

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17845

研究課題名(和文) mtDNA異常疾患iPSモデルにおける麻酔薬の神経系への影響と作用機序の解明

研究課題名(英文) The effect of anesthetics on the nervous system of mitochondrial disorders derived from iPS cell models

研究代表者

森田 知孝 (Morita, Tomotaka)

国際医療福祉大学・医学部・研究員

研究者番号：30546924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠17日目のウイスターラットより胎児脳を取り出し、大脳皮質神経細胞の初代培養を行った。14日間の培養の後、レミマゾラム、ミダゾラムの神経保護効果を神経細胞に投与し、直後に24時間の低酸素曝露を行った。ミダゾラムを投与した群では、麻酔薬を投与しなかった非低酸素曝露群(対照群)と比較して、細胞生存比に有意差を認めなかったが、低酸素曝露群と比較すると有意に細胞生存比が大きく、ミダゾラムによる神経保護効果を認めた。一方、レミマゾラムを投与した群では、50mM投与群では細胞生存比に有意差を認めなかったが、5mMおよび0.5mMでは有意に低下し、レミマゾラムによる神経毒性の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レミマゾラム(RMZ)に関する動物実験はまだ少なく、中でもその中枢神経毒性については明らかになっていない。特に小児においては臨床の現場でもその安全性が検証されている段階である。本研究ではラット初代培養大脳皮質神経細胞にミダゾラム(MDZ)またはRMZを投与し、ベンゾジアゼピン系薬剤の中枢神経保護効果を比較検討したが、RMZはMDZと比較して神経保護効果を期待できない結果であった。しかし、RMZはMDZと比較して作用時間が短時間であること、また本研究ではまだ十分な数の実験をできなかったことから、今後更なる実験を重ねて、より細かな結果が求められると考える。

研究成果の概要(英文)：Neurons prepared from E17 Wistar rats were used after 2 weeks in primary culture. The neurons were exposed to 24-h hypoxic insults with or without remimazolam or midazolam. Though midazolam administration under normoxia did not affect the survival ratio, midazolam exhibited a significant neuroprotective effect against hypoxic insults. While the survival ratio of neurons which were administered 50mM remimazolam was not significantly different from neurons in control groups, 0.5mM and 5mM remimazolam significantly decreased survival ratios. These results may show the neurotoxicity of low-moderate concentrations of remimazolam.

研究分野：神経麻酔

キーワード：神経保護効果 神経毒性 麻酔薬

1. 研究開始当初の背景

プロポフォール(propofol; PPF)は γ -アミノ酪酸 A (γ -Aminobutyric acid A; GABA_A) 受容体を賦活し、N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-d-aspartate; NMDA) 受容体を抑制し、カルシウム (Ca) イオンチャンネルからの Ca 流入を修飾することが知られている。臨床麻酔では、セボフルランやデスフルランなどの吸入麻酔薬と比較すると、PPF は麻酔維持に必要な濃度や量の個人差が大きく、患者ごとに慎重に投与量を調整する必要がある。しかし一方では麻酔からの覚醒の質の良さ、とりわけ術後の嘔気・嘔吐の頻度が低いことなど、PPF を使用した麻酔のメリットは多く、世界中で広く使用される静脈麻酔薬となっている。本邦でも集中治療時の鎮静の導入や維持で一般的に使用されており、局所麻酔中や検査時の鎮静、小児への麻酔の使用例も増えている。このように PPF は手術麻酔のみならず、さまざまな分野で欠かせない薬剤となっている。

近年、プロポフォール注入症候群(propofol infusion syndrome; PRIS)が話題となっている。PRIS は小児の報告例が多いが、成人でも起こりうる疾患であり、PPF の長期投与時に起こる、予期せぬ説明の付かない死亡に至る症候群として提唱された (Bray R.J. Paediatr Anaesth 8: 491-9, 1998)。2015 年の日本集中治療医学会の報告によれば、PRIS または PRIS が疑われる症例を経験した施設は 10%にも及んだという。症状はさまざまであり、脂質異常症、横紋筋融解、治療難治性の不整脈や心不全を起こし、小児での死亡率は 8%に及ぶとの報告もある (Wysowski DK, et al. Anesthesiology 105: 1047-52, 2006)。PRIS の発症機序として、PPF によるミトコンドリアの脂質代謝の障害 (Wolf A, et al. Lancet 357: 606-7, 2001)、中鎖脂肪酸の代謝障害 (Mehta N, et al. Lancet 354: 866-7, 1999) が示唆されているが、中鎖アシル-CoA 脱水素酵素欠損症や 酸化酵素欠損症などの遺伝子異常も疑われており、PRIS の筋生検所見で、続発性ミトコンドリア呼吸鎖酵素欠損症と同様の所見がみられたとの報告がある。

ミトコンドリアは核ゲノムとは異なる独自のゲノム (mitochondrial DNA; mtDNA) を有している。ミトコンドリア病は遺伝子疾患の一つであり、mtDNA 異常によるミトコンドリアの機能低下が主要な病因である。1 細胞内に多数存在するミトコンドリアは個々に mtDNA をもち、変異型 mtDNA を有する細胞は健常型 / 変異型 mtDNA が混在した mtDNA ヘテロプラスミーの状態となり、変異型 mtDNA の割合がある一定値を超えることでミトコンドリア病を発症する。しかしながら、mtDNA ヘテロプラスミーの閾値効果と罹患臓器 (骨格筋・脳・心臓など) における発症・病態との関係については依然として十分な知見が得られていない。また、ミトコンドリア病を有する患者の麻酔および集中治療室における鎮静の際には PPF の使用を避ける麻酔科医が多い。しかし、ミトコンドリア病患者に対する PPF 及びその他の麻酔薬の影響についての詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では脳神経細胞に着目し、初代培養された mtDNA 異常マウス胎児の大脳皮質神経細胞及び mtDNA 異常生体マウスに、PPF を初めとする静脈麻酔薬やセボフルラン・デスフルランなど使用頻度の高い吸入麻酔薬を単独投与してその神経細胞への影響を定量化する。これにより、*in vitro* および *in vivo* で mtDNA 異常を有するマウスにとって最も安全性の高い麻酔薬、すなわちミトコンドリア病患者に対して神経細胞の機能を損なわずに麻酔を行えることが期待できる麻酔薬を検証し、臨床麻酔における麻酔薬の選択の寄与とする。

上記を最終的な目的に掲げた上で、まずは 2020 年に本邦で承認された超短時間作用型ベンゾジアゼピン系静脈麻酔薬であるレミゾラム (RMZ) での実験を開始することとした。初代培養されたラット胎仔由来の大脳皮質神経細胞に、RMZ や、RMZ と同じくベンゾジアゼピン系静脈麻酔薬であり代謝物が活性を有するミダゾラム (MDZ) を単独投与し、その神経毒性を定量化する。

3. 研究の方法

本研究における動物実験計画書は、国際医療福祉大学動物実験規定 (平成 30 年改訂・施行) に基づき、国際医療福祉大学成田動物実験委員会が審査され、「承認番号 22024NA: ラット胚由来・培養中枢神経細胞に対する麻酔薬の影響」として承認された。

神経培養は、これまでの我々の報告 (1-4) と同様の方法で行った。妊娠 17 日目のウイスターラットをセボフルランで麻酔し、十分な麻酔深度を得た後に安楽死させ、開腹して子宮を摘出し、胎仔を取り出した。顕微鏡下で胎仔の脳から左右の大脳皮質を摘出し、37℃ に設定されたインキュベータ内で 0.25% トリプシンに曝露して処理を行った。処理された細胞は、あらかじめポリ-L-リシンでコーティングされた培養皿に移され、培養皿は培養液によって満たされた。培養開始から 72 時間後、培養液を全て入れ替え、5-FU 5 μ g/ml を 3 日間曝露した。その後 5% CO₂ 下のインキュベータで培養を継続し、のべ 13 日間の初代培養を行った。

培養 14 日目に RMZ, MDZ, またはベンゾジアゼピン系薬剤を含まないジメチルスルホキシドを投与した直後に 24 時間の低酸素曝露を行った。低酸素曝露後に、神経細胞生存比を測定した。

細胞生存比の測定は以下のように行った(5)。まず、低酸素曝露前に各培養皿の任意の 3 箇所の写真撮影を行い、生存細胞数を測定した(図 1)。低酸素曝露後にトリパンブルー染色を行い、生存した細胞の写真撮影を行い、生存細胞数を測定した。低酸素曝露後の生存細胞数を、曝露前の細胞数で除したものを各培養皿の細胞生存率とした。さらに、実験群の培養皿の細胞生存率を、対照群の細胞生存率で除したものを細胞生存比とした。これにより、対照群の細胞生存比は 1 と定義できる。

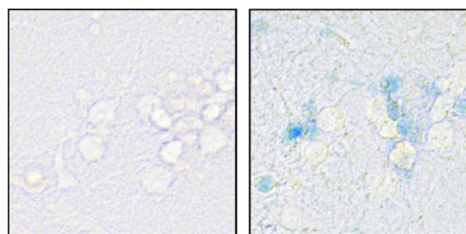


図 1 低酸素曝露前後の神経細胞

各実験群の細胞生存比は、対照群の細胞生存比と t-検定を使用して比較し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

各実験群の細胞生存比を表に示す(表 1, 2)。

MDZ 投与において、非低酸素曝露群では、 $100\mu\text{M}$ 投与群のみ対照群と比較して有意差があったが($P = 0.049$)、その他の 2 群は対照群と比較して有意差を認めなかった。一方、低酸素曝露群では、全ての群において対照群と有意差を認めた($P = 0.047, 0.006, 0.021, < 0.001$)。

また、RMZ 投与において、非低酸素曝露群では、 $500\mu\text{M}$ 投与群のみ対照群と比較して有意差があったが($P = 0.043$)、その他の 2 群は対照群と比較して有意差を認めなかった。低酸素曝露群では、 $500\mu\text{M}$ 投与群では有意差を認めなかったが、その他の群では有意差を認めた($P = 0.025, 0.038, < 0.001$)。

これらの結果から、MDZ を投与した群では低酸素曝露の有無による細胞生存比の差が生じ、MDZ が神経保護効果を示したと考える。これはこれまでの我々の報告(2)と同等の結果であり、本研究でも改めて MDZ による神経保護効果が示されたと言える。

一方、RMZ 投与群では、 $500\mu\text{M}$ の投与では神経保護効果を示さないだけでなく、RMZ による神経毒性が示唆される。一方、 50mM や 5mM という比較的高濃度では神経保護効果を示した可能性が考えられる。

MDZ では十分なサンプルが得られたので、本研究での結果は妥当なものと考えられるが、RMZ では十分なサンプルが得られなかったため、本研究での結果によって RMZ の神経保護効果及び神経毒性を十分に評価できたとは言いがたい。今後さらなる実験を重ねてサンプルを得ることで、RMZ の神経細胞への影響を評価していくべきである。

また、本研究では各麻酔薬の機能的評価をできていないので、これまでの我々の研究と同様に機能的評価も行うことで、RMZ の神経細胞への影響を評価し、臨床の現場に活かしていきたい。

表 1 MDZ 投与時の細胞生存比(平均 ± 標準誤差)

	MDZ 1mM	MDZ $100\mu\text{M}$	MDZ $10\mu\text{M}$	MDZ 投与無し
低酸素曝露なし	0.86 ± 0.17	0.84 ± 0.05	0.93 ± 0.08	1
低酸素曝露あり	0.74 ± 0.12	0.53 ± 0.14	0.66 ± 0.13	0.40 ± 0.13

表 2 RMZ 投与時の細胞生存比(平均 ± 標準誤差)

	RMZ 50mM	RMZ 5mM	RMZ $500\mu\text{M}$	RMZ 投与無し
低酸素曝露なし	1.09 ± 0.37	0.57 ± 0.36	0.54 ± 0.12	1
低酸素曝露あり	0.47 ± 0.12	0.48 ± 0.17	0.76 ± 0.11	0.75 ± 0.20

5. 参考文献

- 1 Shibuta S, Morita T, et al. PLoS ONE 17 e0273219, 2022
- 2 Shibuta S, Morita T, et al. Neurotoxicology 69: 320-9, 2018
- 3 Morita T, Shibuta S, et al. J Neurol Sci 365: 126-31, 2016
- 4 Shibuta S, Morita T, et al. Neurosci. Res. 98: 9-16, 2015
- 5 Shibuta S, et al. Neuroreport 12: 295-8, 2001

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 森田知孝	4. 巻 13
2. 論文標題 小児期における麻酔薬と脳神経の発達：麻酔薬の神経毒性と神経保護効果の今	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 INTENSIVIST	6. 最初と最後の頁 682-685
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森田知孝	4. 巻 1
2. 論文標題 「実用化したいテクノロジー」デジタルガジェットについて	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 麻酔・集中治療とテクノロジー2020	6. 最初と最後の頁 12-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 森田知孝, 内田整, 萩平哲	4. 巻 1
2. 論文標題 レーザ血流計を用いた麻酔導入時の毛細血管血流の変化の比較検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 麻酔・集中治療とテクノロジー2020	6. 最初と最後の頁 27-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 岩切さと子, 吉田力丸, 森田知孝, 澁田達史	4. 巻 1
2. 論文標題 Arduinoと感圧センサーを用いた喉頭展開の際に舌根部にかかる圧力の測定デバイスの試作	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 麻酔・集中治療とテクノロジー2020	6. 最初と最後の頁 66-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 澁田達史, 森田知孝	4. 巻 26
2. 論文標題 新設医科大学における学生教育: 英語による小児麻酔科学講義	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日小児麻酔会誌	6. 最初と最後の頁 82-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森田知孝, 澁田達史
2. 発表標題 プロポフォルプレコンディショニングによる幼若神経細胞傷害への保護効果について <Caイメージングによる比較検討>
3. 学会等名 日本麻酔科学会第69回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田知孝, 澁田達史
2. 発表標題 胎児期のケタミン曝露は幼児期セロトニン曝露による神経細胞傷害性に影響を与えるか
3. 学会等名 日本集中治療医学会第6回北海道支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田知孝, 澁田達史
2. 発表標題 胎児期のケタミン曝露は幼児期ドパミン曝露による神経細胞傷害性に影響を与えるか
3. 学会等名 日本小児麻酔学会第27回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田知孝, 濫田達史, 小阪淳
2. 発表標題 プロボオールプレコンディショニングによる幼若神経細胞傷害への保護効果について
3. 学会等名 第25回日本神経麻酔集中治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田知孝, 内田整
2. 発表標題 レーザー血流計を使用した麻酔薬による末梢血管血流量の変化の比較検討
3. 学会等名 日本臨床麻酔学会第40回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------