

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861242

研究課題名(和文)ミノサイクリンが発達段階の脳における全身麻酔薬の神経毒性を抑制できるか？

研究課題名(英文)The effect of minocycline on the neurotoxicity of general anesthetics in developmental brain.

研究代表者

西和田 忠(Nishiwada, Tadashi)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20649165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞に対する全身麻酔薬・局所麻酔薬の毒性をミノサイクリン等が抑制できるかについて、ヒト神経芽細胞腫株SH-SY5Yを用いて研究を進めた。ブピバカインによる細胞毒性に対し、モルヒネ、ネクロスタチンがそのviabilityを改善することを明らかにしたが、細胞傷害をみた研究では逆に細胞傷害を亢進した。次に麻酔科関連薬剤、特にトラマドール及びその活性代謝物(0デスメチルトラマドール)が癌細胞に与える影響についてヒト肺癌細胞株H358を用いて研究し、それらが癌細胞のviabilityを低下させることを明らかにした。また、その機序がアポトーシス増加もしくは細胞増殖能抑制ではないことも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether minocycline and other treatment options can suppress the cytotoxicity of general or local anesthetics in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Contrary to our expectations, minocycline did not protect the cells against the viability-lowering effect of bupivacaine, however, morphine and necrostatine increased cell viability after the treatment with bupivacaine. In addition, we found that necrostatine itself possibly exhibited cytotoxicity. Next, we investigated the effects of tramadol and its active metabolite (0-desmethyltramadol) on the human lung cancer cell line H358. It was revealed that they decreased the viability of H358 cells and the underlying mechanism does not depend on promotion of cell apoptosis or inhibition of cell proliferation.

研究分野：麻酔科学

キーワード：トラマドール 0デスメチルトラマドール viability アポトーシス 細胞増殖能

## 1. 研究開始当初の背景

1980年代から全身麻酔薬の中枢神経抑制作用が発達期の脳に悪影響を及ぼす可能性が報告され始めた。1990年代以降には新生齶歯類において全身麻酔薬が神経毒性(アポトーシスの誘導)を起こすことが明らかにされ、多くの研究者に注目されるようになった。この中には揮発性麻酔薬、NMDA受容体拮抗薬、GABA受容体作動薬といった一般的に臨床使用されている全身麻酔薬が含まれ、さらに最近では成長後の高次脳機能にも悪影響を与える可能性も示唆されている。現時点でこれらの事実は基礎研究に限定されるものの複数の研究で同様の結果が報告され、さらに臨床研究においても小児期に全身麻酔を複数回受けることによりその後の学習能力の発達に遅れが生じると報告されている。現在、倫理的側面から前向き臨床研究は困難なこともあり、ヒトでの結論は出ていないが、小児における全身麻酔および鎮静に必須である全身麻酔薬の使用が、将来の学習障害や認知機能障害を惹起する可能性があることは、麻酔科医だけでなく社会的にも重要課題であり、同時にその抑制方法について研究することが重要と考えられる。

基礎研究においては全身麻酔薬による神経毒性がミトコンドリアを介して誘導されている可能性が報告され、最近 L-Carnitine がミトコンドリアの膜を安定化させることによりNMDA受容体拮抗薬であるケタミンによる神経障害を抑制する可能性が報告された。しかし、より一般的に用いられる揮発性麻酔薬やGABA受容体作動薬に対する報告や、成長後の高次脳機能障害に対する抑制効果をみた報告はない。

また、手術麻酔の臨床現場では、局所麻酔薬を用いた脊髄クモ膜下麻酔が頻用されているのみならず、近年超音波診断法の発達により、局所麻酔薬を用いた超音波ガイド下神経ブロックの使用頻度が増加している。しかし、基礎的研究において局所麻酔薬が神経細胞毒性を有していることが報告されており、臨床現場でも局所麻酔薬によると考えられる神経障害の症例報告は散見される。

ミノサイクリンはテトラサイクリン系抗生剤の1つで、中枢神経の虚血や神経変性疾患に対し、ミクログリアを抑制することで保護効果を発揮することが知られている。また、ミノサイクリンはミトコンドリアからのチトクロムC放出を抑制することにより、細胞死を引き起こすカスパーゼ3の発現を抑制することも報告されている。

一方、放射線療法、化学療法が発達した現在においても、癌に対する治療の第一選択は手術である。また、がん患者の緩和医療において、WHO方式がん疼痛治療法が用いられており、非オピオイド性鎮痛薬の効果が充分でないがん性疼痛に対して、様々なオピオイドが用いられている。その中でも強オピオイド

であるモルヒネやフェンタニルを使用する前の段階で、弱オピオイドであるトラマドールが用いられる機会が増加している。近年麻酔科領域では、麻酔科関連薬剤の癌細胞への影響が問題視されており、基礎研究、臨床研究両面での研究報告がされている。臨床研究では、乳癌や前立腺癌の手術に際し、神経ブロックや硬膜外麻酔を用いてオピオイドの使用を減らすことによって予後改善が得られる可能性が示唆されている一方で、基礎研究においてはオピオイドが癌に対して促進的に働くという報告と逆に癌に対して抑制的に働くという報告が存在し、結論が出ていない。また、これらの研究はオピオイドとして主にモルヒネやフェンタニルが用いられており、弱オピオイドであるトラマドールに関する研究報告は稀である。

## 2. 研究の目的

(1) ミノサイクリン等が全身麻酔薬及び局所麻酔薬による神経細胞傷害を抑制できるかを研究することによって、全身麻酔及び局所麻酔による神経障害を抑制する物質発見の一助とする。

(2) トラマドールが癌細胞に与える影響を研究することによって、担癌患者におけるトラマドール使用の安全性の検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) まず、生後1-2日のC57BL/6Jマウスから初代培養神経細胞を分離・培養を用いた全身麻酔薬による細胞障害の研究を試みたが、当初の計画通り初期培養細胞を抽出できなかった。そのため、神経芽細胞腫株SH-SY5Yを用いて、代表的な局所麻酔薬であるブピバカインの神経細胞毒性を抑制できる物質の発見を試みた。ブピバカインの細胞死にはアポトーシスが関連しているという報告がある一方、アポトーシスやネクロトーシスだけでは説明できない機序で細胞死が起こっている可能性も報告されている。

モルヒネは臨床的にクモ膜下にブピバカインと併用投与されることがある一方で、SH-SY5Yにおいて細胞傷害性物質に対し、その活性酸素抑制作用、アポトーシス抑制作用を発揮したとする報告がある。また、近年ネクロトーシスという新しい細胞死のメカニズムに関する報告が増加しており、このネクロトーシスの抑制物質であるネクロスタチンについても検討した。

実験プロトコールとしては、神経ブロックや脊髄クモ膜下麻酔を模して、それぞれの薬剤を臨床使用濃度でブピバカイン1mM(臨床使用濃度)とともに6時間暴露した。MTTアッセイにてviabilityを、LDHアッセイにて細胞死を検討した。

(2) 肺癌細胞株H358を用いて、トラマドール及びその活性代謝物であるOデスメチル

トラマドールの癌細胞に対する影響を、主なオピオイドであるモルヒネ、フェンタニルとともに比較検討した。

実験プロトコールとしては、それぞれの薬剤を臨床使用濃度で24時間暴露してMTTアッセイで viability を測定した。その後、MTTアッセイで有意な結果が出たトラマドール、Oデスマチルトラマドール、モルヒネについて、フローサイトメトリーを用いて臨床的な最高濃度24時間暴露によるH358のアポトーシス及び細胞増殖能を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) ブピバカインは臨床使用濃度でもSH-SY5Yに対して強く細胞傷害性を示した。これは過去の文献と比較して顕著であった。ブピバカイン1mMの細胞傷害に対し、ミノサイクリンは有意な保護効果を示さなかった(図1)。モルヒネは、1μMで有意に保護効果を認めたものの、その差はわずかであった(図2)。ネクロスタチンはMTTアッセイにおいて容量依存性にviabilityの低下抑制効果を認めたが(図3)、細胞傷害性をみたLDHアッセイでは逆に容量依存性に細胞傷害を亢進するという結果となった(図4)。

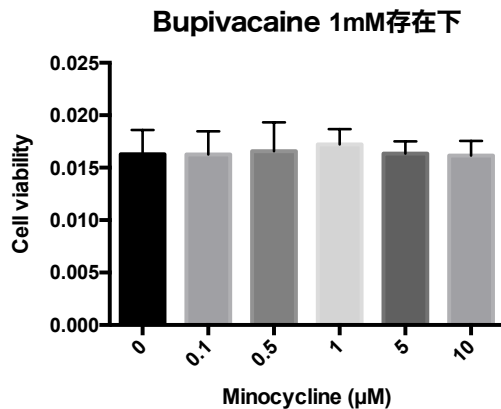


図1 ブピバカイン1mM存在下におけるミノサイクリンのSH-SY5Yのviabilityに与える作用

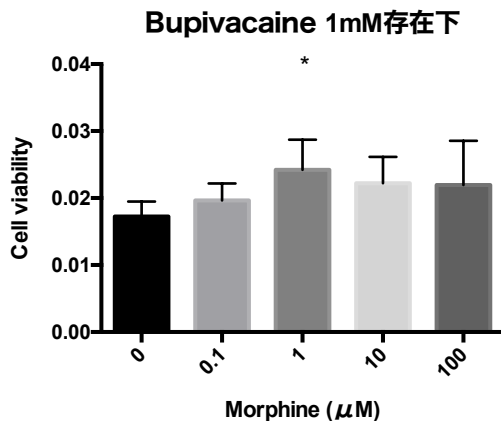


図2 ブピバカイン1mM存在下におけるモルヒネのSH-SY5Yのviabilityに与える作用 (\*  $P < 0.05$  vs.0)

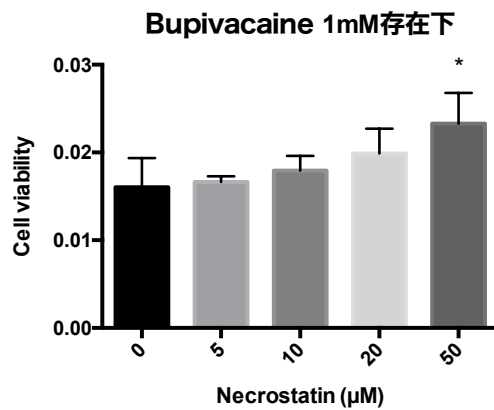


図3 ブピバカイン1mM存在下におけるネクロスタチンのSH-SY5Yのviabilityに与える作用 (\*  $P < 0.01$  vs.0)

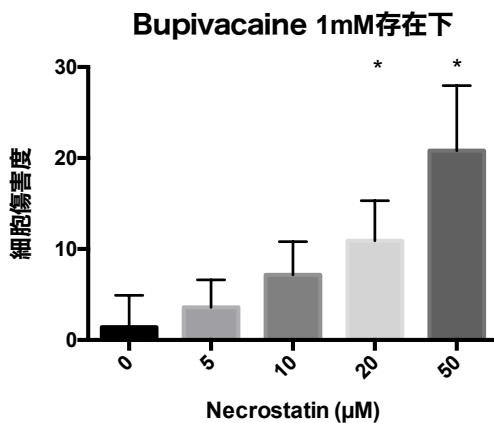


図4 SH-SY5Yに対するブピバカイン1mMの細胞傷害に与えるネクロスタチンの作用 (\*  $P < 0.01$  vs.0)

(2) 臨床的に使用される濃度のトラマドール、その活性代謝物Oデスマチルトラマドールはいずれもモルヒネと同様にH358のviabilityを低下させた(図5-7)。フェンタニルは変化させなかった。viability低下の要因としてH358のアポトーシス増加、増殖能低下を検討したが、コントロールと比較して有意差はなかった(図8,9)。viability低下の要因は明らかにできなかったが、トラマドールは臨床使用濃度で肺癌細胞株H358に対して抑制的に働くことが示唆された。

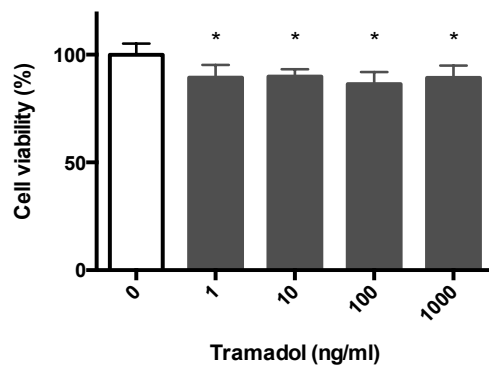


図5 H358のviabilityに対するトラマドールの作用 (\*  $P < 0.01$  vs.0)

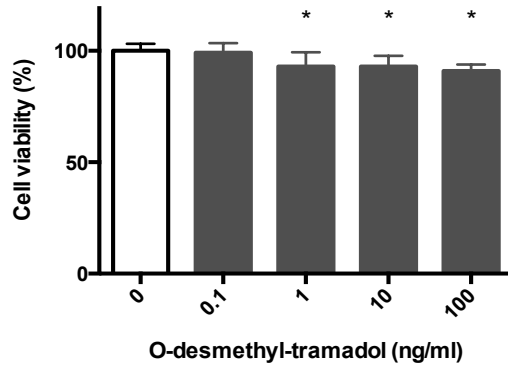


図 6 H358 の viability に対する O デスマチル  
トラマドールの作用 (\*  $P < 0.01$  vs.0)

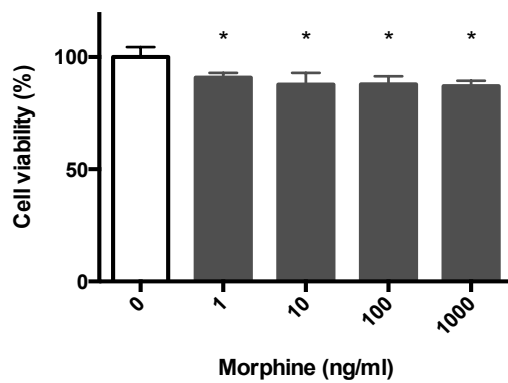


図 7 H358 の viability に対するモルヒネの作用 (\*  $P < 0.01$  vs.0)

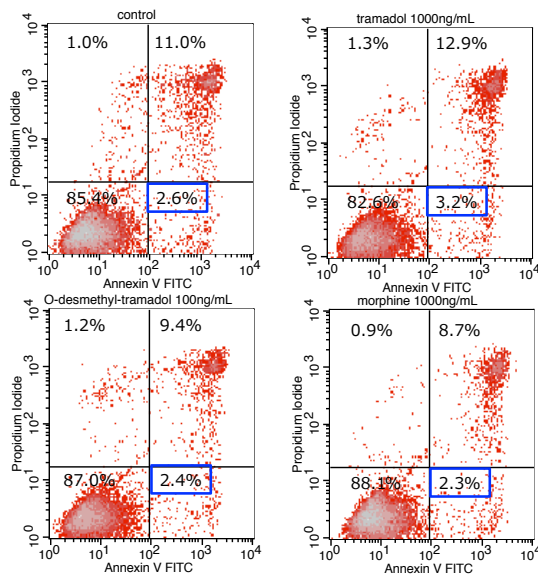


図 8 H358 に対する各薬剤によるアポトーシスの検討 (右下 (青枠) 部分がアポトーシス)

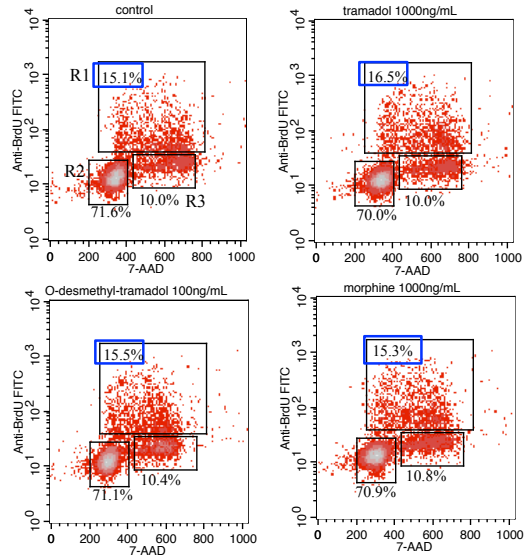


図 9 H358 に対する各薬剤による細胞増殖能の検討 (R1 (青枠) 部分が増殖期)

### 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 1 件)

西和田忠、瓦口至孝、杉田匠、植村景子、川口昌彦. トラマドールとその活性代謝物がヒト非小細胞肺癌由来細胞株 H358 のアポトーシスおよび増殖能に与える影響. 日本麻酔科学会第 63 回学術集会. 2016.5.26. マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西和田 忠 (NISHIWADA, Tadashi)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20649165

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )