

脳虚血に対するペントバルビタール, ミダゾラムの 保護効果の機序

—アポトーシス抑制の可能性—

森本 裕二*, 森本 佳子*, 劔物 修*
柴野 岳樹*, 四釜 裕睦*

はじめに

バルビツレート, ベンゾジアゼピン誘導体などの一部の静脈麻酔薬には何らかの脳保護効果があることが指摘されている^{1,2)}。その保護効果の機序は, これまで代謝の抑制とされてきた³⁾。しかし, 最近の報告では, 代謝の抑制以外の機序の関与が示唆されてるが, いまだその機序については確定していない^{2,4)}。

一方, 昨今, 前 (全) 脳虚血で見られる遅発性神経細胞死や, 局所脳虚血での penumbra 領域においてネクローシス以外にアポトーシスの形態をとる細胞が見られることが報告されている^{5,6)}。ネクローシスは主に細胞内エネルギー欠乏により生じるため, 代謝の抑制がネクローシスの抑制につながりうる。しかし, アポトーシスは細胞内カルシウム濃度の増加, 遺伝子の発現, ある種の蛋白分解酵素 (システインプロテアーゼ: caspase) の活性化など, 細胞内カスケードの活性化によって生じる⁷⁻⁹⁾。すなわち, 代謝抑制ではなく, これらカスケード抑制がアポトーシス抑制につながる可能性がある。そこで著者らは, バルビツレートおよびベンゾジアゼピン誘導体の脳保護効果の機序が, 上記カスケードを抑制する結果としてアポトーシスを抑制するという仮説をたて以下のような研究を行った^{10,11)}。

対象と方法

神経系細胞のモデルとしてラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC 12細胞を使用し, 血清除去によりアポトーシスを誘導した。このモデルではネクローシスは起こらず, 選択的にアポトーシスが誘導される¹²⁾。実際, 用いた細胞でもアポトーシスが実際に起きている事を, DNA のアガロースゲル電気泳動と細胞の蛍光染色で確かめた。蛍光染色には Hoechst は33342を用いて DNA を染色し, クロマチンや核の形態を観察した。

バルビツレート, ベンゾジアゼピン誘導体としてペントバルビタール, ミダゾラムをそれぞれ使用した。培養皿の濃度でペントバルビタールは 0.5, 5, 50 $\mu\text{g/ml}$, ミダゾラムは 0.12, 1.2, 12 $\mu\text{g/ml}$ となるように調整した。これら濃度は, ペントバルビタールが 10-25 $\mu\text{g/ml}$ の血漿濃度で麻酔作用¹³⁾, 50 $\mu\text{g/ml}$ 程度で burst supresson¹⁴⁾, ミダゾラムの 1.2 $\mu\text{g/ml}$ で鎮静効果¹⁵⁾ が得られるという報告に基づいて決定した。血清を除去して, 薬物を投与後, 37°C, 飽和湿度, 5% 二酸化炭素 / 95% 空気の環境下で 4 日間培養した。薬物の効果は以下の 2 つの測定で判定した。

1) 細胞傷害率の定量化

細胞がアポトーシスを起こすと, 最終的には細胞膜破壊を伴う細胞死に至る。その結果乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase: LDH) が細胞外に流出する。細胞内と細胞外に流出した LDH 活性の総和に対する後者の割合が細胞傷害率とな

*北海道大学医学部侵襲制御医学講座

る。LDH 活性は Boehringer Mannheim 社製の細胞毒性検出キットを使用し測定した。

2) アポトーシス細胞の割合

細胞をエタノールで固定して propidium iodide で DNA を染色し, flow cytometry で DNA 含量を測定することにより細胞周期解析を行った。アポトーシス細胞が G1 期より DNA 含量が低い細胞として検出されるため, 全体の細胞数に対するこの領域の細胞数の割合がアポトーシス細胞の割合となる。

結果は平均±標準偏差で表わした, 統計は, 一元配置の分散分析で行い, 有意な場合 post hoc テストとして Student-Neuman-Keuls テストを用いた。P 値が 0.05 以下で有意と見なした。

結 果

(1) アポトーシスの証明

血清除去 1 日後から DNA の電気泳動で梯子状 (ラダー) パターンを認めた。これは DNA がヌクレオソーム単位に断片化されたことを表わしており, アポトーシスに最も特徴的な所見のひとつである。また蛍光染色でも, クロマチン凝集, 核の断片化というアポトーシスに特徴的な所見を呈した細胞の経日的増加が認められた。以上より著

者らの細胞系でも血清除去によりアポトーシスが誘導されたと判断した。

(2) 麻酔薬の影響

血清除去 4 日後の, 対照群 (= ペントバルビタール非投与) の細胞傷害率は $53.9 \pm 24.3\%$ であった (図 1)。ペントバルビタールは濃度依存性に細胞傷害率を低下させ, $50 \mu\text{g/ml}$ 群では対照群と比較して有意差を認めた (図 1)。アポトーシス細胞の割合は血清除去 4 日後の対照群で $94.9 \pm 6.3\%$ であった (図 2)。ペントバルビタール投与によりアポトーシス細胞の割合は濃度依存性に低下し, $50 \mu\text{g/ml}$ 群では対照と比較して有意差を認めた (図 2)。

一方, ミダゾラムは細胞傷害率, アポトーシス細胞の割合のどちらに対しても有意な効果をもたらさなかった (図 1, 2)。

考 察

血清除去により PC 12 細胞でアポトーシスが生じる機序として, 1) 活性酸素産生¹⁶⁾, 2) caspase の活性化¹⁷⁾, 3) c-fos, c-jun などの前初期遺伝子の発現¹⁸⁾, および 4) 神経成長因子欠乏による神経成長因子受容体の脱リン酸化¹⁹⁾などが考えられている。一方, 実際の脳虚血でも, 活性酸素産生²⁰⁾, caspase の活性化²¹⁾, 前初期遺伝子の発

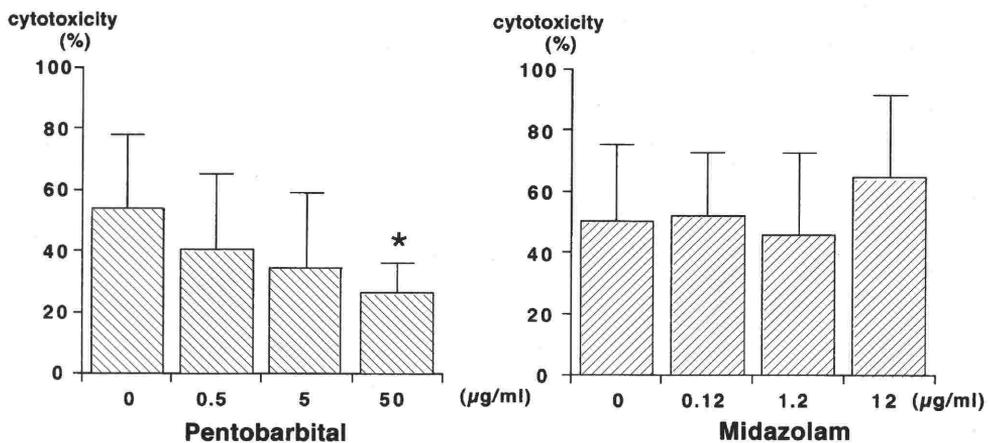


図 1 細胞傷害率 (文献¹¹⁾より一部引用改編)

左: ペントバルビタール (n=12)

右: ミダゾラム (n=12)

p=0.03 by one way ANOVA

p=0.30 by one way ANOVA

*; p<0.05 vs control (=0 µg/ml of pentobarbital)

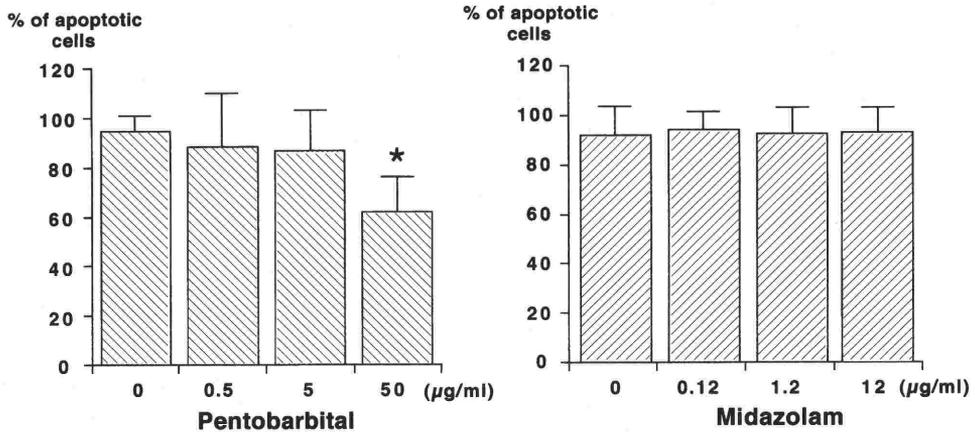


図2 アポトーシス細胞の割合 (文献¹¹)より一部引用改編)

左: ペントバルビタール (n=9)

p<0.01 by one way ANOVA

*; p<0.05 vs control (=0 µg/ml of pentobarbital)

右: ミダゾラム (n=8)

p=0.98 by one way ANOVA

現²²), および神経成長因子減少²³)などが生じることが報告されている。すなわち, 血清除去によりPC 12細胞でアポトーシスが生じる経路と, 実際の脳虚血で神経細胞が細胞死に至る経路とは, 多くの点で共通点があると考えられる。

バルビツレートは遊離脂肪酸やアラキドン酸を産生抑制^{24, 25}), 脂質過酸化反応を抑制²⁶)するという報告がある。又, 砂ネズミの前脳虚血モデルでペントバルビタールが熱ショック蛋白の発現を抑制するという報告がある²⁷)。Caspaseや中枢神経系での神経成長因子に及ぼすバルビツレートの影響に関する報告は見当たらないが, ペントバルビタールがこれらの因子に作用して, アポトーシスを抑制した可能性が考えられる。

PC 12細胞はベンゾジアゼピンレセプタを有するため, ベンゾジアゼピン誘導体薬物の細胞レベルでの作用を研究するモデルとして広く利用されている²⁸)。したがって, 今回の結果は, ベンゾジアゼピンレセプタの賦活がPC 12細胞の血清除去によるアポトーシス進行には関係がない事を示唆したものと思われる。一方, 最近ではベンゾジアゼピン誘導体薬物の脳保護効果の機序としてGABAAレセプタ/Cl⁻チャネル複合体との関連が示唆されている²⁹)。PC 12細胞のベンゾジアゼピンレセプタは末梢型でありGABAAレセプタ/Cl⁻チャネル複合体とのリンクはない²⁸)。した

がって, 今後この複合体を有した新たなモデルで再検証する必要があると思われる。

結論として, ペントバルビタールの脳保護効果の機序として, アポトーシスの抑制が関係している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Schwartz RD, Yu X, Katzman MR, et al : Diazepam, given postischemia, protects selectively vulnerable neurons in the rat hippocampus and striatum. *J Neurosci* 15 : 529-539, 1995
- 2) Warner DS, Takaoka S, Wu B, et al : Electroencephalographic burst suppression is not required to elicit maximal neuroprotection from pentobarbital in a rat model of focal cerebral ischemia. *Anesthesiology* 84 : 1475-1484, 1996
- 3) Michenfelder JD, Theye RA : The effects of anesthesia and hypothermia on canine cerebral ATP and lactate during anoxia produced by decapitation. *Anesthesiology* 33 : 430-439, 1970
- 4) Todd MM, Warner DS : A comfortable hypothesis re-evaluated. Cerebral metabolic depression and brain protection during ischemia. *Anesthesiology* 76 : 161-164, 1992
- 5) Nitatori T, Sato N, Waguri S, et al : Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 15 : 1001-1011, 1995
- 6) Charriaut-Marlangue C, Margail I, Represa A, et al : Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow*

- Metab 16 : 186-194, 1996
- 7) Trump BF, Berezsky IK : Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 9 : 219-228, 1995
 - 8) Hettis SW : To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama* 279 : 300-307, 1998
 - 9) Nagata S : Apoptosis by death factor. *Cell* 88 : 355-365, 1997
 - 10) Morimoto Y, Morimoto Y, Kemmotsu O, et al : Effect of pentobarbital and midazolam on apoptosis in neuronal cells. *Crit Care Med* 26 : A36, 1998
 - 11) Morimoto Y, Morimoto Y, Nishihira J, et al : Pentobarbital inhibits apoptosis in neuronal cells. *Crit Care Med* (In Press)
 - 12) Batistatou A, Greene LA : Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: Correlation with suppression of endonuclease activity. *J Cell Biol* 115 : 461-471, 1991
 - 13) Fukumoto H, Fukumoto K : A case of fatal pentobarbital poisoning. *Nippon Hoigaku Zasshi* (Japanese journal of legal medicine) 24 : 68-72, 1970
 - 14) Winer JW, Rosenwasser RH, Jimenez F : Electroencephalographic activity and serum and cerebrospinal fluid pentobarbital levels in determining the therapeutic end point during barbiturate coma. *Neurosurgery* 29 : 739-741, 1991
 - 15) O'Donnell NG, McSharry CP, Wilkinson PC, et al : Comparison of the inhibitory effect of propofol, thiopentone and midazolam on neutrophil polarization in vitro in the presence or absence of human serum albumin. *Br J Anaesth* 69 : 70-74, 1992
 - 16) Satoh T, Sakai N, Enokido Y, et al : Survival factor-insensitive generation of reactive oxygen species induced by serum deprivation in neuronal cells. *Brain Res* 733 : 9-14, 1996
 - 17) Troy CM, Stefanis L, Greene LA, et al : Nedd2 is required for apoptosis after trophic factor withdrawal, but not superoxide dismutase (SOD1) downregulation, in sympathetic neurons and PC12 cells. *J Neurosci* 17 : 1911-1918, 1997
 - 18) Mesner PW, Epting CL, Hegarty JL, et al : A timetable of events during programmed cell death induced by trophic factor withdrawal from neuronal PC12 cells. *J Neurosci* 15 : 7357-7366, 1995
 - 19) Tagliatalata G, Hibbert CJ, Hutton LA, et al : Suppression of p140trkA does not abolish nerve growth factor-mediated rescue of serum-free PC12 cells. *J Neurochem* 66 : 1826-1835, 1996
 - 20) Siesjö BK, Katsura K, Kristián T : The biochemical basis of cerebral ischemic damage. *J Neurosurg Anesth* 7 : 47-52, 1995
 - 21) Chen J, Nagayama T, Jin K, et al : Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 18 : 4914-4928, 1998
 - 22) Neumann-Haefelin T, Wiessner C, Vogel P, et al : Differential expression of the immediate early genes c-fos, c-jun, junB, and NGFI-B in the rat brain following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 14 : 206-216, 1994
 - 23) Lee TH, Kato H, Chen ST, et al : Expression of nerve growth factor and trkA after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29 : 1687-1696, 1998
 - 24) Shiu GK, Nemoto EM : Barbiturate attenuation of brain free fatty acid liberation during global ischemia. *J Neurochem* 37 : 1448-1456, 1981
 - 25) Hamm TF, Dorman RV : Arachidonic acid metabolism in gerbil cerebra: effects of ischemia and pentobarbital. *J Neurosci Res* 26 : 488-494, 1990
 - 26) Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, et al : Possible molecular mechanisms of barbiturate-mediated protection in regional cerebral ischemia. *Acta Neurol Scand* (Suppl) 64 : 150-151, 1977
 - 27) Kawagoe J, Abe K, Kogure K : Reduction of HSP70 and HSC70 heat shock mRNA induction by pentobarbital after transient global ischemia in gerbil brain. *J Neurochem* 61 : 254-260, 1993
 - 28) Ohara-Imaizumi M, Nakazawa K, Obama T, et al : Inhibitory action of peripheral-type benzodiazepines on dopamine release from PC12 pheochromocytoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 259 : 484-489, 1991
 - 29) Kirsch JR, Traystman RJ, Hurn PD : Anesthetics and cerebroprotection: experimental aspects. *Int Anesthesiol Clin* 34 : 73-93, 1996