

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591712

研究課題名（和文）幼若脳組織の神経活動に対する麻酔薬の作用の解明

研究課題名（英文）Effects of general anesthetics on the neural activity of the immature nervous system.

研究代表者

安藤 富男（ANDOH TOMIO）

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：00193110

研究成果の概要（和文）：幼若ラットではミダゾラムにより海馬 CA3 領域において細胞内 Ca 濃度の上昇、pCREB 陽性細胞の増加が有意に認められ、これらは NKCC1 阻害薬であるブメタニドにより抑制された。成熟ラットではこれらの変化を認めなかった。また、ミダゾラムの鎮静作用は幼若ラットで減弱しており、ブメタニドは鎮静作用を増強した。以上より、ミダゾラムは新生児ラットの海馬において GABAA 受容体刺激を介して興奮作用をもたらし、鎮静効果を減弱させると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We intended to test the hypothesis that midazolam may exert excitatory actions on the developing hippocampus and may reduce sedative effects in neonatal rats. We found that midazolam increased intracellular Ca concentration and pCREB expression in the hippocampal CA3 area from neonatal rats but not from young rats. These excitatory effects of midazolam were inhibited by bumetanide, an inhibitor for NKCC1. Midazolam exhibited less sedative actions in neonatal rats compared with in young rats. Bumetanide enhanced sedative effects of midazolam in neonatal but not young rats. These results indicate that GABAA receptor-mediated excitation is dependent on NKCC1 and may underlie the attenuated sedative effects of midazolam in neonatal rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医学

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：ブメタニド、NKCC1、pCREB、Ca イメージング、鎮静作用

1. 研究開始当初の背景

GABAA 受容体は成熟脳においては Cl⁻ チャネルの開口、過分極を生じ、抑制性の神経伝達を担っている。しかし、生後 10 日程度までの新生児早期のラット、マウスの海馬や大脳皮質などにおいては、細胞内 Cl⁻ 濃度が高いため、Cl⁻ チャネルの開口は Cl⁻ イオンの細胞外流出、脱分極を生じ、興奮性の神経伝達を担っている。したがって、GABAA 受容体刺激は脱分極とこれによる NMDA 型グルタミン酸受容体の Mg²⁺ ブロックの解除により、Ca²⁺ 流入および細胞内 Ca²⁺ 濃度増加をもたらす。霊長類を含む多くの動物種において、脳成熟の過程で同様な GABAA 受容体機能の発達による変化が知られている (Physiol Rev 87: 1215-84, 2007)。

2. 研究の目的

種々の麻酔薬が新生児動物において、広範な神経細胞死を生じるが、このメカニズムは明らかにされていない。麻酔・鎮静薬の多くは GABAA 受容体刺激作用をもち、成熟した脳脊髄では抑制性神経伝達を増強することが良く知られており、この作用が麻酔薬による鎮静作用の発現に寄与していると考えられている。しかし、幼若脳において GABAA 受容体は興奮性神経伝達を担い、これによる脱分極や細胞内 Ca²⁺ 濃度の増加は神経系の成熟に役割を果たしている。したがって、新生児動物の海馬や大脳皮質では麻酔・鎮静薬が興奮性の反応を惹起することが考えられるが、明らかにされていない。また、幼若脳に対してこれらの薬剤が興奮作用をもつ場合、新生児動物に対する麻酔・鎮静作用が影響を受け、減弱することが考えられる。本研究では、GABAA 受容体機能の未成熟な幼若脳における麻酔・鎮静薬の神経活動に対する作用を明らかにし、麻酔・鎮静作用がどのように修飾されているか解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞内 Ca²⁺ 濃度

生後 4, 7 および 28 日の SD ラットから海馬を含む脳スライスを作成し、Fura-2 による Ca imaging により細胞内 Ca²⁺ 濃度を測定した。GABAA 受容体が興奮性の刺激伝達を担うことを確認したのち、ミダゾラム投与およびブメタニド前処置後のミダゾラム投与による細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化を解析し、幼若脳と成熟脳の違いを解析した。

(2) pCREB 免疫染色

また、生後 7 日および 28 日の SD ラットに対

してミダゾラムを腹腔内投与した後、断頭し海馬および視床の phosphorylated cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein (pCREB) 免疫染色を施行した。pCREB は神経細胞では興奮により発現増加するため、興奮性の指標として測定した。ブメタニドを腹腔内に前投与した群およびコントロール群についても同様に免疫染色を行った。

(3) Righting reflex による鎮静作用の評価

ミダゾラムの鎮静効果に対するブメタニドの影響について、ミダゾラム投与群とブメタニド+ミダゾラム投与群で righting reflex を 7 日齢、28 日齢の SD ラットで比較し、幼若脳と成熟脳での違いを解析した。

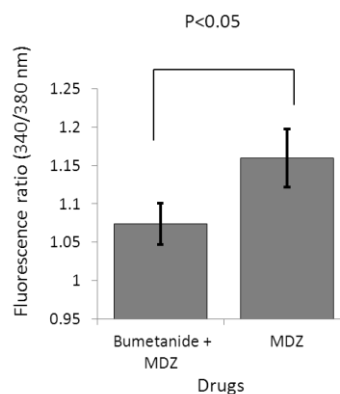
また、GABAA 受容体作用性の静脈麻酔薬であるプロポフォール鎮静作用についても、同様な検討を行った。

4. 研究成果

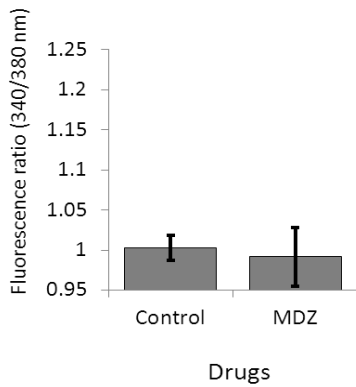
(1) 細胞内 Ca²⁺ 濃度

Ca imaging において 4 および 7 日齢ラットの脳スライスで、ミダゾラムを還流すると細胞内 Ca²⁺ 濃度が増加し、その増加がブメタニドで抑制できることならびに、28 日齢のラットではミダゾラム灌流により細胞内 Ca²⁺ 濃度の増加を認めないことが認められた(下図)。ミダゾラムによる細胞内 Ca²⁺ 濃度増加は、GABAA 受容体拮抗薬であるピククリンおよび電位依存性 Ca²⁺ チャンネル阻害薬であるニカルジピンによっても遮断された。

P7 ラット



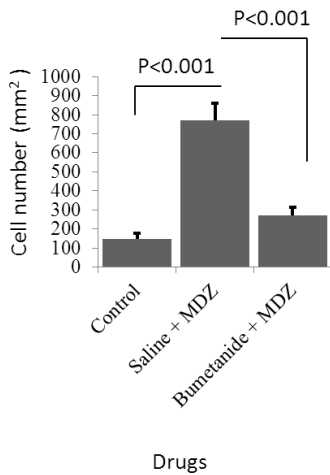
P28 ラット



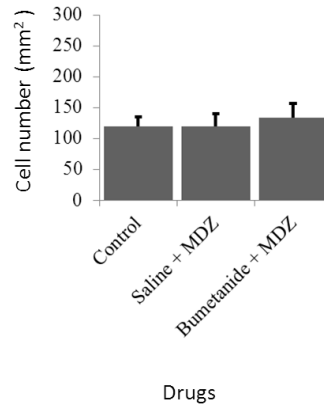
(2) pCREB 免疫染色

上記の *in vitro* の結果のみならず、*in vivo* の結果として、7 日齢ラットへのミダゾラム腹腔内投与により海馬 CA3 領域において pCREB 陽性細胞が増加し、その増加をブメタニドが抑制することが示された。28 日齢ラットではミダゾラム投与により海馬 CA3 領域における pCREB 陽性細胞の増加を認めなかった。(下図) これは上記の Ca²⁺ imaging の結果を支持するものである。

P7 ラット



P28 ラット

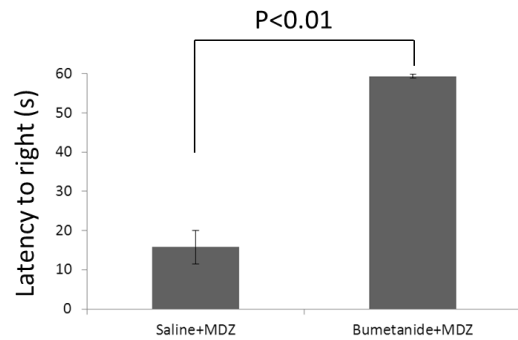


(3) Righting reflex による鎮静作用の評価

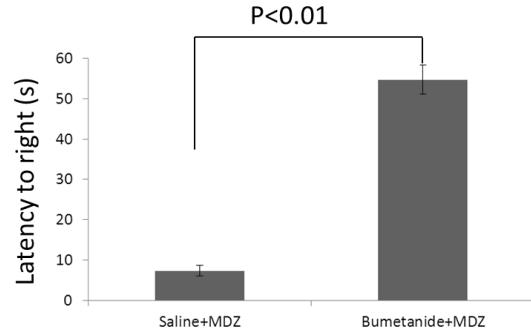
新生児ラットにおいて、ミダゾラムの righting reflex latency は 28 日齢ラットより短縮しており鎮静作用が减弱していると考えられた。ブメタニド前投与は新生児ラットでのみ righting reflex latency を延長し、鎮静作用を増強することが示された (下図)。

さらに、新生児ラットへのプロポフォールの腹腔内投与についても、鎮静効果が 28 日齢ラットに比べて减弱していること、この変化はブメタニド前投与で拮抗されることが示された。

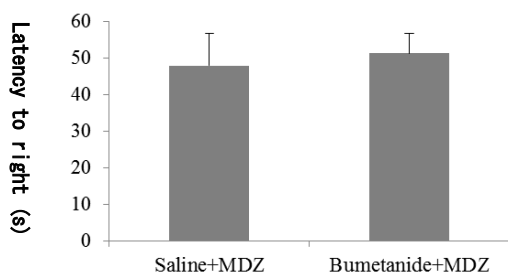
P4 ラット ミダゾラム投与後15分後



P7 ラット ミダゾラム投与後15分後



P28 ラット ミダゾラム投与 15 分



(4) 結論

ミダゾラムは新生児ラットの海馬において、GABAA 受容体刺激を介して興奮作用をもたらす、これによって鎮静作用が减弱していると考えられた。これらの効果は他の GABAA 受容体刺激性麻酔薬に共通していることが推測される。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Yukihide Koyama, Tomio Andoh, Yoshinori Kamiya, Satoshi Morita, Tomoyuki Miyazaki, Kazuhiro Uchimoto, Takahiro Mihara, Takahisa Goto: Bumetanide, an inhibitor of cation-chloride co-transporter isoform 1, inhibits GABAergic excitatory actions and enhances sedative actions of midazolam in neonatal rats. Anesthesiology; in press (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

① Yukihide Koyama, Tomio Andoh, Yoshinori Kamiya, Takahisa Goto
Bumetanide, the inhibitor of NKCC1, cation-chloride co-transporter isoform 1, inhibits the GABAergic excitatory action induced by midazolam in the hippocampus in neonatal rats. Euroanaesthesia 2013, 1-4 June 2013, Barcelona, Spain

② 小山 行秀、安藤 富男、紙谷 義孝、後藤 隆久

Na⁺, K⁺-2Cl⁻ co-transporter (NKCC1) の選択的阻害薬のブメタニドは新生児ラットの海馬 CA3 領域における GABAA 受容体活性化による興奮性活動を抑制する
日本麻酔科学会総会 2013 年 5 月 23 日-25

日、ロイトン札幌他 (北海道)

③ Yukihide Koyama, Tomio Andoh, Yoshinori Kamiya, Takahisa Goto
Bumetanide, the inhibitor of NKCC1 (Cation-Chloride Co-Transporter Isoform 1), inhibited an increase in cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) induced by midazolam in the immature hippocampus. World Anesthesia Convention 2013, 23-27 April 2013, Bangkok, Thailand

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 富男 (ANDOH TOMIO)
横浜市立大学・医学研究科・客員教授
研究者番号: 00193110

(2) 研究分担者

紙谷 義孝 (KAMIYA YOSHINORI)
横浜市立大学・医学研究科・客員講師
研究者番号: 90381491

(3) 連携研究者

越後 憲之 (ECHIGO NORIYUKI)
横浜市立大学・医学研究科・客員准教授
研究者番号: 00363797

(H22 年度~H23 年度で連携研究者としての期間終了)