

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861372

研究課題名(和文)多光子レーザー顕微鏡を用いた吸入麻酔薬による神経細胞死の機序の解明と予防法の開発

研究課題名(英文)Assessment of anesthesia-induced neurodegeneration in the developing brain and clarification of this mechanism using in vivo multi-photon calcium imaging

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：新生仔マウスにおける神経細胞死の原因が呼吸と循環の破綻によるものではなく、麻酔薬そのものによるものであることを確認し、セボフルランとプロポフォール併用麻酔がセボフルラン単独麻酔よりも危険な麻酔法であり、かつ、セボフルランとチオペンタール併用麻酔はそうではないことを証明した。これにより、小児麻酔においてセボフルランとプロポフォール併用はセボフルラン単独に比較して危険な麻酔法である可能性を提示することができた。この結果は論文で発表した。

また、多光子レーザー顕微鏡を用いて、新生仔マウス的大脑皮質の神経細胞内Ca²⁺の可視化に成功した。しかし、新生仔マウスの生存が維持できず機序の解明には至っていない。

研究成果の概要(英文)：Sevoflurane in combination with propofol caused significantly greater numbers of apoptotic neurons than sevoflurane alone in the neonatal mouse brain. However, there was no significant difference in apoptotic neuron density between the groups treated with sevoflurane alone and in combination with thiopental. Neurodegeneration observed in this study was not due to cardiopulmonary collapse. There is the possibility that the combination of sevoflurane and propofol is more harmful anesthetic technique than sevoflurane alone in pediatric patients. This result was published in the paper.

We were successful in multi-photon calcium imaging in the neonatal mouse cortex. However, the mechanism of neurodegeneration has not been elucidated because neonatal mice can not survive the experiment.

研究分野：麻酔学

キーワード：麻酔学

1. 研究開始当初の背景

年間数億人近い人が、イソフルラン、セボフルランなどの吸入麻酔薬を用いた全身麻酔によって手術を受けているが、特に、小児に対する手術件数は年々増加している。

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、セボフルラン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。

エタノールやセボフルランなどの麻酔薬は 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、神経成長の増進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が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。

ヒトでのエビデンスは欠如しているが、培養細胞や動物実験から吸入麻酔薬であるイソフルランとセボフルランは発達段階の脳においてアポトーシスによる神経細胞傷害を誘発することが明らかになっている（Tagawa T et al., in submission; George K et al., 2011）。吸入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^{2+} 放出を誘発し、細胞質とミトコンドリアの Ca^{2+} 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（Yang H et al., 2008）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完が必要であると考えられる。

多光子レーザー顕微鏡 (Multi-Photon Laser Scanning Microscopy; MPLSM) 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

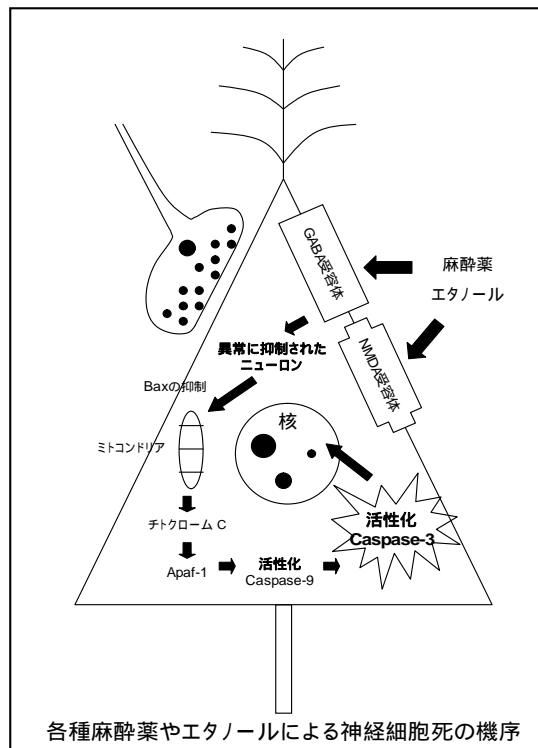
た、蛍光波長の異なる二つの蛍光色素 (Green Fluorescent Protein; GFP と Red Fluorescent Protein; RFP など) を 1 波長で同時励起する多重同時染色も可能である。これらの特性から主に脳神経領域において生きたマウスの生きた神経細胞の形態変化の深部観察に用いられてきた。MPLSM を用いれば、脳内大脳皮質の神経細胞を Oregon Green BAPTA-AM によって標識し、その細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を可視化することが可能となる。この観察法を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度がどのレベル以上になると神経細胞死が起こるかをリア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完し、吸入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。

2. 研究の目的

多光子レーザー顕微鏡を用いて、吸入麻酔薬による全身麻酔下の「生きた新生仔マウス」における「生きた神経細胞内での Ca^{2+} 濃度変化」を可視化（生体内イメージング）することにより、発達段階の脳での吸入麻酔薬による神経細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を介した情報シグナリングと神経細胞死（アポトーシス）の関係を生体内で評価する。

さらに、様々な神経細胞傷害抑制薬の反応性をリアルタイムイメージングし生体内評価することで、吸入麻酔薬による神経細胞傷害の作用機序の解明とその予防法を開発する。

3. 研究の方法



(1) 生後 7 日目のマウスを局所麻酔下に開頭し、multi-cell bolus loading (Garaschuk O et al.,2004; Stosiek C et al.,2003) により、大脳皮質に Oregon Green BAPTA-AM を注入した後 2 群に分け、それぞれ room air 自発呼吸下で等力価 (0.6MAC) のイソフルラン (1.5%) とセボフルラン (2.9%) で麻酔をかけ、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する。麻酔中はパルスオキシメーターで酸素飽和度と心拍数をモニターする。還流固定後、脳の切片をアポトーシスによる細胞死の指標である caspase-3 抗体、蛍光標識 2 次抗体と反応させ、レーザー顕微鏡でアポトーシスを起こした細胞の数を確認し、吸入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。

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

(2) イソフルラン、セボフルラン麻酔下の生後 7 日目マウスに、それぞれ作用機序の異なる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) を投与し、多光子レーザー顕微鏡により神経細胞内 Ca^{2+} 濃度変化をリアルタイムイメージングし生体内観察して、その有効性を評価する。この手法により、マウスを薬剤投与群と非投与群に分けることなく、同一マウスで経時的に神経細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を生体内評価でき、マウス個体間差を無視することができる。これにより、吸入麻酔薬による神経細胞傷害メカニズムを解明し、また、その予防法を開発する。

4. 研究成果

実験を進めるに当たって、新生仔マウスにおける神経細胞死の原因が麻酔薬による呼吸抑制からの低酸素血症及び循環抑制である可能性を排除する必要性が生じた。まず、血液ガス分析により動脈血酸素分圧の測定を試みたが、新生仔マウスが小さすぎるため、分析に必要な量の動脈血の採取は困難を極めた。そこで、パルスオキシメーターによる経皮的動脈血酸素飽和度で代替することとした。パルスオキシメーターによる測定において麻酔薬による新生仔マウスの経皮的動脈血酸素飽和度の低下は認められず、また、ドップラー血流計による脳血流の測定においても脳血流量の低下も認めなかった。これ

により、新生仔マウスにおける海馬と脳梁膨大後部皮質での神経細胞死の原因が麻酔薬による呼吸抑制と循環動態の破綻によるものではなく、麻酔薬そのものによるものであることを確認し、プロポフォルとセボフルラン併用の麻酔がセボフルラン単独の麻酔よりも危険な麻酔法であり、かつ、チオペンターとセボフルラン併用の麻酔はそうではないことを証明した。これにより、プロポフォルとセボフルラン併用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。この結果は論文で発表することができた (Tagawa T et al. Sevoflurane in combination with propofol, not thiopental, induces a more robust neuroapoptosis in the neonatal mouse brain. J Anesth. 2014; 28 :815-820.)

次に、多光子レーザー顕微鏡を用いた、吸入麻酔薬による全身麻酔下の ' 生きた新生仔マウス ' における ' 生きた神経細胞内での Ca^{2+} 濃度変化 ' の可視化 (生体内イメージング) であるが、神経細胞を同定し、細胞内 Ca^{2+} のリアルタイムイメージングは成功した。しかし、実験時間中はパルスオキシメーターで酸素飽和度と心拍数を、ドップラー血流量計で脳血流量をモニターしているものの、新生仔マウスの生存維持が困難を極めた。multi-cell bolus loading (Garaschuk O et al.,2004; Stosiek C et al.,2003) による、大脳皮質への Oregon Green BAPTA-AM の注入のための開頭作業の侵襲がその原因と推測された。そこで、開頭せずに経頭蓋骨的に Oregon Green BAPTA-AM を注入して実験したが、おそらく頭蓋内圧の上昇により、生存時間の延長には至らなかった。現在、Oregon Green BAPTA-AM に代わって、経皮的または腹腔内投与により大脳皮質神経細胞内 Ca^{2+} を標識できる物質を探索及び開発中である。

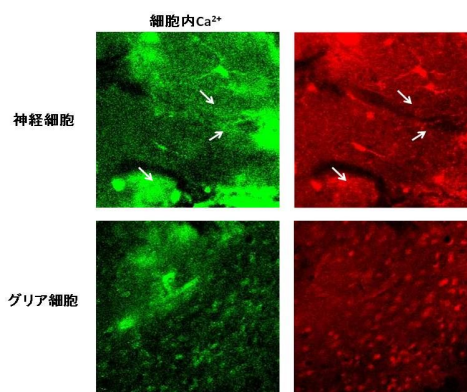


図2 多光子レーザー顕微鏡による吸入麻酔下生後7日目マウスの神経細胞とグリア細胞、および細胞内 Ca^{2+} のリアルタイムイメージング

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 2 件)

すべて査読有

1. Tagawa T, Sakuraba S, Mizoguchi A.
In reply: Is propofol more neurotoxic in
the developing brain ? J Anesth. 2015;
29: 314.
2. Tagawa T, Sakuraba S, Kimura K,
Mizoguchi A. Sevoflurane in
combination with propofol, not
thiopental, induces a more robust
neuroapoptosis in the neonatal mouse
brain. J Anesth. 2014; 28: 815-820.

〔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：