

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592253

研究課題名(和文)低酸素傷害に対する麻酔薬の神経保護 バイオイメージングによる残存神経細胞の解析

研究課題名(英文)The neuroprotective effects of anesthetics against hypoxia

研究代表者

澁田 達史 (Shibuta, Satoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20324767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：動物実験において発達中の脳では麻酔薬投与がアポトーシスの増加や樹状突起の形態変化を引き起こすことが報告されている。妊娠17日目の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。培養直後から72時間、培養液中に数種類の麻酔薬を暴露した。培養13または14日目に神経細胞に対しグルタミン酸を暴露しカルシウムイメージング法にて反応を測定比較した。その結果、麻酔薬であるチオペンタールを暴露した場合、カルシウムイメージングでの反応性には有意差がみとめられなかったが、ケタミンではカルシウムの流入が増強することが確認された。

研究成果の概要(英文)：The neurotoxic effects of anesthetics on the developing brain are a concern. We examined the degree of L-glutamate-induced intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) elevation and neurotoxicity in primary cultured neurons exposed to anesthetics. The primary cortical neurons from E17 Wistar rats were preincubated with various concentrations of ketamine or thiopental sodium (TPS) for the first 72 h of culturing. Two weeks later, the neurons were exposed to L-glutamate. The extent of glutamate toxicity was evaluated by Ca-imaging and morphological experiments. Although preincubation with extra high concentration of ketamine showed enhancement of L-glutamate-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation 2 weeks later, long-term exposure to TPS or ketamine at clinical dose during developmental periods may not result in a dose-related potentiation of exogenous glutamate-induced neurotoxicity, once the intravenous anesthetics are removed.

研究分野：麻酔学

キーワード：脳神経 麻酔薬

1. 研究開始当初の背景

麻酔薬は神経細胞の発達、興奮、細胞死を制御する細胞内信号伝達経路に影響を与えている。静脈麻酔薬ケタミンは p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)の活性、ERK1/2 のリン酸化の下方制御に関与しているという報告は近年、その作用機序の一つとして注目を集めている。この他にも麻酔薬が MAPK やカルシウム伝達系に関与している報告はあるが、低温療法や麻酔薬等の薬物療法の神経細胞保護作用に関し、これらの系との関係を調べた研究は少なく、更に形態学的に観察された生存神経細胞機能をバイオイメージング法及び免疫組織学的検査により質的な評価を行ったという報告はなかった。また、低酸素暴露の際に麻酔薬等により保護された残存神経細胞に関し、質的特徴を明らかにした研究もなく、麻酔薬や低温療法により細胞生存率が上昇した場合、上昇した割合の生存神経細胞における特定の神経伝達物質(グルタミン酸、GABA 等)に対する反応の差違等の生理学的な特徴があったかは明らかでなかった。

2. 研究の目的

低酸素傷害に対する低温療法並びに麻酔薬等の薬物療法による神経保護作用に関し、作用機序を細胞内カルシウムの制御及び MAPK 系の点より解明し、生存神経細胞をカルシウムイメージング法、量子ドット-分子蛍光イメージング法、免疫組織学的染色法により質的に判定し、細胞死に至る細胞と麻酔薬等薬物療法・低温療法によりレスキューされる細胞の分子細胞生物学的特徴を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

研究申請者の澁田が確立したウイスターラットの胎児大脳皮質及び海馬細胞の初代培養神経細胞モデル(Shibuta S et al, Br J Pharmacol 1998 124; 804-819., Shibuta S et al., Neuroreport 12;12(2):295-8 2001)を利用し、脳神経細胞を無酸素インキュベーター (ASTEC water jacket type multi-gas incubator, APM-30D) 内に 24 時間留置し、形態学的に神経細胞の生死を判定したところ、細胞生存率は常温下では 14.7%、32 °C の低温療法下では 63.0% であった。つまり、48%の脳神経細胞が低温療法により保護されたということが我々の研究によりしめされている (Shibuta S et al Br J Anaesth 2010 104: 52-58.筆頭著者)。この結果を利用し、薬物や低温療法の際に MAPK 及びその関連シグナルの阻害薬である JNK 阻害薬、MEK1/2 阻害薬、PDK-1 阻害薬、フォスホリパーゼ C 阻害薬、カルモジュリン阻害薬、IP3 受容体拮抗薬を胎児大脳皮質及び海馬細胞の初代培養神経細胞モデルに投与し、細胞生存率に対する影響を解析し、低温及び薬物療法の神経保護作用における MAPK 系の関与を明らかにし、メカニズムの解明を試みた。また、Fluo-4AM を神経細胞に投与しインキュベートを行った後に、NBS に溶解した 1 μ M のグルタミン酸を暴露しカルシウムイメージング法にて Fmax/Fo 値を測定比較した。

4. 研究成果

静脈麻酔薬ケタミン、チオペンタールナトリウム、プロポフォールを胎児大脳皮質及び海馬細胞の初代培養神経細胞モデルにあらかじめ投与したうえで、低酸素暴露またはグルタミン酸投与に

より人工脳虚血状態とした。

静脈麻酔薬療法を実施し、人工脳虚血状態後に生存した脳神経細胞に対し、神経刺激物質としてグルタミン酸を投与し、神経細胞内カルシウム濃度を測定結果を解析した。

この実験により、通常の初代培養神経細胞と人工脳虚血状態において生存することが可能であった培養神経細胞におけるグルタミン酸や NMDA に対する反応性の差異について検討を加えた。

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)

[雑誌論文](計 4 件)

太田千穂、澁田達史、上林卓彦、萩平哲 . 心臓移植術後 5 ヶ月後に行われた超低体温人工心肺下仮性動脈瘤修復術の麻酔経験 ; 日本臨床麻酔学会雑誌., 2013, 33:101-105 . (査読有)

澁田達史., 神経系細胞を使用した脳虚血の研究 ; Anesthesia 21 Century, Anesthesia 21 Century., 2013, 15: 4-8 . (査読無)

S Shibuta, S Kanemura, O Uchida, T Mashimo; J Anaesthesiol Clin Pharmacol., 2012, 28:194-199. (査読有)

T Yamashita and T Shibuta: J. Anesthe. Clinic., 2011, Res. 2:8. (査読有)

[学会発表](計 13 件)

澁田達史、森田知孝、上林卓彦、藤野裕士., 胎児期のケタミン暴露は幼児期脳虚血の神経細胞傷害性に影響を与えるか; 第61回日本麻酔科学会総会 横浜市, 2014年5月15~17日.

大森学、大田典之、澁田達史、藤野裕士., n-ブチル-2-シアノアクリレート (NBCA) を用いた血管塞栓術中に心室性不整脈をきたした小児の一症例; 第60回日本麻酔科学会関西地方会 大阪市, 2014年9月6日.

澁田達史、森田知孝、上林卓彦、藤野裕士., E17ラット初代培養神経細胞におけるケタミン暴露はグルタミン反応性に影響を与えるか: カルシウムイメージングを用いた研究; 第60回日本麻酔科学会関西地方会 大阪市, 2014年9月6日.

橋本明佳、植田一吉、古出萌、今田竜、澁田達史、藤野裕士., 閉塞性肥大型心筋症に伴う僧帽弁収縮期前方運動による重症僧帽弁逆流症に対し、僧帽弁置換術および中隔筋切除術を施行した症例の麻酔経験; 第60回日本麻酔科学会関西地方会 大阪市, 2014年9月6日.

古出萌 澁田達史 松本悠 入嵩西 毅 藤野裕士., アイゼンメンゲル症候群合併患者の精巣固定術に対し腹横筋膜面ブロックを施行した 1 症例; 第26回小児麻酔科学会 札幌市, 2014年9月22日~23日.

S Shibuta, T Morita, T Kamibayashi, Y Fujino., Prolonged exposure to ketamine but not thiopental sodium might potentiate glutamate-induced neurotoxicity in rat primary cultured cortical neurons; Society for Neuroscience, USA(Washington DC), 2014年11月15日~19日.

澁田達史、森田知孝、上林卓彦、藤野裕士., 胎児期のチオペンタール暴露は幼児期脳虚血の神経細胞傷害性に影響を与えるか; 日本麻酔科学会 第 59 回関西支部学術

集会, 大阪市, 2013 年 9 月 7 日.

伊藤一樹、澁田達史、高階雅紀., アテ
トース型脳性麻痺患者において, 無気肺
のため抜管困難となった症例の麻酔経験;
日本臨床麻酔科学会 金沢市, 2013 年 11 月
1 日~3 日.

加藤佳子、宮本善一、澁田達史、山本
俊介、磐井多美子、内田 整., Stickler 症候
群患児の麻酔経験; 小児麻酔学会 宇都宮
市, 2012 年 9 月 28 日~29 日.

伊藤一樹、春日千春、澁田達史、高階雅
紀., 術中大量出血に対し異型輸血を行った
生体肝移植手術症例の麻酔経験; 第 32 回
日本臨床麻酔学会 郡山市, 2012 年 11
月 1 日~3 日.

澁田達史 宮本善一 真下節., ラット
初代培養神経細胞における静脈麻酔薬の影
響 (シンポジウム) The effect of
intravenous anesthetics on rat primary cultured
neurons; 第 58 回日本麻酔科学会総会 神
戸市, 2011 年 5 月 19 日~21 日.

太田千穂、澁田達史、上林卓彦、萩平哲、
山中寛男、坂口太一、真下節., 心臓移植術
後患者における超低体温下上行大動脈仮性
動脈瘤修復術の麻酔経験, Anesthetic
management of a patient with transplanted
heart undergoing ascending aortoplasty with
homograft patch; 日本心臓血管麻酔学会
第 16 回学術大会 旭川, 2011 年 10 月 8 日
~10 日.

金村誠哲 澁田達史 内田整 真下節.,
高齢女性患者におけるプロポフォル初期
効果部位目標濃度と入眠・覚醒時の効果部
位濃度の相関関係について; 第 24 回日本

老年麻酔学会, 松山市 2012 年 2 月 4 日~5
日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

上林 卓彦 (KAMIBAYASHI Takahiko)

大阪大学大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 10273640

宮本 善一 (MIYAMOTO Yoshikazu)

独立行政法人 大阪府立病院機構大阪府立

母子保健総合医療センター・医員

研究者番号：70278844

(平成26年7月8日付けで分担研究者より
削除)

小阪 淳 (KOSAKA Jun)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：40243216

(平成26年4月1日付けで所属変更)