

機関番号：21601

研究種目：若手 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791461

研究課題名 (和文) 高サイトカイン血症における意識障害のメカニズムと麻酔作用への影響

研究課題名 (英文) The mechanisms of cytokine-induced encephalopathy and influence on anesthesia

研究代表者

林 志保 (HAYASHI SHIHO)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：60443868

研究成果の概要 (和文) : サイトカインと眠気の関係について研究を行った。ラットの腹腔内に Lipopolysaccharide を投与して高サイトカインモデルを作成した。Microdialysis のプローブを大脳皮質に留置し、サンプルを採取した。高速液体クロマトグラフィーにより細胞外アセチルコリン量を計測し、その変動を観察することによりアセチルコリンニューロンの活動性を評価した。結果としては有意な変動は得られなかったがさらなる検討が必要である。

研究成果の概要 (英文) : I conducted research to confirm if cytokine levels affect acetylcholine neuron. Lipopolysaccharide was injected to rats intraperitoneally. Microdialysis probe was inserted into brain and samples were obtained. The acetylcholine levels were measured using HPLC system. Our results showed that the extracellular acetylcholine levels of rat brain after LPS injection were not significantly different from control levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：サイトカイン、アセチルコリン、催眠作用

1. 研究開始当初の背景

サイトカインが催眠作用を持つことは近年明らかになってきている。例えば感冒症状を呈しているときに眠気を伴うことが一般的である。動物モデルとしても、インフルエンザウイルスをウサギに静注すると4-8時間で脳波に徐波活動の増加がみられ、ノンレム睡眠が約15%増加する。重症の感染症であれば、意識障害を伴うこともある。

これらの原因としてサイトカイン

が関わっているといわれている。サイトカインには発熱作用もあるが、細菌由来の物質を動物に投与し、解熱薬も一緒に服用させると体温は上昇せずにノンレム睡眠だけが誘導される。また、サイトカイン分子のフラグメントを投与すると、発熱作用のみが単独に発現する。これらの結果は感染による眠気の増加は発熱に随伴する症状ではないことを示唆している。

これまでの研究を総合すると、インターロイキン1β (IL-1β)、Tumor

Necrosis Factor α (TNF α) がノンレム睡眠を促進し、中枢神経活動に対してサイトカインの中では中心的な役割を果たし、インターロイキン2、4、6、8、10、13、15、18、インターフェロン (INF) α 、 β 、 γ などがさらに反応を修飾していることがわかっている。

この中で IL-4、10 は IL-1 β 、TNF α 産生を抑制することが知られているが、ノンレム睡眠に関しても抑制性を示す。

サイトカインネットワークがより複雑に制御していることがわかる。

臨床の現場において、われわれがもっとも経験する高サイトカイン血症は感染症であるが、自己免疫疾患、悪性腫瘍、手術などほかの疾患でも起きている。

最近のトピックでは、睡眠時無呼吸症候群患者 (OSAS) がサイトカイン血症を呈していることがわかっている。OSAS に特徴的な日中の眠気は単に睡眠不足がもたらすわけではなく、TNF α の睡眠誘発作用が関与しており、TNF α の中和剤であるエタネルセプトを投与することで眠気が改善するという研究結果がある。

しかしサイトカインによる眠気がどのような機序を介しているか、どの神経伝達物質に影響を与えているか、不明な点が未だに多い。本研究では感染症モデルのラットを使用し、大脳皮質のアセチルコリンニューロンの活動性に変化が起きているかどうか検討する。

2. 研究の目的

アセチルコリンは大脳皮質において睡眠-覚醒レベルの変化に主要な役割を果たす神経伝達物質である。研究代表者の所属する講座ではこれまでラット大脳皮質のアセチルコリンニューロンにおける麻酔薬の作用を Microdialysis を用いて研究してきた。イソフルラン、セボフルランなどの吸入麻酔薬、プロポフォール、ミダゾラムなどの静脈麻酔薬などがアセチルコリンのレベルを下げ、麻酔薬の作用発現に関与していることを示してきた。

本研究ではこの手法を用いることで高サイトカイン血症がアセチルコリンニューロンの活動性に影響を及ぼしているのか、さらには麻酔薬との相互作用としてはどの程度影響しているか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

250-300g の Wistar Rat 6 匹を使用した。

ペントバルビタールを投与し、麻酔深度を得たあとにフレイムで頭部を固定し、剃毛後、頭蓋骨にドリルで穴をあけた。歯科セメントなどを使用してカニューレ用の穴を確保しそこに一時的なダミーカニューレを挿入しておいた。

一晚経過を観察し、特に神経症状などを呈していないことを確認したのち、ダミーカニューレを抜いて Microdialysis のプローブを留置し、持続灌流を行った。

大脳皮質から内部標準物質と共に回収した灌流液を高速液体クロマトグラフィーでアセチルコリンレベルを計測した。

90 分のコントロールデータを取ったあと、Lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内に 5 mg/kg 投与し、その後のアセチルコリンレベルの変動を観察した。

4. 研究成果

研究開始当初、手技に慣れ、結果が安定するまでに時間がかかった。また、当初、LPS の静注を試みていたが、結果にばらつきが見られ、静脈からの LPS の漏れが疑われた。確実に投与されたかどうか評価が難しいことがあり、より確実な腹腔内投与に変えて結果を出した。

LPS 投与後、ラットは明らかに行動が鈍くなり、活動性が低下した。しかしながら LPS 投与後 150 分の経過を追っても、アセチルコリンの変動は平均値で 94% から 106% の中に納まり、有意な差は見られなかった。

TNF α などサイトカインそのものの投与も検討したが、リコンビナントのサイトカインは高価であり、今回の研究計画からは除外した。

サイトカインレベルの計測、サイトカインに対する中和抗体の投与と行動変化の評価等は今後の課題である。睡眠覚醒を制御する神経伝達物質はノルアドレナリン、ヒスタミンなど他にも存在する。これまでの研究から麻酔の効果発現では常にアセチルコリンの変動が伴っていたが、今回の結果からはサイトカインによる催眠作用はアセチルコリン以外の伝達物質を介していることが示唆された。

また、今回は LPS 投与後 150 分まで

の検討結果であったがさらに長時間の経過を観察すれば何らかの変化が検出できる可能性はある。また、臨床では重症感染症などの場合、麻酔薬の必要量が少ないことが経験上明らかでありその関連も興味を持たれるところである。

今回の結果を踏まえ、次の段階としては以下のような条件でアセチルコリンの計測を検討している。

(1)LPS を投与し、360 分までアセチルコリンレベルの変動を観察する。

(2)LPS を投与し、さらにエタネルセプトなど抗サイトカイン薬を投与する。

(3)リコンビナントのサイトカインを投与する。

(4)LPS を投与しなかった群、投与した群に分け、同量の吸入麻酔薬を投与する。

さらに HPLC や Microdialysis の条件も変えなければならないが、ノルアドレナリン、セロトニン、ヒスタミンなどの他の神経伝達物質の変化も観察できれば本現象をより具体的に検証できると思われる。

5. 研究組織

(1)研究代表者

林 志保 (HAYASHI SHIHO)
福島県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：60443868

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

村川 雅洋 (MURAKAWA MASAHIRO)
福島県立医科大学・医学部・病院長
研究者番号：90182112

高橋 晋一郎 (TAKAHASHI SHINICHIRO)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：50457769

箱崎 貴大 (HAKOZAKI TAKAHIRO)
福島県立医科大学・医学部・病院助手