

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591980

研究課題名（和文） 麻酔薬の幼弱脳神経毒性に対するエリスロポイエチンの予防効果

研究課題名（英文） Protective potentials of erythropoietin against neurotoxicity of general anesthetics on immature brain.

研究代表者

越後 憲之 (ECHIGO NORIYUKI)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：00363797

研究成果の概要（和文）：全身麻酔薬は幼弱動物に対して長時間施行すると、広範な神経細胞死を生じることが報告されている。この麻酔薬の神経毒性に対して、エリスロポエチン（Epo）が保護作用を示すかを検討した。日齢 7 日ラットにおいて麻酔 6 時間施行後、大脳皮質と海馬にアポトーシスの増加を認めた。麻酔前に Epo 鼻腔内、腹腔内投与を行った群において、アポトーシスの程度は有意に変化しなかった。したがって、Epo の麻酔薬神経毒性に対する保護作用は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：General anesthetics are shown to induce wide spread apoptosis in the developing brain. We studied if erythropoietin (Epo) affords protection against anesthetic-induced neurotoxicity in neonatal rats. We found that neuroapoptosis was induced in the cerebral cortex and hippocampus after 6 hour exposure to general anesthetics. Intranasal and intraperitoneal administration of Epo failed to inhibit apoptosis. The results suggest that Epo is not effective in inhibiting anesthetic-induced neurotoxicity in immature brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：エリスロポエチン、新生児、神経保護、神経細胞死、麻酔薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 麻酔薬の幼若脳に対する神経毒性

新生児ラットに対して、亜酸化窒素、イソフルレン、ミダゾラムなどの臨床に広く使用されている麻酔薬を通常使用量で数時間暴露すると、大脳皮質、海馬などに広範囲に神

経細胞死が生じ、成熟後の空間学習能の低下を惹起するという報告が 2003 年になされ、非常に大きなセンセーションを起こした (J. Neurosci 23:876, 2003)。その後数多くの追試によって、発達過程の幼若な脳にケタミン、プロポフォール、セボフルレンなどの麻酔薬も神経毒性をもたらすことが確認された。シ

ナプス形成が進行中の未発達な脳にGABA_A受容体刺激作用やNMDA型グルタミン酸受容体抑制作用を持つ麻酔薬が作用することによってアポトーシスが誘導されると考えられているが、そのメカニズムの詳細は明らかではない。最近、イソフルレンが神経栄養因子であるBDNFのシナプス形成および神経栄養作用を阻害する可能性や neuronal progenitor cellの数の低下を生じる可能性が指摘されている。臨床においては麻酔薬の神経毒性を裏付けたり、否定するに足る疫学的なデータは得られていないが、小児麻酔の大きな課題であると考えられている (Anesth Analg 104:509, 2007)。

(2) Erythropoietin の神経保護作用

近年erythropoietin (Epo) の受容体が神経細胞に発現しており、神経系の発達に重要な働きをするとともに、神経栄養因子様作用や神経保護作用を持つことが明らかとなってきた (Nat Rev Neurosci 6: 484, 2005)。新生児動物や成熟動物において、Epo投与が虚血や外傷など様々な要因によるアポトーシスを強力に抑制することが動物実験で示されている。さらに、ヒトにおいても脳梗塞や多発性硬化症などにおいてEpo投与の神経保護効果が示された。また、傷害修復に重要な neuronal progenitor cellの増殖にEpoシグナル伝達系が必要であり、外因性に投与したEpoは脳梗塞モデルで neuronal progenitor cellの増殖を刺激し損傷修復を促進することが明らかとなった (J Neurosci 26:1269, 2006, J Biol Chem 282:25875-83, 2007)。この時点では、Epoの麻酔薬のin vivoでの神経毒性に対する効果に関する報告は見られなかった。

2. 研究の目的

新生児ラットに長時間麻酔薬を投与することによって生じる神経細胞死などの脳傷害に対して、erythropoietin (Epo) が神経保護因子として働き、この神経毒性を抑制するという仮説を検討することを目的とする。

具体的には、日齢7日の新生児ラットに6時間の亜酸化窒素・イソフルレン麻酔を行い、Epoの前投与によって、神経細胞のアポトーシスの程度がどのように変化するかを明らかにする。

Epoは分子量の高い蛋白であるため、末梢投与では脳血管関門を通過しにくいことが

知られている。成体動物やヒトにおいて、鼻腔内投与した場合、インスリンやEpoなどの蛋白製剤が神経経路を介して脳内へ高効率に移行することが報告されている。本研究でも、Epoの腹腔内投与に加えて鼻腔内投与の効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 薬剤投与: Wistar系ラット哺乳7日齢を用い、Epoの投与経路別に鼻腔内投与群と腹腔内投与群に分けた。Epoはhuman recombinant Epo (rEpo)を生食に溶解して用いた。蛋白吸着を避けるためピペット、容器は吸着防止薬を塗布したものをを用いた。

鼻腔内投与群は、生食群(NS12mcl)、低用量EpoのrEpo-L群(20U/12mcl)、中等量EpoのrEpo-M群(66U/12mcl)、高用量EpoのrEpo-H群(200U/12mcl)の4群に分けた。麻酔開始の30分前に、2mclずつ交互に、左右の鼻腔に注入した。

腹腔内投与群は、同様な4群を設け、同量の薬剤を麻酔開始30分前に、腹腔内に一度に全量を注射した。

(2) 麻酔実施: 恒温槽につけた密閉容器にラットを収納し、自発呼吸下に6時間の麻酔薬暴露を行った。麻酔器より亜酸化窒素4 l/min、酸素2 l/min、イソフルラン0.95%の混合ガスを容器の流入口より送気し、排出口より排出させた。排出口で麻酔ガス濃度を連続モニターした。非麻酔群では、亜酸化窒素に変えて窒素を同量送気した。また、麻酔中のバイタルサインを評価するため、別の7日齢ラットにおいてMouseOXを用いて、呼吸数、心拍数、SpO₂、体温をモニターした。

(3) 脳組織の検討: 麻酔終了約30分にペントバルビタール麻酔を施し、断頭して脳を摘出した。海馬部分、頭頂部の大脳皮質部分をブロックとして切離し、凍結した。後日解凍し、それぞれの部位から脳組織homogenateを作成し、cleaved Caspase 3を抗体としてウェスタンブロット法を行った。一部の例では、前頭部と後頭部の大脳皮質のブロックも採取し、homogenateを作成し、ELIZA法を用いてhuman recombinant Epoの定量を行い、投与したEpoの脳への移行を評価した。

4. 研究成果

(1) 麻酔中の呼吸、循環、体温の変化
麻酔開始後、呼吸数の低下と心拍数の増加が見られたが、6時間の麻酔中も体温は正常に保たれた。SpO₂は麻酔中軽度低下したが、どの時点でも95%以上を保った。

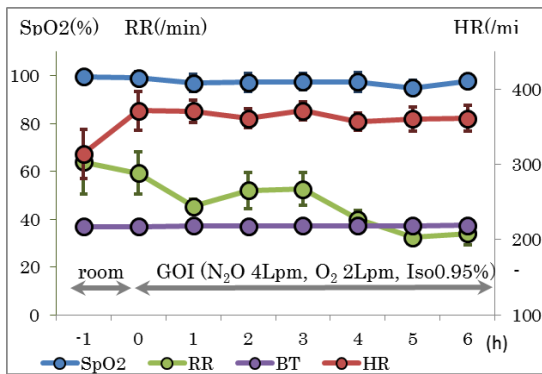


図 1 : 麻酔中のバイタルサイン

(2) 投与した Epo の脳内への移行

対照として生食を鼻腔内および腹腔内に投与した生食群ではヒト Epo は検出限界以下であった。したがって、この方法では内因性の Epo は検出されず、外部から投与した human recombinant Epo の移行を評価できると考えられた。これは過去の報告とも一致する結果であった。

大脳皮質ホモジェネート内のヒト Epo は鼻腔内投与では、大量投与でも極微量しか検出できなかったが、腹腔内投与後には 3.9 mU/protein mg 程度の移行が認められた。これは、新生児の脳虚血モデルで Epo 腹腔内投与後に脳保護作用が認められた報告と近い脳内濃度であり、有効な濃度に達していると考えられた。

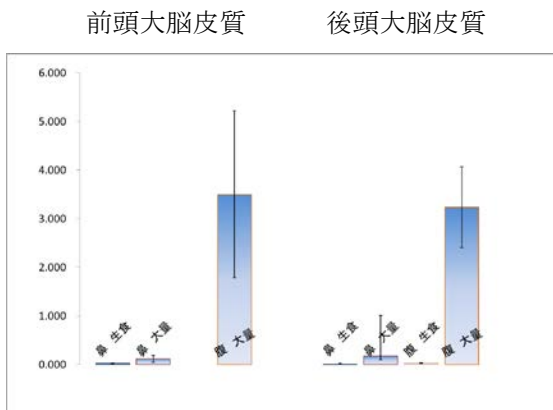


図 2 : 前頭および後頭大脳皮質ホモジェネートのヒトエリスロポエチン濃度 (mU/protein mg)

(3) アポトーシスの評価

cleaved caspase3 の発現は GAPDH の発現量との比を取って調べた。6 時間の麻酔薬暴露により、頭頂部大脳皮質の cleaved caspase3 は、非麻酔群と比べて、鼻腔投与群、腹腔投与群それぞれ、約 8 倍、10 倍と有意に増加した。海馬では麻酔暴露によって、鼻腔投与群、腹腔投与群それぞれ約 5 倍に増加した。

Epo 投与は、いずれの投与量においても鼻

腔内、腹腔内投与どちらの群も cleaved caspase3 の発現量を有意に変化させなかった。鼻腔内低用量投与群は生食投与群に比べて増加傾向を示したが、差は有意ではなかった。

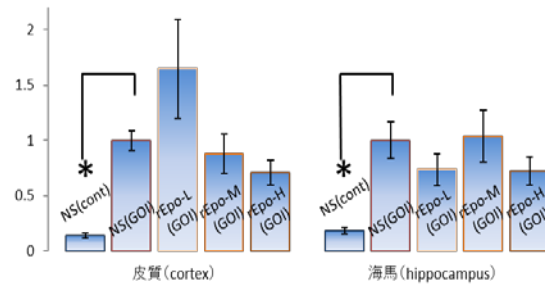


図 3 : 鼻腔内投与群の cleaved caspase3/GAPDH 比の比較

皮質 [1-way ANOVA: $F(3, 30) = 1.892$; $P = 0.155$]。海馬 [1-way ANOVA: $F(3, 29) = 0.918$; $P = 0.446$]。

*; student's T test; $p < 0.01$

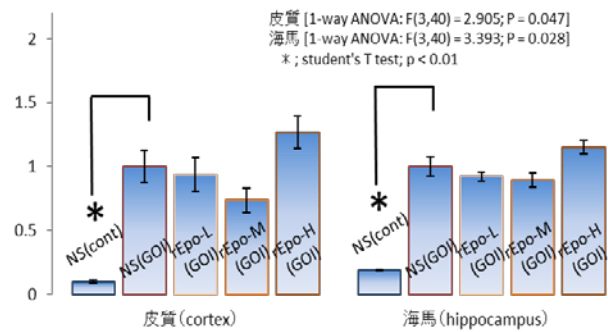


図 4 : 腹腔内投与群の cleaved caspase3/GAPDH 比の比較

(4) 考察

Epo 鼻腔内投与について：成熟ラットやヒトにおいて、分子量の大きい蛋白質やポリペプチドを全身投与した場合、脳血液関門の存在のために脳神経系への移行が少なく、作用部位で十分な濃度に達しないことはしばしばみられる。このような場合に、鼻腔内投与は経神経的に脳への移行が期待できる投与経路である。投与物質が鼻粘膜より神経線維に取り込まれて、嗅神経内を輸送されて脳内に達する経路や、神経線維周囲に沿って輸送されて移行する経路、脳血液関門を欠く脳底部に運ばれて循環を介して移行する経路などが存在すると考えられている。ヒトにおいても、インスリンの鼻腔内投与後に脳内へ効率よく移行することが報告されている。Epo も

高分子量の蛋白質であるため、末梢投与では脳への移行は遅く、かつ限定的であり、大量投与を必要とする。成熟ラットにおいて、腹腔内投与と鼻腔内投与を比較し、後者が圧倒的に効率よく脳組織へ移行することも報告されている。しかし、新生児動物での鼻腔内投与は、Epo やそれ以外の蛋白質に関して報告はなかった。これらより、新生児ラットでEpo の鼻腔内投与を試行したが、脳への移行は腹腔内投与よりも少なかった。非常に微量投与になること、非麻酔下の投与であるため十分吸収されなかったことが考えられる。予備実験で色素の鼻腔内投与を行ったときは、脳への移行が肉眼的にも認められた。したがって、神経線維でのEpo の取り込みや輸送系が新生児動物では未発達であることも考えられる。

(5) 結論

- ①新生児ラットにおいてEpo の鼻腔内投与後の脳内への移行を、ヒトEpo のELIZA 法による測定によって評価した。成体での報告とは異なり、鼻腔内投与は腹腔内投与に比べて脳への移行は著しく低かった。新生児ラットでは、鼻腔への薬液投与は、確実に投与できない、鼻閉を生じるなどの欠点があり、投与方法として不備であった。
- ②新生児ラットに対する6時間の亜酸化窒素-イソフルレン麻酔は、低酸素を来さずに大脳皮質、海馬のアポトーシスを誘発し、cleaved caspase3 の発現増加を生じた。
- ③Epo の麻酔暴露30分前の投与は、鼻腔内、腹腔内投与いずれにおいても、cleaved caspase3 の発現量に有意の変化を生じなかった。したがって、現時点までの検討では、Epo は新生児ラットの亜酸化窒素-イソフルレン麻酔による神経細胞死を抑制する所見は認められなかった。

[学会発表] (計 1件)

- ① 内本一宏、後藤隆久、安藤富男：幼若ラットへのイソフルレン暴露による海馬アポトーシスに対してエリスロポエチンに保護作用はあるか？日本麻酔科学会第59回学術集会、2012年6月7日、神戸

[図書] (計 1件)

- ① 安藤富男:エリスロポエチンの神経保護作用とその臨床効果. 帝京医学会雑誌、査読有、32巻:319-328、2009

6. 研究組織

(1)研究代表者

越後 憲之 (ECHIGO NORIYUKI)
横浜市立大学・医学部・客員准教授
研究者番号：00363797

(2)研究分担者

安藤 富男 (ANDOH TOMIO)
横浜市立大学・医学研究科・客員教授
研究者番号：00193110
紙谷 義孝 (KAMIYA YOSHINORI)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：90381491