

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K10512

研究課題名(和文) iRNA導入神経細胞を用いたバイオイメーキング：麻酔薬の神経保護、傷害機序の解明

研究課題名(英文) To elucidate mechanisms of anesthetic-induced neuroprotection and neurotoxicity

研究代表者

澁田 達史 (Shibuta, Satoshi)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：20324767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：麻酔薬には神経保護的な側面と神経傷害的な側面があり、これら両面の特徴を掴むことは麻酔科医には必須であると考えられる。とりわけ、小児における麻酔薬の神経毒性は、現在、麻酔科医をはじめとする医療関係者のみならず広く社会的にも大きな問題とされ関心を集めている。我々は、発達期の経過と共に変化する静脈麻酔薬ミダゾラム、プロポフォール、チオペンタールナトリウムの幼弱神経細胞に対する影響を比較検討し公表した。また、形態学的に神経保護作用を示すチオペンタールナトリウムの神経細胞に対する質的な評価をカルシウムイメーキング法を用いて、神経伝達物質の種類による反応の差違を示すことにより突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児における麻酔薬の神経毒性は、麻酔科医をはじめ、広く社会的にも大きな問題とされ関心を集めている。我々は、ラット胎児大脳皮質神経細胞より初代培養を行い、本邦で汎用されている3種類の静脈麻酔薬をそれぞれ培養日数の異なる神経細胞に投与し、細胞死に至る様子を形態学的手法により調べ、さらに麻酔薬を投与した際の神経細胞内カルシウム濃度を測定することにより、中枢神経の発達に伴う臨床使用濃度における麻酔薬の神経毒性の経時的変化を調べた。これらの結果、特定の条件下(培養日数及び麻酔薬の種類)では麻酔薬の神経毒性が大きくなることが示唆され、実際の小児麻酔を行う際の麻酔薬の選択に影響を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The neurotoxicity of anesthetics in children is currently major concern for not only for anesthesiologists but also patients and their parents. We compared the effects of the intravenous anesthetics, midazolam, propofol, and thiopental sodium on primary cultured neurons along with the course of development. Although many in vitro studies showed that thiopental sodium is neuroprotective, clinical attempts showed unsatisfactory results. We investigated the dynamics of the intracellular calcium in the surviving neurons after hypoxic insults with or without TPS pretreatment following the application of neurotransmitters. Though TPS was neuroprotective against HI morphologically, the response not to L-glutamate but to acetylcholine was impaired. This may partially explain the inconsistent results regarding the neuroprotective effects of TPS.

研究分野：麻酔学

キーワード：静脈麻酔薬 幼弱脳 神経毒性 神経保護 初代培養脳神経細胞 カルシウムイメーキング

1. 研究開始時の背景

麻酔薬は、脳虚血や低酸素傷害に対して神経保護作用を示す一方で、特に脳発達期に麻酔薬に曝露された場合、神経変性や長期的な認知障害を引き起こす可能性が示唆されており、その正確な作用機序を含め不明な点が数多く残されている。神経保護と毒性のバランスに鑑み、これらの系との関係を調べた研究は少なく、更に特定の遺伝子を制御した上で、麻酔薬を投与し、低酸素性傷害を曝露し、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。申請者らは平成7年より初代培養脳神経細胞を用いて麻酔薬等の薬物及び低温療法の脳保護作用ならびに幼弱脳における麻酔薬の神経毒性について精力的な研究を行ってきた。我々の開発した Shibuta's model は正常脳組織由来の個々の初代培養脳神経細胞を培養皿の外側からマーキングすることにより、同一細胞を長期間、安価、簡便に観察することを可能にしたもので、その独創的な手法は高い評価を受けている。同モデルを利用し、麻酔薬や低温療法の神経保護作用を細胞レベルで解析した我々の一連のは高い評価を受け欧米の学術雑誌に掲載された。とりわけ、フリーラジカルスカベンジャー(FRS)としてのチオペンタールナトリウム (TPS) の脳保護作用 (Shibuta S et al, Br J Pharmacol 1998 124; 804-819.筆頭著者) や低温による神経細胞保護の研究 (Shibuta S et al. J Neurosci Res. 15;65(6):583-90 2001. 第2著者) は大きな反響を呼び、多数の欧米の学術論文のみならずテキストブックにも引用された。また、プロポフォールには神経保護作用はない (Shibuta S et al. Neuroreport 2001 12: 295-298. 筆頭著者) 事や、誘導型一酸化窒素合成酵素阻害薬による脳神経保護作用の論文 (Shibuta S et al J Neurol Sci. 2003 215(1-2):31-6. 筆頭著者)、ケタミンによる神経保護作用と TPS 同時投与による相加作用 (Shibuta S et al, Br J Anaesth 2006 97 (4): 517-24. 筆頭著者)、FRS であるエダラボンの神経保護作用は僅かな温度差に影響されることを示した論文 (Shibuta S et al Br J Anaesth 2010 104: 52-58.筆頭著者) もそれぞれ欧米の一流学術誌に掲載された。さらに 23-26 年度に日本学術振興会科学研究費補助金(基盤 C)を受けて施行した研究で、形態実験並びにカルシウム (Ca) イメージング法を用い、妊娠 17 日目のラット初代培養神経細胞においてケタミンを初代培養開始から 72 時間曝露した場合、培養 14 日後にグルタミン酸を負荷すると、神経細胞内 Ca 濃度が異常に上昇し、細胞死が増強すること、そしてこのような反応は TPS では見られないことを Neurosci Res 誌において発表(2015 98: 9-16)し、その形態学的手法とカルシウムイメージングによる解析方法は大きな反響を呼んだ。

2. 研究の目的

静脈麻酔薬曝露による培養神経細胞の生存状況の変化を分析し、各条件下での生存神経細胞における特定の神経伝達物質(NMDA, GABA、アセチルコリン)に対する反応の差など分子生物学的特徴を Ca イメージング法、免疫組織学的染色法により質的な面から検討することを目的に掲げた。本研究の実施により、麻酔薬や温度による神経細胞の生死における分子生物学的特徴が解析されることは、虚血や低酸素の際に関与する遺伝子や特定の系の役割に関する基礎的研究の発展において有意義な知見が得られ、ひいては細胞死を防ぐ薬物治療法の開発に繋がり、臨床医学においても脳神経保護作用としての麻酔薬使用法の発展に多大なる貢献が期待される、非常に有益かつ独創的な研究であり、そのインパクトは非常に大きなものとなることが予想された。

3. 研究の方法

1) 研究代表者の澁田が既に確立している初代培養大脳皮質神経細胞モデル(Shibuta S et al., Neuroreport 12;12(2):295-8 2001)を利用した。妊娠 17 日目ウイスターラットより仔体大脳皮質並びに海馬を取り出し、初代培養神経細胞を作成した。2 週間の神経細胞培養の後、低酸素インキュベーター (ASTECH water jacket type multi-gas incubator, APM-30D) 内に 24 時間留置した。その際に、既に神経保護作用が示された濃度のチオペンタールナトリウム (Shibuta S et al., Br J Anaesth 97 (4): 517-24. 2006) を投与し、生存していると判定された培養神経細胞に対し、刺激伝達物質であるグルタミン酸、アセチルコリンをそれぞれ投与し、カルシウムイメージング法にて神経細胞内のカルシウム濃度の変化を Zeiss Axiovert 200, Hamamatsu photo C8214, ORCA-ER を用いて測定し、アクアコスモス(浜松フォトニクス)にて解析を行った。

2) 同様に、ウイスターラット胎児大脳皮質神経細胞より初代培養を行い、チオペンタール(TPS), ミダゾラム (MDZ), プロポフォール(PPF)をそれぞれ培養日数 (DIV) の異なるラット初代培養大脳皮質神経細胞に投与し、細胞死に到る様子を形態学的手法により調べ、さらに麻酔薬を投与した際の神経細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇を Zeiss Axiovert 200, Hamamatsu photo C8214, ORCA-ERを用いて測定し、アクアコスモス(浜松フォトニクス)にて解析を行うカルシウムイメージング法によって調べることにより、中枢神経の発達に伴う臨床使用濃度における麻酔薬の神経毒性の経時的变化を調べた。

4. 研究成果

1) 低酸素曝露に対し、TPS は形態学的に細胞保護機能を示した。一方で、生存細胞におけるカルシウムイメージングによる解析では、グルタミン酸刺激による応答性は極めて良好に保持された一方で、アセチルコリンに対する反応は大きく減弱していた。この結果は、麻酔薬が形態学的に神経細胞保護作用を示した場合でも、機能的には損傷を受けている可能性があることを示し、さらに基礎研究と臨床研究での麻酔薬の脳保護作用の効果の差違を説明する一助となる可能性がある。この結果は JNeurol Sci 誌に発表された。(2016 365: 126-131)

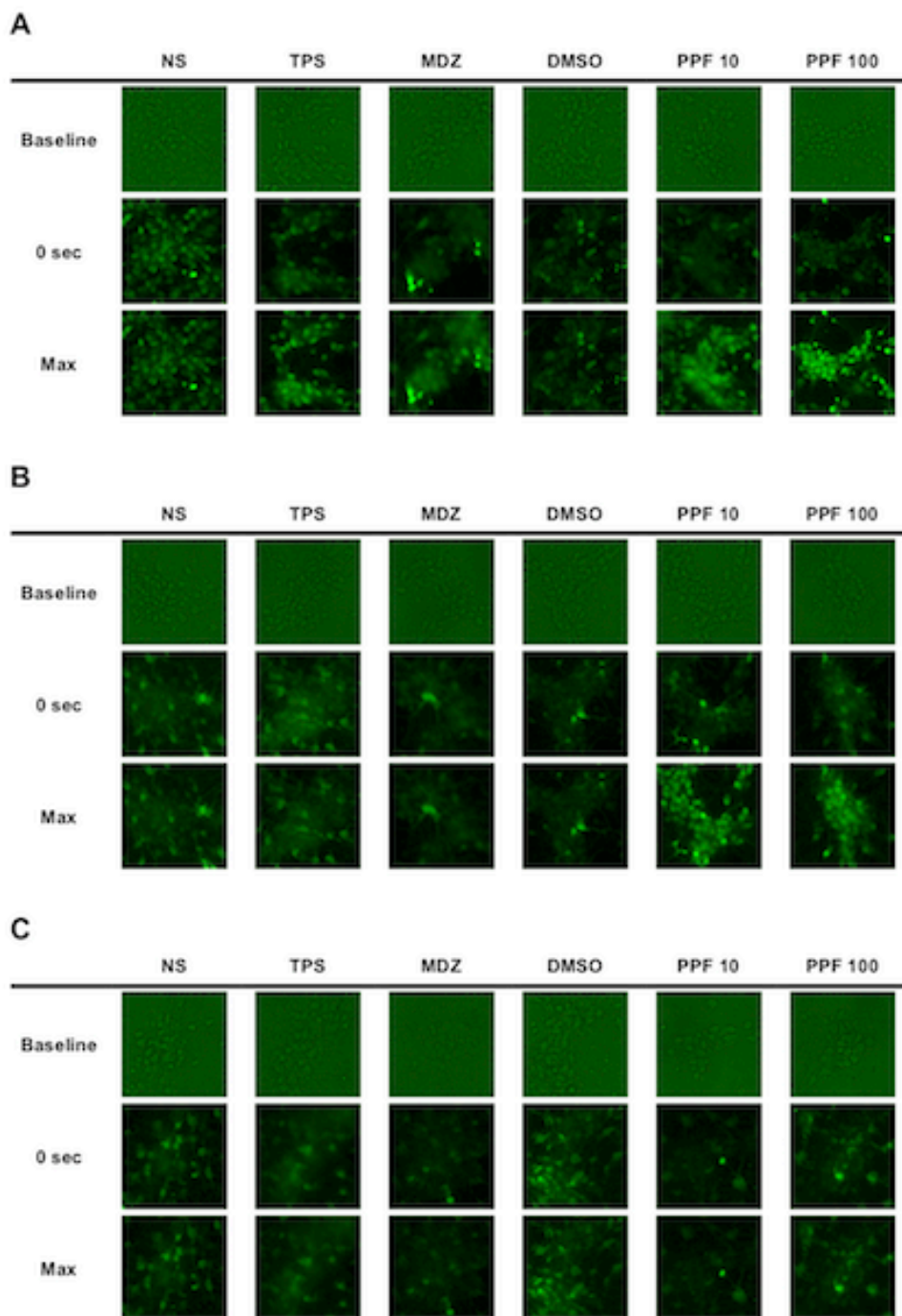
2) これらの実験とデータ解析を行うことにより、DIV4 の神経細胞にては、3 種類すべての静脈麻酔薬により有意な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められた。また、PPF では有意な細胞生存率低下が認められた一方で、TPS 並びに MDZ では認められなかった。DIV8 でも、PPF による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇並びに細胞生存率の低下が認められた一方で、TPS 及び MDZ では、両者とも見られなかった。さらに、DIV13 では、3 種類の麻酔薬は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇も細胞生存率の低下も引き起こさなかった。(図参照)

我々は、妊娠ラットから摘出した胎児大脳皮質神経細胞より初代培養を行い、現在本邦にて汎用されている 3 種類の麻酔薬、チオペンタール(TPS), ミダゾラム (MDZ), プロポフォール(PPF)をそれぞれ培養日数 (DIV) の異なる神経細胞に投与し、細胞死の状況を形態学的手法により調べ、さらに麻酔薬投与による神経細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇をカルシウムイメージング法によって調べることにより、中枢神経の発達に伴う麻酔薬の神経毒性の経時的变化を明らかにした。

その結果、DIV4では、全ての静脈麻酔薬により有意な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められた一方で、有意な細胞生存率低下が認められたのは PPF だけであった。DIV8では、PPFでのみ

[Ca²⁺]_i上昇並びに細胞生存率の低下が認められた。DIV13では、全ての麻酔薬で[Ca²⁺]_i上昇も細胞生存率の低下も引き起こさなかった。

これらの成果は、日本麻酔科学会総会（2018年5月18日 横浜市）にて「初代培養大脳皮質細胞における静脈麻酔薬誘発性細胞内カルシウム濃度上昇の経時的变化」とのタイトルで学会発表を行い、「Intravenous anesthetic-induced calcium dysregulation and neurotoxic shift with age during development in primary cultured neurons」がNeurotoxicology誌に掲載された。（69: 320-9；2018）本論文に関しては、麻酔科医向けの有力な雑誌であるLISAにも紹介され（25(11): 1217-8, 2018）るなど、大きな反響があった。



☒ : Transmitted light microphotographs of cultured cortical neurons exposed to vehicle or anesthetics on days *in vitro* (DIV) 3–4 (A), 7–8 (B), and 13–14 (C), respectively. The images in the upper row were taken shortly before administration of vehicle or anesthetic, and the images in the lower rows were taken at 24 h after administration of these agents. Dead neurons disappeared or stained with trypan blue in the microphotographs taken at the same region of each given dish. A: DIV 3–4. Compared to normal saline (NS), thiopental sodium (TPS; 100 μ M) and midazolam (MDZ; 10 μ M) did not result in marked neuron death, while propofol (PPF; 100 μ M) markedly elicited neuronal death as compared to vehicle (dimethyl sulfoxide [DMSO]/phosphate buffered saline [PBS]). B: DIV 7–8. Compared to NS, TPS (100 μ M) and MDZ (10 μ M) did not result in marked neuron death, while PPF (100 μ M) elicited neuronal death as compared to vehicle (DMSO/NBS). C: DIV 13–14. No anesthetic elicited significant neuronal death as compared to vehicle. NS: normal saline, TPS: thiopental sodium (100 μ M), MDZ: midazolam (10 μ M), DMSO: DMSO dissolved in phosphate buffered saline (PBS), PPF: propofol (10 μ M and 100 μ M), DIV: days *in vitro*.
Neurotoxicology 69: 320-9 ; 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shibuta Satoshi, Morita Tomotaka, Kosaka Jun	4. 巻 69
2. 論文標題 Intravenous anesthetic-induced calcium dysregulation and neurotoxic shift with age during development in primary cultured neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 NeuroToxicology	6. 最初と最後の頁 320 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuro.2018.08.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomotaka Morita, Satoshi Shibuta, Jun Kosaka, Yuji Fujino	4. 巻 365
2. 論文標題 Thiopental sodium preserves the responsiveness to glutamate but not acetylcholine in rat primary cultured neurons exposed to hypoxia.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 126-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://doi.org/10.1016/j.jns.2016.04.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 S. Shibuta, T. Morita, J. Kosaka, T. Kamibayashi, and Y. Fujino	4. 巻 98
2. 論文標題 Only extra-high dose of Ketamine affects L-glutamate-induced Ca ²⁺ elevation and neurotoxicity.	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 9-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2015.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yu Matsumoto, Satoshi Shibuta, Tomotaka Morita, Takeshi Iritakenishi, Nobuyuki Nishimura, Moe Koide, Yuji Fujino	4. 巻 1
2. 論文標題 Transversus abdominis plane block for bilateral orchiopexy in an 8-year-old patient with Eisenmenger's syndrome.	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 JA Clinical Reports	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tomotaka Morita, Satoshi Shibuta
2. 発表標題 The neuroprotective effect of individual and combined administration of edaravone and hypothermia against hypoxic insults
3. 学会等名 Euroanaesthesia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澁田達史、森田知孝
2. 発表標題 初代培養大脳皮質細胞における静脈麻酔薬誘発性細胞内カルシウム濃度上昇の経時的変化
3. 学会等名 第65回日本麻酔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田知孝、内田整、澁田達史
2. 発表標題 臍部への持続創部浸潤麻酔による術後痛の軽減に関する比較検討
3. 学会等名 第64回日本麻酔科学会関西地方会 優秀演題
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澁田達史、森田知孝
2. 発表標題 初代培養大脳皮質細胞における静脈麻酔薬神経毒性の経時的変化
3. 学会等名 第64回日本麻酔科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森田知孝、澁田達史、藤野裕士
2. 発表標題 ラット大脳皮質神経細胞における低酸素傷害に対する保護効果の比較検討 ~低温療法vsエグラボン~
3. 学会等名 第21回日本神経麻酔集中治療学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 澁田達史、森田知孝
2. 発表標題 初代培養大脳皮質細胞におけるミダゾラム誘発性細胞内カルシウム濃度上昇の経時的変化
3. 学会等名 第23回日本小児麻酔学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Shibuta, Tomotaka Morita, Jun Kosaka
2. 発表標題 Intravenous anesthetic-induced neurotoxic shift with age in the developing periods
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 澁田達史
2. 発表標題 麻酔薬の変遷 この四半世紀
3. 学会等名 第4回がいなカンファレンス(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomotaka Morita, Satoshi Shibuta, Jun Kosaka, Yuji Fujino
2. 発表標題 The functional assessment of edaravone-induced neuroprotection against hypoxic insults
3. 学会等名 Society for Neuroscience2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 森田知孝、澁田達史、藤野裕士
2. 発表標題 低酸素傷害に対してエダラボンにより保護された神経細胞の機能評価
3. 学会等名 第20回日本神経麻酔集中治療学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 森田知孝、澁田達史、藤野裕士
2. 発表標題 エダラボンにより保護された低酸素曝露後の神経細胞の機能評価-Caイメージングを用いてー
3. 学会等名 第62回日本麻酔科学会関西地方会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 澤水千恵、岩崎光生、澁田達史、入高西毅、藤野裕史
2. 発表標題 心臓移植後に全身麻酔下で腹膜透析チューブ留置術・腹腔鏡下鼠径ヘルニア修復術を施行した小児の 1 症例
3. 学会等名 第22回日本小児麻酔学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 森田知孝、澁田達史、藤野裕士
2. 発表標題 スガマデクス暴露による初代培養大脳皮質神経細胞への影響
3. 学会等名 第19回日本神経麻酔集中治療学会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 澁田達史、森田知孝、上林卓彦、藤野裕士
2. 発表標題 E17ラット初代培養神経細胞におけるチオペンタール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
3. 学会等名 第62回日本麻酔科学会総会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 大森学、澁田達史、藤野裕士
2. 発表標題 左室駆出率20%の心サルコイドーシス患者に対する腹腔鏡下結腸切除術の麻酔経験
3. 学会等名 第61回日本麻酔科学会関西地方会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 前島慶人、澁田達史、高階雅紀、藤野裕士
2. 発表標題 巨大ブラを合併した肥満高齢者の腹腔鏡下胃切除術に対する麻酔経験
3. 学会等名 第61回日本麻酔科学会関西地方会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Tomotaka Morita, Satoshi Shibuta, Yuji Fujino, Jun Kosaka
2. 発表標題 Neurons protected by thiopental sodium did not show L-glutamate-induced hypersensitivity in vitro
3. 学会等名 Euroanaesthesia (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Tomotaka Morita, Satoshi Shibuta, Yuji Fujino, Jun Kosaka
2. 発表標題 The response of cortical cultured neurons to neurotransmitters after hypoxic insults In vitro.
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>濹田 達史 教授からメッセージ https://narita.iuhw.ac.jp/labo-masui/profile/message-shibuta.html 大阪大学大学院医学系研究科 麻酔・集中治療医学教室 http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/anes/www/home.htm</p> <p>Atlas of science https://atlasofscience.org/ketamine-not-tps-potentiates-glutamate-induced-ca-neurotoxicity/</p> <p>LISA Editorial: Vol 25 No11; 1216-7 2018</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森田 知孝 (Morita Tomotaka)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	小阪 淳 (Kosaka Jun)		