

平成 22 年 2 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19591790

研究課題名（和文）麻酔薬の神経保護メカニズム：MAP キナーゼとカルシウム動態からの解明

研究課題名（英文）The effect of MAP kinases and Calcium ion to neuroprotective mechanism of the anesthetics

研究代表者

澁田 達史 (SATOSHI SHIBUTA)

大阪大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20324767

研究代表者の専門分野：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：麻酔薬 神経保護 NMDA 受容体 カルシウム MAP キナーゼ

1. 研究計画の概要

今回の研究の目的はNMDA、一酸化窒素または無酸素無グルコース暴露による脳虚血モデルにおいて静脈麻酔薬、NMDA拮抗薬、一酸化窒素合成酵素阻害薬、カルシウム拮抗薬、フリーラジカスカルベンジャー等の薬物の神経保護作用の作用機序を細胞内カルシウムイオンの制御及びマイトジェン活性化プロテインキナーゼの点より明らかにすることである。我々が今回調べるのは細胞内カルシウムイオンの制御、カルシウムイオン依存性のPyk-2やMEK-ERK 1/2のリン酸エステル化、カルシウムイオン依存性のJNK-cJunやp38経路のリン酸エステル化、アポトーシスのレギュレーター(Akt, GSK, Bad, Forkhead protein, p90 RSK)であり、これらの経路のリン酸エステル化の変化及び関連転写要素を測定する。

さらに、現状に於いて形態学的検査にのみ拠って判定されていた生存神経細胞に対し、カルシウム蛍光プローブを用いることにより細胞外液よりのカルシウムイオン流入、細胞外刺激によるGタンパク活性化に基づく遊離IP3による小胞体からのカルシウム放出、微量のカルシウムによる小胞体からのカルシウム放出を測定する事により細胞内カルシウムイオン動態を把握する。

2. 研究の進捗状況

フリーラジカスカルベンジャー、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワンの神経細胞に対する保護作用に関し、長期間暴露された低酸素に対する神経保護作用に関して、温度の差異による影響を調べた。設定温度は軽

度低温（32度）、常温（37度）、高温（39度）とした。妊娠16日目のウイスターラット胎児大脳皮質神経細胞を14日間培養し実験に使用した。各培養神経細胞皿に対し3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワンを50nM to 50microMの濃度にて投与し、無酸素インキュベーター内に24時間留置した後に細胞生存率を形態学的方法により判定した。常温下、低酸素暴露群のコントロール群における細胞生存率は $14.7 \pm 1.8\%$ であった。比較的低濃度（500nM以下）の3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワン投与下においては細胞生存率の上昇はみられなかった。一方で、5、50microMの各濃度ではそれぞれ $26.7 \pm 4.7\%$ 、 $40.5 \pm 4.7\%$ と有為な細胞生存率の上昇が確認された。高温下低酸素暴露群では、対照群の細胞生存率は $9.1 \pm 2.2\%$ で常温群に比べ生存率が有為に低かった。比較的低濃度（500nM以下）の3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワン投与下においては細胞生存率の上昇はみられず、一方、5、50microMの各濃度ではそれぞれ $24.5 \pm 3.3\%$ 、 $39.5 \pm 3.5\%$ と有為に細胞生存率が常温下低酸素暴露群と有為差が消失するまで上昇することが確認された。一方で低温下低酸素暴露群では、対照群の細胞生存率が $63.0 \pm 5.2\%$ と、高温及び常温群に比べ有為に高く、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワンを投与しても細胞生存率に影響はみられなかった。以上の結果より低酸素暴露に対しては低温による神経保護作用が3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワン投与の神経保護効果を上回った。一方で、常温及び高温下では3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワン投与により細胞生存率は有為に上昇したこ

とにより、神経保護作用が明らかになったと考えられる。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している (理由)

上記研究に関し、平成20年に米国ワシントンDCにて Society for Neuroscience で “Neuroprotective effect of edaravone on cortical cultures exposed to prolonged hypoxia in vitro.” とのタイトルで発表を行い、参加者と活発な討議を行った。それを元に “Small temperature variations alter edaravone-induced neuroprotection of cortical cultures exposed to prolonged hypoxic episodes.” として、平成21年、麻酔学の中でも権威のある雑誌の一つである British Journal of Anaesthesia にて受理され、2010 (平成22年)年1月号にて公表された。以上の経過より研究の達成はおおむね順調に進展している

4. 今後の研究の推進方策

細胞内カルシウムイオン動態の測定による虚血モデル暴露後生存脳神経細胞の機能評価に関しては以下の通り計画する。NMDA、NO供与体または無酸素無グルコースによる虚血モデル暴露後の生存神経細胞は形態学的には何ら問題なく生存している判定される場合でも個々の脳神経細胞を電気生理学的に検査した場合、神経細胞として十分な機能を有すると判定されるとは限らない。従って、今回の我々の実験モデルに於いては形態学的に生存と判定された脳神経細胞に対して細胞内カルシウムイオン濃度の測定を行う。カルシウムイオンは様々な細胞機能の調節に関わる重要な細胞内因子であり、カルシウムイオン動態 (細胞外液よりの流入、細胞外からの刺激によりGタンパク活性化に基づく遊離IP3による小胞体からのカルシウム放出、微量のカルシウムによる小胞体からの放出) を蛍光プローブを用いて測定する事は大変有意義と考えられる。本研究においては形態学的検査において生存と判定された細胞を使用する予定である。生存脳神経細胞を含んだ培養皿に調整したFluo 4-4AM溶液を加えてインキュベーションを行い神経細胞内にFluo 4を取り込ませる。細胞内のエステラーゼにより加水分解されてFluo 4を再生し、代謝型グルタミン酸受容体により刺激を与える。これら一連の細胞内カルシウムイオンの動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。装置は大阪大学共同研の現有設備にて行う予定である。また、本格的な虚血状態の前にプレコンディショニングを暴露した場合の動態についても実験を開始する予定である。

5. 代表的な研究成果

(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)

① Shibuta, S., Varathan, T., Kamibayashi, and T. Mashimo

Small temperature variations alter edaravone-induced neuroprotection of cortical cultures exposed to prolonged hypoxic episodes

British Journal of Anaesthesia

2010 104: 52-58 査読あり

② Shibata SC, Mizobuchi A, Shibuta S, Mashimo T.

Undiagnosed thyrotoxicosis in a pregnant woman with spontaneous renal artery aneurysm rupture.

Anesth Analg. 2009 Jun;108(6):1886-8.

査読あり

[学会発表] (計3件)

① 表題: 挿管困難症例に対してダブルルーメンチューブを挿管する方法について

発表者: 大住安紀子、萩平哲、溝渕敦子、入嵩西毅、渋田達史、真下節

学会: 第29回日本臨床麻酔学会総会

年: 2009.10.29 浜松

② 表題: 帝王切開時に難治性頻脈に陥り術後甲状腺クリーゼと判明した一症例

発表者: 溝渕敦子、柴田晶カール、植田一吉、高階雅紀、真下節、渋田達史

学会: Journal of Anesthesia P2-66-05

年: 2009.8.16 神戸

③ 表題: Neuroprotective effect of edaravone on cortical cultures exposed to prolonged hypoxia in vitro.

発表者: Satoshi Shibuta*, Sriranganathan Varathan

学会: Society for Neuroscience Abstracts

Presentation Number: 834.12

年: 2008.11 Washington