

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591707

研究課題名(和文) 1分子イメージングを用いた揮発性麻酔薬による幼若脳神経細胞障害作用の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of volatile anesthetics toxicity on the immature mammalian brain cells: Analysis by single fluorescent molecule imaging.

研究代表者

宮本 善一 (Miyamoto, Yoshikazu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70278844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、揮発性麻酔薬による幼若脳神経細胞の障害作用の全容を解明するため、揮発性麻酔薬がどのような投与条件でラット幼若脳神経細胞の障害作用を呈するのか、またこれがニューロトロフィンの作用阻害によるものか否かを検討した。蛍光プローブを結合させたニューロトロフィン(Qdot-NGF, Qdot-BDNF)の1分子ライブセルイメージングの系を確立し、現在、揮発性麻酔薬がニューロトロフィンの細胞膜表面受容体への結合や二量体化などにどのような影響を与えるかを解析・検討中である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to find out the whole mechanism of the toxicity of volatile anesthetics to fetal rat brain. We speculated that volatile anesthetics might cause injury through inhibition of neurotrophins such as NGF or BDNF to bind to each receptor on the surface of the neuronal cells, or they might inhibit dimerization of the NGF/BDNF-receptor complexes.

We established the single Qdot-NGF/BDNF molecule live cell imaging system, and now analyzing if volatile anesthetics affect the binding of NGF or BDNF to each receptor or dimerization of the NGF/BDNF-receptor complexes.

研究分野：医歯薬学

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：揮発性麻酔薬 幼若脳神経細胞障害 分子機構 1分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

2003年に幼若ラットに対する全身麻酔による脳神経細胞の障害(アポトーシスによる広範な神経変性)が報告されて以来、臨床で未熟児・新生児にも広く用いられている全身麻酔薬の安全性に疑問が投げかけられた。この作用は主に NMDA 受容体阻害あるいは GABA_A 受容体賦活を介するものと考えられていたがその全容は解明されておらず、神経細胞の生存・分化に不可欠な NGF, BDNF などのニューロトロフィンによる細胞内情報伝達系の関与も示唆されはじめていた。

2. 研究の目的

本研究は蛍光色素1分子を観察可能な全反射蛍光顕微鏡を用い、ラット胎仔大脳皮質初代培養細胞上の1分子ライブセルイメージングを行い、揮発性麻酔薬が蛍光プローブ量子ドット(Qdot)を導入したニューロトロフィンの神経細胞膜上レセプターへの結合に与える直接作用を1分子レベルで解析、そのメカニズムの全容を明らかにすることを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

揮発性麻酔薬がラット胎仔大脳皮質初代培養細胞のアポトーシスを誘導する条件の決定
オリンパス社のステージインキュベーター搭載の蛍光顕微鏡を用い、ラット胎仔大脳皮質初代培養細胞のライブセルイメージングを行う。5%CO₂を含む空気に揮発性麻酔ガス(セボフルラン, イソフルラン)を混合したものをステージインキュベーターに流した。培養皿に蛍光色素 FLIV0 (ImmunoChemistry Technologies 社)を用い、蛍光顕微鏡下にタイムラプス計測を行い、アポトーシスに陥る過程の『プレ死細胞』細胞が有意に上昇する揮発性麻酔ガス濃度及び暴露時間を求めた。

ニューロトロフィン(BDNF, NGF)への蛍光プローブ量子ドット(Qdot)のより効率的な導入

ニューロトロフィンのアミノ末端をビオチン化し、透析によって未反応のビオチンを取り除いた後、ストレプトアビジン化された Qdot と反応させることにより Qdot-ニューロトロフィンを作製、その生理活性・ラベル率を計測・確認する。実験には大量の Qdot-ニューロトロフィンが必要となるため、回収率を上げる方法を同時に探索した。

ラット胎仔大脳皮質初代培養細胞上のニューロトロフィン1分子ライブセルイメージング

上記のラット胎仔大脳皮質初代培養細胞ライブセルイメージング系を対物レンズ型全反射蛍光顕微鏡に導入する。ステージインキュベーター上の温度は37度とし、ステージ内へ5%CO₂を含む空気に揮発性麻酔ガス(上述の cell survival の実験系にて6時間以内に有意に神経細胞のアポトーシスを引き起こした濃度)を混合したものを流した。揮発性麻酔薬非存在下・存在下双方においてライブセルイメージングを行い、細胞膜表面に結合する蛍光ニューロトロフィンの結合頻度・二量体化・immobile phase への移行頻度を解析、揮発性麻酔薬が神経細胞膜上へのニューロトロフィンの結合~二量体化からその下流の細胞内情報伝達系に与える影響を解析した。

4. 研究成果

ラット胎仔大脳皮質初代培養細胞の作成は研究分担者の澁田らが確立した初代脳神経細胞培養法に従って行った。

研究1年度目は、本実験に不可欠な超低流量対応のペンロン社製シグマデルタ気化器の国内代理店がない状態となってしまう、入手不可能であったため、Qdot-NGF, Qdot-BDNF

の合成に着手し、収率の向上をめざしつつ生理活性の維持の確認を行った。

研究2年度目によろしく、シグマデルタ気化器が入手可能となり、オリンパス社のステージインキュベーター (MI-IBC) を搭載した蛍光色素1分子を観察可能な全反射蛍光顕微鏡を完成させることができた。ステージインキュベーター上に5%CO₂を含む空気に揮発性麻酔ガス(セボフルラン, イソフルラン)を混合した気体を流し、麻酔ガス濃度は随時麻酔ガス濃度計で計測しながら目的濃度に随時titrationした。培養皿に蛍光色素 FLIVO (ImmunoChemistry Technologies 社製) を注入し、アポトーシスに陥る過程の『プレ死細胞』細胞を高感度・特異的に検出できる系を作成した。(FLIVOは細胞透過性が高く、細胞内の活性型カスパーゼを蛍光標識する試薬であり、細胞や核がアポトーシスによる形態変化を呈するよりも早く細胞内のカスパーゼ活性化を検出できる。またFLIVOは活性型カスパーゼのみに結合、結合していないFLIVOは細胞外に排出されるため、アポトーシスに陥る過程の『プレ死細胞』細胞を高感度で特異的に検出可能である。)

細胞を蛍光顕微鏡下にタイムラプス計測、培養神経細胞のアポトーシスが上昇しはじめる揮発性麻酔ガス濃度及び暴露時間を解析したところ、イソフルラン単独で4%前後、セボフルラン単独で5%前後であった。

(もう少し実験数を増やせば、もう少し低い麻酔ガス濃度でもアポトーシスを有意に誘発する可能性もある。)

また、蛍光色素ニューロトロフィン1分子のライブセルイメージング及びタイムラプス計測も行い、上記濃度の揮発性麻酔薬がニューロトロフィンの細胞膜への結合や二量体化などにどのような変化をもたらすかを解析中である。現在までのところ、高濃度の揮発性麻酔薬はニューロトロフィンの細胞膜への結合や二量体化などを減少させる傾向

が認められた。しかし、1分子ライブセルイメージングをすべて解析するにはかなりの時間を要するため、現時点では最終的な結論にはまだ至っていない。

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 2件)

Miyamoto Y. Influences of general anesthetics on the developing mammalian brain. Masui 60: 597-602, 2011.

Taleda J, Miyamoto Y., et al.
A prospective randomized multicenter comparative study of BLM-240 (desflurane) versus sevoflurane in Japanese patients.
J Anesth, 27: 468-471, 2013.

[学会発表](計 2件)

宮本善一, 松本充弘, 眞下 節.
シンポジウム『臨床に役立つ麻酔メカニズム Bench to Bed, Bed to Bench』全身麻酔薬・局所麻酔薬の様々な副作用の分子メカニズム

Molecular mechanism of general and local anesthetics-induced various side effects by using *in vitro* motility assay, single molecule motility assay and ATPase measurement.

日本麻酔科学会第57回学術集会(福岡市)(2010/6/4)

澁田 達史, 宮本 善一, 眞下 節.
幼弱脳に対する麻酔薬の神経毒性 ラット初代培養神経細胞における静脈麻酔薬の影響

The effect of intravenous anesthetics
on rat primary cultured neurons
日本麻酔科学会第58回学術集会（神戸市）
（2011/05/21）

〔図書〕（計 0 件）

なし

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

なし

取得状況（計 0 件）

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 善一（MIYAMOTO Yoshikazu）
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70278844

(2) 研究分担者

眞下 節（MASHIMO Takashi）
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10110785

澁田 達史（SHIBUTA Satoshi）
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20324767

柳田 敏雄（YANAGIDA Toshio）
大阪大学・生命機能研究科・教授
研究者番号：20324767

岩根 敦子（IWANE Atsuko）
大阪大学・生命機能研究科
研究者番号：30252638