

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590540

研究課題名 (和文) 低酸素血症状況下でのアミノフィリン投与による中枢神経傷害およびその
予防・治療戦略研究課題名 (英文) Aminophylline induced-neuronal cell injury under hypoxic conditions
and the survey of the protective agents against the injury.

研究代表者 入江 徹美 (IRIE TETSUMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：60150546

研究成果の概要 (和文)：

無呼吸発作の治療に用いられるアミノフィリンの中枢神経傷害誘発の可能性評価およびその予防・治療法探索を行った。低酸素血症モデルへのアミノフィリン投与により、治療域の薬物濃度において、血清クレアチンキナーゼ活性上昇、海馬神経細胞数減少および脳組織中酸化ストレスマーカーの上昇が見られ、これらは抗酸化薬エダラボンで顕著に抑制された。低酸素時のアミノフィリン投与の中枢傷害とそれに対する抗酸化薬の効果が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Aminophylline, a hydrophilic methylxanthine derivative, is often used to treat patients with apnea of prematurity to prevent further respiratory impairment in Japan. We showed that aminophylline, used at recommended doses, aggravated neuronal injury as indicated by increased serum CK-BB activity, a reduction in the number of cells in the hippocampal CA1 region, and increased lipid peroxide levels and a decreased GSH:GSSG ratio in brain tissue under hypoxic conditions induced by low-tidal volume ventilation in guinea pigs. We also showed that these effects were attenuated by treatment with the free radical scavenger, edaravone. The results suggest that aminophylline treatment aggravates the central nervous system of patients with hypoxemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：アミノフィリン、中枢神経傷害、医薬品副作用、新生児医療、呼吸興奮薬、薬物有害事象

1. 研究開始当初の背景

未熟児無呼吸発作は主に呼吸中枢の未熟性に起因し、20 秒以上の呼吸停止または 20 秒未満の呼吸停止にチアノーゼや脈を伴う疾患であり、妊娠 34 週未満で出生した早産

児の約 85%に発症する。無呼吸発作を発症した患児は、症状の遷延により低酸素血症が惹起され、発達途中の脳に障害を受け、神経発達予後不良となるおそれがあることから、適切な呼吸管理が極めて重要である。

アミノフィリン（テオフィリンのエチレンジアミン塩）、クエン酸カフェインおよび塩酸ドキサプラムは呼吸中枢刺激作用をもつことから、呼吸促進薬として未熟児無呼吸発作に続発する低酸素血症状態の改善に用いられる。わが国においては、唯一アミノフィリン（2004年）・テオフィリン（2006年）が早産・低出生体重児の無呼吸発作治療薬として承認され、新生児領域では必須の薬物となっている。アミノフィリンは、早産・低出生体現在、本邦では第一選択薬として広く使われており、呼吸中枢興奮作用は病態改善に寄与する一方で、低酸素状態に陥っている患児に対しては中枢神経傷害を増悪する可能性が懸念されてきたが、長らくそれは解明されないまま今日に至っている。

2. 研究の目的

本研究では、早産・低出生体重児の無呼吸発作の治療に用いられるアミノフィリンの中枢神経傷害誘発の可能性評価およびその予防・治療法探索を企図し、実験動物を用い低酸素血症病態モデルにアミノフィリンを投与し、病理組織学的観察、血液生化学的 surrogate marker の特定、薬物濃度モニタリングなどの結果を総合的に解析して、本剤による中枢神経傷害誘発の可能性を検証し、その機序に基づいた中枢神経傷害の予防・軽減法を確立することを目的とし検討を行った。

3. 研究の方法

■低酸素血症動物モデルにおけるアミノフィリンによる中枢神経傷害の作成

Hartley 系雄性モルモットをペントバルビタール麻酔後、背位に固定し鎖骨下静脈に薬物投与用のカテーテル、鎖骨下動脈に採血用の同径カテーテルを挿入する。ペントバルビタール深麻酔後、気道内挿管し人工呼吸器により分時換気回数を 60 回/分で体温はヒーターにより 37-38°C に保ち実験を行う。その際、1 回換気量は 4.9-8.9 ml/kg の容量範囲内で調節し、低酸素血症群では動脈血酸素分圧 (PaO₂) を 40-60 mmHg に、正常群では PaO₂ を 80-100 mmHg に調節する。本モデルに対してアミノフィリン (10, 20 mg/kg) は生理食塩水で全量を 1 ml/kg とし、気道内挿管の 15 分前より、30 分間で鎖骨下静脈より持続投与することで、海馬をはじめとする中枢神経を、ニッスル染色による病理組織学的に、血清中 CK-BB 活性・脳脊髄液中神経特異的エノラーゼ活性測定による病態変動する生体内物質変化により評価した。また、以下の検討において、他の呼吸興奮薬であるカフェイン (40mg/kg, i. v.) およびドキサプラム (100mg/kg, i. v.) 投与の影響についても比較検討を行った。

■低酸素血症下、アミノフィリンによる中枢神経傷害の組織学的観察

本研究の低酸素血症モデルにおいて、アミノフィリン投与後の海馬および大脳皮質の病理組織学的変化を観察する。具体的には、ラットを麻酔下で、生理食塩水およびパラホルムアルデヒドにより灌流固定した後に脳を摘出し、パラホルムアルデヒドに 24 時間浸して後固定し、スクロース溶液中で 48 時間脱水置換する。その後 -80°C 凍結しクリオスタットにより、Bregma-2.40 mm から -4.68 mm に渡り厚さ 50 μm の切片を作製する。切片をニッスル染色後、ランダム抽出した 5 枚を光学顕微鏡で観察し盲検下で海馬 CA1 部および大脳皮質の一定面積 (320×425 μm²) を WinROOF ver. 5.01 にて撮影し、その面積当り細胞数を ImageJ 1.35s にてカウントし定量評価する。

■低酸素血症下、アミノフィリンによる中枢神経傷害に伴う血清生化学パラメータの解析

低酸素血症条件下、アミノフィリンを投与した際の中枢神経傷害を迅速・高感度に検出できる surrogate marker を確立するため、神経細胞傷害時に変動することが予測される各種パラメータ (lactate dehydrogenase (LDH)、choline esterase (CHE)、C-reactive protein (CRP)、lactic acid、creatine kinase (CK) を測定する。さらに、CK のアイソザイム (CK-BB、MB、MM) の定量は、電気泳動法 (エパライザー、ヘレナ社) により行う。また、中枢神経傷害時に増加することが知られている neuron specific enolase (NSE)、protein S-100、glial fibrillary acidic protein (GFAP) 等のタンパク質および過酸化脂質の変動を調べる。

■低酸素血症条件におけるアミノフィリン血中濃度の測定

上記で作成した低酸素血症モデルにアミノフィリンを投与した際の、血液ガスパラメータや脳血流量の変化およびアミノフィリンの血中濃度を経時的に測定する。アミノフィリン (10, 20 mg/kg) 投与後、30 分おきに 6 時間まで採血し、血液ガス分析装置 (ABL5 型、RADIOMETER COPENHAGEN 社) により PaO₂、動脈血二酸化炭素分圧 (PaCO₂)、pH、酸素飽和度 (SaO₂) を測定する。同時に採取した血清を高速液体クロマトグラフ (Waters 600E Multisolute Delivery System) によりアミノフィリン濃度を測定する。

■アミノフィリンによる中枢神経傷害に対する予防・軽減候補化合物のスクリーニング

作成した低酸素血症モデル動物へのアミノフィリン投与で誘発される中枢神経傷害

に対し、予防・治療薬候補となる薬物の影響を調べる。すなわちアミノフィリンを投与された低酸素血症モデル動物に、薬物として、アミノフィリン誘発中枢神経傷害の一因と予測される活性酸素種を除去する目的で脳保護薬エダラボン(30 mg/kg)、さらに脳内のエネルギー状態を維持する目的で、神経細胞内で高いATP産生機能を維持するホスホエノールピルビン酸(PEP)(40 mg/kg)を投与し、アミノフィリン誘発中枢神経傷害に対する効果を検討する。

4. 研究成果

人工呼吸器による強制換気を行い、動脈酸素分圧を通常換気条件では80-100 mmHgに、低酸素血症条件では40-60 mmHgに保ちモデルを作成した(図1)。

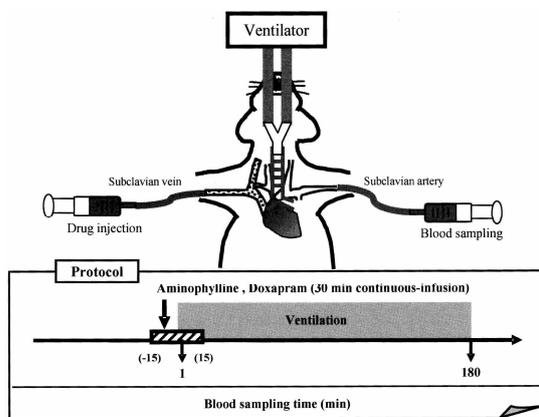


図1.低酸素血症モデルと薬物投与

アミノフィリン(5, 10, 20mg/kg, i. v.)投与により、正常群では顕著な変化は見られなかったが、低酸素血症群ではアミノフィリン10 mg/kg以上の投与で、CK-BB活性の顕著な増加が確認された(図2)。

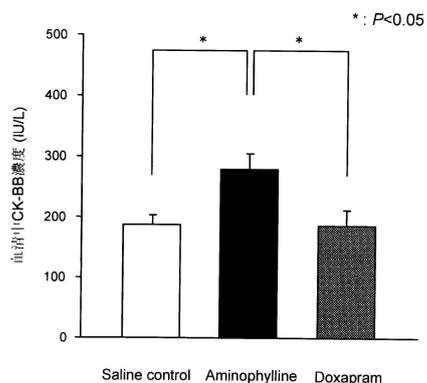


図2.低酸素条件下におけるアミノフィリン投与時の血清中CK-BB活性

また、このとき海馬CA1部の病理組織学検討において、神経細胞の顕著な脱落が確認さ

れ(図3)、定量的評価において、有意に低値を示した。

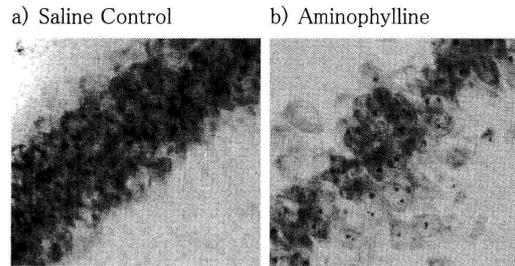


図3.低酸素条件下におけるアミノフィリン投与(10 mg/kg)時の海馬CA1部の組織像

このときのアミノフィリン投与量(5, 10, 20mg/kg, i. v.)は通常、本動物種において薬理実験で使う通常用量であるが、低酸素血症の際、アミノフィリンの活性本体であるテオフィリンの肝クリアランスが低下し血中濃度が増加する可能性が考えられるが、本実験条件下では血清中テオフィリン濃度はヒト・モルモットにおける有効血中濃度に相当する濃度範囲内で推移し、脳脊髄液中薬物濃度に関しても通常換気条件および低酸素条件の両群間に有意な差は見られなかった。これらの結果から、低酸素血症条件下でのアミノフィリン投与により、血清中薬物濃度が有意に増加することなく、中枢神経傷害が誘発されることが示された。

他の呼吸興奮薬との比較検討において、高用量のカフェイン(40mg/kg, i. v.)およびドキサプラム(100mg/kg, i. v.)を投与した際のCK-BB活性および海馬CA1部神経細胞数は、コントロール群と比較しほとんど変化せず、アミノフィリン投与時に見られたような中枢神経傷害を示唆する所見は見られなかった。

また、低酸素血症条件下でのアミノフィリン投与時の他の中枢神経細胞の指標として脳脊髄液中のNSE活性の顕著な増加が見られた。さらに、脳組織中の酸化ストレスの指標である過酸化脂質の増加および還元型/酸化型グルタチオン比の低下が観察された。さらに、活性酸素種除去薬であるedaravoneおよびPEPの投与により、低酸素血症条件下、アミノフィリンで誘発されたCK-BB活性の上昇、海馬神経細胞数の減少および酸化ストレスパラメータの変動は、通常換気条件のコントロール群とほぼ同程度まで改善された。したがって、低酸素血症条件下でのアミノフィリン投与による中枢神経傷害には活性酸素

種が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

また、現在、更なる検証として、in vitro 細胞培養系における傷害機序解析および傷害性比較について検討を行っている。PC-12 細胞および SH-SY5Y 細胞をモデル細胞として、通常酸素条件下や低酸素条件下などの病態および動物モデルの状態を模倣し、テオフィリン、カフェインおよびドキサプラムをそれぞれ添加して培養した結果、いずれの薬物も顕著な細胞障害は誘発しなかった。これらの結果から、in vivo 低酸素血症モデルで見られたアミノフィリンによる中枢神経傷害は神経細胞に対する直接的な作用ではなく、脳血流障害等の他の要因が関与する可能性が示唆され、今後更なる検証が必要であると考えられる。また、カフェインは PC-12 細胞神経突起伸長を促進すること、さらには SH-SY5Y 細胞を用いた低酸素誘発細胞傷害に対し用量依存的な抑制効果が見られたことから、アミノフィリン・テオフィリンと異なり、低酸素傷害に対しカフェインは神経保護的に作用する可能性が示唆された。今後、脳海馬スライス培養系を用いた検討およびカフェインの抗酸化作用に関する検討を行っていく予定である。

以上、本研究により、低酸素血症時のアミノフィリン投与により中枢神経傷害が誘発されることが明らかになり、その傷害には活性酸素種が関与することが示唆された。このようなアミノフィリンによる有害作用は、正常な呼吸状態・血中酸素分圧状態では見られないが、特に低酸素血症状態にある患者に対してアミノフィリンを投与する際は、中枢神経傷害に関する注意喚起が必要であると考えられる。さらに、アミノフィリン投与による中枢神経傷害の予防・治療薬として edaravone などの抗酸化作用を有する脳保護薬が有効であることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 石塚洋一、山口圭太郎、染川智子、伊藤禎子、河内山佳英、富安麻友、森内宏志、入倉充、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫、安東由喜雄、入江徹美、低酸素血症

動物モデルにおける呼吸興奮薬による中枢神経傷害性に関する検討，日本薬剤学会第 24 年会，2009 年 5 月 23 日 静岡県コンベンションアーツセンター

- ② 山口圭太郎，染川智子，伊藤禎子，河内山佳英，富安麻友，石塚洋一，森内宏志，入倉充，副田二三夫，白崎哲哉，高濱和夫，安東由喜雄，香月博志，入江徹美，呼吸促進薬の中枢神経傷害性および神経突起成長に及ぼす影響，第 25 回日本薬学会九州支部大会 (2008 年 12 月 6 日-7 日) 延岡市 九州保健福祉大学
- ③ 山口圭太郎，染川智子，伊藤禎子，河内山佳英，富安麻友，石塚洋一，森内宏志，入倉充，入江徹美，低酸素血症動物モデルにおける未熟児無呼吸発作治療薬の中枢神経傷害性に関する検討，第 33 回西日本薬剤学研究会 (2008 年 8 月 30 日-31 日) 大分県玖珠郡九重町九州地区国立大学九重共同研修所

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/dcci/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 徹美 (IRIE TETSUMI)

熊本大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号：60150546

(2) 研究分担者

石塚 洋一 (ISHITSUKA YOUICHI)

熊本大学・大学院生命科学研究所・助教
研究者番号：70423655

高濱 和夫 (TAKAHAMA KAZUO)

熊本大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号：80150548

安東 由喜雄 (ANDO YUKIO)

熊本大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号：20253742