

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号： 14101  
 研究種目： 若手研究（B）  
 研究期間： 2011～2012  
 課題番号： 23791702  
 研究課題名（和文） 新生児脳における麻酔薬の副作用による神経細胞死の評価と予防法の開発  
 研究課題名（英文） Assessment of anesthesia-induced neurodegeneration and development of preventive measure in the developing brain  
 研究代表者  
 田川 剛志（TAGAWA TSUYOSHI）  
 三重大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号： 00508517

研究成果の概要（和文）：新生児マウスの海馬と脳梁膨大後部皮質において sevoflurane と propofol 併用は sevoflurane 単独に比較して有意に多くのアポトーシスを起こした細胞数を確認した。sevoflurane と thiopental 併用と sevoflurane 単独の間には差はなかった。これにより、小児麻酔において sevoflurane と propofol 併用は sevoflurane 単独に比較して危険な麻酔法である可能性が示唆された。この結果は現在論文投稿中である。  
 また、多光子レーザー顕微鏡を用いて、新生児マウスの脳内大脳皮質の神経細胞を Oregongreen BAPTA-AM によって標識し、その細胞内  $Ca^{2+}$  の可視化に成功した。

研究成果の概要（英文）：Sevoflurane in combination with propofol resulted in significantly greater numbers of apoptotic neurons than sevoflurane alone in both the hippocampal CA1 region and retrosplenial cortex of the neonatal mice. However, there was no significant difference in apoptotic neuron density in both the regions between the groups treated with sevoflurane alone and in combination with thiopental. There is the possibility that the combination of sevoflurane and propofol is more harmful anesthetic technique than sevoflurane alone in pediatric patients. This result is now in submission.  
 In addition, we were successful in multi-photon calcium imaging in the neonatal mouse cortex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：麻酔学

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：麻酔学

## 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国では年間 3500 人の新生児に対して手術が行われており、この小児外科手術の発展の恩恵を受けて多くの患者に根治的な治療が可能となってきた。しかし、その一方で、最近、Sevoflurane などの麻酔薬の副作用による術後麻酔後遺症が患者にとって大きな問題となる可能性が出てきた。

エタノールや Sevoflurane などの麻酔薬は

GABA 受容体を活性化し、NMDA 受容体を拮抗する作用を持つ。発達段階の脳では GABA を介した抑制性ニューロンによる神経伝達は、神経成長の増強促進因子として重要な役割を担うが、この作用が強すぎると興奮毒性を示し、神経細胞死（アポトーシス）を惹起することが報告されている。一方、NMDA 受容体を介した興奮性ニューロンの脱分極は、神経への栄養供給・維持の役割を担っており、

NMDA 受容体の拮抗は、この神経栄養供給・維持作用を減弱させる。

近年、動物実験により、これらの薬剤が発達段階の脳で広汎な神経細胞死を起し、さらにそれに引き続く行動障害を引き起こされることが示されている。しかし、それらの実験は、日常的にはあまり使われない薬剤の組合せで行われていたので、実際の小児麻酔を受けた患者の危険性を予測することは困難であった。

また、麻酔薬の毒性の機序は依然不明であるが、その一つとして細胞内カルシウムの恒常性維持の破綻が挙げられる。吸入麻酔薬は、神経細胞において小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出を誘発し、細胞質とミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>濃度を上昇させるが、これが濃度依存性に、ミトコンドリア膜電位の低下に伴うミトコンドリア機能不全とアポトーシスを誘発すると考えられている。このメカニズムは、ニワトリのリンパ球を用いた培養細胞レベルの研究で解明されてきたが、さらなる病態解明には、生きた生命現象としての神経細胞傷害を実体的かつ統合的に捉えることができる生体内イメージングによる補充が必要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

今回、現在日常的に小児麻酔において最も使用頻度の高い麻酔薬である Sevoflurane、Thiopental、Propofol を組み合わせた麻酔で神経細胞死を評価し、より安全な麻酔法の提示を目的とした。さらに、多光子レーザー顕微鏡を用いて、実験動物が生きたままの状態での神経細胞の活動状態をモニターし、麻酔薬による神経細胞傷害メカニズムの解明とその予防法の開発に繋げる。

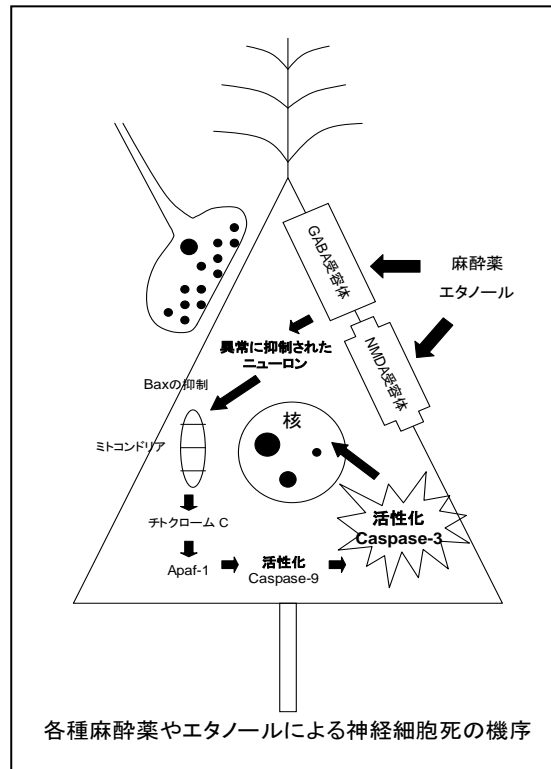
## 3. 研究の方法

新生仔マウス脳神経細胞死(Caspase-3発現を指標とした)への麻酔薬の影響の解析



(1) 細胞でアポトーシスが起る際、ミトコンドリアからチトクローム C が放出され、caspase-3 が活性化され、クロマチンの断片化が起る。この caspase-3 を抗体で蛍光抗体法で検出することによりアポトーシスを起こした細胞を確認することができる。

生後7日目のマウスを現在日常的に小児麻酔において最も使用頻度の高い麻酔薬である Sevoflurane、Thiopental、Propofol を① Control ②Thiopental(注射薬) 5mg/kg ③ Propofol(注射薬) 10mg/kg ④Sevoflurane(吸入麻酔薬) 3% 6時間 ⑤Thiopental 5mg/kg + Sevoflurane 3% 6時間 ⑥Propofol 10mg/kg + Sevoflurane 3% 6時間の6群に組み合わせ麻酔をかける。麻酔終了後に灌流固定し、脳の切片を caspase-3 抗体、蛍光標識2次抗体と反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で海馬と脳梁膨大後部皮質でアポトーシスを起こした細胞の数を確認する。アポトーシスによる細胞死の指標である caspase-3 を蛍光抗体法で検出することにより神経細胞死を評価し、より安全な麻酔法を提示する。



(2) 多光子レーザー顕微鏡は物質励起に多光子過程を利用した顕微鏡である。長波長の励起光を用いるため、共焦点顕微鏡より退色・光毒性が低く、生きたままの組織や細胞の観察が可能で、組織表面から数百マイクロメートルといった深部観察も可能である。また、蛍光波長の異なる二つの蛍光色素(Green Fluorescent Protein; GFP と Red Fluorescent Protein; RFP など)を1波長で同時励起する多重同時染色も可能である。これらの特性から

主に脳神経領域において生きたマウスの生きた神経細胞の形態変化の深部観察に用いられてきた。多光子レーザー顕微鏡を用いれば、脳内大脳皮質の神経細胞を Oregon Green BAPTA-AM によって標識し、その細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化を可視化することが可能となる。この観察法を用いて、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度がどのレベル以上になると神経細胞死が起こるかをリアルタイムイメージングできるだけでなく、神経細胞傷害抑制作用を有する薬剤（デクスメトミジン、メラトニン、リチウムなど）の細胞レベル反応性を生体内評価できる。この手法により、これまで培養細胞レベルの研究を実体的かつ統合的に補充し、麻酔薬による神経細胞傷害メカニズムの解明とその予防法の開発に貢献できると思われる。

生後7日目のマウスを局所麻酔下に開頭し、multi-cell bolus loading により、大脳皮質に Oregon Green BAPTA-AM を注入した後麻酔をかけ、多光子レーザー顕微鏡を用いて脳神経細胞の活動状況を生きたままの状態でリアルタイムに観察する。脳内大脳皮質の神経細胞を Oregon Green BAPTA-AM によって標識し、その細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化を可視化する。

多光子レーザー顕微鏡による生きたままのマウスの神経細胞内  $Ca^{2+}$  濃度と細胞死の観察



多光子レーザー顕微鏡

生きたままのマウスの脳を観察

#### 4. 研究成果

(1) 新生仔マウスの海馬と脳梁膨大後部皮質において sevoflurane と propofol 併用は sevoflurane 単独に比較して有意に多くのアポトーシスを起こした細胞数を確認した。sevoflurane と thiopental 併用と sevoflurane 単独の間には差はなかった。これにより、小児麻酔において sevoflurane と propofol 併用は sevoflurane 単独に比較して危険な麻酔法である可能性が示唆された(図1)。これにより、sevoflurane と propofol 併用が最も危険な麻酔法であることが示唆され、この麻酔法を回避することで、海馬と脳梁膨大後部皮質での神経細胞死を抑制することによって、術後小児の行動障害や学習障害を予防できる可能性を提示することができた。この結果は現在論文投稿中である。

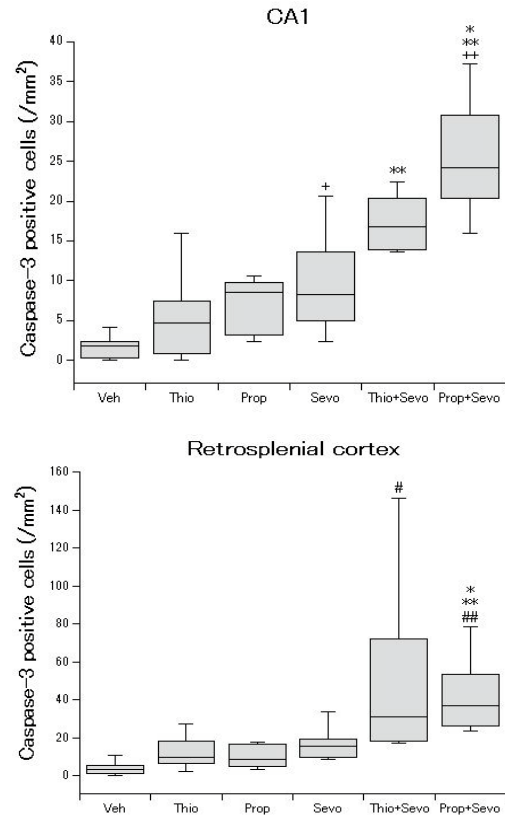


図1 sevoflurane と propofol 併用による神経細胞死の促進

\*P = 0.04 versus Sevo; \*\*P = 0.001 versus Veh or Prop; + P = 0.04 versus Veh; ++ P = 0.006 versus Thio; # P = 0.001 versus Veh; ### P = 0.04 versus Thio

(2) 多光子レーザー顕微鏡を用いて、新生仔マウスの脳内大脳皮質の神経細胞を Oregon Green BAPTA-AM によって標識し、その細胞内  $Ca^{2+}$  の可視化に成功した(図2)。今後は、大脳皮質神経細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度変化と細胞死の過程を多光子レーザー顕微鏡により可視化し、麻酔薬の神経細胞毒性と細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の関係を評価する。

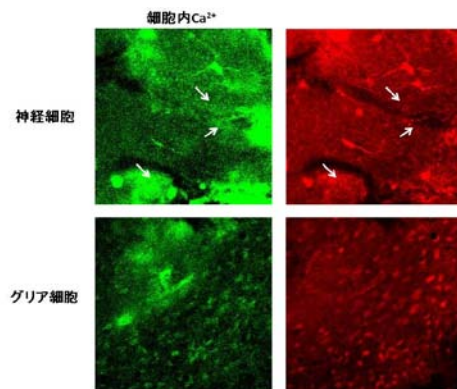


図2 多光子レーザー顕微鏡による吸入麻酔下生後7日マウスの神経細胞とグリア細胞、および細胞内  $Ca^{2+}$  のリアルタイムイメージング

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田川 剛志 (TAGAWA TSUYOSHI)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号： 00508517

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：