

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791450

研究課題名 (和文)

脳虚血中のケタミン投与が細胞外グルタミン酸濃度の経時的変化に与える影響

研究課題名 (英文)

Effect of ketamine on dynamic change in extracellular glutamate concentration during cerebral ischemia in gerbils: a microdialysis study

研究代表者

谷西 秀紀 (TANINISHI HIDEKI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：40509428

研究成果の概要 (和文)：

脳虚血時の静脈内ケタミン投与が細胞外グルタミン酸濃度の経時的変化にあたる影響をマイクロダイアリシス法にて明らかにした。スナネズミに5分間の前脳虚血を負荷し、虚血5分前から虚血30分後までの海馬CA1領域のグルタミン酸濃度の推移を1分ごとに測定した。虚血開始3分後から6分後までの間はケタミンの投与によって細胞外グルタミン酸濃度は対照(ハロタン投与)に比べ有意に低下し、最大濃度はケタミン投与群 $1.97 \pm 0.52 \mu\text{M}$ 、対照群 $3.26 \pm 0.79 \mu\text{M}$ であった ($p < 0.01$)。脳虚血時のケタミン投与は細胞外グルタミン酸濃度を低下させ、ケタミンの持つ脳保護効果の一つの要因であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The effect of intravenous ketamine on dynamic change in extracellular glutamate concentration during cerebral ischemia was determined by use of microdialysis. Five minutes of ischemia was performed to male Mongolian gerbils, and dynamic change in extracellular glutamate concentration was measured in the area of hippocampal CA1 region every minute from 5 minutes before the ischemia to 30 minutes after the ischemia. Extracellular glutamate concentration from 3 minutes to 6 minutes after the initiation of ischemia was significantly lower in the group of ketamine administration more than did halothane (control). Mean maximum value of extracellular glutamate concentration in the group of ketamine administration ($1.97 \pm 0.52 \mu\text{M}$) was significantly lower than that in the control group ($3.26 \pm 0.79 \mu\text{M}$) ($p < 0.01$). Administration of intravenous ketamine reduced extracellular glutamate concentration during cerebral ischemia, suggesting that suppression of activation of the NMDA receptor by lower extracellular glutamate concentration would affect one of the factors of the neuroprotective effect of ketamine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			0
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：脳虚血、ケタミン、細胞外グルタミン酸、マイクロダイアリシス

1. 研究開始当初の背景

ケタミンは40年以上にわたって臨床使用されている歴史ある静脈麻酔薬である。多くの静脈麻酔薬が循環抑制作用を持つのに対し、ケタミンは血圧を維持する方向に働くため、循環不全患者の麻酔導入や鎮静時に用いられる。

ケタミンは脳血流量、頭蓋内圧を上昇させるといわれ、現在脳外科麻酔に用いられることはほとんどない。しかし、ケタミンはグルタミン酸 NMDA 受容体拮抗薬の一つであり、理論上は NMDA 受容体をブロックして神経細胞内へのカルシウム流入を抑制して脳保護的に働く。実際に動物実験では脳保護的に働いたという報告が多く見られるが、その機序については明らかではない。

脳虚血時には神経細胞は酸素、グルコースの枯渇によって脱分極し、それを契機に細胞外へのグルタミン酸の放出が起こる。放出されたグルタミン酸は神経細胞のグルタミン酸受容体に結合し、細胞内へのカルシウム流入を契機に不可逆的な神経障害を引き起こす。

MK-801をはじめとする NMDA 受容体拮抗薬は脳虚血時の細胞外グルタミン酸濃度を低下させる。しかし、現段階では脳虚血時のケタミン投与が細胞外グルタミン酸放出に与える影響については一定した結論は得られていない。

2. 研究の目的

脳虚血時のケタミン投与が虚血前後の細胞外グルタミン酸濃度の経時的変化に与える影響につき明らかにすることを目的とする。そのためにスナネズミ前脳虚血モデルにおいてケタミンの持続静脈内投与を行い、虚血時の海馬CA1領域に相当する部分の細胞外グルタミン酸濃度の推移をマイクロダイアリシス法を用いて測定する。

3. 研究の方法

National institutes of Health animal care Guideline および岡山大学動物実験規約に準じた。雄性スナネズミを用い、ケタミン投与群（ケタミン群）と1%ハロタン投与群（対照群）

に分けた。全例4%ハロタン、100%酸素下で麻酔導入し、30%酸素、70%窒素、1%ハロタン下に両側内頸動脈を剥離し、虚血用のゴムワイヤ（直径0.5mm）をかけて前脳虚血モデルを作成した。右側大腿静脈からカテーテル（PE-10）を挿入し、ケタミン（ケタミン群）あるいは生理食塩水（対照群）の投与ラインとした。

定位固定具で頭を固定したのち、右側頭骨にバーホールを開け、マイクロダイアリス用透析 probe（透析膜長1.5mm、カットオフ50000、外径220 μ m、A-I-04-015、エイコム、京都）を右海馬CA1領域（bregmaの2mm後方、1.5mm外側、深さ2mm）に刺入した。透析プローブにリンゲル液をマイクロシリンジポンプ（ESP-32、エイコム）を用いて3 μ l/minで灌流した。透析プローブ刺入時に透析液を試験的に採取しグルタミン酸検出が可能であることを確認した。

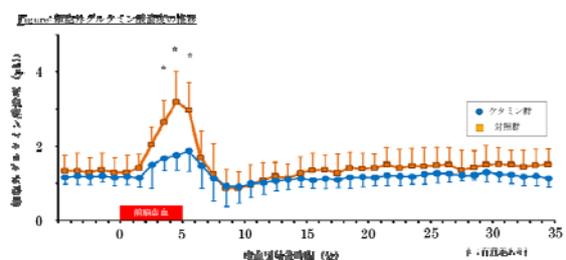
ケタミン群ではケタミンの持続静脈内投与（1mg/kg/min）を開始し、その15分後にハロタン投与を中止した。透析プローブ挿入から虚血（ケタミン群ではケタミン投与開始から虚血）までに60分以上の時間を置き、透析プローブ挿入時の脳への機械的損傷による細胞外グルタミン酸濃度上昇の影響を排除した。両側総頸動脈にかけたゴムワイヤにおもり（重さ各4g）を吊るして5分間の前脳虚血を負荷した。

透析液を虚血5分前から虚血終了30分後までフラクションコレクター（EFC-82、エイコム）を用いて1分毎に連続して採取した。なお、虚血中の体温、脳温は $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。

グルタミン酸の定量化は高速液体クロマトグラフィー（Nanospace syscon 21、Shiseido、Tokyo）を用いて行った。まず採取したサンプルをオートサンプラー内でリンゲル液を用いて3倍に希釈し、そのうち7 μ lをクロマトグラフィーに注入し、分離カラム（GU-GEL, $4.6\times 150\text{mm}$, エイコム）と酵素カラム（E-ENZYMPAK、直径3mm、エイコム）を直列に接続してグルタミン酸を分離した。グルタミン酸定量は白金電極（450mV）と塩化銀リファレンスを用いた電気化学検出器を用いて行った。

4. 研究成果

虚血開始3分後から6分後までの間、ケタミン群で細胞外グルタミン酸濃度は対照群（ハロタン投与）に比べ有意に低下した。また細胞外グルタミン酸濃度の最大値はケタミン群で $1.97\pm 0.52\mu\text{M}$ 、対照群 $3.26\pm 0.79\mu\text{M}$ であり（ $p<0.01$ ）、これらの値はそれぞれ虚血前の値の167%、247%に相当した。また透析プローブの回収率は3.2~4.7%であり、これらの回収率で除した実際の細胞外グルタミン酸濃度はケタミン群 $49.8\pm 14.1\mu\text{M}$ 、対照群 $88.1\pm 31.8\mu\text{M}$ であると推定された（ $p=0.02$ ）。



本研究では虚血後半から再灌流直後までの比較的短い期間のみでケタミン投与によって細胞外グルタミン酸濃度の低下を認め

た。もし透析サンプルの採取間隔が長ければ、サンプルデータそれぞれが平均化されてしまうことによって有意差を得ることができなかつたと考えられ、透析サンプルを1分ごとに採取できる手法の確立によってはじめてケタミンのグルタミン酸濃度低下作用を検出できたと考えられる。またケタミン群では虚血中の細胞外グルタミン酸濃度の上昇開始が虚血開始2分後、対照群では1分後であった。これまでの研究で虚血性脱分極の開始時間はケタミンで虚血開始後約2.5分、ハロタンで虚血開始後約1.8分であることが分かっており、ケタミン群での細胞外グルタミン酸の放出開始が虚血性脱分極の開始の遅れにより遅くなることも合わせて明らかになった。ケタミンが脳虚血時の神経障害を軽減することはすでに明らかになっており、虚血中の細胞外グルタミン酸濃度を低下させその後のNMDA受容体の活性化を抑制することがケタミンによる神経障害の軽減に一つの役割を果たしていることが示唆された。

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)

[学会発表] (計4件)

①Hideki Taninishi, et al. Effect of ketamine on dynamic change in extracellular glutamate concentration during cerebral ischemia in gerbils: a microdialysis study, American society of anesthesiologists annual meeting, 2010.10.17, San Diego, USA

②Hideki Taninishi, et al. Effect of ketamine on dynamic change in extracellular glutamate concentration during cerebral ischemia in gerbils: a microdialysis study, Society for neuroscience in anesthesia and ceitical

care annual meeting, 2010.10.15, San Diego, USA

③谷西秀紀 他、脳虚血時のケタミン投与が細胞外グルタミン酸濃度の推移にあたえる影響、日本麻酔科学会 第57回学術集会、2010.6.3、福岡

④谷西秀紀 他、脳虚血時のケタミン投与が細胞外グルタミン酸濃度の推移にあたえる影響、日本神経麻酔・集中治療研究会 第14回大会、2010.4.22、松本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷西 秀紀 (TANINISHI HIDEKI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：40509428