

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462408

研究課題名(和文) 幼若脳に対する麻酔薬の興奮作用と神経毒性との関係の解明

研究課題名(英文) The study to clarify the excitatory effect of anesthetics on neuronal toxicity in the neonatal brain

研究代表者

石和 大 (ISHIWA, Dai)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：30457858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多くの麻酔薬が幼若脳に広範なアポトーシスを生じることが報告されているが、その機序の全容は明らかではない。GABAA受容体は幼若脳では脱分極性の反応を生じ、GABAA受容体刺激作用のある麻酔薬は、興奮作用を示す可能性がある。私たちはCl<sup>-</sup>-共輸送担体によるCl<sup>-</sup>-排泄機構の変化およびそれに伴うGABA受容体の脱抑制が細胞毒性に関連しているのではないかと考えた。実験の結果、未成熟期にミダゾラム投与を行い、成長期以降に社会的行動が阻害された、組織学に脳機能への影響を包括的に評価した、Cl<sup>-</sup>-共輸送担体の一つであるKCC2の選択的活性化薬剤であるCLP290を投与することで、これらの現象が抑制された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that anesthetic agents induce apoptosis abundantly over the brain in the neonate but its mechanisms remain unknown. The GABAA stimulants induce neuronal depolarization and have excitatory effects in cortex and hippocampus. Due to these effects, neurons may lead to neuronal death. In this study we clarify neonatal administration of midazolam disrupt learning ability in the adolescent and this effect can be rescued by CLP290.

研究分野：麻酔科学

キーワード：麻酔薬 幼若脳 アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

多くの麻酔薬が幼若脳に広範なアポトーシスを生じることが報告されているが、その機序の全容は明らかではない。Proneurotrophin による p75 neurotrophin (p75NTR) 受容体活性化とそれに引き続く RhoA 誘導は、メカニズムの一つとして有力である。しかし、この経路の活性化は神経活動の抑制または増加のどちらの誘因でも生じることが知られている。GABAA 受容体は幼若脳では脱分極性の反応を生じるため、GABAA 受容体刺激作用のある麻酔薬は、大脳皮質や海馬では興奮作用を示す可能性がある。興奮作用に引き続き、その興奮毒性に由来したアポトーシスが生じるとされる。神経細胞死が誘発された場合、最終的に成長期以降に学習障害が生じる可能性が示唆される。これまでアポトーシスを治療のターゲットとして水素ガスやエリスロポエチン等の有効性が動物実験で検討されてきたが、興奮毒性に着目した研究というのはほとんど見られなかった。

### 2. 研究の目的

私たちは上記過程に、Cl<sup>-</sup>共輸送担体による Cl<sup>-</sup>排泄機構の変化およびそれに伴う GABA 受容体の脱抑制が関与しているのではないかと考えた。幼若動物を用いたてんかん原獲得のメカニズムに Cl<sup>-</sup>共輸送担体が関与していることは報告されているが、しかしながら臨床分野で広く使用されている GABA 受容体アゴニストであるミダゾラムについて、成長期以降の記憶能への影響を検討した研究はあまりない。

本研究では以下の目的を設定する。

未成熟期にミダゾラム投与を行い、成長期以降に社会的行動、認知能力に関する行動実験への影響を検討する

組織学・生化学および電気生理学的手法を用い投与頻度や用量変化に伴う脳機能への影響を包括的に評価する

Cl<sup>-</sup>共輸送担体の一つである KCC2 の選択的活性化薬剤である CLP290 を投与することにより、これらの現象が抑制されるかを検証する

### 3. 研究の方法

#### 動物

雄性 SD ラットを使用した (チャールスリバー)。ミダゾラムは生理的食塩水に溶解し、30mg/kg で腹腔内投与した。生後 7 日の単回投与ないし 5~7 日の 3 日間連続投与を行った。対照群は同量の生理的食塩水を腹腔内投与した。

#### 社会的認知学習課題

未成熟期にミダゾラム投与を行い、7 週齢の時点で社会的行動、認知能力を調べるため、社会的認知学習を行った (social recognition test)。はじめに 4 週齢のラットに 5 分間接触させ、30 分それぞれを隔離した後、先ほど接

触させた個体および新規個体に同時に接触させた。それぞれへの探索時間を測定し、既知個体に対する探索時間に対する新規個体への探索時間を比率として算出し、学習の指標とした。

#### 組織学的実験

ミダゾラム単回投与群では生後 7 日目、3 日連続投与群では最終投与である生後 7 日目のそれぞれ投与終了 90 分後にペントバルビタール 10mg/kg を腹腔内投与し、入眠後に経左心室的に 4%パラホルムアルデヒド (体重 g × 3ml) を 10 分間かけて還流した。その後断頭し、脳を 4%パラホルムアルデヒドで一晩後固定した後、15 および 30%スクロースに浸透させた。その後パラフィン包埋し、厚さ 15um の切片を作成した。切片はスライドガラスに載せ、アポトーシスを検出するため TUNNEL 染色を行った。染色はキットを使用し実施した。TUNNEL 陽性細胞の測定に際しては、蛍光閾値の設定を行い、キーエンスの顕微鏡でカウントした。

#### CLP290 の調整および投与

CLP290 の粉末は 40%HPBCD に氷冷下で溶解し、完全に溶解したところで氷冷した生理的食塩水を等量加え、最終的に 20%HPBCD に溶解して使用した。CLP290 は prodrug であるため、静脈ではなく経口投与を行った。マウス用経口ゾンデを用いて 25mg/kg で投与を行った。

### 4. 研究成果

#### 幼若期のミダゾラム投与は、成長期以降に社会的学習を阻害する

生後 7 日ないし 5~7 日にミダゾラム 30mg/kg を投与し、7 週齢で社会的認知学習を行った。生後 7 日目の単回投与による学習成績は生理的食塩水を投与した群と比較して有意差は認められなかった。しかしながら 3 日連続投与を行うと有意に学習機能が低下した (図 1)。

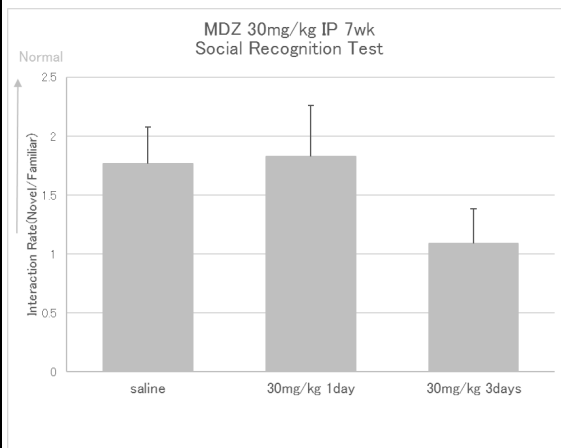


図 1. 生後 5~7 日のミダゾラム投与は 7 週齢における社会的認知学習を阻害する

われわれは先行研究で当該時期のミダゾラム投与は神経細胞を興奮させることを明ら

かにしている (Koyama et al. Anesthesiology 2013)。この原因として、当該時期には細胞外に比して細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度が高いため、GABA<sub>A</sub> 受容体刺激により濃度勾配により Cl<sup>-</sup>が細胞内から細胞外に流出し、それにより神経細胞が興奮することを明らかにしている。したがって図1の学習障害も同じメカニズムにより神経細胞の興奮毒性が生じて引き起こされるのではないかと考えた。幼若期の細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度を規定するのは Cl<sup>-</sup>共輸送担体であり、Cl<sup>-</sup>を細胞内に組み入れる NKCC1 と細胞外にくみ出す KCC2 とが存在する。したがって NKCC1 を阻害ないし KCC2 を活性化することで細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度を低下させることができる。われわれは先行研究にて NKCC1 の阻害薬である bumetanide を投与することにより相対的に細胞内の Cl<sup>-</sup>を低下させ、GABA<sub>A</sub> 受容体刺激による興奮毒性を抑制することを明らかにしている。その一方で、本研究では KCC2 をターゲットとした。われわれは KCC2 選択的機能活性化薬剤である CLP290 (Dr. DeKoninck より譲渡)を用いて幼若期の細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度を低下させることで、成長期以降の学習障害が予防できるのではないかと考えた。図1と同様にミダゾラム 30mg/kg を生後 5~7 日に投与する一方で、CLP290 25mg/kg を同時に投与した。その結果 CLP290 を併用した群では、7 週齢の社会的学習の成績が健常動物並みまで回復した。この効果は溶媒である HPBCD では見られなかった(図2)。

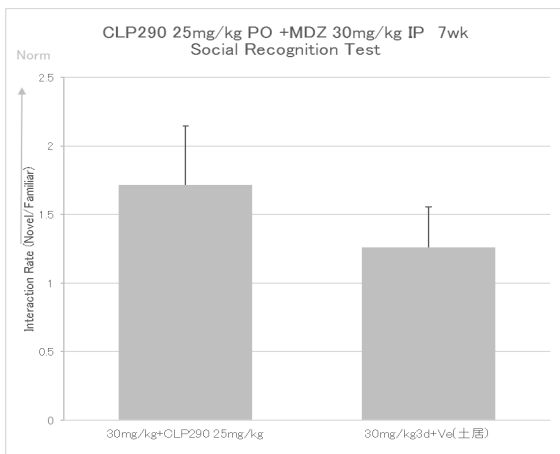


図2. 生後 5~7 日のミダゾラム投与による学習障害は CLP290 によって改善する

### 幼若期のミダゾラム投与は、明確なアポトーシスを誘導しないが、デスフルランはアポトーシスを誘導する

図1の結果にあるように、幼若期のミダゾラム投与は成長期以降に学習障害を引き起こすことが明らかとなった。続いて、ミダゾラムが幼若脳にどのような変化を引き起こしているかを検討した。背景でも述べたように、そこにはアポトーシスおよび神経細胞死が関与しているのではないかと考えた。したがってアポトーシス評価のために TUNNEL 染色を実施した。しかしながらミダゾラム投与

は TUNNEL 染色により検出されるアポトーシスを引き起こさなかった。したがって幼若期ミダゾラム投与は興奮毒性を引き起こすが、非アポトーシス依存的な細胞死ではないかと考えた。一方、実験系が適切に機能しているかを確認するため、positive control としてデスフルラン曝露動物を用いて TUNNEL 染色を行った。デスフルランは生後 7 日目に 8% で 6 時間曝露を行った。その結果、デスフルラン曝露動物では視床において TUNNEL 陽性細胞を誘導した(図3)。

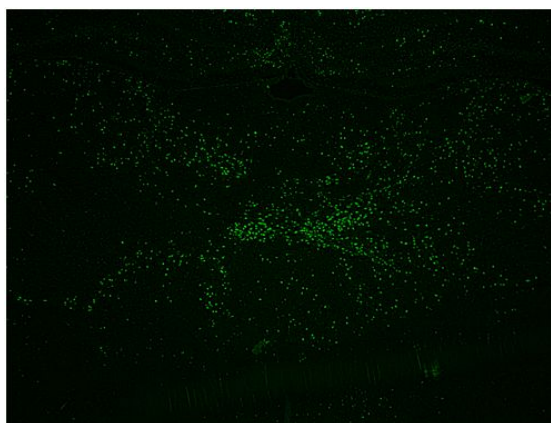


図3. 生後7日目のデスフルラン曝露は視床において TUNNEL 陽性細胞数を増加させる

一方、デスフルラン非曝露動物では TUNNEL 陽性細胞は検出されなかった。続いてこのアポトーシスが麻酔薬曝露による幼若期の神経細胞興奮毒性に依存するかを検討するため、CLP290 を同時に投与した。その結果、CLP290 投与はデスフルランによる TUNNEL 陽性細胞数の増加を抑制した(図4)。

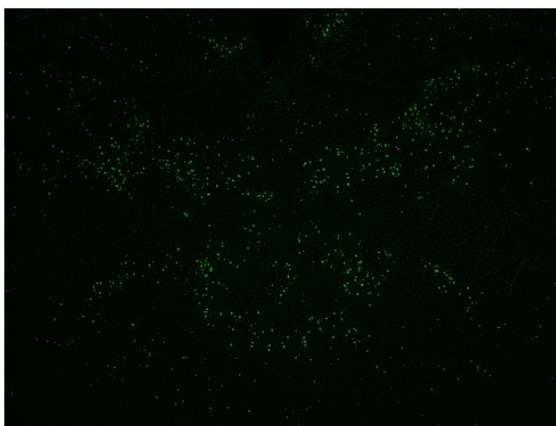
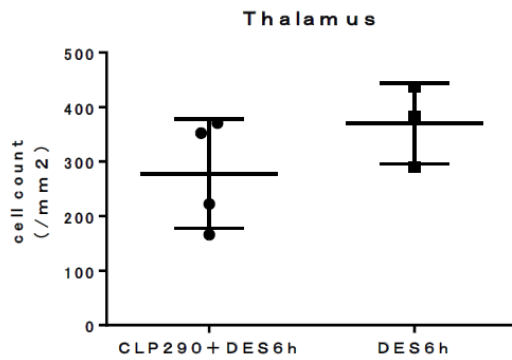


図4. 生後7日目のデスフルラン曝露による視床でのアポトーシスは CLP290 投与により抑制される

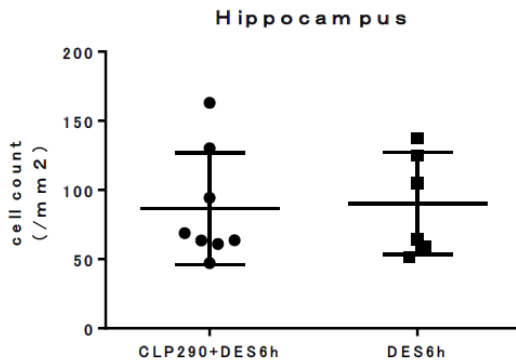
われわれはこの結果を網羅的に検討すべく、各脳領域におけるデスフルランのアポトーシスに対する影響および CLP290 による予防効果を評価した。その結果、前述の視床では CLP290 が有意にアポトーシス予防効果を有したが(図5) 海馬においてはその効果を検出することができなかった(図6)。

図5. 生後7日目のデスフルラン曝露による視



床でのアポトーシスは CLP290 投与により抑制される

図6. 生後7日目のデスフルラン曝露による海



馬でのアポトーシスは CLP290 投与では抑制されない。

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)

[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

石和 大 (ISHIWA, Dai)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号: 30457858

(2) 研究分担者

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)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号: 90381491

BAYaHHeX