

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19209

研究課題名（和文）経動脈除脳灌流標本を用いた気道確保困難時の病態解析

研究課題名（英文）Analysis of Difficult Airway Management Using Working Heart-Brainstem Preparation

研究代表者

立川 哲史（Tachikawa, Satoshi）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60781036

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：この研究では、呼吸などの自律神経系の発生に関するPhox2bといわれる転写因子の研究を行っている。研究を重ねるにつれ、現在ではこのPhox2bという転写因子が呼吸のみならず、歯科の分野である咀嚼や唾液分泌に関与している可能性を見出している。学会発表（転写因子Phox2bを発現する小細胞性網様体ニューロンの生理学的解析，2019，第13回三叉神経領域の感覚⁻運動統合機構研究会・小細胞性網様体存在するPhox2陽性ニューロンの電気生理学的・形態学的解析，2020，第62回歯科基礎医学会学術大会）も行った。現在は、論文投稿に向け執筆中であり、年内中に投稿予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究で、呼吸などの自律神経系の発生に関するPhox2bといわれる転写因子の持つ役割が、呼吸のみならず、歯科の分野である咀嚼や唾液分泌に関与している可能性を見出すことができた。近年、唾液の分泌のメカニズムはおおよそわかっているが、新たな唾液分泌のメカニズム解明や、呼吸中枢に関する疾患の遺伝的解析に重要な役割をもたらす知見が得られた。この成果に関しては学会発表も行っている。

研究成果の概要（英文）：In this research, we are studying a transcription factor called Phox2b, which is involved in the development of the autonomic nervous system, such as respiration. Through repeated research, we have now discovered that this transcription factor Phox2b may be involved not only in respiration but also in mastication and saliva secretion in the field of dentistry. Conference presentations (Physiological analysis of small reticular neurons expressing the transcription factor Phox2b, 2019, 13th Meeting on Sensory-Motor Integration Mechanisms in the Trigeminal Nerve Region and Electrophysiological and Morphological Analysis of Phox2-positive Neurons in the Small Reticular System, 2020, 62nd (The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society of Basic Dental Medicine)). We are currently writing a paper for submission, which will be published within this year.

研究分野：歯科麻酔

キーワード：CVCI 全身麻酔 経動脈灌流標本 Phox2b

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔導入時の気道確保困難 (CVCI) の原因の多くは舌根沈下及びそれに伴う上気道閉塞がある。

全身麻酔の導入時に、マスク換気が出来ず、かつ気管挿管も出来ない状態 (cannot ventilate cannot intubate : CVCI) がある。気道確保困難への対策は、麻酔科医にとって基本的な重要事項であり、より安全な周術期患者管理に繋がると考えられる。

その発生頻度は、日本の大学病院を対象とした報告によると、CVCI 自体では 10,000 件中 1.7 件である [J Anesth 17:232-240, 2003]。次に、麻酔による心停止は、10,000 件中 0.88 ~ 1.17 件で、そのうちの 5.6 ~ 6.2% が不適切な気道管理によるものと言われている。不適切な気道管理の詳細は不明であるが、中でも、CVCI では、急激に低酸素血症、高二酸化炭素血症が進み、心停止や脳障害を引き起こす可能性が強く、早急に適切な対策を求められる。このように CVCI の発生頻度は決して高くはないが、起きた場合非常に重篤な結果を引き起こす事が知られている。

覚醒時には、舌根部、咽頭、喉頭の統合された活動により上気道が開存している。しかしながら、全身麻酔及び鎮静薬の投与や、血中酸素 (O_2) 濃度、血中二酸化炭素 (CO_2) 濃度の上昇等多くの因子が関わり、神経・筋活動が抑制され、舌根部の筋肉の弛緩や、咽頭喉頭の腹側の組織が背側に垂れ込み、結果として上気道の閉塞が起こるとされている [J Anaesth 65:54-62, 1990]。例えば、先行研究には、動物実験において、全身麻酔に使われるオピオイドが、舌筋の活動や舌下神経核の活動を抑制する、と言った報告 [J Physiol 2677-92 2009] や、高 CO_2 血症にした結果、舌下神経の活動が横隔神経の活動に先駆けて記録され、舌根部の活動と横隔膜の活動との協調が乱れると言った報告がされている [Respir Physiol Neurobiol.; 215:47-50 2015]。これらの事から、全身麻酔の導入時に用いられる鎮静薬やオピオイドの影響、及び、低 O_2 血症、高 CO_2 血症等の様々な因子が、中枢の化学受容野に影響を与え、上気道の開存のタイミングを変化させ、その結果、呼吸運動と上気道との協調性に変調を起こし CVCI の発生に繋がっている事が考えられる。

2. 研究の目的

○呼吸抑制においては、脳幹部の呼吸中枢の酸素分圧が低下していることは推測できる。組織における低酸素状態を正確に評価するため、経動脈除脳灌流標本の脳幹部の組織酸素分圧を測定し、実測値を評価する。

○近年、自律神経中枢の発生に関わっている転写因子 Phox2b が存在し、その転写因子 Phox2b を特異的に発現している CO_2 受容ニューロンが、呼吸の調節に深く関与することが分かっている。Phox2b 陽性ニューロンを黄色蛍光タンパク質 (EYFP) にて標識したトランスジェニックマウスも作成されている [PLoS ONE, 10 p. e0132475, 2015]。Phox2b 陽性ニューロンは中枢化学受容野や末梢の化学受容器である頸動脈小体にも存在しており低酸素の状態、高 CO_2 血症によって Phox2b 陽性ニューロンの活動に変化が見られると考えられるが、実際に中枢においてどのエリアへの投射が見られるのか、限定的に探索していく。

3. 研究の方法

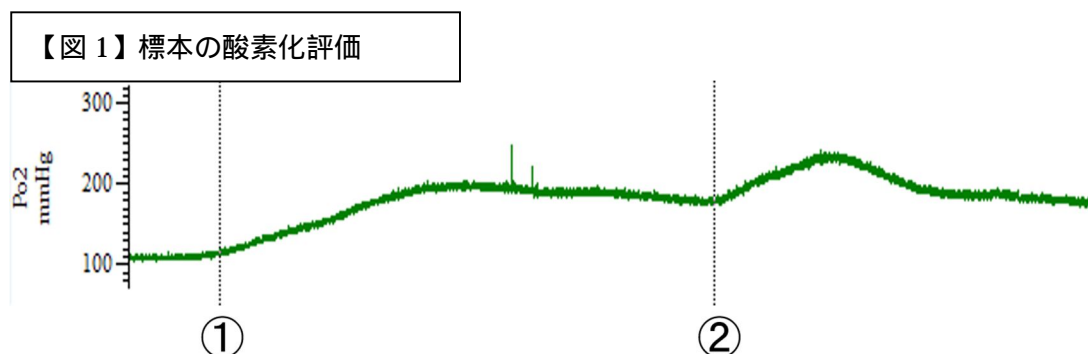
呼吸の分野に限らず、これまでの脳幹や脊髄の研究分野では、胎生期や生後間もない時期 (生後

0週令)の齧歯類から摘出された脳幹-脊髄標本(en-broc 標本)、脊髄標本、スライス標本等が研究対象となっている。これらの標本では、酸素化がなされた細胞外液(人工脳脊髄液、あるいはリンゲル液)と常に標本の全表面を接触させ、酸素分子の拡散能を利用して標本の細胞に酸素運搬を行う方法(= Bath Application 法)が使用されている。しかし、生後発達と共に細胞膜の弾性や酸素の透過性は低下する。そして、個々の細胞の容積も増大する。そのため、幼若期以降の細胞に対する酸素分子の拡散能は低下してしまうため、Bath Application 法で標本すべての細胞に酸素を供給することは不可能となり標本を生体と同じ生理状態で生かすことは難しくなる。対して、通常の丸ごと動物と同じように生かした状態で中枢神経系の機能を調べる場合、まず外科的手術によって目的とする中枢神経系を露出する。一般的に手術侵襲によって出血は起こる。目的とする中枢神経系領域が大出血を引き起こしやすい場所にある場合は、実験を行うこと自体が難しくなる。つまり、丸ごと動物を用いた状態で中枢の呼吸ニューロン群の解析を行う研究においては、手術のための麻酔薬による呼吸中枢への影響は切っても切り離せない。この「標本に対する酸素化の問題」「手術侵襲に対する麻酔薬の影響」を克服するために、心臓移植時に用いられる体外循環法を“除皮質が施された丸ごと動物”に適用し、齧歯類の体外循環による経動脈灌流標本が開発された。この方法論を持ちいる事で、生体に近い生理状態で丸ごと動物では耐えられない手術侵襲が加わるような呼吸中枢、中枢の化学受容野からの修飾といった部分を解析できる可能性が考えられる。

4. 研究成果

○呼吸抑制においては、脳幹部の呼吸中枢の酸素分圧が低下していることは推測できる。組織における低酸素状態を正確に評価するため、経動脈除脳灌流標本の脳幹部の組織酸素分圧を測定し、実測値を評価する。

灌流標本を作製し、自発呼吸の確認が得られた後、筋弛緩薬を投与し、標本の不動化を行った。その後、上丘付近から脳幹部に向けて、酸素分圧測定器(ユニークメディカル社製)を組織に刺入、計測を行った。同時に、横隔神経を吸引電極を用いて吸引し、自発呼吸の電気的活動を記録した。酸素分圧は、当初 110mmHg(5%CO₂ 95%O₂ によるバブリングガス使用)で推移したが、8%CO₂ 90%O₂ によるバブリングガスを変更した結果、190~200mmHg へ上昇が見られた。また、その後にはバブリングガスを戻した結果、一時的に 240~250mmHg へ上昇し、その後 180~190mmHg へと収束していった。(図1)

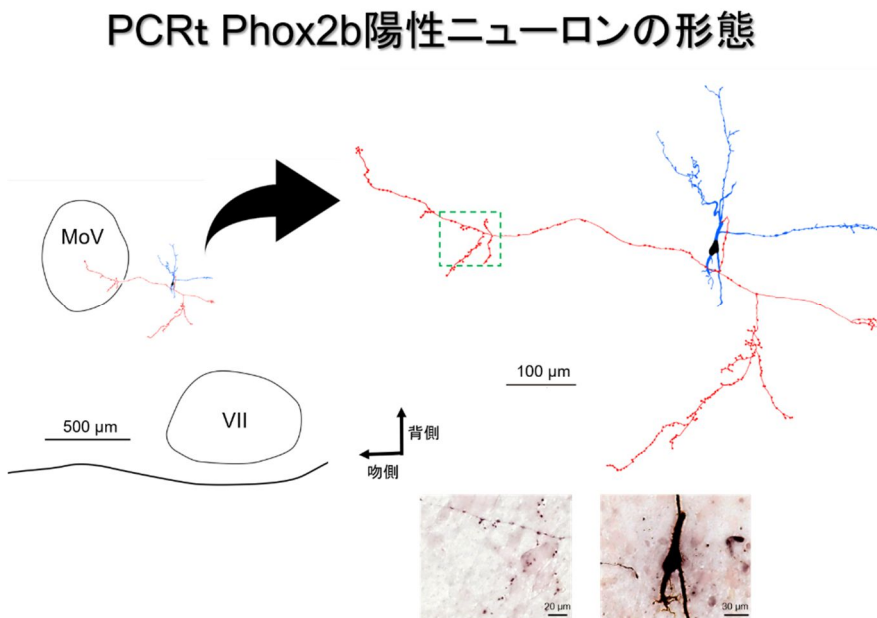


- ①: 5%CO₂ → 8%CO₂ にバブリングチェンジ
110mmHg → 190~200mmHg へ上昇
- ②: 8%CO₂ → 5%CO₂ にバブリングチェンジ
180~190mmHg → 240~250mmHg へ上昇

○Phox2b 陽性ニューロンの活動が、実際に中枢においてどのエリアへの投射が見られるのか、限定的に探索していく。

Phox2b 陽性ニューロンが三叉神経運動核背側 (RdV) に存在し、顎運動制御に関与している可能性が報告されている。生後 3-9 日齢の Phox2b-EYFP ラットの矢状断脳幹スライス標本を用いて、三叉神経運動核尾側の小細胞性網様体 (PCRt) の Phox2b 陽性ニューロンにパッチクランプ記録と細胞内染色を行った。(図 2) また、PCRt の Phox2b 陽性ニューロンと上唾液核 (SSN) との関連を解析するため、SSN ニューロンからパッチクランプ記録を行い、PCRt の化学刺激に対する SSN ニューロンの応答を解析した。

【図 2】PCRt Phox2b 陽性ニューロンの形態



RdV と同様、PCRt にも高頻度または低頻度発火を示すニューロンが認められたが、RdV と PCRt 間で割合に有意差はみられなかった。一方、自発発火を示すニューロンの割合は、RdV (1.8%, 1/56) よりも PCRt (14.5%, 8/55) で有意に高い割合を示した。また、約 67% の Phox2b 陽性ニューロン (16/24) が RdV の電気刺激に対してシナプス後電流を誘発した。PCRt の Phox2b 陽性ニューロンのなかには、三叉神経運動核内に軸索を伸張しているニューロンが認められた。PCRt の様々な領域を化学刺激した際、59.6% (34/57) の SSN ニューロンにシナプス後電流が誘発された。本研究により、PCRt の Phox2b 陽性ニューロンは RdV と異なる電気生理学的特性を有すること、PCRt の Phox2b 陽性ニューロンの中には顎運動制御だけでなく唾液分泌にも関わるニューロンが存在する可能性が示唆された。

歯科治療を行う上で全身麻酔は広く使われているが、その安全性は保証されていなければならない。全身麻酔による致死率は極めて低いが、全身麻酔導入時に人工呼吸ができなくなり (Can't Ventilate: CV) しかも気管挿管ができなくなり、(Can't Intubate: CI) 致命的な転帰を辿ることがある。この CVCI は歯科患者にも起こりうる危険な合併症である。この状態になると速やかに低酸素血症に陥り、心停止や重篤な脳障害が引き起こされるため、解決しなければならない重要な問題となっている。本研究の学術的意義は、この病態の解明のため、重要な基礎データとして示されることになる。

今後の研究の方向性として、さらに化学受容野における、二酸化炭素応答の詳細な位置分析。

また、Phox2b 陽性ニューロンを黄色蛍光タンパク質 (EYFP) にて標識したトランスジェニックマウスを用いた経動脈除脳灌流標本において、呼吸運動のみならず、唾液分泌のメカニズムと関連した嚥下の運動の基礎データとして重要な知見になる可能性になる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 梶原 里紗, 立川 哲史, 幸塚 裕也, 西村 晶子, 五島 衣子, 飯島 毅彦	4. 巻 48
2. 論文標題 術前セファログラムおよびCT画像を用いて経鼻挿管の可否を判断したMarshall症候群患者の全身麻酔経験	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯科麻酔学会雑誌	6. 最初と最後の頁 13-15
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶原 里紗, 中村 史朗, 中山 希世美, 望月 文子, 壇辻 昌典, 立川 哲史, 飯島 毅彦, 井上 富雄
2. 発表標題 小細胞性網様体に存在するPhox2陽性ニューロンの電気生理学的・形態学的解析
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 立川 哲史
2. 発表標題 経動脈灌流標本を用いた上気道構成筋群及び胸郭の呼吸性神経活動におけるアシドーシスの影響
3. 学会等名 昭和大学スポーツ運動科学研究所 第8回学術研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原 里紗, 中村 史朗, 中山 希世美, 望月 文子, 壇辻 昌典, 立川 哲史, 飯島 毅彦, 井上 富雄
2. 発表標題 転写因子Phox2bを発現する小細胞性網様体ニューロンの生理学的解析
3. 学会等名 第13回三叉神経領域の感覚&運動統合機構研究会
4. 発表年 2019年

〔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
研究協力者	梶原 理沙 (kajihara risa)		

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