

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 長谷 徹太郎

学位論文題名

イソフルラン暴露による延髄最後野における c-Fos の発現誘導に関する研究
(Studies on c-Fos expression in area postrema of the rat induced by isoflurane)

【背景と目的】 術後嘔気嘔吐は、未だに周術期の大きな問題の一つである。重度の合併症を引き起こすことは少ないが、患者にとっては非常に不快な周術期合併症とされる。患者背景としては、術後嘔気嘔吐は、若い年齢、女性、非喫煙歴、動揺病の既往などの素因で増加することが知られている。また、臨床研究の結果、術後嘔気嘔吐は吸入麻酔薬、術後の麻薬の使用が麻酔方法では最大の原因となっていることが判明している。しかし、これまでその機序を示した研究はない。一方、悪性腫瘍に対する抗腫瘍薬による嘔気・嘔吐に対する研究は進んでおり、これまでに延髄背側にある、最後野、孤束核の関連が指摘されている。最後野は嘔吐にかかわる化学受容体引き金帯として知られ、シスプラチンの投与で神経細胞の活動性の指標とされる c-Fos タンパクの発現上昇が報告されている。また、げっ歯類では、催吐作用のある薬剤の投与で、嘔吐反射はないが、代わりにカオリンなど通常の餌ではないものに食欲を示す異食行動を行うとされ、シスプラチンの投与で異食行動を行い、摂取するカオリンの摂食量増加と c-Fos 上昇の関連が報告されている。オキシコドン、トラキネム酸でも、最後野での神経細胞の活動性の上昇と異食行動の増加が示されている。我々は、麻酔による嘔気・嘔吐が延髄最後野・孤束核において神経細胞の活動性を惹起することに起因するとの仮説を立てた。もしこの仮説が正しいとすると、制吐薬により、この神経細胞の興奮が抑制されうると考えた。この仮説を検証するため、免疫組織学的な手法を使用し、ラットへのイソフルラン暴露後の延髄最後野と孤束核での神経細胞の活動性を評価した。

【対象と方法】 実験には雄性の Wistar 系ラットを用いた。実験はすべて「北海道大学医学研究科における動物実験に関する指針」に準拠して行った。以下の 3 つの条件でイソフルラン暴露を行った。①イソフルランによる時間依存性の評価として、ラットを、0 分 (N=5)、90 分 (N=6)、120 分 (N=6)、180 分 (N=5)、240 分 (N=6) の各群に分け、イソフルラン暴露を行った。②イソフルランによる濃度依存性の評価として、ラットを、120 分間、0% (N=5)、1.3% (N=6)、2.6% (N=5) 群に分け、イソフルラン暴露を行った。③制吐薬の効果をみるために、ラットを、イソフルラン暴露 30 分前に、オンダンセトロン (コントロール群, 1mg/kg 群, 2mg/kg 群, 4mg/kg 群; 各群 n=6)、ドロペリドール (コントロール群, 30 μ g/kg 群, 100 μ g/kg 群, 300 μ g/kg 群; 各群 n=4) を腹腔内投与し、1.3%イソフルランに 120 分間暴露した。上記暴露後、4%PFA による灌流固定を行った。灌流固定後に開頭して脳を摘出し、4%PFA に浸漬して後固定、スクロース置換を行った。その後、延髄最後野を含む 30 μ m 厚の水平断薄切切片を作成した。作成した切片は 3 切片毎に 1 切片採取した。抗 c-Fos 抗体、ビオチン標識 - ロバ - 抗ヤギ抗体を用い、免疫染色を行った。作成したサンプルは、光学顕微鏡を使用し、c-Fos 抗体で標識された最後野の細胞核の分布を観察した。各切片を 10 倍対物レンズでデジタルカメラを用い、スキャンした。1 個体につき 12 切片からの画像を作成し、最後野における標識された細胞核を計数した。計数結果を元に各個体における上位 3 切片分を合計し、統計学的検討を用いた群間比較を行った。

【結果】 1.3%イソフルラン暴露による最後野 c-Fos 陽性細胞数は 0 分、90 分、120 分、180 分、240 分の 5 群において統計学的検討を施行したところ、有意差を認めた

($F(4, 23)=20.31, P<0.0001$)。c-Fos 陽性細胞数はイソフルラン濃度依存性に増加し、統計学的に有意差を認めた ($F(2, 13)=82.46, P<0.0001$)。オンダンセトロン 4 mg/kg 投与によりイソフルラン暴露による c-Fos 陽性細胞数の増加が抑制された。他の群では有意差を認めなかった。

【考察】 c-Fos タンパクは、初期調節性遺伝子 c-fos から作成される、神経活動性のマーカーである。シスプラチンは、抗悪性腫瘍薬であり、その代表的な副作用として、嘔気・嘔吐が報告されている。シスプラチンの嘔気・嘔吐に対する基礎研究はよく行われており、シスプラチン投与により、延髄最後野・孤束核における c-Fos タンパクの誘導が分かっている。この c-Fos 誘導が嘔吐行動に比例し、また 5-HT3 受容体遮断薬などの制吐薬で抑制されることから、延髄最後野・孤束核での神経細胞の活動性の上昇が、嘔吐行動につながるものと考えられている。

フェレットは、嘔吐反射があり、比較的容易に管理できることから、これまで嘔吐研究における標準的な動物として使用されてきた。しかしながら、吸入麻酔による嘔吐行動はみられないと報告されている。このため、吸入麻酔による術後悪心嘔吐の研究には使用できず、最近では術後悪心嘔吐の研究は、トガリネズミなどの小動物での検討が行われている。

トガリネズミは入手が困難であり、他の犬、猫などの嘔吐のある哺乳類も、一定数の入手が困難である。実験動物として頻用されるラット・マウスはげっ歯類であり、もともと嘔吐行動を欠く。これは、嘔吐の基礎研究が進まなかった原因の 1 つと考えられる。近年の化学療法誘発性嘔気嘔吐の研究に伴い、嘔吐のないラットでも、脳内の構造は類似した構造をしており、その入力部位では同様の反応が見られること、嘔吐行動の代わりに異食行動が見られることが報告されている。このため、我々は、術後悪心嘔吐に関しても同様の反応が見られるのではないかと考え、延髄最後野・孤束核の評価を行った。今回の実験で、我々はイソフルラン暴露により、延髄最後野・孤束核で c-Fos タンパクが誘導されることを示した。この反応は、これまで報告のあった、シスプラチン、オキシコドン、トラネキサム酸投与時のラットの最後野での c-Fos タンパク発現に準じたものである。前述の研究でラットは嘔吐行動に準じた異食行動が生じていることから、イソフルラン暴露ラットにおいても、同様の行動が期待できると考えられる。また、c-Fos 陽性細胞数の変化は、イソフルラン暴露に対する時間依存性と濃度依存性があり、イソフルランに特異的な反応と考えることができる。制吐薬に対する反応では、ドロペリドールには有意差を認めず、オンダンセトロンには有意差が認められた。ドロペリドールで有意差が見られなかった原因としては、効果部位が異なる可能性、溶媒として必要だった DMSO の影響が考えられる。オンダンセトロンは、4 mg/kg 群において有意差が認められた。他の報告でも 5-HT3 受容体拮抗薬による最後野での c-Fos タンパク抑制は報告されており、また完全に抑制されないことも 5-HT3 受容体拮抗薬のみで術後嘔気嘔吐が解決しないことと臨床的にも矛盾しない。嘔吐には 5-HT3 のみでなく他の化学受容器が関わっていることを示唆する結果となった。

【結論】 イソフルラン暴露により、ラット延髄最後野で c-Fos タンパクの誘導が確認された。イソフルラン暴露により、ラット延髄孤束核で c-Fos タンパクの誘導が確認された。オンダンセトロン前投与により、イソフルラン暴露による c-Fos タンパクの発現は抑制された。ラットでの術後悪心嘔吐の評価の可能性が示唆された。