

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791582

研究課題名(和文) 麻酔薬による脊髄保護効果の電気生理学的解析

研究課題名(英文) Electrophysiological analysis of anesthetic neuroprotective effect

研究代表者

本田 博之 (Honda, Hiroyuki)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：20535174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：胸腹部大動脈瘤手術における最も重大な合併症に脊髄虚血による下肢麻痺がある。電気生理学的手法を用いた本研究により、脊髄虚血は三相性のシナプス伝達の変化を引き起こし、これには活性酸素種が重要な役割を担っている可能性がある。麻酔薬である合成麻薬は脊髄前角ニューロンの興奮性ならびに抑制性シナプス伝達を抑制するが、虚血性神経細胞死には影響しなかった。抑制性神経伝達の調節が神経保護の観点からは重要であると推測される。

研究成果の概要(英文)：One of the most worrisome complications of thoracoabdominal aneurysm repair is paraplegia caused by spinal cord ischemia. We revealed that ischemic insult induced the three-phase change of synaptic neurotransmission on spinal ventral horn neurons. The reactive oxygen species also produced similar reaction. We also elucidated that mu opioid receptor activation inhibited both the excitatory and inhibitory neurotransmission in spinal ventral horn neurons but did not influence ongoing ischemia-induced neuronal death. Our findings suggest that control of the inhibitory input to the spinal ventral horn neurons is important for neuroprotection.

研究分野：医歯薬学

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：神経保護 脊髄虚血 パッチクランプ 興奮性神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

大血管手術に伴う脊髄虚血は麻痺や感覚障害を引き起こし、患者の QOL (Quality of life) を著しく損なう。これまで副腎皮質ステロイドホルモン大量投与などの薬理学的神経保護のアプローチが検討されてきたが、有効性や副作用などの点で満足できる結果が得られる方法は確立していないのが現状である。

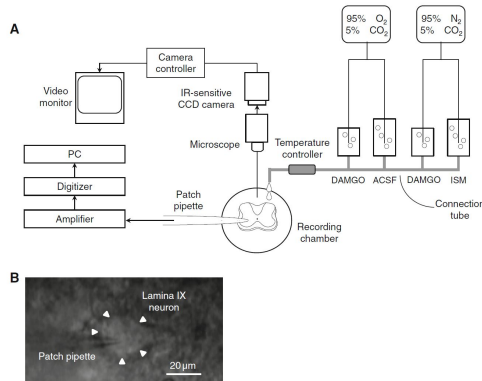
手術には麻酔薬は必須であり、全身麻酔状態を維持するために揮発性麻酔薬や静脈麻酔薬が投与される。これらの麻酔薬は種々の受容体に作用してニューロンの興奮性を抑制することで催眠、鎮痛、不動化などの作用を発揮するとされる。手術操作に伴う脊髄虚血により、細胞レベルではニューロンが異常興奮して細胞死に至るとされているが、全身麻酔薬がこの虚血によるニューロンの興奮を抑制し、神経保護作用をもたらすかどうかはわかっていない。すなわち、臨床において日常的に使用されているにもかかわらず、全身麻酔薬による神経保護作用の細胞レベルでの詳細な機序については判明していないといえる。

2. 研究の目的

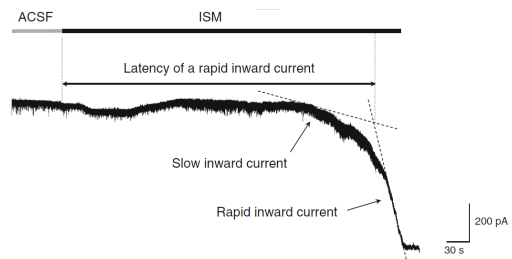
- (1) 脊髄前角ニューロンのシナプス伝達に対する麻酔薬の作用を明らかにする。
- (2) 虚血負荷によって生じる電気生理学的変化を明らかにする。
- (3) 麻酔薬による神経保護効果のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 幼若ラットにウレタン麻酔を行って脊髄を摘出する。マイクロスライサーを用いて厚さ約 500 μm の脊髄横断スライスを作成する。このスライス標本を記録用チャンバーに移して人工脳脊髄液で灌流する。チャンバー内の人工脳脊髄液の温度は 36 に調節する。近赤外線システムを装備した顕微鏡を用いて脊髄前角の第 1 層に存在するニューロンをテレビモニター下に観察しながら微小電極を誘導し、ホールセル・パッチクランプ記録を行う。得られた結果はパッチクランプ用増幅器により増幅し、データ解析用ソフトウェアを用いて解析する。



(2) パッチクランプ記録が安定した後に、人工脳脊髄液 (Artificial cerebrospinal fluid: ACSF) に含まれる酸素とグルコースをそれぞれ窒素とスクロースに置換した溶液 (Ischemia simulating medium: ISM) を灌流することで虚血病態を再現できる。負荷開始から虚血により誘起される連続した二種類の内向き電流の傾きの交点までの時間 (潜時) を測定し、細胞死に至るまでの時間の指標とする。ラットの日齢やニューロンの電気生理学的膜特性 (細胞膜容量や静止膜電位) がこの潜時に影響するので麻酔薬の神経保護効果を比較検討するためにこれらの因子の神経細胞死に対する影響を解析しなければならない。



(3) 全身麻酔薬存在下で虚血負荷を行って潜時を測定し、薬剤非存在下 (対照群) での潜時と比較する。この際、各群間で日齢や電気生理学的膜特性に差が生じていないことを確認する。神経細胞死を示唆する内向き電流の潜時が延長すれば、その薬物に神経保護効果があると考えられる。このように、動物モデルを用いた他の実験とは異なり、本実験手法では薬剤の無い状態で虚血負荷を行う対照群を容易に設定可能、薬剤間での比較が容易、細胞死に至る過程をリアルタイムに観測可能、といった点で有利である。

(4) 吸入麻酔薬の作用解析のためにガスクロマトグラフィーを導入した。吸入麻酔薬としてセボフルレンとイソフルレンを選択し、それぞれ 2 種類の基準濃度の溶液を作成し、この 2 点を用いてガスクロマトグラフィーの基準線を作成した。

4. 研究成果

(1) 脊髄前角ニューロンにおけるシナプス伝達の解析と麻酔薬の作用を調査した。膜電位を -70 mV と 0 mV に固定することで、それぞれ興奮性シナプス後電流 (Excitatory post-synaptic currents; EPSC) と抑制性シナプス後電流 (Inhibitory post-synaptic currents: IPSC) が観察された。テトロドトキシンを灌流投与すると IPSC の振幅と頻度が抑制され、脊髄前角においては自発的な抑制性入力があることが明らかとなった。術中

に頻用される麻酔薬としてフェンタニルやレミフェンタニルといった合成麻酔薬の作用点である μ 受容体の選択的作動薬 (DAMGO) を灌流投与すると、約 60% の脊髄前角ニューロンに G 蛋白質を介する外向き電流を誘起した。さらに EPSC ならびに IPSC の頻度をそれぞれ 73% と 62% に減少させた。すなわち、麻酔性麻酔薬は脊髄前角におけるシナプス伝達を興奮性、抑制性に関わらず全て抑制するということが判明した。これは吸入麻酔薬に見られる作用 (興奮性入力抑制と抑制性入力増強) とは異なる作用であった。

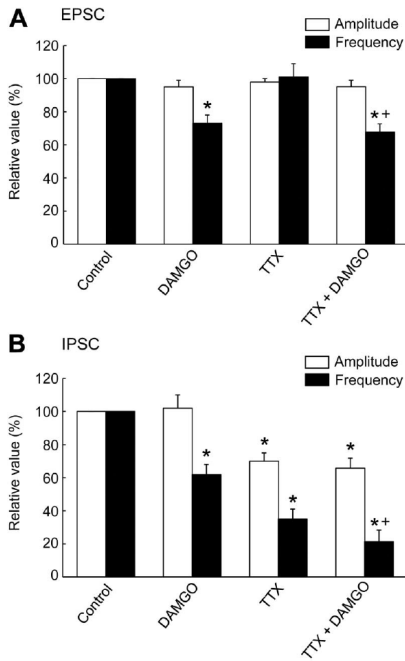


図 1 DAMGO とテトロドトキシン (TTX) の EPSC・IPSC の振幅と頻度に対する影響

(2) DAMGO 誘起性電流は塩化バリウムの同時投与やセシウムの電極内投与によって抑制された。DAMGO 誘起性電流の逆転電位は約 -90 mV であった。さらに GDP- β -S を電極内投与することによって電流は抑制された。これらの結果から DAMGO は G 蛋白質を介してカリウムチャネルを開口し、細胞膜を過分極させることが明らかとなった。

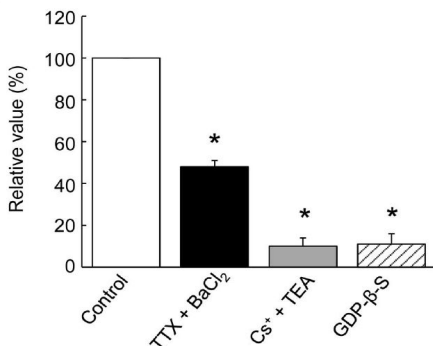


図 2 DAMGO 誘起性電流はカリウムチャネル阻害薬や G 蛋白阻害薬で抑制される

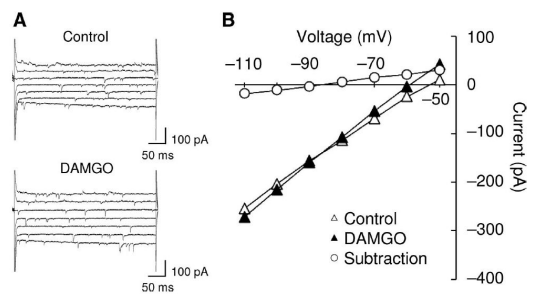


図 3 DAMGO 誘起性電流の逆転電位はカリウムチャネルの平衡電位と近似する

(3) 虚血性神経細胞死の電気生理学的解析を行った。ISM 灌流投与による自発性シナプス後電流について解析した。灌流投与直後にその頻度が増加し、その後数分間にわたって 50~70% まで減少、細胞死を示唆する巨大な内向き電流が誘起されるタイミングにおいては 500~700% にまで増加した。すなわち、虚血によりシナプス伝達は三相性の反応を示した。

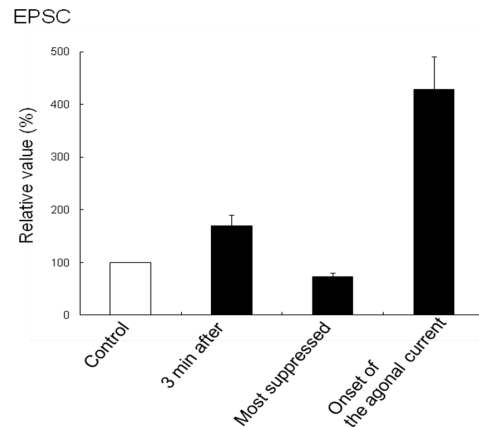


図 4 ISM 灌流によって引き起こされる EPSC の頻度の三相性の変化

(4) 虚血性神経細胞死における重要なメディエータとして活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) が挙げられる。虚血のメカニズムを明らかにするために ROS の一種である過酸化水素 (H₂O₂) を灌流投与すると、EPSC の頻度は一過性に増加し、その後減少に転じて H₂O₂ 灌流投与終了後 10 分の時点でも頻度減少は続いていた。この現象は TTX 存在下でも同様に観察された。すなわち、シナプス前に対する作用であると考えられた。

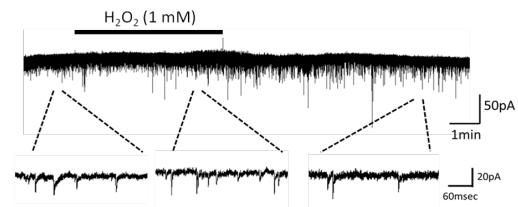


図 5 過酸化水素は EPSC の頻度を一過性に増加させ、その後減少させる

(5) ISM と同時に DAMGO を灌流投与し、細胞死を示唆する急速な内向き電流が生じるまでの潜時を修飾するかどうかを解析した。日齢によって潜時が短縮することが知られているため各日齢毎に検討したが、DAMGO 存在下で潜時に有意な変化は無かった。また、 μ 受容体拮抗薬であるナロキソンを同時灌流投与したがやはり潜時に変化は無かった。つまり、 μ 受容体活性化ならびに遮断による神経保護効果は無いと考えられた。

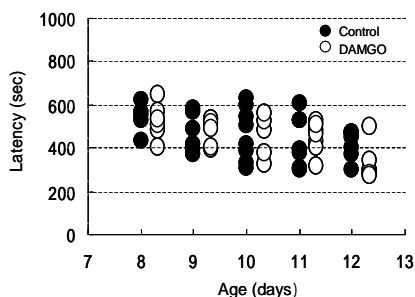


図6 DFAMGO は虚血性神経細胞死までの潜時に影響しない

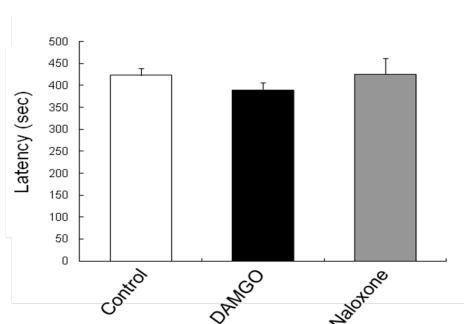


図7 DAMGO とナロキソンは虚血性神経細胞死の潜時に影響しない

(6) 本研究により、脊髄前角ニューロンにおける虚血性神経細胞死の電気生理学的メカニズムが明らかになった。脊髄前角ニューロンにおいて虚血は一過性にシナプス伝達を促進するが、その後シナプス伝達は抑制され、最終的には過剰な促進を引き起こす三相性の反応が起きる。虚血性神経障害のメディエータである H_2O_2 の灌流投与でも同様の変化を認めたことから、この三相性反応には ROS が重要な役割を果たしている可能性が示唆される。このことから脳梗塞などで既に臨床使用されている ROS 不活化薬エダラボンが脊髄虚血における神経保護に有用である可能性が考えられ、臨床応用につながる重要な成果であると言える。さらに麻酔薬として必須と考えられる μ 受容体作動薬の脊髄前角ニューロンにおける作用を詳細に明らかにした。これまで脊髄前角ニューロンにおいて μ 受容体作動薬が作用を及ぼす事を報告したものは無いため重要な知見である。しかし神経保護効果については有用性を認めることができなかった。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計2件)

Hiroyuki Honda, Hiroshi Baba, Tatsuro Kohno, The μ opioid receptor activation does not affect ischemia-induced agonist currents in rat spinal ventral horn, Journal of Anesthesia, 査読有、In-press, 2014

DOI 10.1007/s00540-014-1829-3

Hiroyuki Honda, Yasuhiko Kawasaki, Hiroshi Baba, Tatsuro Kohno, The μ opioid receptor modulates neurotransmission in the rat spinal ventral horn, Anesthesia and Analgesia, 査読有、115、2012、703-712

DOI 10.1213/ANE.0b013e318259393d

6. 研究組織

(1)研究代表者

本田 博之 (HONDA HIROYUKI)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：20535174