

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101  
 研究種目：若手研究  
 研究期間：2019～2021  
 課題番号：19K18289  
 研究課題名(和文) 脊髄前角運動ニューロンにおける麻酔薬の作用と、虚血神経保護作用の有無と作用機序

研究課題名(英文) Anesthetic action mechanism and ischemic neuroprotective action mechanism of anesthetics on spinal anterior horn motor neurons

研究代表者  
 山本 知裕 (YAMAMOTO, Tomohiro)  
 新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：70596543  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：幼弱ラットin vitro脊髄スライスを用いて脊髄前角運動ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行うため、脊髄スライス標本用の記録チャンパー、人工脳脊髄液や薬物を脊髄スライス標本へ投与するための灌流システム、脊髄前角に存在する運動ニューロンをテレビモニター下で観察・同定するための近赤外線システムを装備した顕微鏡、微小電極を誘導するためのマイクロマニピュレーター、ホールセル・パッチクランプ記録から得られた電気信号を増幅するためのパッチクランプ用増幅器などを備えた実験系システムを立ち上げた。しかし、昨今のCOVID-19対応などの日常臨床業務も重なり、当初の計画通りには研究が進行していない。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

前年度は幼弱ラットin vitro脊髄スライスを用いて脊髄前角運動ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行うため、脊髄スライス標本を乗せる記録用チャンパー、人工脳脊髄液や薬物を脊髄スライス標本へ投与するための灌流システム、脊髄前角に存在する運動ニューロンをテレビモニター下で観察・同定するための近赤外線システムを装備した顕微鏡、微小電極を誘導するためのマイクロマニピュレーター、ホールセル・パッチクランプ記録から得られた電気信号を増幅するためのパッチクランプ用増幅器などを備えた実験系システムを立ち上げた。

研究成果の概要(英文)：We have launched an experimental system equipped with a recording chamber for spinal cord slice, a perfusion system for administration of artificial cerebrospinal fluid and drugs to spinal cord slice for whole cell patch clamp recording from spinal cord anterior horn motor neurons of juvenile rat in vitro spinal cord slice, a microscope equipped with near-infrared system to identify spinal cord anterior horn motor neurons under a television monitor, a micromanipulator for guiding microelectrode, and an amplifier for electrical signals obtained from whole cell patch clamp recordings from spinal cord anterior horn motor neurons. However, the research has not progressed as originally planned because researchers needed to engage in clinical work such as dealing with COVID-19 patients in addition to routine anesthesia work.

研究分野：麻酔科学

キーワード：脊髄前角運動ニューロン 麻酔薬の作用機序 麻酔薬の虚血神経保護作用 幼弱ラットin vitro脊髄スライス ホールセルパッチクランプ記録

1. 研究開始当初の背景

本研究の代表研究者は心臓血管外科領域の麻酔を専門としている。大血管手術は周術期において他の手術と比較して脊髄虚血が生じる危険性が高い。症例によっては脊髄ドレナージや脊髄モニタリングを併用した全身麻酔管理が行われているが、脊髄虚血の予防法に関してはいまだに確実な方法はない。大血管手術や脊椎手術で起こりうる脊髄虚血に対して、麻酔科医として、選択する麻酔薬によって脊髄前角運動ニューロンにおける虚血神経保護に寄与できないかと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、脊髄前角運動ニューロンにおける麻酔薬の作用機序を究明し、さらに、その虚血神経保護作用の有無について、電気生理学的手法を用いて細胞レベルで検討する。

本研究の研究代表者は、*in vitro* 脊髄スライス標本を用いた電気生理学的手法により、脊髄前角運動ニューロンにおいてキセノンが AMPA 受容体に対して抑制作用を有することを見出した(Yamamoto T, et al. *Anesthesiology* 2012;116:1025-34.)。しかし、現在広く臨床使用されている揮発性吸入麻酔薬であるセボフルランやデスフルランの脊髄前角運動ニューロンにおける作用の電気生理学的検討はまだなされていない。

本研究では、まずは、現在一般的に臨床使用されている揮発性吸入麻酔薬であるセボフルランやデスフルラン、吸入麻酔薬である亜酸化窒素(笑気)の脊髄前角運動ニューロンにおける作用を電気生理学的手法により検討する。

その後さらに、その研究結果を踏まえて、これらの吸入麻酔薬やキセノンが脊髄前角運動ニューロンにおいて虚血神経保護作用を有するかについても検討する。

3. 研究の方法

脊髄前角運動ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行い、セボフルランやデスフルラン、亜酸化窒素の脊髄前角運動ニューロンにおけるシナプス伝達機構に対する作用を調べる。幼弱ラットより脊髄を摘出し、マイクロスライサーを用いて、厚さ 500  $\mu\text{m}$  の脊髄横断スライスを作成する。このスライス標本を記録用チャンバーに移して人工脳脊髄液で灌流する。近赤外線システムを装備した顕微鏡を用いて脊髄前角に存在する運動ニューロンをテレビモニター下で観察・同定し、微小電極を誘導し、ホールセル・パッチクランプ記録を行う。得られた結果はパッチクランプ用増幅器により増幅し、データ解析用ソフトを用いて解析する。麻酔薬をバブリングし溶解した人工脳脊髄液を脊髄表面に灌流し、AMPA、NMDA、GABA、グリシン誘発性電流に与える影響を観察する。また、微小興奮性および抑制性シナプス後電流の振幅および頻度の変化も観察する。さらには、AMPA、NMDA、GABA、グリシンのそれぞれの選択的受容体拮抗薬を併用投与しながら脊髄前角近傍を電極で刺激することにより、麻酔薬が脊髄前角運動ニューロンへの神経伝達に与える影響も観察する。

脊髄前角運動ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行い、セボフルランやデスフルラン、亜酸化窒素やキセノンの脊髄前角運動ニューロンにおける虚血神経保護作用の有無とそのメカニズムを明らかにする。脊髄前角運動ニューロンからのホールセル・パッチクランプ記録が安定した後に、人工脳脊髄液に含まれる酸素とグルコースをそれぞれ窒素とスクロースに置換した人工脳脊髄虚血模倣液で脊髄スライス標本を灌流し虚血負荷を与える。虚血開始から細胞死に至るまでの時間(潜時)を測定する。潜時は虚血開始から虚血によって誘起される連続した二種類の内向き電流の傾きの交点までの時間とする(Honda H, et al. *Neurosci Lett.* 2011;494:161-4.)。また、細胞死に至るまでの過程における、自発性 EPSC や自発性 IPSC の発生頻度や振幅についても記録する。次いで、麻酔薬をバブリングし溶解した人工脳脊髄液で脊髄スライス標本を灌流し、麻酔薬存在下で同様に虚血負荷を与え、虚血負荷開始から細胞死に至るまでの潜時など上記の項目について記録し、麻酔薬非存在下での記録データと比較し、麻酔薬が脊髄前角運動ニューロンにおいて虚血耐性作用を有するかを検討する。

4. 研究成果

前年度は幼弱ラット *in vitro* 脊髄スライスを用いて脊髄前角運動ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行うため、脊髄スライス標本を乗せる記録用チャンバー、人工脳脊髄液や薬物を脊髄スライス標本へ投与するための灌流システム、脊髄前角に存在する運動ニューロンをテレビモニター下で観察・同定するための近赤外線システムを装備した顕微

鏡、微小電極を誘導するためのマイクロマニピュレーター、ホールセル・パッチクランプ記録から得られた電気信号を増幅するためのパッチクランプ用増幅器などを備えた実験系システムを立ち上げた。しかし、昨今の COVID-19 対応などの日常臨床業務も重なり、当初の計画通りには研究が進行していない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------