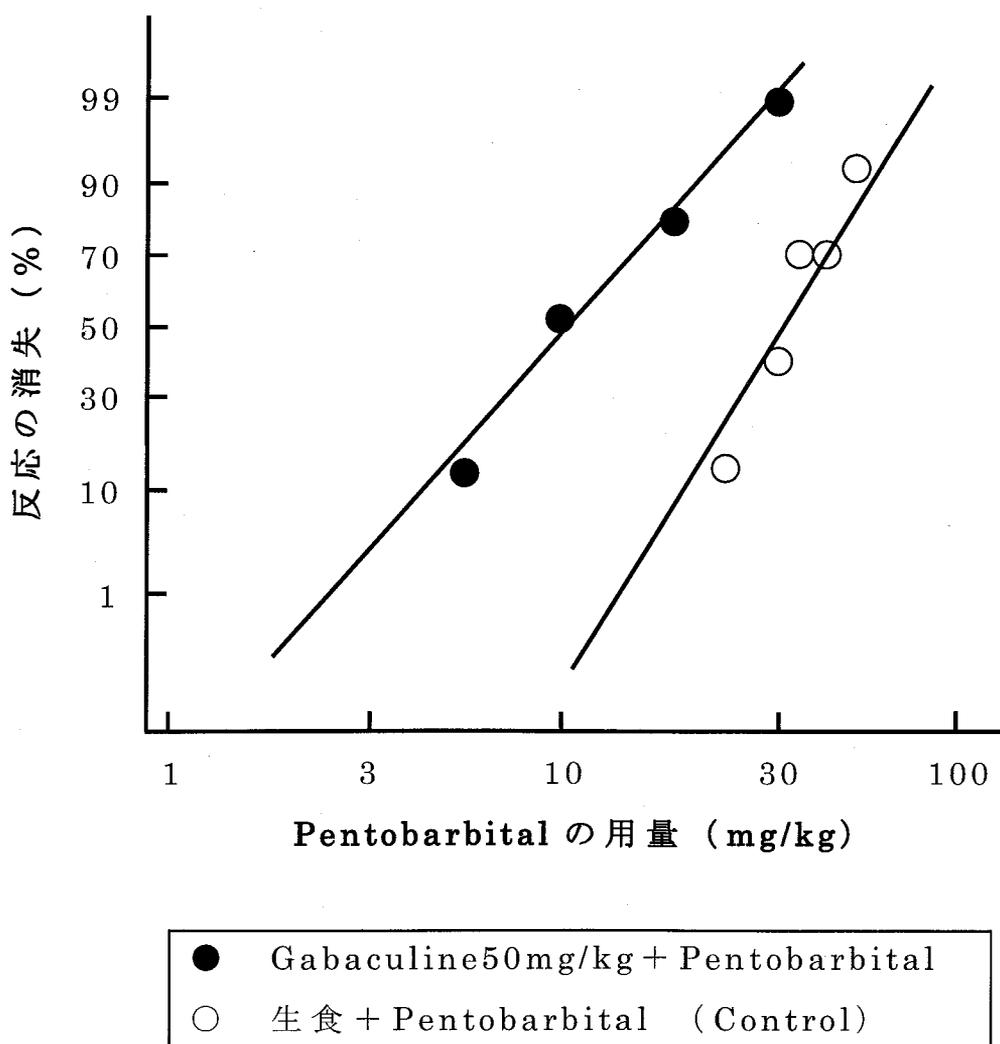
**図 9** Pentobarbital に gabaculine (50 mg/kg) を併用したときの握力を経時的変化で示す. すべての薬物はマウスの腹腔内に投与した. 握力 (g) は, gabaculine の投与前, gabaculine 投与から 17 時間後, および pentobarbital (10 mg/kg; 握力に影響しない用量) を投与してから 5 分毎に 1 時間測定した. 0.9% 生理食塩水 (生食) のみを投与する群, 生食と pentobarbital を投与する群, gabaculine と生食を投与する群と併用群をそれぞれ比較した. 各点は, 平均値 ± 標準誤差で示す (n = 5 - 7). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 (Student's t-test).



**図 10** 正向反射スコアに及ぼす pentobarbital に gabaculine を併用したときの影響を経時的変化で示す. 0.9%生理食塩水 (生食) あるいは gabaculine (50 mg/kg) をマウスの腹腔内に投与し, その薬理効果が最大となる 17 時間後に pentobarbital (1 - 30 mg/kg) を腹腔内に投与してから, 2 分毎に正向反射スコアを記録した. 正向反射スコアの評価は図 1 に準ずる.



**図 11** 正向反射の消失に及ぼす pentobarbital に gabaculine を併用したときの影響を示す。すべての薬物は、マウスの腹腔内に投与した。マウス 5 - 7 匹を 1 群とし、各用量反応曲線につき 4 - 5 群を用いた。0.9%生理食塩水（生食）あるいは gabaculine（50 mg/kg）を投与してから 17 時間後に pentobarbital（5 - 45 mg/kg）を投与し、正向反射の消失を生じたマウスの反応百分率（%）を対数確率紙にプロットし、用量反応曲線を描いた。



**図 12** 侵害刺激に対する体動の消失（不動化）に及ぼす pentobarbital に gabaculine を併用したときの影響を示す。すべての薬物は、マウスの腹腔内に投与した。マウス 5 - 7 匹を 1 群とし、各用量反応曲線につき 5 群を用いた。0.9% 生理食塩水（生食）あるいは gabaculine (50 mg/kg) を投与してから 17 時間後に pentobarbital (20 - 70 mg/kg) を投与し、pentobarbital の正向反射に及ぼす作用が最大となる時間に、tail-clamp 刺激を加え体動の有無を評価した。不動化を生じたマウスの反応百分率 (%) を確率対数紙にプロットし、用量反応曲線を描いた。

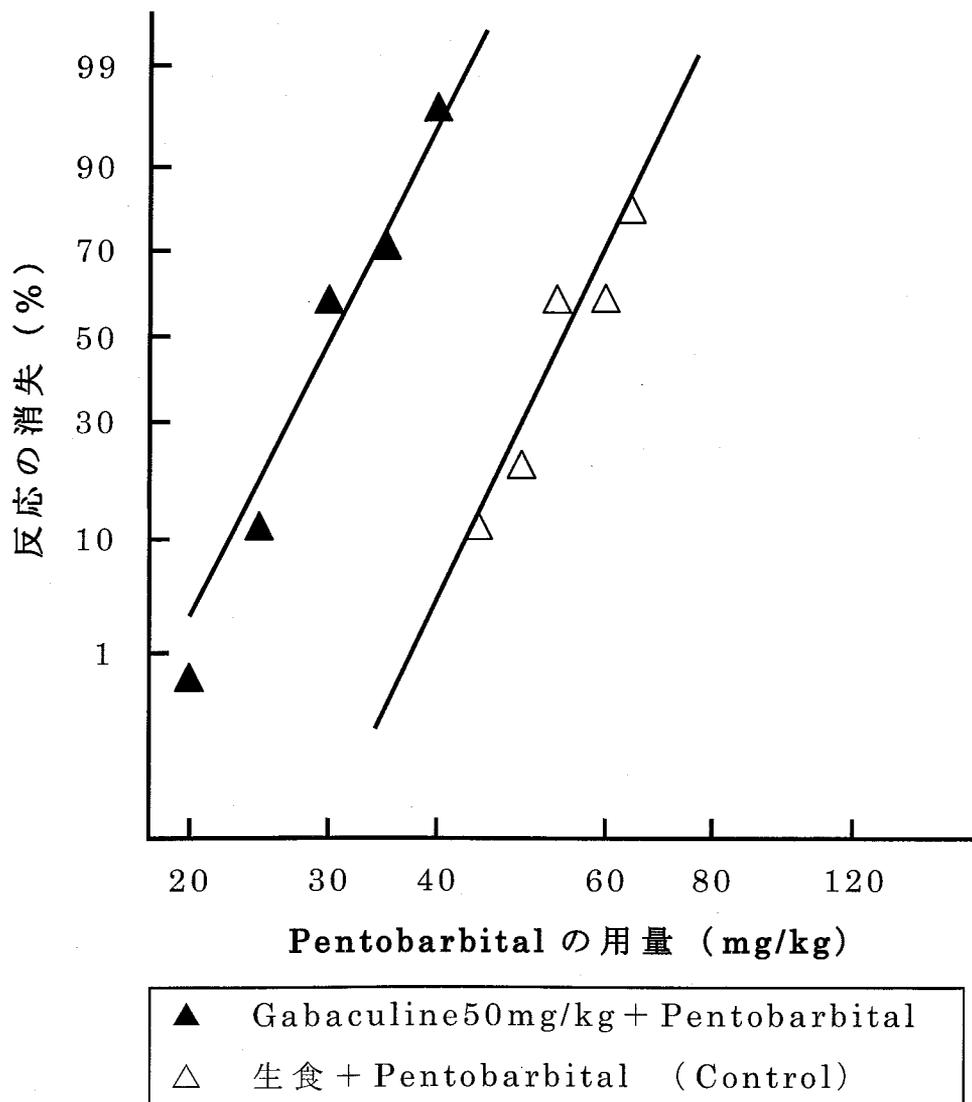


図 13 Pentobarbital に sarcosine (10 mg/kg) を併用したときの握力を経時的変化で示す. Pentobarbital はマウスの腹腔内に, sarcosine は尾静脈に投与した. 握力 (g) は, sarcosine の投与前, sarcosine 投与 5 時間後, pentobarbital (10 mg/kg) を投与してから 5 分毎に 1 時間測定した. 0.9%生理食塩水(生食)のみを投与する群, 生食と pentobarbital を投与する群, sarcosine と生食を投与する群と併用群をそれぞれ比較した. 各点は, 平均値±標準誤差で示す (n=5 - 7) .

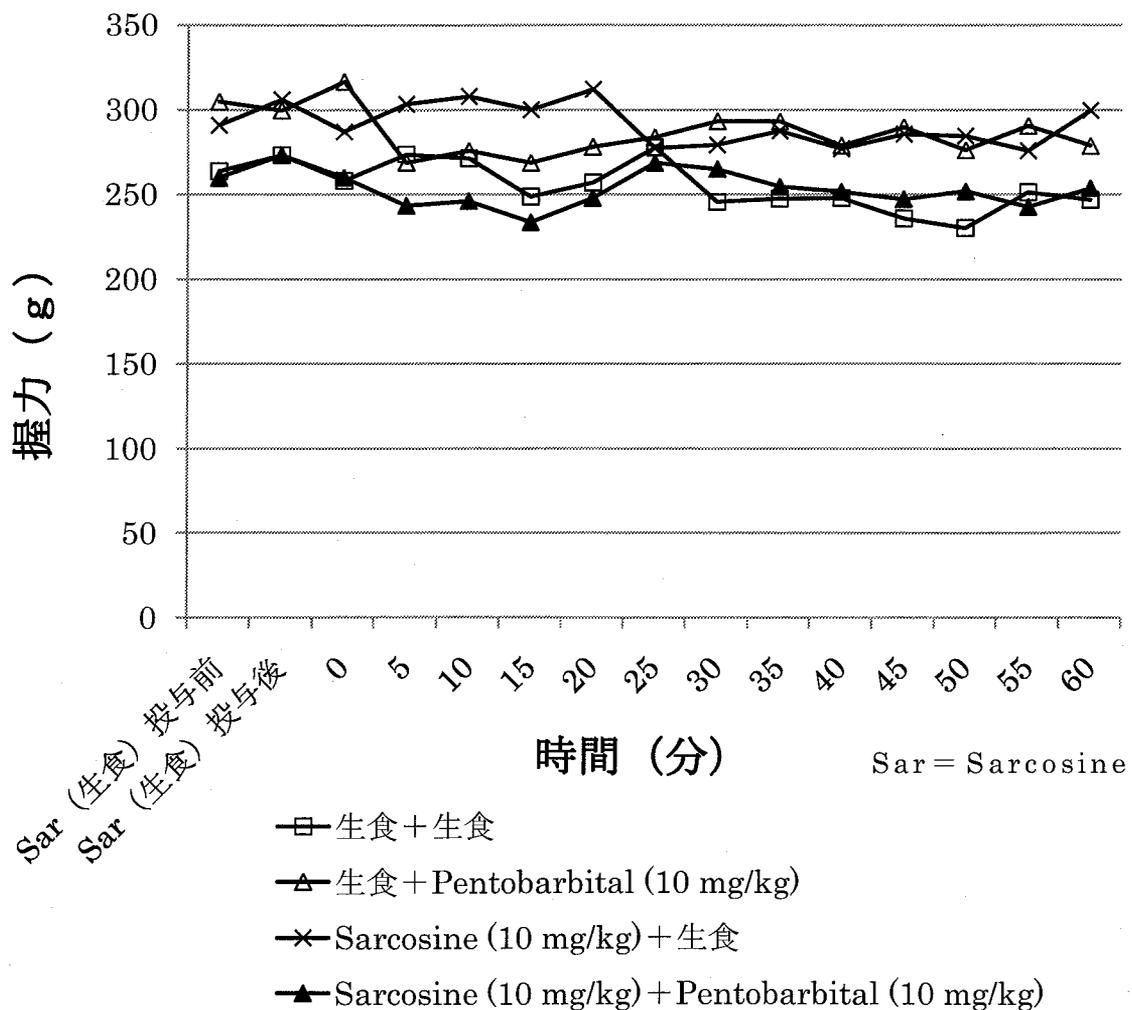
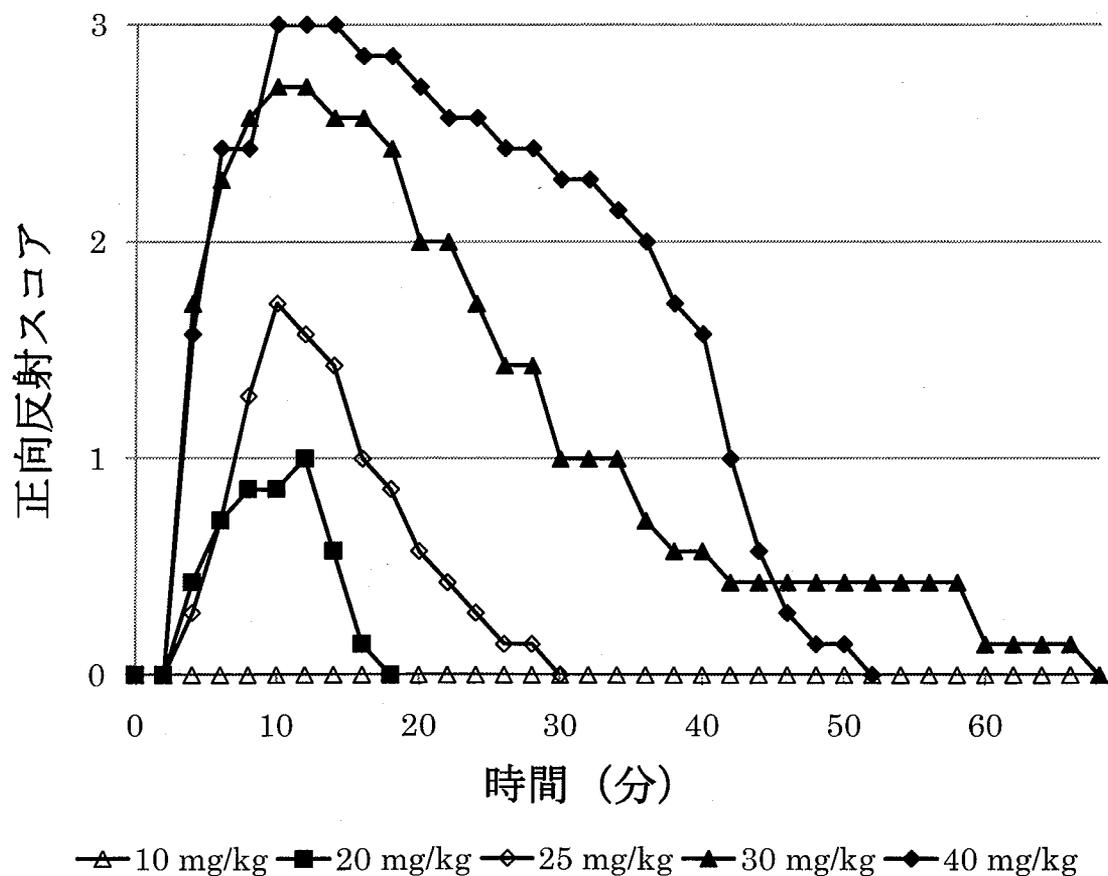
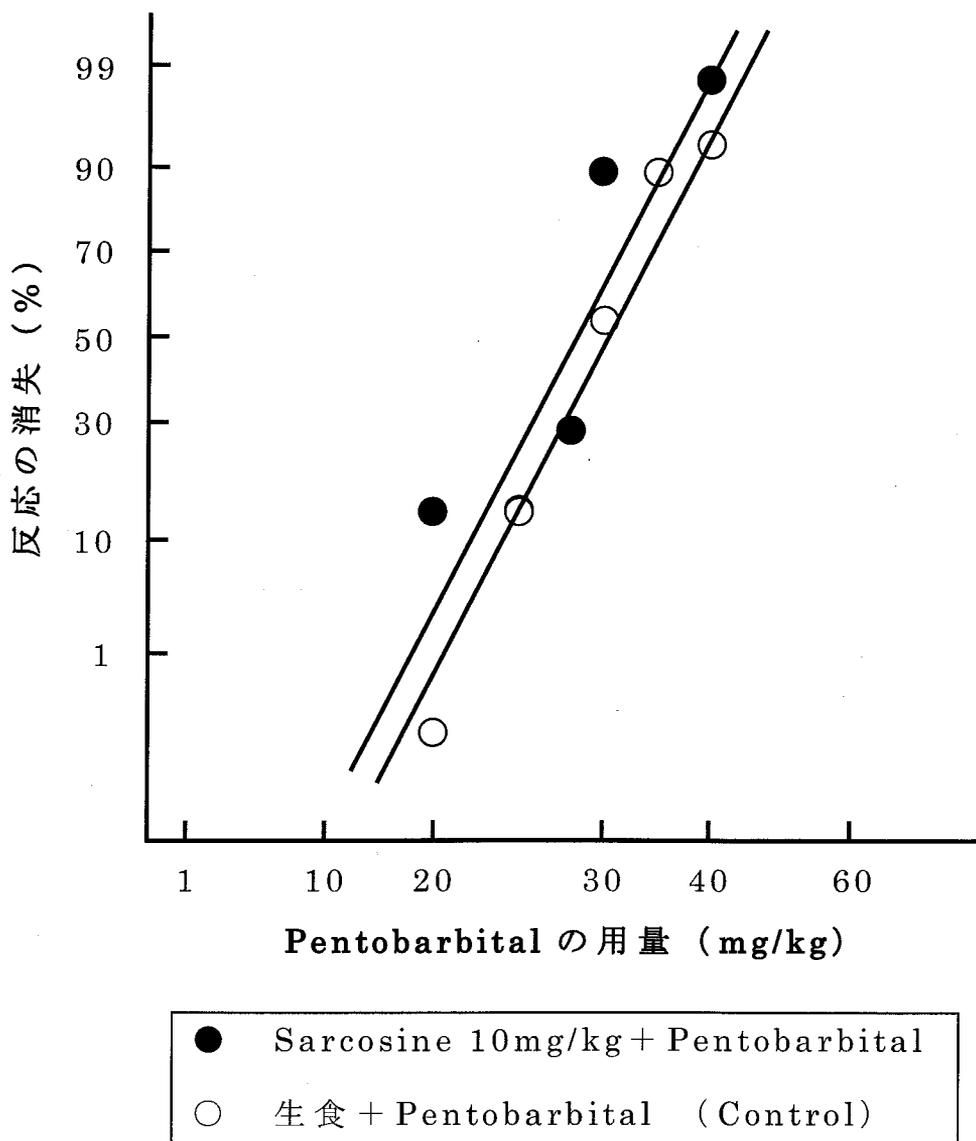


図 14 正向反射スコアに及ぼす pentobarbital に sarcosine を併用したときの影響を経時的变化で示す. Sarcosine (10 mg/kg) をマウスの尾静脈内に投与し, その薬理効果が最大となる 5 時間後に pentobarbital (10 - 40 mg/kg) を腹腔内に投与してから, 2 分毎に正向反射スコアを記録した. 正向反射スコアの評価は図 1 に準ずる.



**図 15** 正向反射の消失に及ぼす pentobarbital に sarcosine を併用したときの影響を示す. Sarcosine はマウスの尾静脈内に, pentobarbital は腹腔内に投与した. マウス 5 - 7 匹を 1 群とし, 各用量反応曲線につき 5 群を用いた. 0.9% 生理食塩水 (生食) あるいは sarcosine (10 mg/kg) を投与してから 5 時間後に pentobarbital (20 - 40 mg/kg) を投与し, 正向反射の消失を生じた動物の反応百分率 (%) を対数確率紙にプロットし, 用量反応曲線を描いた.



**図 16** 侵害刺激に対する体動の消失（不動化）に及ぼす pentobarbital に sarcosine を併用したときの影響を示す。0.9%生理食塩水（生食）あるいは sarcosine（10 mg/kg）を投与してから 5 時間後に pentobarbital（30 - 70 mg/kg）を投与し，pentobarbital の正向反射に及ぼす作用が最大となる時間に，tail-clamp 刺激を加え体動の有無を評価した。不動化を生じた動物の反応百分率（%）を対数確率紙にプロットし，用量反応曲線を描いた。

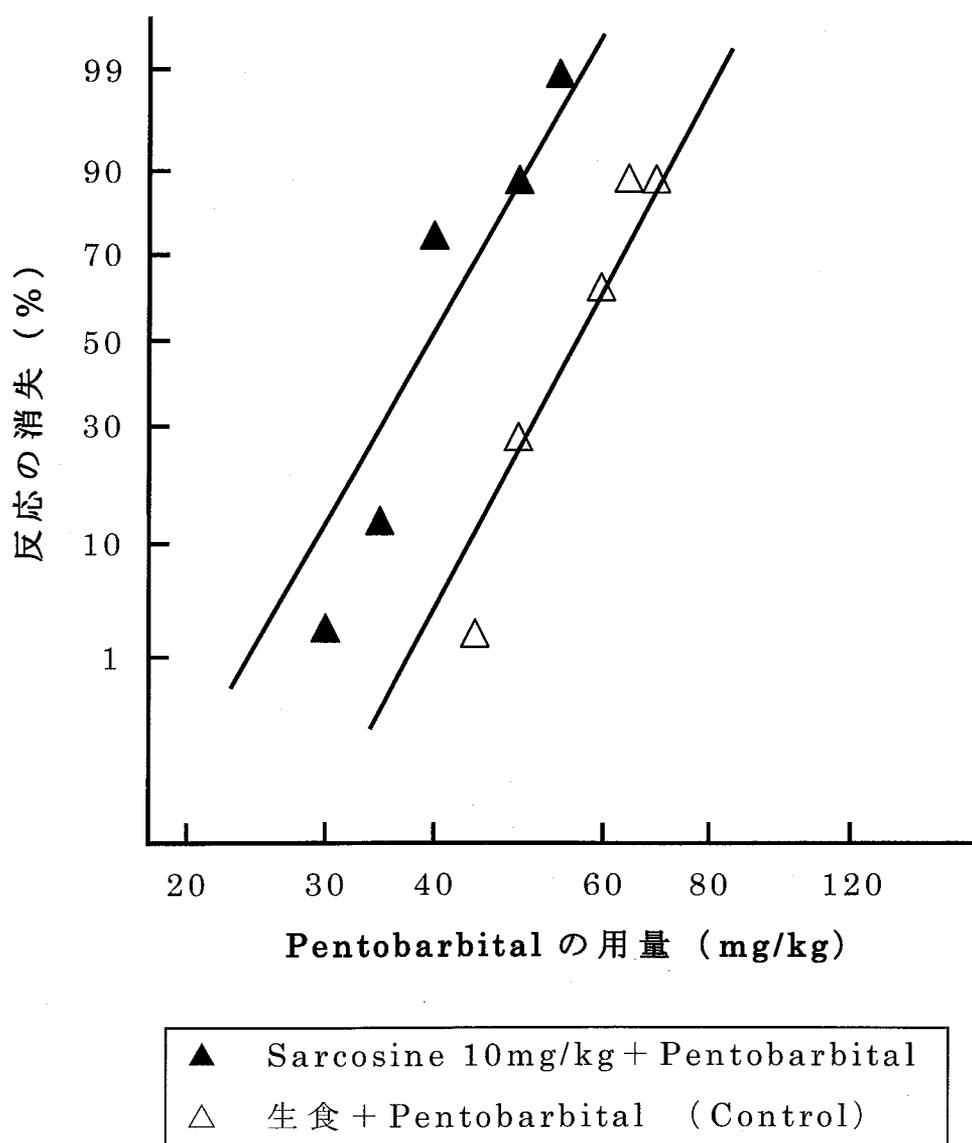


図 17 Pentobarbital に mecamlamine (5 mg/kg) を併用したときの握力の経時的変化を示す. すべての薬物は, マウスの腹腔内に投与した. 握力 (g) は mecamlamine 投与前, mecamlamine 投与 30 分後, および pentobarbital(10 mg/kg) を投与してから 5 分毎に 1 時間測定した. 0.9%生理食塩水 (生食) のみを投与する群, 生食と pentobarbital を投与する群, mecamlamine と生食を投与する群と併用群をそれぞれ比較した. 各点は, 平均値±標準誤差で示す (n=5-7) .

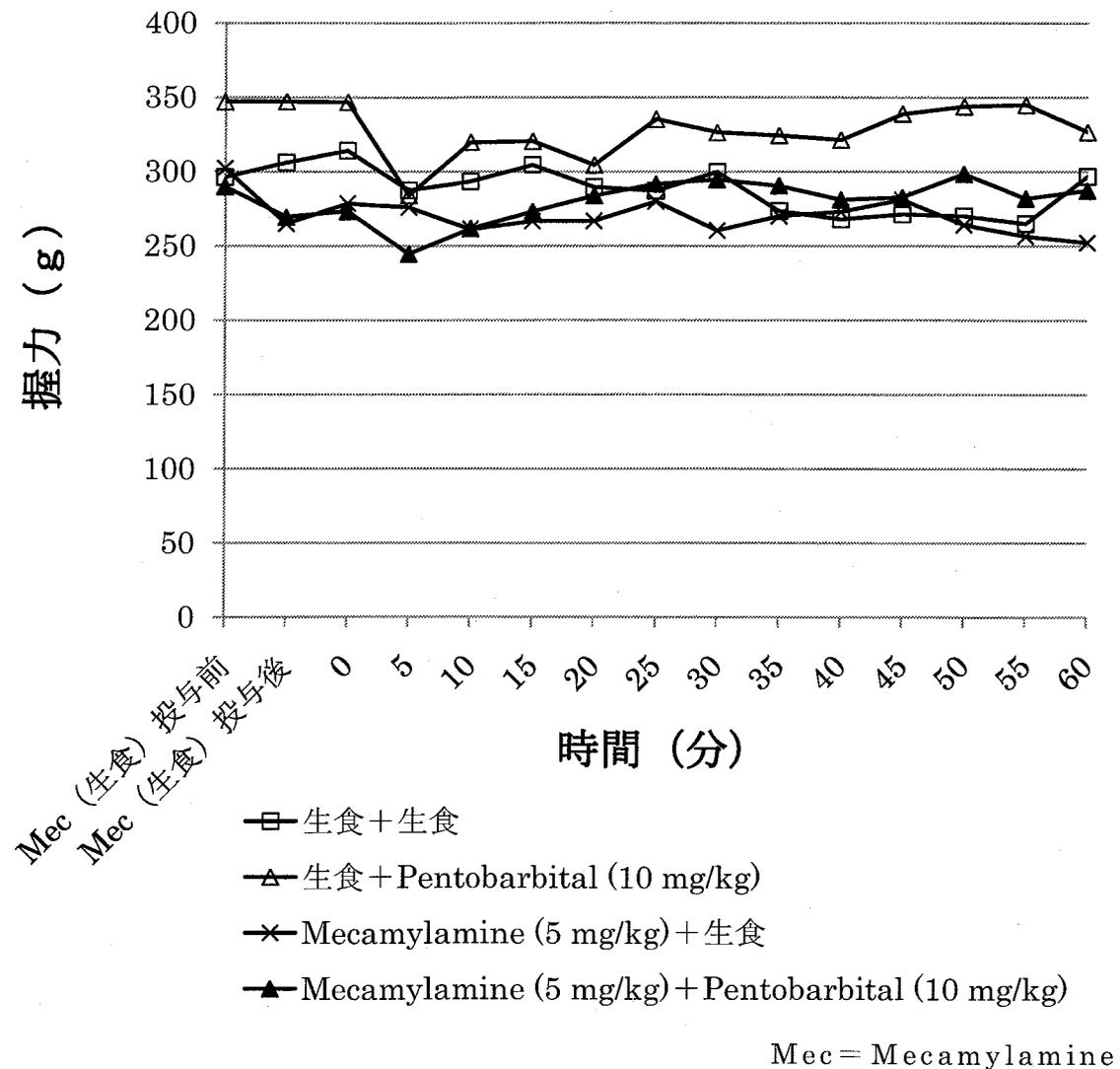
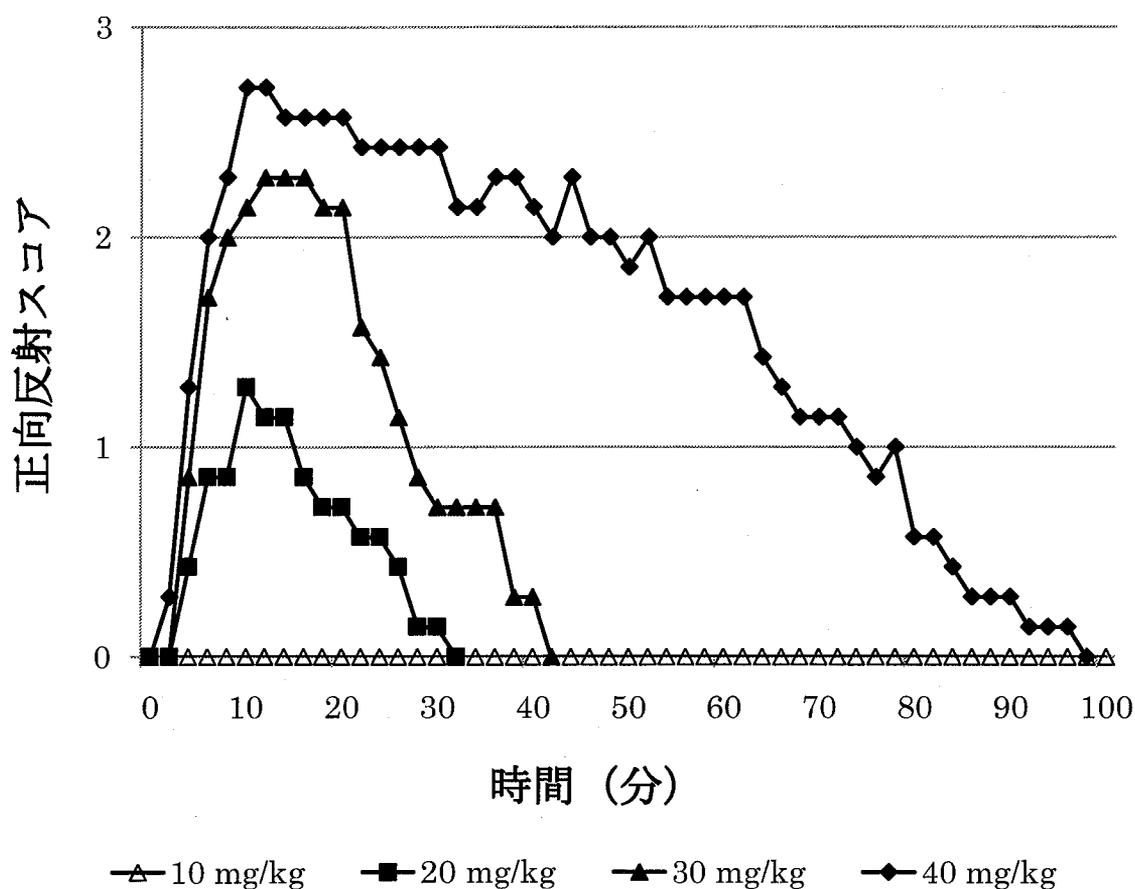
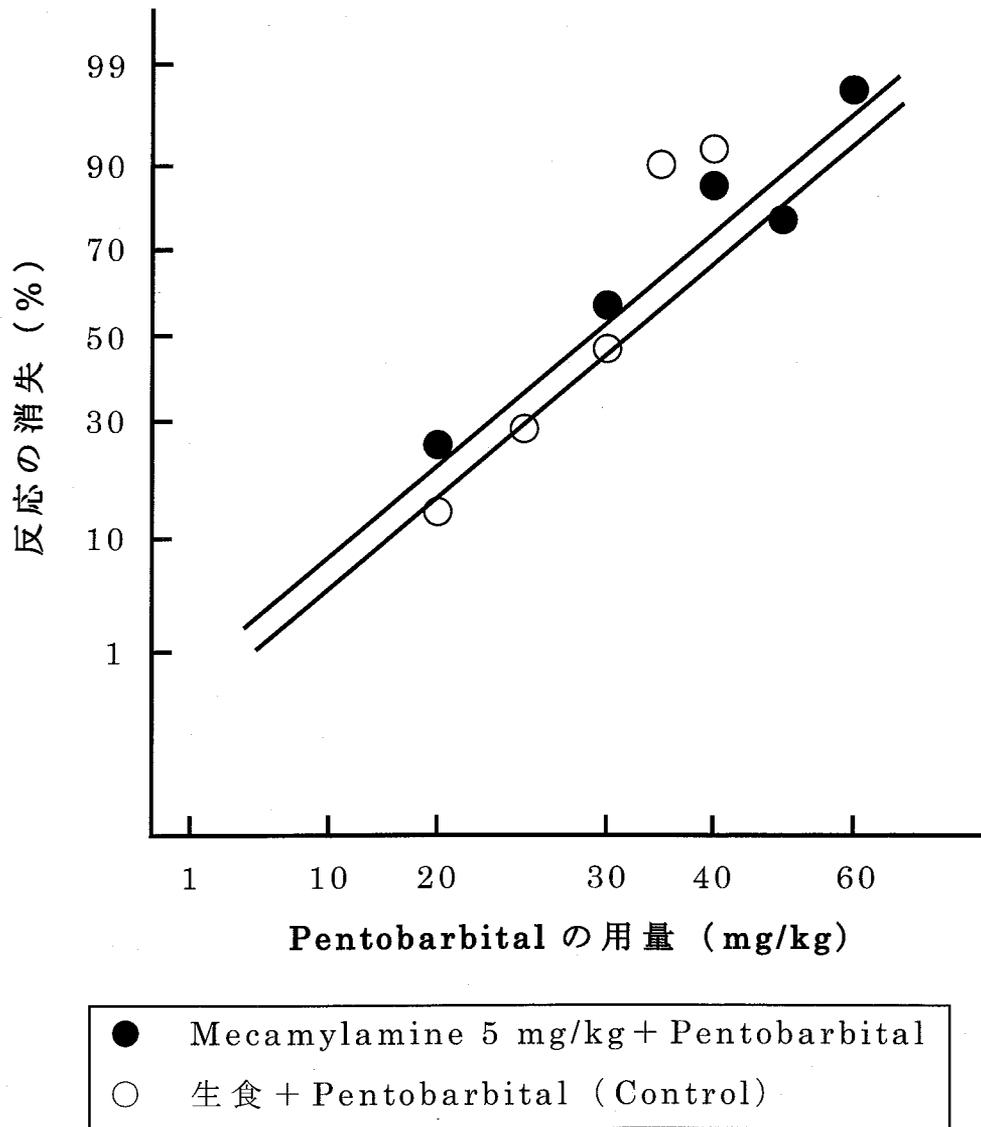


図 18 正向反射スコアに及ぼす pentobarbital に mecamlamine を併用したときの影響を経時的变化で示す。Mecamlamine (5 mg/kg) をマウスの腹腔内に投与し、その薬理効果が最大となる 30 分後に pentobarbital (10 - 40 mg/kg) を腹腔内に投与してから、2 分毎に正向反射スコアを記録した。正向反射スコアの評価は図 1 に準ずる。



**図 19** 正向反射の消失に及ぼす pentobarbital に mecamylamine を併用したときの影響を示す。すべての薬物は、マウスの腹腔内に投与した。マウス 5 - 7 匹を 1 群とし、各用量反応曲線につき 5 群を用いた。0.9% 生理食塩水（生食）あるいは mecamylamine (5 mg/kg) を投与してから 30 分後に pentobarbital (20 - 60 mg/kg) を投与し、正向反射の消失を生じた動物の反応百分率 (%) を対数確率紙にプロットし、用量反応曲線を描いた。



**図 20** 侵害刺激に対する体動の消失（不動化）に及ぼす pentobarbital に mecamlamine を併用したときの影響を示す。すべての薬物は、マウスの腹腔内に投与した。マウス 5 - 7 匹を 1 群とし、各用量反応曲線につき 5 - 6 群を用いた。0.9% 生理食塩水（生食）あるいは mecamlamine (5 mg/kg) を投与してから 30 分後に pentobarbital (35 - 70 mg/kg) を投与し、pentobarbital の正向反射に及ぼす作用が最大となる時間に、tail-clamp 刺激を加え体動の有無を評価した。不動化を生じた動物の反応百分率 (%) を対数確率紙にプロットし、用量反応曲線を描いた。

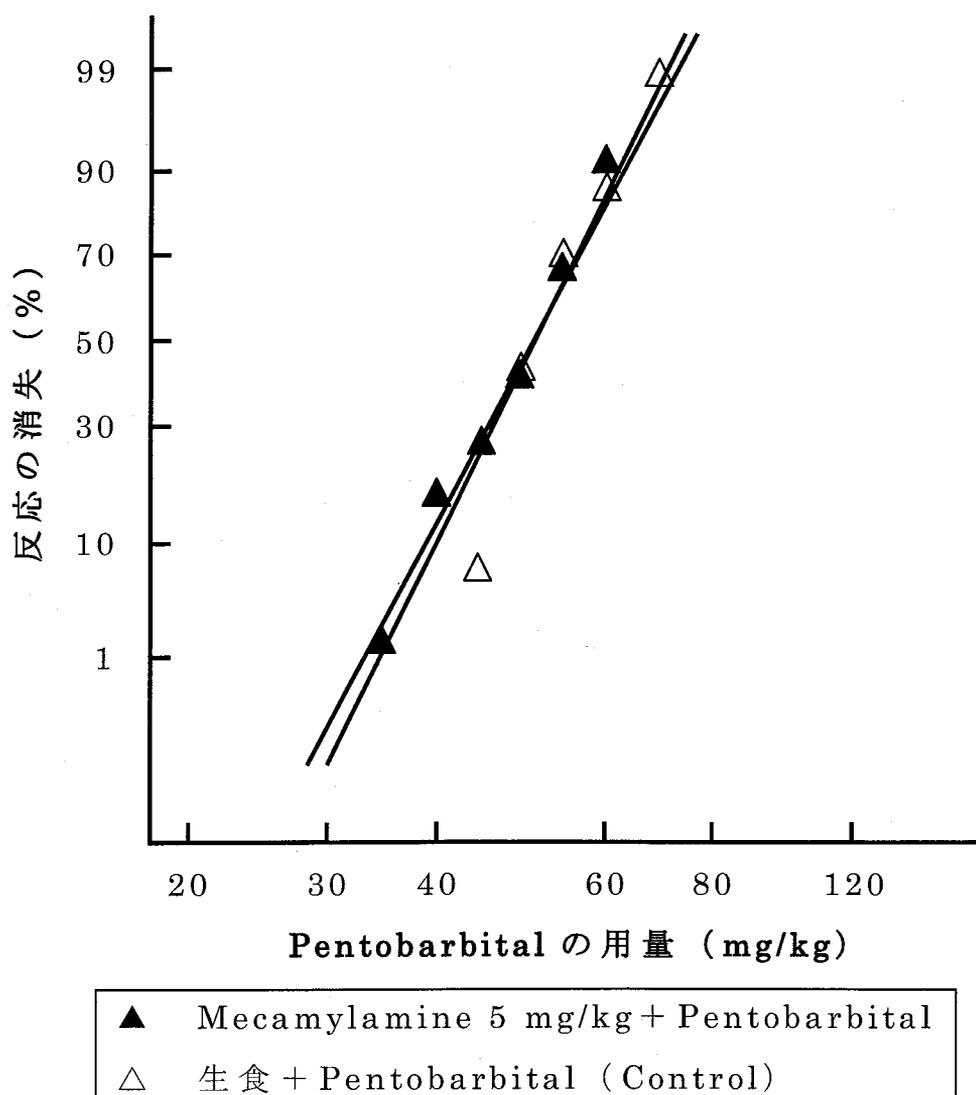
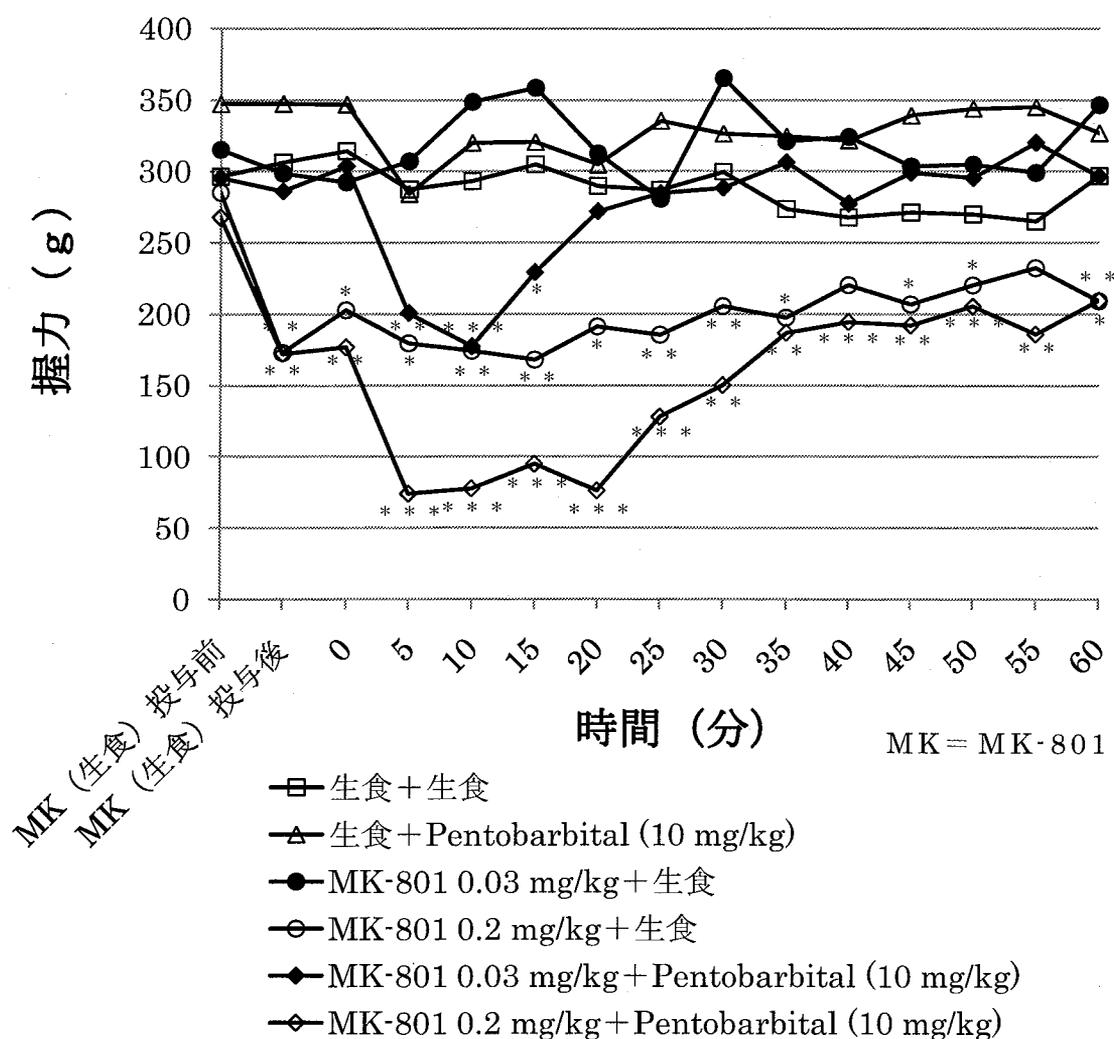
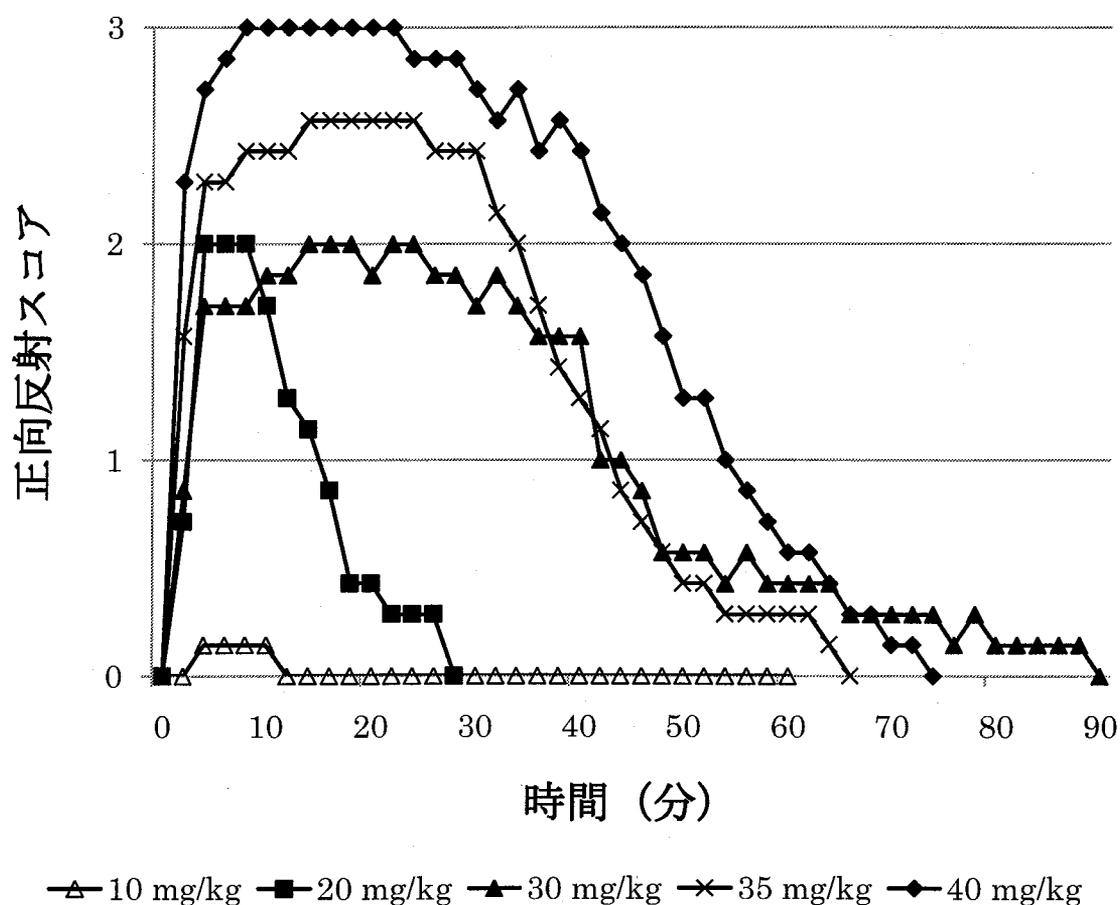


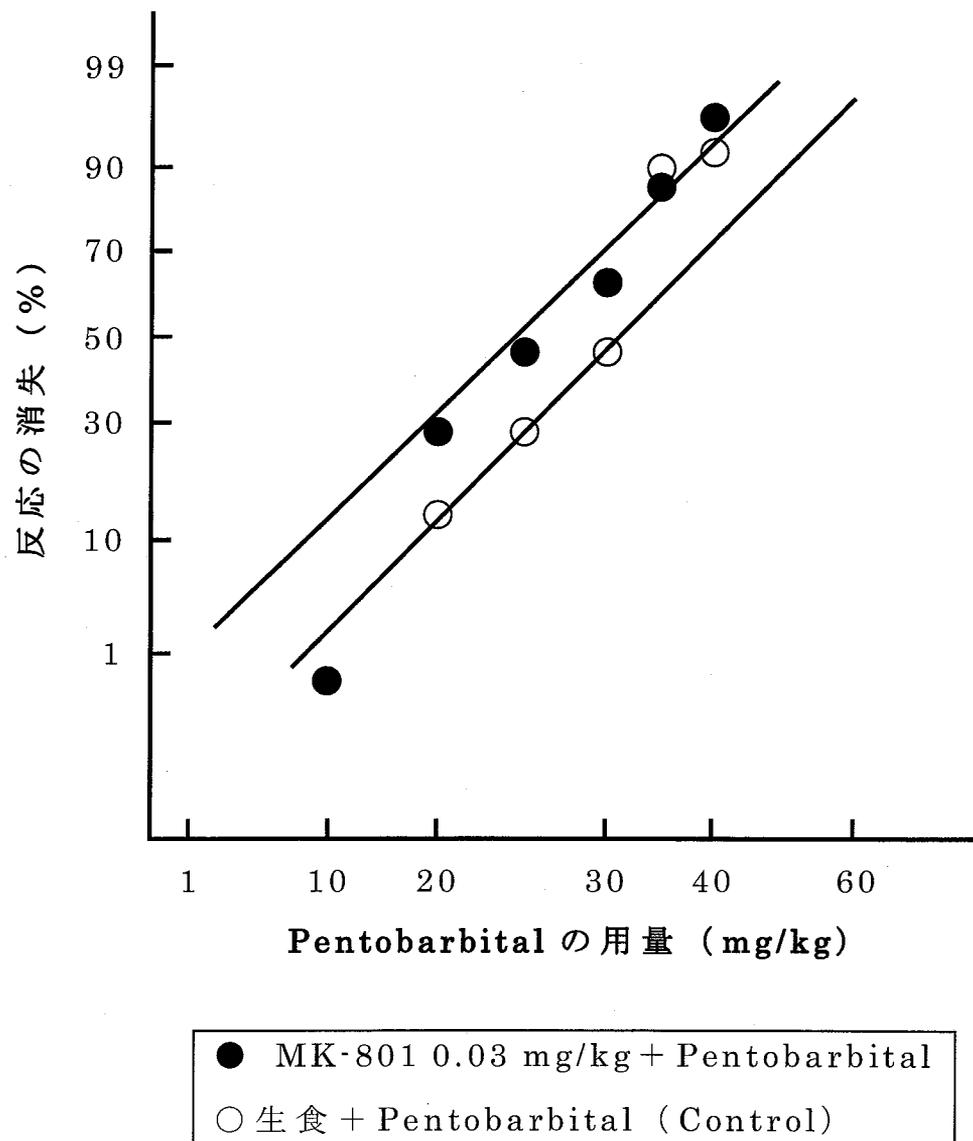
図 21 Pentobarbital に MK-801 (0.2, 0.03 mg/kg) を併用したときの握力を経時的变化で示す. すべての薬物は, 腹腔内に投与した. 握力 (g) は, MK-801 の投与前, MK-801 投与 30 分後, および pentobarbital (10 mg/kg) を投与してから 5 分毎に 1 時間測定した. 0.9% 生理食塩水 (生食) のみを投与する群, 生食と pentobarbital を投与する群, MK-801 と生食を投与する群と併用群をそれぞれ比較した. 各点は, 平均値 ± 標準誤差で示す (n = 5 - 7). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 (Student's t-test).



**図 22** 正向反射スコアに及ぼす pentobarbital に MK-801 (0.03 mg/kg) を併用したときの影響を経時的变化で示す。MK-801 (0.03 mg/kg) をマウスの腹腔内に投与し、その薬理効果が最大となる 30 分後に pentobarbital (10 - 40 mg/kg) を腹腔内に投与してから、2 分毎に正向反射スコアを記録した。正向反射スコアの評価は図 1 に準ずる。



**図 23** 正向反射の消失に及ぼす pentobarbital に MK-801 (0.03 mg/kg) を併用したときの影響を示す. すべての薬物は, マウスの腹腔内に投与した. マウス 5 - 7 匹を 1 群とし, 各用量反応曲線につき 5 群を用いた. 0.9% 生理食塩水 (生食) あるいは MK-801 (0.03 mg/kg) を投与してから 30 分後に pentobarbital (10 - 40 mg/kg) を投与し, 正向反射の消失を生じた動物の反応百分率 (%) を対数確率紙にプロットし, 用量反応曲線を描いた.



**図 24** 侵害刺激に対する体動の消失（不動化）に及ぼす pentobarbital に MK-801 (0.03 mg/kg) を併用したときの影響を示す。すべての薬物は、マウスの腹腔内に投与した。マウス 5 - 7 匹を 1 群とし、各用量反応曲線につき 5 群を用いた。0.9% 生理食塩水（生食）あるいは MK-801 (0.03 mg/kg) を投与してから 30 分後に pentobarbital (40 - 70 mg/kg) を投与し、pentobarbital の正向反射に及ぼす作用が最大となる時間に、tail-clamp 刺激を加え体動の有無を評価した。不動化を生じた動物の反応百分率 (%) を対数確率紙にプロットし、用量反応曲線を描いた。

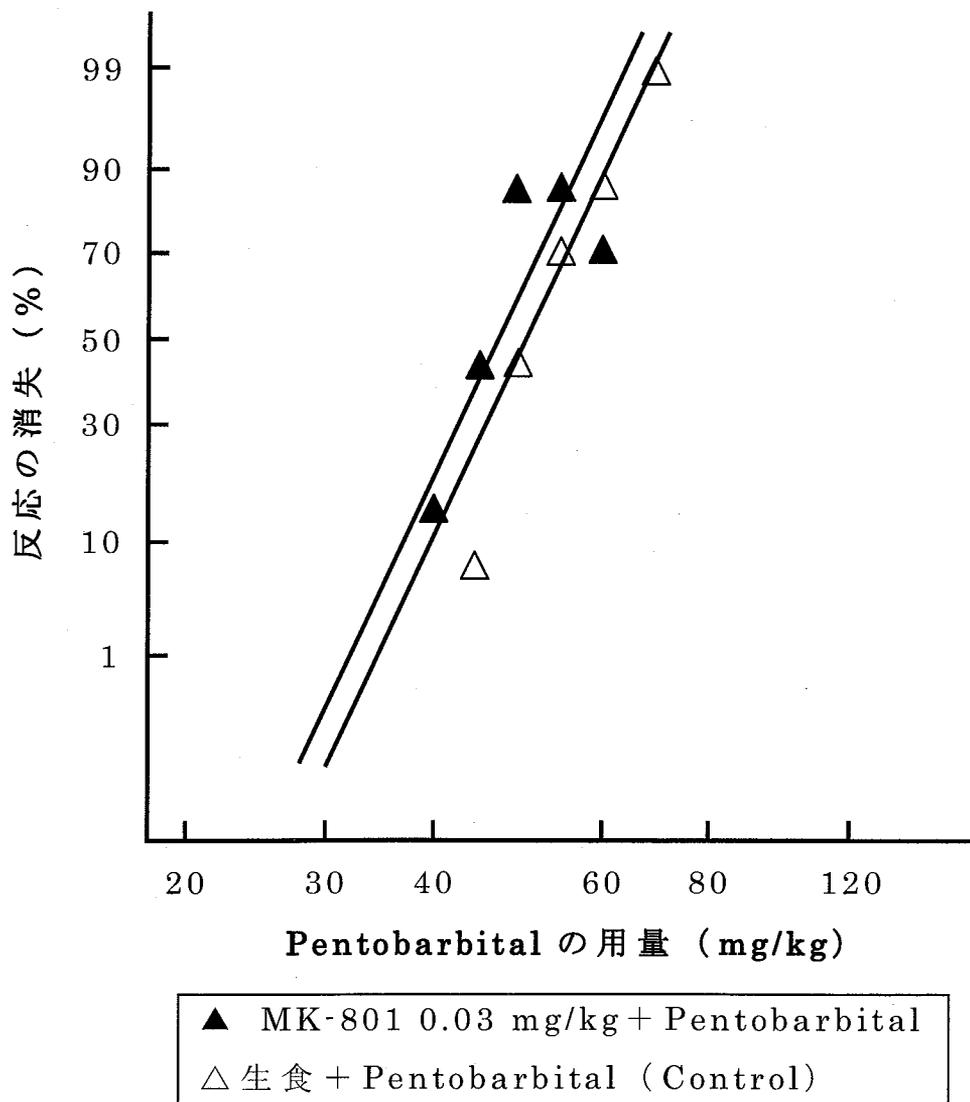
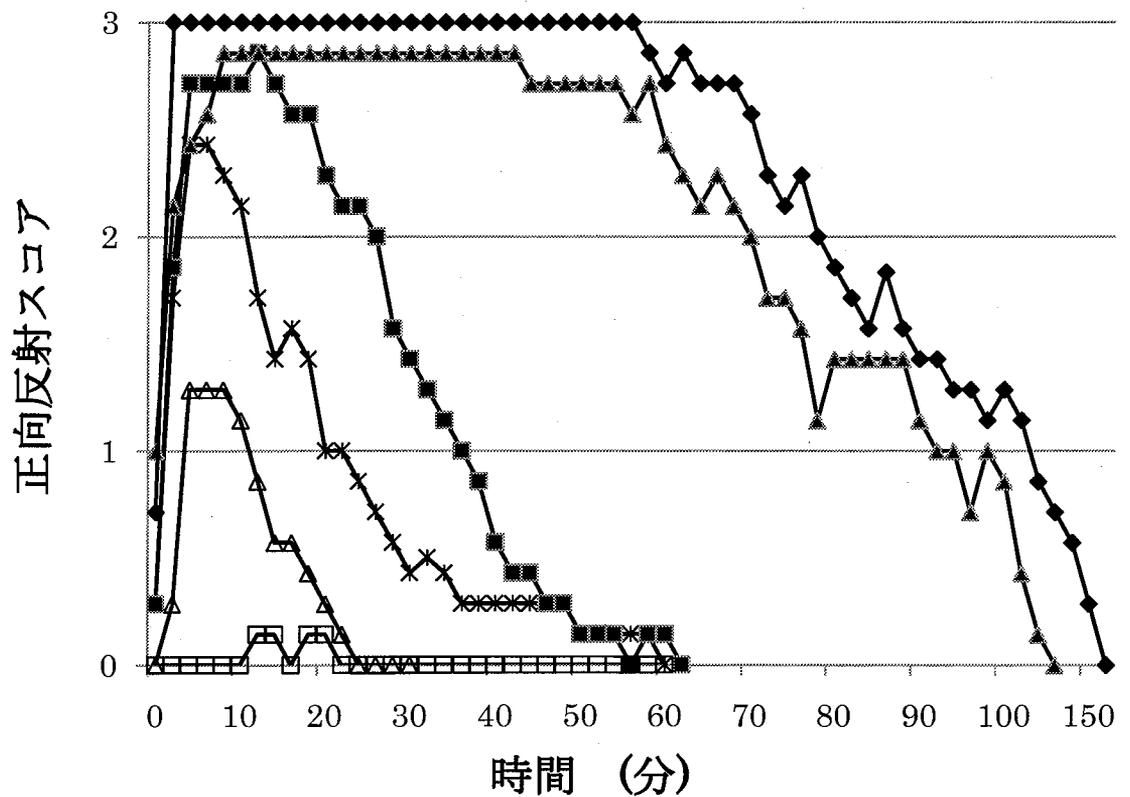


図 25 正向反射スコアに及ぼす pentobarbital に MK-801 (0.2 mg/kg) を併用したときの影響を経時的変化で示す. 0.9%生理食塩水 (生食) あるいは MK-801 (0.2 mg/kg) をマウスの腹腔内に投与し, その薬理効果が最大となる 30 分後に pentobarbital (10 - 40 mg/kg) を腹腔内に投与してから, 2 分毎に正向反射スコアを記録した. 正向反射スコアの評価は図 1 に準ずる.



△ 10 mg/kg × 15 mg/kg ■ 20 mg/kg ▲ 30 mg/kg ◆ 40 mg/kg □ 生食

**図 26** 正向反射の消失に及ぼす pentobarbital に MK-801(0.2 mg/kg) を併用したときの影響を示す. すべての薬物は, マウスの腹腔内に投与した. マウス 5 - 7 匹を 1 群とし, 各用量反応曲線につき 5 群を用いた. 0.9%生理食塩水 (生食) あるいは MK-801 (0.2 mg/kg) を投与してから 30 分後に pentobarbital (10 - 40 mg/kg) を投与し, 正向反射の消失を生じた動物の反応百分率 (%) を対数確率紙にプロットし, 用量反応曲線を描いた.

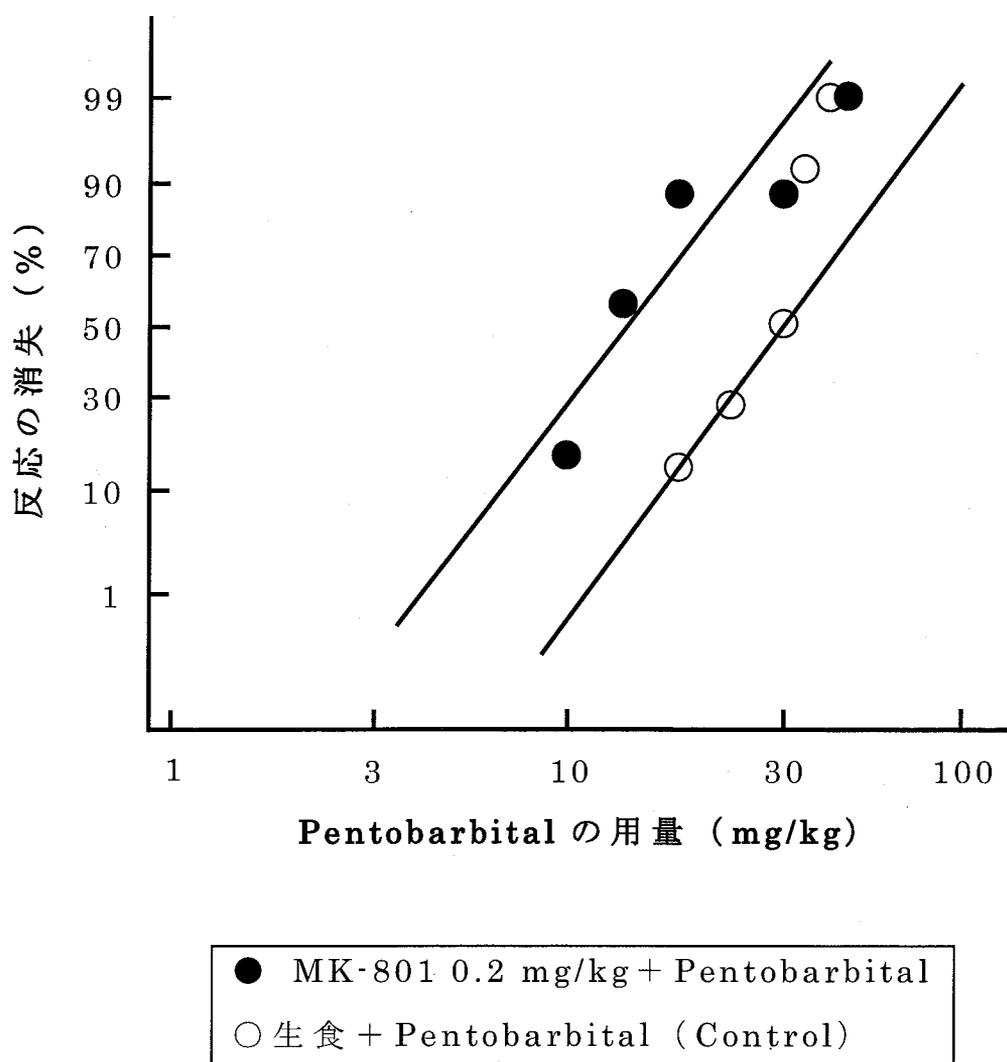


図 27 侵害刺激に対する体動の消失（不動化）に及ぼす pentobarbital に MK-801 (0.2 mg/kg) を併用したときの影響を示す。すべての薬物は、マウスの腹腔内に投与した。マウス 5 - 7 匹を 1 群とし、各用量反応曲線につき 5 群を用いた。0.9% 生理食塩水（生食）あるいは MK-801 (0.2 mg/kg) を投与してから 30 分後に pentobarbital (30 - 70 mg/kg) を投与し、pentobarbital の正向反射に及ぼす作用が最大となる時間に、tail-clamp 刺激を加え体動の有無を評価した。不動化を生じた動物の反応百分率 (%) を対数確率紙にプロットし、用量反応曲線を描いた。

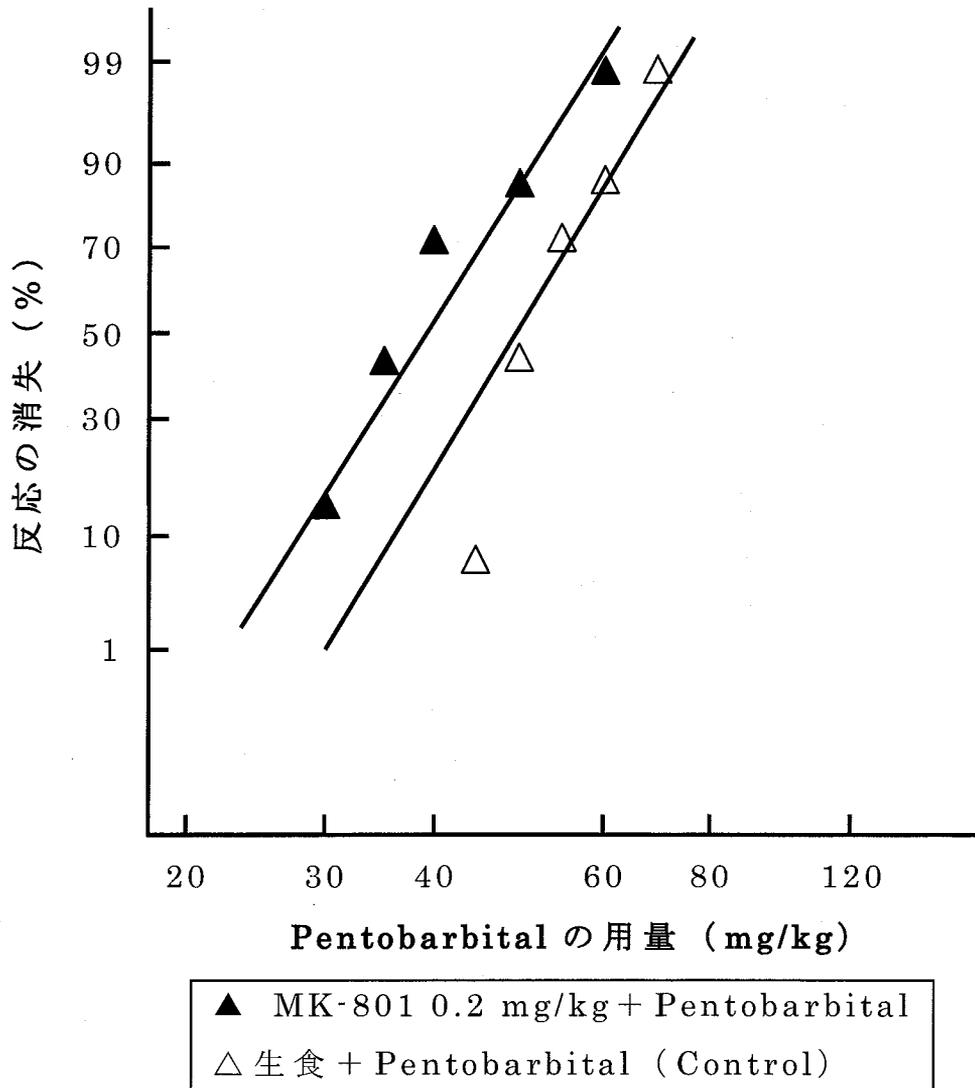


図 28 Capsaicin 誘発サブスタンス P 遊離に及ぼす pentobarbital (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM) の影響を示す. 縦軸は capsaicin (100 nM) 刺激で誘発されるサブスタンス P 遊離量を 100%としたときの値 (%) である. Normal は, capsaicin 刺激をしなかったときのサブスタンス P 遊離量である. 各棒は, 平均値  $\pm$  標準誤差で示す (n=6). \*\* p < 0.01 (Student's t-test) .

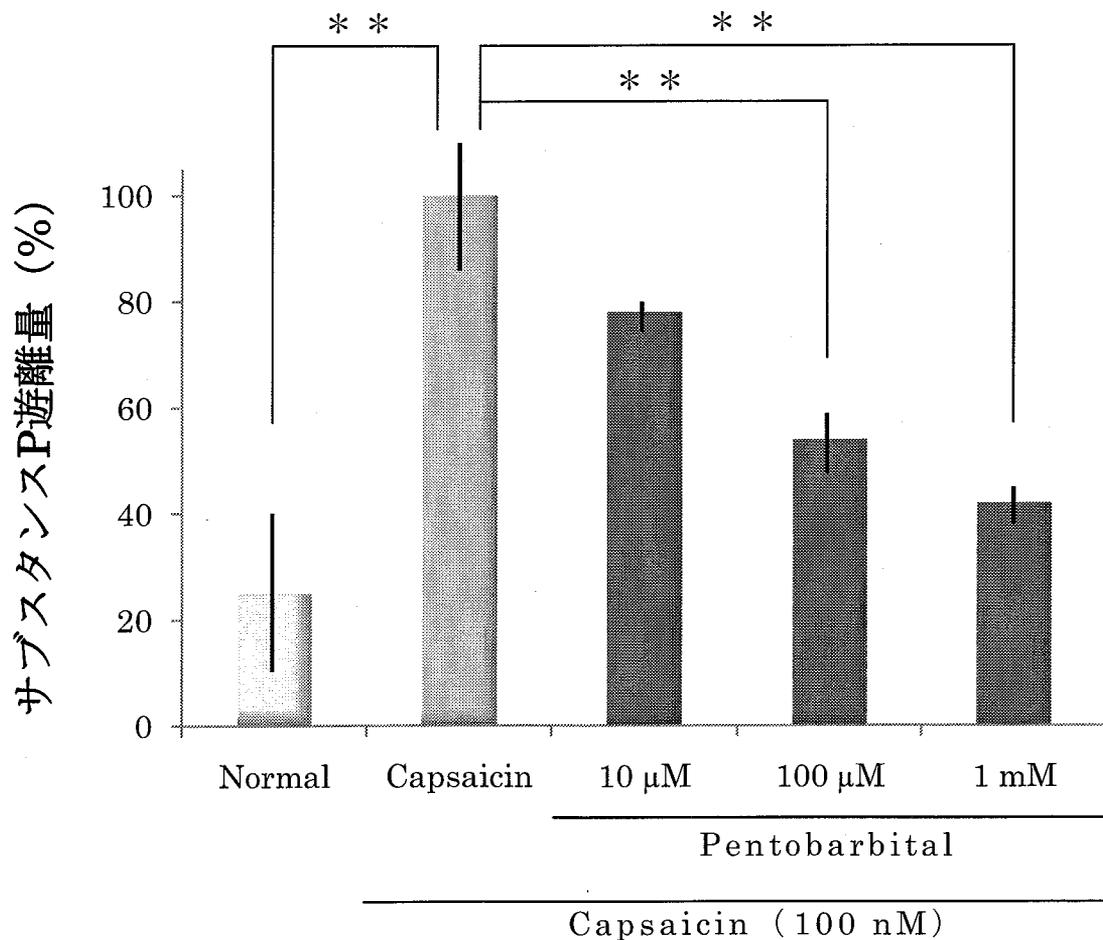


図 29 Capsaicin 誘発サブスタンス P 遊離に及ぼす pentobarbital (1 mM) と, GABA, グリシン, グルタミン酸, 神経性ニコチンの各受容体リガンド (1 mM) の影響を示す. 縦軸は capsaicin (100 nM) 刺激で誘発されるサブスタンス P 遊離量を 100%としたときの値 (%) である. 各棒は, 平均値 ± 標準誤差で示す (n=6). \*  $p < 0.05$  (Student's t-test).

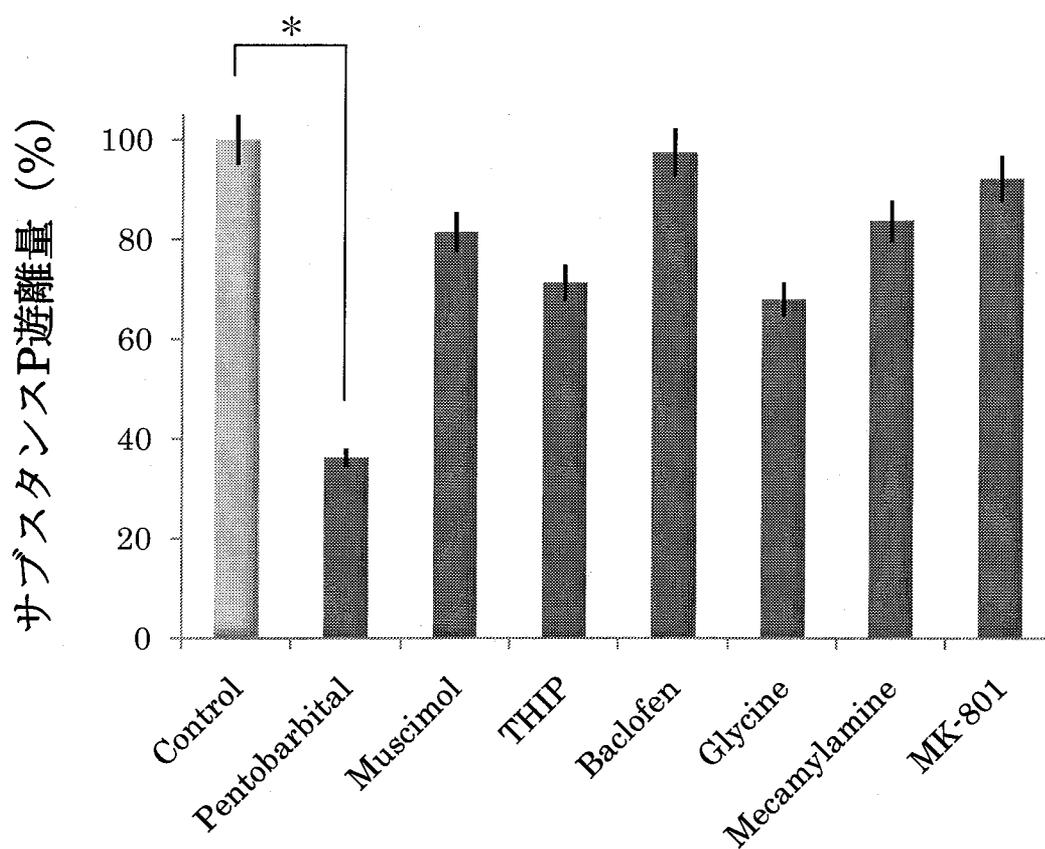


図 30 Capsaicin 誘発サブスタンス P 遊離に及ぼす pentobarbital に GABA, グリシン, グルタミン酸, 神経性ニコチンの各受容体リガンドを併用したときの影響を示す. 縦軸は, 1 枚の dish あたりのサブスタンス P 遊離量である. Control は, pentobarbital (100  $\mu$ M) 単独のときの capsaicin 刺激によるサブスタンス P 遊離量であり, その他は pentobarbital (100  $\mu$ M) に各受容体リガンド 1 mM を併用したときの capsaicin 刺激によるサブスタンス P 遊離量を示す. 各棒は, 平均値  $\pm$  標準誤差で示す (n = 6).

