

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10504

研究課題名(和文) 発達期脳に対して吸入麻酔薬が及ぼす毒性の原因と対策

研究課題名(英文) The causes and measures of neural toxicity induced by inhalational anesthesia exposure on the developing brain

研究代表者

合谷木 徹 (Goyagi, Toru)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：30302277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：幼若脳に麻酔薬を暴露すると、神経細胞に影響を与え、成長後の行動異常や学習機能の低下に関連することが知られている。麻酔薬暴露の1日前のプレコンディショニング(PC)がその毒性に関連するのかを検討した。10%酸素PCが3%セボフルランPCよりも強く、その後の神経変性に影響を与え、8方向性迷路での改善とNucN染色での正常細胞数の増加に関連した。デクスメトミジンのPCでは、セボフルラン暴露による認知機能低下を改善、成長後の正常細胞数の割合を増加させることが示唆された。新生児のセボフルラン暴露による神経毒性は、PCにより減弱させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that anesthetic exposure induces neural apoptosis and degeneration in neonatal immature brain, resulted in behavioral disorder and decline of learning ability after growth. We examined whether preconditioning (PC) with sevoflurane or hypoxia (10% oxygen) attenuated apoptosis and long-term neural degeneration in neonatal rats exposed to 3% sevoflurane. PC with 2% Sevoflurane or 10% oxygen before exposure to 3% Sevoflurane for 4 h would attenuate long-term cognitive dysfunction in neonatal rats. Moreover, PC of dexmedetomidine improved the spatial memory, and increased the normal cells in the brain 6 weeks after anesthesia exposure. These results indicated that PC is useful to ameliorate the neural toxicity induced by anesthetics in neonatal rats.

研究分野：麻酔科学、神経科学

キーワード：anesthetic toxicity preconditioning neural apoptosis developing brain neural degeneration neonatal brain

### 1. 研究開始当初の背景

麻酔は、すべての年齢で必要不可欠で、高齢者では術後の認知機能障害が、新生児のような脳の成長発達期に麻酔薬に暴露されると、その後の脳の発達・学習障害を起こすことが知られており、後ろ向きの臨床研究では幼少時の麻酔手術の経験が学習障害や行動障害の危険因子であることが示されている。動物実験では麻酔薬に暴露されたラットの脳に広範囲の変性と成長後の学習機能障害が起きていることが示されている。このメカニズムは明らかではないが、麻酔薬は NMDA 受容体の拮抗作用や GABA<sub>A</sub> 受容体の促進やカリウムチャンネルの活性化などで作用している (Franks1994) ので、それらが関連していると推測されている。この麻酔薬の中でも静脈麻酔薬のプロポフォールやミダゾラム、吸入麻酔薬であるイソフルランのデータが多い (Andreas2008)。いずれの報告でも短期的には暴露された後、脳の変性がおきるが、長期的な行動へ影響には異論があり一致していない。現在多く臨床使用されている吸入麻酔薬はセボフルランであるが、幼少時にセボフルラン麻酔を受けた後に行動の変化、不眠、食欲不振などの報告から、発達障害に関連があるのではないかと推測される。動物実験ではセボフルランに暴露されたマウスでは、その後の脳ではアポトーシスが起こり、学習記憶障害が起きる。

一方、新生児に低酸素暴露された時に誘導される虚血耐性によりその後の脳虚血保護効果がみられる。さらに、同時投与されたフリーラジカルスカベンジャーである水素ガス、さらに前投与されたセボフルランにより麻酔薬による毒性の減弱することが示されている。キセノンは脳保護効果を有しており、前投与によりその後の麻酔薬によるアポトーシスを減弱させる。ラットでイソフルラン麻酔時にデクスメトミジンを併用投与した際には、イソフルランによる障害作用を減弱させる。また、エリスロポイエチンは新生児の低酸素性脳障害を減弱させる。このように麻酔薬の神経毒性を減弱させる可能性のあるものは多数みられるが、セボフルラン暴露前に与えられた種々の薬物や状況 (プレコンディショニング) が、その後のセボフルラン暴露による神経変性に影響を与えるのか、詳細は未だ不明であり、早急に研究開発が必要である。

このため、麻酔薬によって脳の変性や学習機能障害がどの程度起きるのか、その原因、防止策を講じるのは、これからの新生児の麻酔に必要な不可欠であり重要な課題である。

### 2. 研究の目的

昨年度までの基盤研究 (C) により、酸素濃度 30% より、21% 下での 3% セボフルランの 4 時間、6 時間暴露により急性期のアポトーシスが增加し、長期的な認知機能障害に影響が出る可能性が判明した。この事実を発展

させ、セボフルラン暴露の前に、低濃度酸素、キセノン、空気、高濃度酸素、及びセボフルランを予め短時間暴露させることにより、その後の 3% セボフルラン暴露による短期的な脳の変性と長期的な認知機能への影響、及び脳の組織学的、電気生理学的変化を検討し、セボフルラン暴露以前に与えられたプレコンディショニング効果があるのか判明させる。

### 3. 研究の方法

(1) 生後 7 日目のラットへの 3% セボフルラン暴露による短期的・長期的組織学的変化と学習機能へ及ぼす影響 - プレコンディショニングの効果

1. 生後 6 日目の雄性 Wistar ラットを用いる。
2. プレコンディショニング: 6 日ラットに下記をクリアアクリルボックス内で 1 時間暴露、30 分空気に戻して、再度 1 時間暴露後に母親のケージに再度戻す (各 n=5)。

グループ: 低濃度酸素 (酸素 10%)  
低濃度酸素 (酸素 15%)  
水素 15% + 空気  
高濃度酸素 (酸素 90%)  
セボフルラン 2% + 酸素 30%  
デクスメトミジン 10 µg/kg  
デクスメトミジン 10 µg/kg 投与 + 低濃度酸素  
なし

3. 翌日生後 7 日目に吸入麻酔薬セボフルラン 3% の暴露を、酸素 50% 下で 4 時間、6 時間吸入させる。

4. 麻酔後は覚醒させ母親のケージに戻す。
5. 生理学的評価: 別の生後 7 日のラットで麻酔薬による呼吸状態を評価するため、麻酔開始 4, 6 時間直後に血液を採取して血液ガスを測定する。

6. 組織学的評価: 麻酔暴露終了直後に、ペントバルビタール 100mg/kg を腹腔内に投与して、パラホルムアルデヒドを心腔内に投与後、生食を投与して脳を採取固定する。

7. activated-caspase 3 染色を行う。activated-caspase 3 染色陽性は、アポトーシスの最終カスケードのカパーゼ 3 はエンドヌクレアーゼを活性化させアポトーシスの細胞死に影響する。

8. 海馬 CA1、歯状回における陽性細胞数を計測する。

9. 学習機能評価: 8 方向放射状迷路を麻酔暴露 3 週後に学習させ 6 週後に再度評価する。5 週後に恐怖条件付けテストを学習させ 6 週後に再評価を行う。

10. 8 方向放射状迷路: 8 方向迷路で作業エラーと正選択数を計測する。

11. 恐怖条件付けテスト: 白色雑音を聞かせ、同時に足に電気ショックを与え、翌日に同じケージに戻した時の freezing する時間を計測、さらに 24 時間後に違うケージで音のみ聞かせた場合に freezing する時間を計測する。

12.6 週目に学習機能評価をした後、ペントバルビタール麻酔下に灌流して脳を採取する。  
 13. 長期的な免疫組織学的評価：NeuN(Neural nuclei)染色を行う。新生細胞と成熟細胞がそれぞれ染色でき、神経新生の評価を行う。

(2) 生後7日目のラットへの3%セボフルラン暴露による短期的・長期的組織学的変化と学習機能へ及ぼす影響 - プレコンディショニングの用量反応効果

1. 生後6日の雄性Wistarラットを使用し、下記のグループに分ける。
2. グループ：  
 Control: PC(-) + Sevo 暴露  
 Sham: PC(-)+ Sevo (-)  
 Dex 2 : デクスメデトミジン 2μg/kg  
 Dex 20: デクスメデトミジン 20μg/kg  
 Dex 200: デクスメデトミジン 200 μg/kg
3. 翌日の生後7日後に吸入麻酔薬セボフルラン3%の暴露を、酸素30%下で4時間吸入させる。
4. 学習機能評価：麻酔暴露3週後にモーリス水迷路を施行し、6週後に再度モーリス水迷路を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1-1) 生存率

	生存	死亡
10%O2-4h	4	2
10%O2-6h	4	0
15%O2-4h	5	1
15%O2-6h	4	0
90%O2-4h	5	0
90%O2-6h	5	0
H21.3%-4h	2	4
H21.3%-6h	3	1
precon(-)-4h	1	2
precon(-)-6h	5	2
Sevo2%-4h	4	1
Sevo2%-6h	4	1
Dex20μg/kg+10% O2-4h	5	0
Dex20μg/kg+10% O2-6h	4	1
Dex20μg/kg-4h	3	2
Dex20μg/kg-6h	3	2

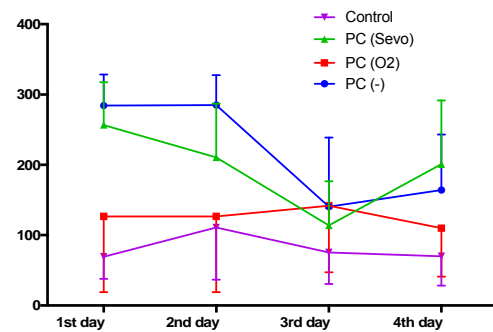
##### (1-2) カスパーゼ3陽性細胞数

Preconditioning			Lt	Rt	
4h	1	CA1	0	1	
		DG	0	1	
	2	CA1	1	1	
		DG	4	0	
Pre con (-)	1	CA1	0	2	
		DG	2	1	
	2	CA1	3	2	
		DG	5	3	
	6h	3	CA1	0	1
			DG	0	1
		4	CA1	1	3
			DG	2	2
			CA1	2	0
	DG	0	1		
10% O2	1	CA1	0	0	
		DG	0	0	
	4h	2	CA1	0	0
			DG	0	0
		3	CA1	0	0
			DG	0	0
	4	CA1	0	0	
		DG	0	0	
	6h	1	CA1	0	0
			DG	0	0
		2	CA1	0	0
			DG	0	0
3		CA1	0	0	
		DG	0	0	
4		CA1	0	0	
		DG	0	0	
15% O2	4h	1	CA1	0	0
			DG	1	0
		2	CA1	0	0
			DG	0	0
	6h	3	CA1	0	0
			DG	0	0
		4	CA1	0	0
			DG	0	0
	5	1	CA1	0	1
			DG	0	0
		2	CA1	0	0
			DG	0	0
3	1	CA1	0	0	
		DG	0	0	
	2	CA1	0	0	
		DG	0	0	
3	CA1	0	0		
	DG	0	0		

	4	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	1	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	2	CA1	0	1					
		DG	3	6					
4h	3	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	4	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	5	CA1	2	0					
		DG	3	1					
90% O2	1	CA1	2	0					
		DG	0	0					
	2	CA1	0	2					
		DG	3	1					
6h	3	CA1	1	2					
		DG	1	2					
	4	CA1	1	3					
		DG	2	1					
	5	CA1	2	2					
		DG	1	4					
	1	CA1	0	0					
		DG	1	0					
4h	2	CA1	0	0					
		DG	0	2					
H2	1	CA1	0	0					
		DG	0	2					
6h	2	CA1	0	2					
		DG	0	0					
	3	CA1	3	1					
		DG	1	1					
	1	CA1	0	0					
		DG	0	0					
4h	2	CA1	0	0					
		DG	2	0					
	3	CA1	/	0					
		DG	/	0					
Sevo 2%	1	CA1	1	0					
		DG	2	0					
	2	CA1	0	1					
		DG	1	0					
6h	3	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	4	CA1	1	2					
		DG	3	2					
Dex 20 μ/kg	4h	1	CA1	0	0				
			DG	0	0				
	2	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	3	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	1	CA1	0	1					
		DG	1	1					
	2	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	3	CA1	0	0					
		DG	1	1					
	4	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	5	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	1	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	2	CA1	1	1					
		DG	0	0					
	3	CA1	0	0					
		DG	2	1					
	4	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	5	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	6h	1	CA1	0	0				
		DG	0	0					
	2	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	3	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	4	CA1	0	0					
		DG	2	1					
	5	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	6h	1	CA1	0	0				
		DG	0	0					
	2	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	3	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	4	CA1	0	0					
		DG	0	0					
	5	CA1	0	0					
		DG	0	0					

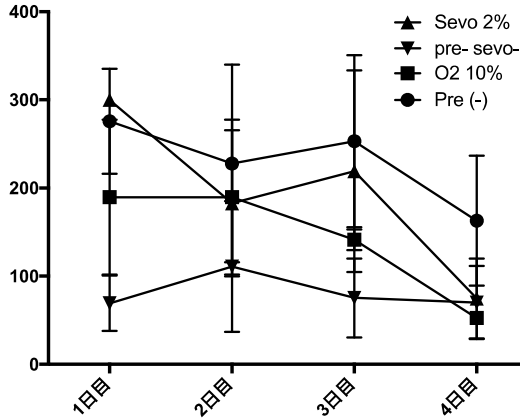
カスパーゼ3陽性細胞数には差が見られなかった。

(1-3) 8方向迷路 到達時間  
4時間暴露 到達時間



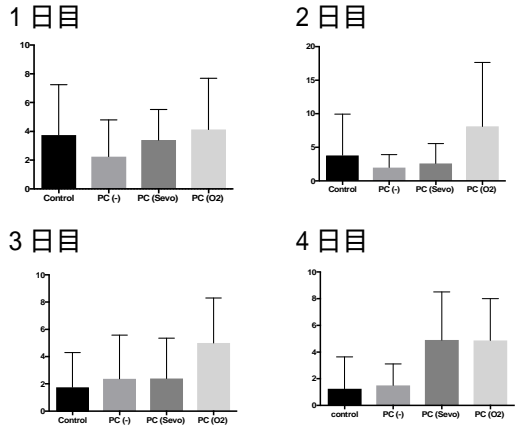
10%O<sub>2</sub>暴露のプレコンディショニングは、改善させた。セボフルラン暴露のプレコンディショニングは改善傾向だが、有意ではなかった。

6 時間暴露 到達時間



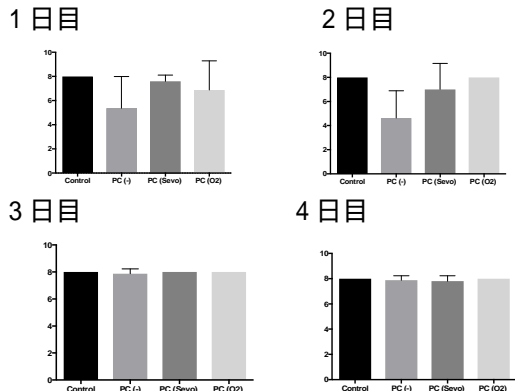
同様に 10%O<sub>2</sub> 暴露のプレコンディショニングは、改善させた。セボフルラン暴露のプレコンディショニングは、4 日目に有意に改善させた。

4 時間暴露 作業エラー



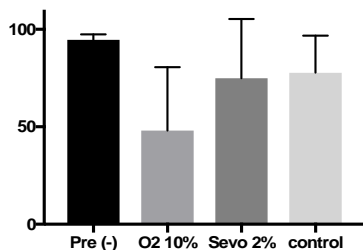
4 日目にプレコンディニング群で増加した。

4 時間暴露 正選択数



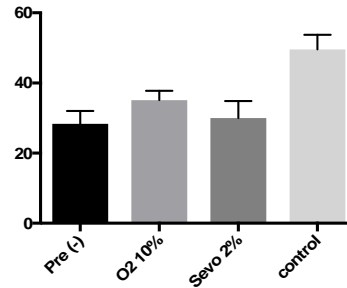
1, 2 日目でセボフルランと 10%O<sub>2</sub> のプレコンディショニングは有意に改善した。

(1-4) Fear conditioning test



有意差はなかった。

(1-5) NueN 染色 (海馬 CA1)

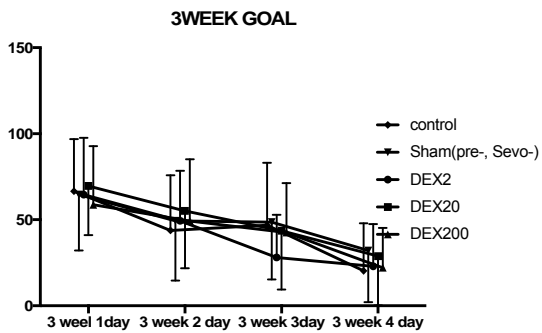


10%O<sub>2</sub> のプレコンディショニングは有意に細胞数を増加させた。

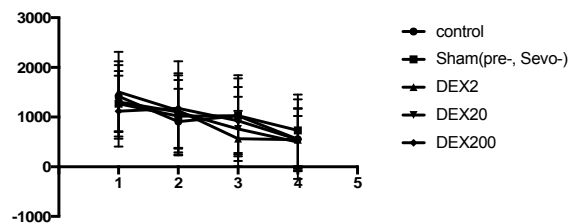
(1-6) まとめ

10%O<sub>2</sub> によるプレコンディショニングはセボフルラン暴露による神経変性を減弱させた。短時間のセボフルラン暴露によるプレコンディショニングも改善させる可能性があった。

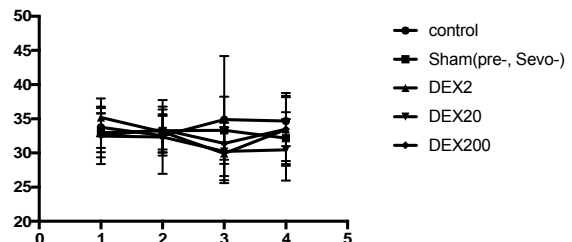
(2-1) 3 週目の水迷路



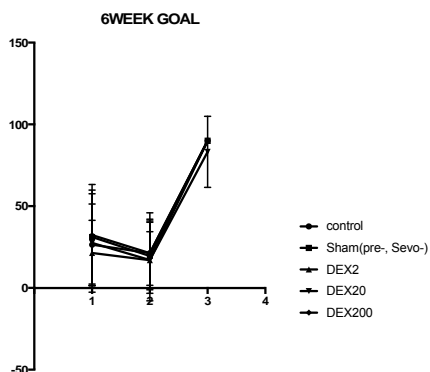
3WEEK distance



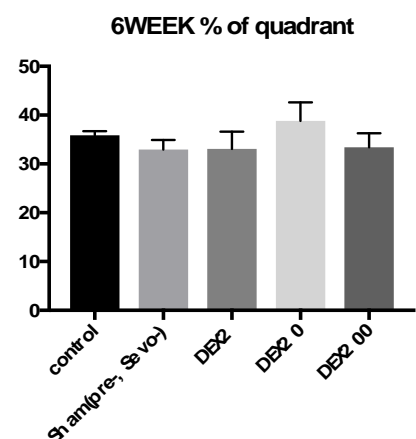
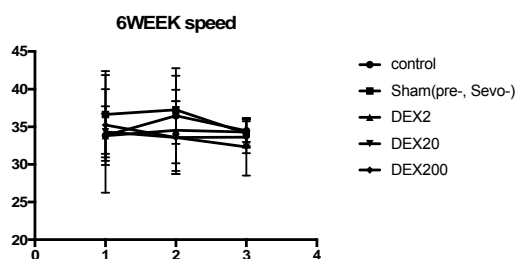
3WEEK speed



(2-2) 6週目の水迷路



3週目の学習効果は各群で同等であったが、6週目の記憶保持に関しては占有時間率においてDEX20で有意に改善されていたので、デ



クスメドミジンによる改善効果が示唆された。

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 2件)

1. Goyagi T. The effects of preconditioning on the long-term cognitive function after sevoflurane exposure in neonatal rats. 28th

International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & 13th International Conference on Quantification of Brain Function with PET, 2017

2. 水野香菜、合谷木徹、西川俊昭. 新生ラットのセボフルラン暴露による長期的認知機能低下に対する低酸素プレコンディショニングの効果. 日本麻酔科学会. 北海道・東北支部第7回学術集会. 2017 [図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

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

合谷木 徹 (GOYAGI Toru)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号: 30302277

(2) 研究分担者

木村 哲 (KIMURA Tetsu)  
秋田大学・医学系研究科・講師  
研究者番号: 00312702

西川 俊昭 (NISHIKAWA Toshiaki)  
秋田大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 50156048