

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890190

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬の脳神経毒性に対する、マンニトール エリスロポエチンの神経保護効果

研究課題名(英文) Protective potentials of mannitol-erythropoietin against neurotoxicity of general anesthesia on immature brain.

研究代表者

前島 英恵 (MAESHIMA, Hanae)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：80638172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：全身麻酔薬は幼弱動物に対して長時間施行すると、広範な神経細胞死を生じることが報告されているが、マンニトールを併用することでエリスロポエチン(Epo)が保護作用を示すかを検討した。7日齢ラットにおいて亜酸化窒素-イソフルラン麻酔6時間施行後、大脳皮質と海馬にアポトーシスの増加を示すCaspase3の増加を認めたが、マンニトール併用Epo投与群においては有意に変化しなかった。また、麻酔群では、血中酸素飽和度はあまり低下しなかったが、二酸化炭素濃度が増加していた。本研究ではマンニトール併用Epoの麻酔薬神経毒性に対する保護作用について明らかかな有意性を示すことはできなかった。

研究成果の概要(英文)：General anesthetics are shown to induce wide spread apoptosis in the developing brain. We studied if mannitol - erythropoietin (M-Epo) combined administration affords protection against a nesthetic-induced neurotoxicity in neonatal rats. We found that Caspase-3 was induced in the cerebral cortex and hippocampus after 6 hour exposure to general anesthetics, meaning apoptosis increasing. Intraperitoneal administration of mannitol and Epo failed to inhibit apoptosis. In anesthetized rats, blood saturation of oxygen did not decreased, but blood concentration of carbon dioxide increased. Our results cannot suggest whether M-Epo is effective or not in inhibiting anesthetic-induced neurotoxicity in immature brain.

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：エリスロポエチン マンニトール 新生児 神経保護 神経細胞死 麻酔薬

## 1. 研究開始当初の背景

幼若動物の麻酔薬曝露モデルでは、短期的な細胞傷害(アポトーシス)や長期的な認知記憶・学習障害等の機能的障害が生じる(Jevtovic-Todorovic et al. 2003; Liang et al. 2010)。疫学研究からも小児期の麻酔薬曝露による学習障害が報告されており(DiMaggio et al. 2009; Kalkman et al. 2009; Wilder et al. 2009)、そのメカニズムの解明や予防法の開拓は、全身麻酔における安全性の確保のために急務である。

エリスロポエチン(erythropoietin; Epo)は、虚血低酸素モデル等で神経保護作用を發揮することが報告されている(Sun et al. 2004)。我々は、7日齢ラットで吸入麻酔薬曝露の前にEpoを腹腔内投与して、脳神経細胞のアポトーシスを予防できるか検証したが、予想に反し、有意な予防効果は見い出せなかった(2012 日本麻酔科学会一般演題採択)。この理由について我々は、虚血低酸素モデル(Sun et al. 2004)では血液脳関門(BBB)が破綻しており、腹腔内投与されたEpoが脳神経細胞内に移行するために保護効果を生じるが、我々の麻酔薬曝露モデルでは、Epoが正常BBBを通過できなかったのではないかと考えた。

また研究過程において、我々はEpoを投与しなかった場合のアポトーシスを誘導するCaspase3の発現量の時間変化が、我々の麻酔薬曝露モデル(8時間後にピーク)と低酸素モデル(24時間後にピーク)(Li et al. 2007)と異なることを見出した(Fig 1.)。さらに我々は、(Li et al. 2007)と同じ低酸素条件下(8%酸素 2.5時間)で、8時間後に低酸素誘導因子(HIF)が増加することを確かめており、HIFの増加によって細胞内でEpoの発現量が増加し、アポトーシスの増加が抑制されると考えている。そうであれば、何らかの方法でBBBの透過性を亢進させて、脳神経細胞内にEpoを移行させることができれば、麻

酔薬による神経障害を防止することができるかと予想される。BBBの透過性を亢進させる方法のひとつは、一時的に脳血流の浸透圧を高めるマンニトールの投与である(Chi et al. 2000)。

我々は、マンニトールを用いて、麻酔薬曝露モデルにおいても虚血低酸素モデルと同様に、Epoによる脳神経細胞保護効果をえられるのではないかと着想するに至った。マンニトールおよびエリスロポエチンは、既に臨床で用いられている薬物であり、脳細胞保護が可能であると証明されれば、麻酔薬の中枢神経障害に対する予防法の開発という点で非常に有意義である。幼若脳に対する麻酔薬の神経毒性は、大規模臨床研究が進行するなど、社会的にも強い関心を集めているが、その予防法は確立していないので、その開発は急務である。

さらに、マンニトール投与後の一時的なBBB透過性亢進について検証することは、エリスロポエチンのみならず、脳神経細胞への薬物投与方法の新たな可能性を明らかにする知見として重要な意義がある。

## 2. 研究の目的

本研究の麻酔薬曝露の条件でアポトーシスが増加することは、既に確認済みである。本研究は、新生児ラットを用いて、エリスロポエチン(Epo)およびマンニトールの同時投与による麻酔薬の神経毒性に対する脳神経細胞保護の可能性を明らかにする目的で、次の研究を計画した。

- (1) 我々のマンニトールの投与条件で、一時的な脳圧亢進による脳神経細胞の傷害を引き起こさずにBBBの透過性を高めることができる事を検証する。
- (2) マンニトール投与後にEpoを投与し、Epoが細胞内に移行することを検証する。また、Epoおよび関連蛋白の細胞内発現量の時間変化を検証する。
- (3) Epoおよびマンニトールの投与後、Epo

が最も増加しているタイミングで、吸入麻酔薬曝露を行い、脳神経細胞障害が予防できるか検証する。(4)さらに行動的に、高次脳機能の障害が予防できるか検証する。

我々は、エリスロポエチンに加えてマンニトールを投与することで、脳神経細胞内のEpoを増加させ、麻酔薬によるアポトーシスの増加や学習障害を抑制することが証明できると考えている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 麻酔方法

恒温槽につけた密閉型自作プラスチック製麻酔チャンバーを用いた半閉鎖式低麻酔・酸素回路を用いた。麻酔中のチャンバーは恒温槽に設置して、カプノグラムおよび直腸用温度センサーでモニターして、一定環境を保った。酸素2L・笑気(亜酸化窒素)4L・イソフルラン0.95%の混合ガスで灌流し、自発呼吸下で6時間曝露させた後、速やかに室内環境に戻した。排出口で麻酔ガス濃度を連続モニターした。非麻酔群では、亜酸化窒素に変えて窒素を同量送気した。また、麻酔中のバイタルサインを評価するため、別の7日齢ラットにおいてMouseOXを用いて、呼吸数、心拍数、SpO<sub>2</sub>、体温をモニターした。さらに、別の7日齢ラットを用いて断頭採血を行い、血中の二酸化炭素濃度、酸素濃度、pHを測定した。

#### (2) 薬剤投与方法

7日齢のWistarラットに対して、25%マンニトールを腹腔内に5mL/kg投与した(Chi et al. 2000)。Epoを投与する場合は、マンニトール投与後すみやかにBBB透過性が亢進するので(Chi et al. 2000)、5分後に遺伝子組み換えヒトエリスロポエチンを腹腔内に250U/body投与した。これを麻酔曝露の60分前に行い、母親ラットの元で休息させた。

腹腔内投与群は、生食群(NS12mcl)、低用量EpoのrEpo-L群(20U/12mcl)、中等量Epo

のrEpo-M群(66U/12mcl)、高用量EpoのrEpo-H群(200U/12mcl)の4群を設け、同量の薬剤を麻酔開始30分前に、腹腔内に一度に全量を注射した。蛋白吸着を避けるためピペット、容器は吸着防止薬を塗布したものをを用いた。

#### (3) 生化学的検討

麻酔終了約30分にイソフルレン投与下に断頭して脳を摘出した。海馬部分、頭頂部の大脳皮質部分をブロックとして切離し、凍結した。後日解凍し、それぞれの部位から脳組織homogenateを作成し、cleaved Caspase 3を抗体としてウェスタンブロット法を行った。また、同様にしてパラホルムアルデヒド固定検体を採取した。パラホルムアルデヒド固定検体については、クライオスタット法を用いて、皮質および海馬の冠状断の薄切り切片を作成した。薄切り切片を用いて、免疫染色法を行い、Epoおよび、エリスロポエチン受容体(Epo-R)の発色をおよび定量を試みた。

#### (4) 行動学的検討

受動回避(Inhibitory Avoidance; IA)試験。麻酔の3週間後に専用の試験用ケージを用いて行った。ケージは隣接する明箱と暗箱からなっており、ラットが明箱から暗箱に入ってから後、0.4-0.8mA、1-2秒の電流刺激を与えて学習させた。トレーニングの24時間にリテンション(想起)テストを行い、ラットが暗箱に入っていくまでの潜時を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 麻酔中の呼吸、循環、体温の変化

麻酔開始後、非侵襲的モニタリングでは、先行実験の結果と同様に、呼吸数の低下と心拍数の増加が見られたが、6時間の麻酔中も体温は正常に保たれた。SpO<sub>2</sub>は麻酔中軽度に低下したが、どの時点でも95%以上を保った。

しかしながら、別のラットを用いて、麻酔中の断頭採血を行ったところ、個体によっては血中二酸化炭素濃度が50mmHg前後にまで

貯留していることが判明した。

## (2) 投与した Epo の脳内への移行

対照として生食を腹腔内に投与した生食群ではヒト Epo は検出限界以下であった。したがって、この方法では内因性の Epo は検出されず、外部から投与した human recombinant Epo の移行を評価できると考えられた。これは過去の報告とも一致する結果であった。

大脳皮質ホモジェネート内のヒト Epo は、腹腔内投与後には 3.9 mU/protein mg 程度の移行が認められた。これは、新生児の脳虚血モデルで Epo 腹腔内投与後に脳保護作用が認められた報告と近い脳内濃度であり、有効な濃度に達していると考えられた。

マンニトール併用下での Epo の細胞内移行については、パラホルムアルデヒド固定検体および薄切り切片を作成したが、先行報告を参照しておこなった Epo および Epo-R の免疫染色にて、有効な染色画像および測定結果を得ることが出来なかった。引き続き、染色条件の検討を進めている。

## (3) 生化学的検討：海馬アポトーシス

cleaved caspase3 の発現は GAPDH の発現量との比を取って調べた。6 時間の麻酔薬暴露により、頭頂部大脳皮質の cleaved caspase3 は、非麻酔群と比べて、腹腔投与群で約 10 倍と有意に増加した。海馬では麻酔暴露によって、腹腔投与群で約 5 倍に増加した。Epo 投与および M-Epo 投与群において、cleaved caspase3 の発現量を有意に変化させなかった。皮質 [1-way ANOVA:  $F(3,30) = 1.892$ ;  $P = 0.155$ ]。海馬 [1-way ANOVA:  $F(3,29) = 0.918$ ;  $P = 0.446$ ]。

## (4) 行動学的検討

IA 試験については、研究期間中に実験施設の改装のために実験設備を移動したため、新たな実験環境における条件検討を行う必要があった。麻酔 3 週間後に相当する 4 週齢の Wistar ラットを用いて検討を行ったが、実験環境に変化に伴って、先行実験と同様の刺激

強度では、適当な学習効果を得られなかった。実験環境の改良をおよび、適度に学習効果を認める電流刺激強度と電流刺激持続時間の検討を行っている。

## (5) 考察

成熟ラットやヒトにおいて、分子量の大きい蛋白質やポリペプチドを全身投与した場合、脳血液関門の存在のために脳神経系への移行が少なく、作用部位で十分な濃度に達しないことはしばしばみられる。Epo も高分子量の蛋白質であるため、末梢投与では脳への移行は遅く、かつ限定的であり、大量投与を必要とする。このため、能血液関門の通過性を高める効果を期待できるマンニトールの併用投与を検討したのであるが、本研究では、免疫染色の条件検討に難渋したために、染色画像を用いて Epo の細胞内移行を確認することができなかった。したがって、本研究で最初に設定し施行した投与条件で Epo の脳細胞への移行が高まったのかどうか検証できていない上に、Epo の脳細胞への移行を高めることの出来る投与条件の検討が出来なかった。

また本研究において、改めて麻酔群における血液ガス分析を行ったところ、血中酸素飽和度はあまり低下しなかったが、二酸化炭素濃度が増加していた。血中二酸化炭素濃度の高度の上昇はそれ自体、脳神経毒性を示すことが報告されている。(Tachibana et al. 2013) 文献中の血中二酸化炭素濃度に比べて、本研究の麻酔モデルにおける血中二酸化炭素濃度の上昇は軽度であるが、全身麻酔薬の作用と、血中二酸化炭素濃度上昇による直接の脳神経毒性の可能性および脳圧亢進作用の影響を分離して検証をすすめる必要があることが判明した。

## (6) 結論

新生児ラットにおいてマンニトールおよび Epo の腹腔内投与後の脳内への移行を、免疫染色法を用いて確認および定量を試み

たが、免疫染色の条件検討に難渋したため、はっきり確認することができなかった。したがって、本研究におけるマンニトールおよび Epo の初期投与条件の妥当性と適切な投与条件の検討が出来なかった。

新生児ラットに対する 6 時間の亜酸化窒素 イソフルレン麻酔は、低酸素を来さずに大脳皮質、海馬のアポトーシスを誘発し、cleaved caspase3 の発現増加を生じたが、血中二酸化炭素濃度が軽度ではあるが無視できない程度に上昇することが判明した。したがって、麻酔薬の作用と二酸化炭素濃度上昇による作用を分離して検証できる麻酔条件の検討が新たに必要となった。

初期投与条件下でのマンニトール併用 Epo の麻酔暴露前の腹腔内投与は、cleaved caspase3 の発現量に有意の変化を生じず、新生児ラットの亜酸化窒素 イソフルレン麻酔による神経細胞死を抑制する新たな所見を得ることは出来なかった。しかしながら、現時点までの検討では、マンニトール併用 Epo の適切な投与条件の検討が不十分であるため、更なる検証が必要である。

## 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

(1) 安藤富男、内本一宏、前島英恵：真興交易(株)医書出版部、臨床麻酔、小児脳障害とエリスロポエチン．2013、37(増):278-88、査読無

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

前島 英恵 (MAESHIMA, Hanae)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80638172

### (2)研究分担者

なし

### (3)研究協力者

内本 一宏 (UCHIMOTO, Kazuhiro)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：50710951

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