

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10548

研究課題名(和文) 消化管運動障害でのアストロサイトを介する腸管神経系制御機構の役割と麻酔薬作用

研究課題名(英文) Role of astrocyte in enteric nervous system and effect of anesthetic on enteric nervous system

研究代表者

橋本 篤 (Hashimoto, Atsushi)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：00378035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：局所麻酔薬ブピバカインは神経毒性を持つことが知られており、その機序を解明することによりブピバカインによる神経毒性を予防することを目標とした。ヒト神経芽細胞腫培養細胞(SH-SY5Y細胞)を使用し、ブピバカイン投与により細胞の生存率低下が見られたが、この生存率はT型カルシウムチャネル阻害薬の併用により更に悪化した。SH-SY5Y細胞におけるT型カルシウムチャネルの発現をリアルタイムPCRで調べたところ、Cav3.1のみが発現していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Local anesthetic, bupivacaine, is known to have neurotoxicity. Bupivacaine decreased viability of human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y cell). T-type calcium channel blocker exacerbated the bupivacaine induced cell death. According to the result of realtime PCR, Cav3.1 was the only subtype of T-type calcium channel which expressed on the SH-SY5Y cell.

研究分野：局所麻酔

キーワード：局所麻酔薬 ヒト神経芽細胞腫 細胞死 T型カルシウムチャネル

### 1. 研究開始当初の背景

消化管神経叢には神経細胞支持組織としてアストロサイトが存在する。乳酸トランスポーターを介したアストロサイトによるエネルギー供給が、腸管神経系、腸管機能に果たす役割は未知である。術後消化管機能障害(イレウス)は術後の患者の予後を悪化させる重大な合併症であるが、その予防、治療について画期的な方法はなく、麻酔法や麻酔薬が術後イレウスに与える影響についても議論があり、予防するための周術期管理戦略は確立していない現状にある。

### 2. 研究の目的

本研究では、1)消化管神経叢における乳酸トランスポーターを介したアストロサイトによるエネルギー供給が、腸管機能維持に役割を果たしているか、2)腸管神経系機能異常、腸管炎症反応がどの様に影響し合い術後イレウスを発生させるか、また、それに及ぼすアストロサイトの役割はなにか、3)術後イレウスモデルマウス由来の神経細胞-アストロサイトユニットへの乳酸トランスポーターcDNA導入は腸管神経系機能障害を治療できるか、4)麻酔薬および麻酔薬投与方法が、術後イレウス発生に影響を与えるか、それらは麻酔薬間で相違するか、について検討することを目的とした。

神経細胞が局所麻酔薬により障害を受けることは知られているが、その機序はまだ解明されていない。これまでに局所麻酔薬により誘導される神経細胞死はナトリウムチャンネル、カリウムチャンネルを介さないことが示されているが、カルシウムチャンネルに関する報告はない。一方、局所麻酔薬がカルシウムチャンネル電流を阻害することは知られており、このカルシウムチャンネル阻害作用と神経細胞死の関連を調べることも目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)術後イレウスモデルマウスの作成

セボフルランによる全身麻酔下に、マウスの下腹部正中に長さ8mmの切開を加え、切開創より小腸を腹腔外に取り出し、生理食塩水で加湿した綿棒で外側から腸管全体をなでる。その後、腸管を腹腔内に還納して閉創し麻酔から覚醒させる。

#### (2)小腸の腸管神経細胞-アストロサイトユニットの作成

安楽死後のマウス小腸から筋層間神経叢を遊離して培養し、アストロサイトに支持された状態で培養する。神経細胞は継代培養が困難なため、実験の都度単離培養する必要がある。安楽死後、小腸を摘出し、内腔を洗浄後、外側から綿棒で縦走筋を摘除後、内側についた筋間神経叢を剥離し、洗浄後神経細胞培養用の培養液で培養する。これにより、神経細胞とアストロサイトが同時に培養される。培養後は1-4日目がパッチクランプに最適であるが、用途に応じ培養期間は変更することが

できる。

#### (3)電気生理実験

培養された神経細胞-アストロサイトユニットを使用し、神経細胞に対し whole-cell patch clamp 法により静止膜電位、活動電位を測定する。

#### (4)ヒト神経芽細胞腫(SH-SY5Y細胞)に対するプピバカインの毒性の検討

SH-SY5Y細胞をプピバカインを含有した培養液で培養し、細胞の生存率をMTTアッセイ法で測定した。さらに、プピバカインと同時にナトリウムチャンネル阻害薬、カリウムチャンネル阻害薬、カルシウムチャンネル阻害薬を投与し、SH-SY5Y細胞の生存率を調べた。

#### (5)SH-SY5Y細胞に発現しているT型カルシウムチャンネルのサブタイプ解析

RT-PCRによりSH-SY5Y細胞のCav3.1, 3.2, 3.3のmRNA発現を調べる。

#### (6)カルシウムチャンネルCav3.1のSiRNAによるノックダウンと、プピバカインによって誘導される細胞死への影響

Cav3.1のみがSH-SY5Y細胞に発現していることがわかったため、Cav3.1-SiRNAのみを導入する。SiRNA導入24時間後より様々な濃度のプピバカインを含有した培養液に変更し、24時間後、48時間後の細胞の生存率をMTTアッセイ法により測定する。

### 4. 研究成果

#### (1)術後イレウスモデルの作成

パッチクランプ技術の確率ができなかったため、イレウスモデルは作成しなかった。

#### (2)小腸の腸管神経細胞-アストロサイトユニットの作成

マウスの小腸から腸管神経細胞-アストロサイトユニットを単離培養した。培養器内で5日程度培養できた。

#### (3)電気生理実験

マウスから単離培養した腸管神経細胞を使用してパッチクランプを行った。神経細胞の静止膜電位、活動電位を測定できた。デルタオピオイドレセプター刺激薬(DPDPE)を神経細胞に灌流することにより、神経細胞の自発活動電位発現性がたかくなることを確認した。しかし、薬物投与などを行う間に細胞とマイクロピペットの接触が悪くなり、持続的な測定ができなかった。細胞外液、ピペット内液の組成変更、マイクロピペットの先端形状の調節、細胞の単離からパッチクランプまでの時間の変更などのできるだけの変更をしたが改善は見られなかった。

#### (4)ヒト神経芽細胞腫(SH-SY5Y細胞)に対するプピバカインの毒性の検討

神経細胞の培養系であるヒト神経芽細胞腫(SH-SY5Y細胞)を使用し、麻酔薬の神経毒性を調べた。局所麻酔薬のプピバカインは濃度依存性、時間依存性にSH-SY5Y細胞の生存率を低下させた。その機序を調べるために、様々なイオンチャンネルブロッカーを同時に投与した場合、カルシウムチャンネルブロッカ

ーを投与した場合に生存率が悪化した。  
(5) SH-SY5Y 細胞に発現している T 型カルシウムチャンネルのサブタイプ解析

T 型カルシウムチャンネルは Cav3.1、3.2、3.3 のサブタイプがあるため、どのサブタイプが細胞死に関与するかを調べるために、RT-PCR で Cav3.1、3.2、3.3 の mRNA の発現を調べた。Cav3.1 のみが発現していることがわかった。

(6) カルシウムチャンネル Cav3.1 の siRNA によるノックダウンと、プピバカインによって誘導される細胞死への影響

Cav3.1 の発現を抑制することでプピバカインによる細胞死が抑制できるかを調べるために、Cav3.1-siRNA を導入することとした。siRNA による Cav3.1 のノックダウン効果を RT-PCR で確認する段階まで実験は進んだが、プピバカインを添加するまでには至っていない。

## 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 9 件)

Okumura M, Ujira A, Otsuka Y, Yamamoto H, Wada S, Iwata H, Kan T, Miyachi S, Hashimoto A, Sato Y, Fujita Y, Fujiwara Y, Shimaoka H : Cardiac arrest caused by rapidly increasing ascites in a patient with TAFRO syndrome: a case report. *Acute Medicine & Surgery*. 2017 4: 344-8.  
DOI <http://doi.org/10.1002/ams2.278>

橋本篤、木下浩之、磯部英雄、榊原健介、藤田義人、畠山登、藤原祥裕. 気道確保が必要となった甲状腺穿刺吸引細胞診後の一過性甲状腺腫大の症例. *日本集中治療医学会雑誌* 2018 25:195-6.  
DOI [https://doi.org/10.3918/jsicm.25\\_195](https://doi.org/10.3918/jsicm.25_195)

橋本篤、藤原祥裕. 超音波ガイド下神経ブロックの進歩-仙骨神経叢～坐骨神経ブロック-. *日本臨床麻酔学会誌* 2018 38:119-22  
<https://doi.org/10.2199/jjsca.38.119>

Kinoshita H, Otake K, Yamasaki T. The unknown mechanism of exogenous tetrahydrobiopterin in the renal protection of sheep ischemia and reperfusion. *Anesth & Analg* 2018 126: 1088  
DOI 10.1213/ANE.0000000000002784

Kinoshita H, Watanabe K, Azma T, Feng GG, Akahori T, Hayashi H, Sato M, Fujiwara Y, Wakatsuki A. Human serum albumin and oxidative stress in preeclamptic women and the mechanism of albumin for stress reduction. *Heliyon* 2017 3:e00369

DOI

<http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00369>

Azma T, Ogawa S, Nishioka A, Kinoshita H, Kawahito S, Nagasaka H, Matsumoto N. Involvement of superoxide generated by NADPH oxidase in the shedding of procoagulant vesicles from human monocytic cells exposed to bupivacaine. *J Thromb Thrombolys* 2017 44: 341-54

DOI

<https://doi.org/10.1007/s11239-017-1531-z>

Miyamoto Y, Feng GG, Satomi S, Tanaka K, Fujiwara Y, Kinoshita H. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition induces vasodilator effect of sevoflurane via reduction of Rho kinase activity. *Life Sciences* 2017 177: 20-6

DOI

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.04.005>

Kinoshita H. Does Memory consolidation by anesthetics relate to a time window of age? *Anesth Analg* 2017 125: 357  
DOI 10.1213/ANE.0000000000002163

Kinoshita H, Kawahito S, Takaishi K. The unique action of nicorandil on cerebral circulation. *J Anesth* 2018 32: 1

DOI

<https://doi.org/10.1007/s00540-018-2499-3>

[学会発表](計 1 件)

Hashimoto A, Takayanagi H, Kanamori H, Sato Y, Fujita Y, Fujiwara Y. Continuous rectus sheath block provides effective analgesia after breast reconstruction with free abdominal flap. *American Society of Anesthesiologists 2017 Annual Meeting*. 2017. 10 Boston, U.S.A.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 篤 (Hashimoto Atsushi)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：00378035

(2)研究分担者

木下 浩之 (Kinoshita Hiroyuki)  
愛知医科大学・公私立大学の部局等・客員  
研究員  
研究者番号：70291490

(3)連携研究者

馮 国剛 (Feng Guo-Gang)  
愛知医科大学・薬理学・講師  
研究者番号：70351111