

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791685

研究課題名(和文) GABA作動性ニューロンの可視化による成長期の脳神経回路構築への麻酔薬の影響

研究課題名(英文) Influence of the anesthetic on nerve circuit construction of the period of growth by the visualization of the GABAergic neuron

研究代表者

久保 和宏(kubo, kazuhiko)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80546531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：GABA合成能が低下したGAD65ノックアウトマウスを用いて侵害刺激閾値を調べるためにホットプレートテスト、テールドロップテスト、ホルマリンテストを行った。ホットプレートテストでは有意な差を観察することができたがテールドロップテストでは差が見られなかった。ホルマリンテストの結果もGABA放出能の低下は上位中枢での閾値の変化をもたらすことが示唆される。これらの結果は、今後、成長過程でのGABA受容体を介する麻酔薬の影響を調べるうえで重要なデータをなっている。

研究成果の概要(英文)：All procedures were performed on adult (12-16 weeks of age) male wild-type(WT) and GAD65 knockout mice (GAD65^{-/-}). Three pain-related behavior tests(Hotplate test; Tail-immersion test; Formalin test) were performed to assess response to nociceptive stimulation. We measured latencies to licking or jumping from the hotplate set at 53centigrade. A significant alteration of the response was found in male GAD65^{-/-} (p<0.01) compared to their wild-type controls, indicative of increased nociceptive perception. However, there was no significant difference in the latency of the tail-immersion test, which was known to be spinally-mediated nociceptive thresholds. In formalin test, there were no significant difference in peak response time of phase I and phase II, but GAD65^{-/-} mice indicate the prolongation of hypersensitivity in phase II.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医薬・麻酔科学

キーワード：麻酔薬 GAD65 GAD67

1. 研究開始当初の背景

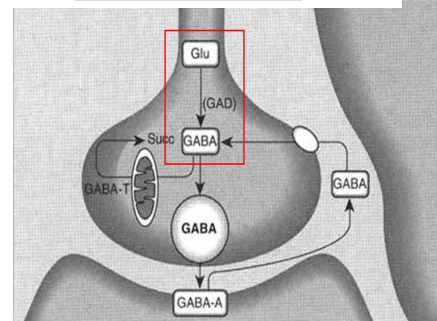
現在、世界では年間 150 万人の胎児や新生児が何らかの麻酔薬を母胎経由、もしくは直接投与されている。麻酔薬が脳の発達に影響を与える一因子である可能性が報告されているものの、胎児・新生児に対する影響は、未解明である。研究目的は、GABA 合成酵素 (GAD67) のプロモーターの下流に GFP を挿入し、GABA 作動性ニューロンが同定可能なノックインマウスを用いて、胎仔期、新生期の麻酔薬の曝露が発達段階の中樞神経系の構築においてどのような影響を与えるかを調べることである。そして、その影響が長期間続くものであるかを麻酔薬に対する感受性・疼痛閾値の変化を個体レベルで解析し、臨床使用されている麻酔薬の分子レベルにおける安全性を評価する新規アプローチである。

2. 研究の目的

哺乳類の脳の構造はその形成期に細胞増殖、分化、移動、配置、シナプス形成を経て非常に精緻な神経ネットワークを構築し記憶、学習など様々な高次機能を有するようになる。近年では、これらの機構に関与する分子が次々に明らかになりその解明が進んでいる。GABA 作動性ニューロンは側脳室腹側の基底核原基から分化し接線方向の移動 (tangential migration) により大脳皮質内に配置されることが分かっている。本研究目的である麻酔薬のこれらの機構に対する影響はいまだ明らかでないが、大脳皮質における 6 層構造を形成する過程において GABA 作動性ニューロンの移動形式に関与する報告は多く見られる。また、その移動に関与する分子も遺伝子改変マウスにより同定されているが、まだ多くの分子が関与していると考えられる。それらに麻酔薬が作用し、神経細胞の分化、移動、定着に影響を与え、神経系の構築に異常を引き起こし、個体レベルでの行動異常を起こす可能性がある。

GAD67 (glutamate decarboxylase) は GABA 作動性ニューロンの細胞体に分布するグルタミン酸から GABA を合成する酵素の一つである。この遺伝子の下流に GFP 遺伝子を挿入し、GABA 作動性ニューロンが同定可能なノックインマウスを今回使用した。このマウスでは非常に高い精度で GABA 作動性ニューロンに一致することを確認してある (Tamamaki et al., J.Comp.Neurol, 2003)。このマウスを用いることにより GABA 作動性ニューロンが可視化でき、それに対する麻酔薬の影響を確認することができる利点がある。

GABA の合成経路



3. 研究の方法

今回、麻酔薬と GABA の成長に対する影響をみるため GABA 合成能を低下させたマウス (GAD65 ノックアウトマウス、) を用いた。下記の方法で麻酔薬感受性評価と疼痛閾値を測定し、成長の過程による麻酔薬と GABA 量の影響を測定する。

麻酔感受性評価方法

プロポフォールを腹腔内注射したときの麻酔薬の反応を催眠作用の指標として用いる Loss of righting reflex (LORR)、鎮痛作用の指標として loss of tail-pinch withdrawal response (LTWR) として測定する。LORR とは 10sec 以上の立ち直り反射の消失から 2sec 以内の反射の回復

までを、麻酔薬による催眠作用と定義し、LTWR は麻酔薬投与により尾基部への血管遮断クリップを用いた侵害刺激に対する掉尾反射の消失時間と定義する。また、容量—反応曲線を求める。

鎮痛閾値の評価方法

Hotplate test : 53 度に設定したアルミニウム製プレートの上に置いたマウスが抗侵害反応 (hindpaw licking, hindpaw shaking, and jumping) までの時間を測定する。上位中枢を介した抗侵害行動を評価する。



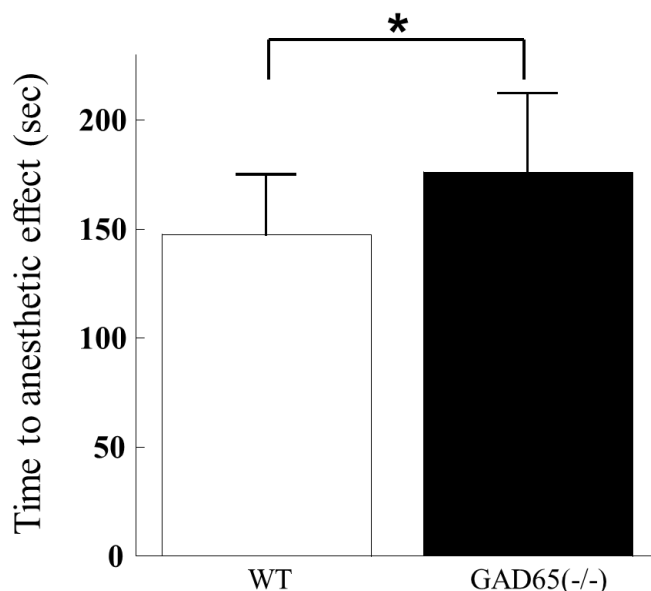
Tail immersion test : 48 度に設定した water-bath に尾先 1cm をつけ尾の逃避反射が起こるまでの時間を測定する。主として脊髄を介した反射行動を評価する。

Formalin test : 5% formalin を 20 μ l 後趾底に皮下注射を行い、ビデオで 60 分間撮影後、Phase I (0-10min) Phase II (10-60min) の licking or lifting time を測定する。

Planter test: マウスを無拘束の状態、足底への熱刺激に対する痛覚過敏度を評価する。

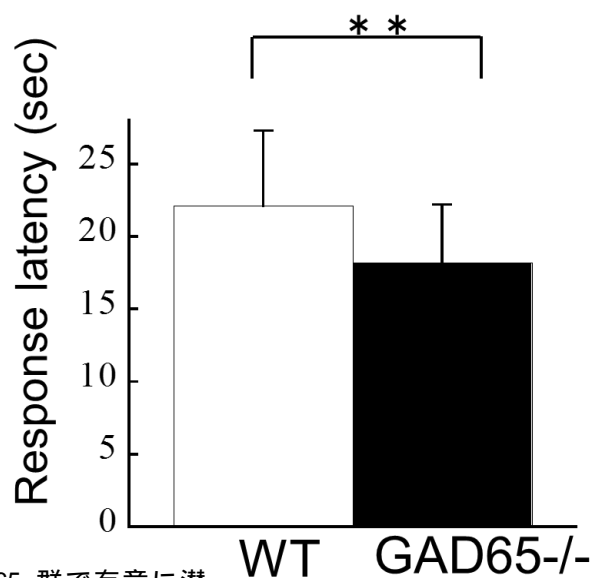
4. 研究成果 麻酔感受性評価方法

Propofol 100mg i.p.



GAD65 群で有意に麻酔薬の作用発現時間が延長していた。麻酔薬の感受性低下が考えられる。

鎮痛閾値の評価方法 Hotplate test



GAD65 群で有意に潜在時間が短縮していた。疼痛閾値の低下が考えられる。

他にも、疼痛閾値、学習障害を示すデータ等についてまとめて今後、学会、論文等で報告する予定である。

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)

研究者番号：

〔雑誌論文〕(計 0 件)

特になし

〔学会発表〕(計 0 件)

特になし

〔図書〕(計 1 件)
新麻酔科ガイドブック (P32-48)
齋藤繁 後藤文夫 久保和宏
真興交易出版社
2013 年発行

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
久保 和宏 (KUBO KAZUHIRO)
群馬大学大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80546531

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()