

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791734

研究課題名(和文) 吸入麻酔の種類による幼若脳の障害の発現型及び程度の比較

研究課題名(英文) Neonatal desflurane exposure induces more robust neuroapoptosis than do isoflurane and sevoflurane and impairs working memory.

研究代表者

児玉 光厳 (Kodama, Mitsuyoshi)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・その他部局等・助教)

研究者番号：00597528

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)：現在臨床において一般的に用いられている3種類の吸入麻酔薬セボフルラン、イソフルラン、デスフルランにおいてはデスフルランの発達期脳に対する毒性が著しく強い事を報告した。水素の混合投与によりセボフルランによる発達期脳に対する毒性を軽減することを報告した。幼若期のセボフルラン暴露は成長後の母性行動を障害することを報告した。

研究成果の概要(英文)：1. In an animal model, neonatal desflurane exposure induced more neuroapoptosis than did sevoflurane or isoflurane and impaired working memory, suggesting that desflurane is more neurotoxic than sevoflurane or isoflurane. 2. Inhalation of hydrogen gas robustly decreased neuronal apoptosis and subsequent cognitive impairments caused by neonatal exposure to sevoflurane. 3. In an animal model, sevoflurane exposure in the developing brain caused serious impairment of maternal behaviors when fostering their pups, suggesting pervasive impairment of brain functions including innate behavior essential to species survival.

研究分野：麻酔学

キーワード：麻酔薬 発達期脳神経 毒性

## 1. 研究開始当初の背景

近年まで麻酔薬による作用は可逆的であり遺伝子発現、蛋白発現には影響は及ぼさないと信じられてきた。しかし 2003 年に Jevtovic-Todorovic らはラットを用い、通常の臨床で新生児、幼児に使用されている麻酔薬の混合でアポトーシスが起き、成長後の記名力障害が起きることを発表した。2007 年には Fredriksson らが N-methyl-D-aspartate(NMDA) レセプターアンタゴニストと  $\gamma$ -aminobutyric acid type A(GABA<sub>A</sub>) レセプターアゴニストの併用により新生児のアポトーシスを引き起こし、同様の記名力障害を起こすと報告した。また 2009 年に我々のグループは吸入麻酔薬であるセボフルラン暴露が生後 6 日目のマウスの脳にアポトーシスを惹起し、成長後の記名力障害のみならず社会行動の異常を起こすことを発表した。特にこの社会行動異常は自閉症に関わっている可能性を強く示唆するものであった。また 2009 年に Wilder らは人においても 4 歳に至るまでに複数回全身麻酔を行った者は成長後の学習障害を起こすことを報告している。新生児や幼児が外科的手術を受ける際には麻酔薬は必要不可欠である。しかし新生児や幼児では静脈麻酔薬投与が困難な場合も多く、吸入麻酔薬の担う役割は比較的大きい分野といえる。現在、主に臨床使用されている吸入麻酔薬はセボフルラン、イソフルラン、デスフルランの三つである。セボフルラン及びイソフルランは幼若期の脳にアポトーシスを起こすことが報告されているが、最も近年に開発された麻酔薬であるデスフルランの幼若期の脳への毒性を報告した論文は未だない。人間の T-cell、鶏の B-cell の培養細胞を用いた vitro での研究ではデスフルランの細胞毒性はその他の等力価の吸入麻酔薬(セボフルラン、イソフルラン)に比較し最も少ないとされている。この事はこれらの麻酔薬の毒性が、異なることを示唆しており、今回我々はマウスを用いて確認する。臨床使用濃度のデスフルランを用い、暴露直後のアポトーシスおよび成長後の機能をほぼ同等の力価のセボフルラン暴露群、イソフルラン暴露群と比較していく。

Caspase-3 免疫染色、TUNEL 染色、及びウエスタンブロットを用いアポトーシスを評価、比較する。Fear Conditioning テスト、Y-maze テスト等の行動実験を用い成長後の機能を評価、比較する。

## 2. 研究の目的

新生児や幼児が外科的手術を受ける際には麻酔薬は必要不可欠である。しかし新生児や幼児では静脈麻酔薬投与が困難な場合も

多く、吸入麻酔薬の担う役割は比較的大きい分野といえる。現在、主に臨床使用されている吸入麻酔薬はセボフルラン、イソフルラン、デスフルランの三つである。セボフルラン及びイソフルランは幼若期の脳にアポトーシスを起こすことが報告されているが、最も近年に開発された麻酔薬であるデスフルランの幼若期の脳への毒性を報告した論文は未だない。セボフルラン、イソフルランと比較しデスフルランの毒性を評価する。

当該研究では、さらに既存の臨床薬物投与により吸入麻酔曝露によるアポトーシス及び成長後の機能障害を減弱させる方法を検討していく。2009 年に Megan らがケタミンによる幼若期の脳でのアポトーシスの出現をリチウムの腹腔内投与が減弱させることを報告した。リチウムは ERK(extracellular signal-regulated kinase)経路を介して作用を発現させることが知られている。我々は同様に ERK 経路を介して作用するとされるバルプロ酸を腹腔内投与し、吸入麻酔薬曝露による幼若期の脳におけるアポトーシスを減弱しうるのかを検討した。バルプロ酸は臨床において使用可能な薬剤であり、レスキュードラッグとして期待したが優位な改善効果は認めなかった。しかしながら我々は水素のセボフルランとの同時投与によって優位に本毒性を軽減することを見出しこれを学術論文に報告した。またフラボノイドの一つであるフィセチンの腹腔内投与によってもどけ性軽減効果を認めており、毒性メカニズムの核心部分ではないものの毒性発生から引き起こされる二次的な酸化ストレスによる毒性増幅を抑えることによりある程度の有害事象の軽減を期待できる可能性を見出すことができた。

幼若な脳への吸入麻酔薬の毒性を完全に抑制する薬剤の開発もしくは幼若な脳への毒性のない新たな麻酔薬の開発にはアポトーシス発現のメカニズムの全容解明が必須となると考えており、将来的には培養細胞を使用した実験、電気生理を用いた実験も行う。

## 3. 研究の方法

幼若な脳への吸入麻酔曝露がアポトーシスを惹起し、成長後に機能障害も生じることは知られる。臨床上最もよく使用される吸入麻酔の力価の評価法である最小肺胞濃度(MAC)を用い、およそ 0.7~0.8MAC で等力価となる吸入麻酔濃度においての毒性を比較検討していく。

酸素 25%のみ(コントロール群)、酸素 25%、デスフルラン 8%(デスフルラン群)、

酸素 25%、セボフルラン 3%(セボフルラン群)、酸素 25% イソフルラン 2%(イソフルラン群)の 4 群にわけ暴露させる。3 時間及び 6 時間暴露後の脳で免疫染色及びウエスタンブロットを用いてアポトーシスの程度を比較する。行動実験はそれぞれの麻酔薬に 6 時間暴露後親元に戻し、6 週齢から 7 週齢にかけて測定を行う。

➤ Caspase-3 免疫染色

チャンバー内で上記仔マウスを 3 時間又は 6 時間吸入麻酔薬に曝露後、還流固定を行う。脳を取り出した後、パラフィン包埋し、切片を作製する。切片は抗原賦活、内在性ペルオキシダーゼを失活させた後、抗 Caspase-3 抗体を用いて 4 でオーバーナイト、インキュベートする。さらに 2 次抗体を 1 時間インキュベート後、DAB で発色させる。

➤ アポトーシス定量解析

チャンバー内で上記仔マウスを 3 時間又は 6 時間曝露後、脳を素早く摘出し、-80 で保存する。その後脳サンプルをホモジナイズし、抽出したタンパクを SDS-PAGE、ウエスタンブロット解析を行い、PARP 発現の程度をを検討する。

➤ 行動実験

チャンバー内で上記を 6 時間曝露後、親元に戻し 6 週齢 ~ 7 週齢まで成長した後以下の行動実験を実施

オープンフィールドテスト：活動量測定、情動性のテスト

初見のアクリルの箱の中での 10 分間の活動量及び活動場所を測定。

高架式十字迷路：不安様行動のテストのテスト

マウスを迷路の中心のプラットフォームに置き 10 分間にオープンアーム(壁のないアーム) 滞在していた時間を測定。

Y-maze テスト：短期記憶のテスト

Y の形をした迷路の中での交替行動数を測定。

恐怖条件付けテスト：文脈記憶や注意能力(潜在抑制)を測定するテスト

箱にいれ、音と電気ショックを組み合わせて提示する(条件付け)

Context:24 時間後電気ショックをかけた箱に入れて、フリージングの割合を測定することにより、文脈記憶を測定。

Cued: 4 8 時間後電気ショックをかけた箱とは別部屋の別の箱に入れて、フリージングの割合を測定することにより、音に対する条件付けの強さを測定。

4 . 研究成果

- 現在臨床において一般的に用いられている 3 種類の吸入麻酔薬セボフルラン、イソフルラン、デスフルランにおいてはデスフルランの発達期脳に対する毒性が著しく強い事を報告した。
- 水素の混合投与によりセボフルランによる発達期脳に対する毒性を軽減することを報告した。
- 幼若期のセボフルラン曝露は成長後の母性行動を障害することを報告した。

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)

Kodama M, Satoh Y, Otsubo Y, Araki Y, Yonamine R, Masui K, Kazama T.

Neonatal desflurane exposure induces more robust neuroapoptosis than do isoflurane and sevoflurane and impairs working memory.

**Anesthesiology**. 2011 Nov;115(5):979-91.

Yonamine R, Satoh Y, Kodama M, Araki Y, Kazama T.

Coadministration of hydrogen gas as part of the carrier gas mixture suppresses neuronal apoptosis and subsequent behavioral deficits caused by neonatal exposure to sevoflurane in mice.

**Anesthesiology**. 2013 Jan;118(1):105-13.

Takaenoki Y, Satoh Y, Araki Y, Kodama M, Yonamine R, Yufune S, Kazama T.

Neonatal exposure to sevoflurane in mice causes deficits in maternal behavior later in adulthood.

**Anesthesiology**. 2014 Feb;120(2):403-15.

{ 雑誌論文 }( 計 3 件 )

{ 学会発表 }( 計 2 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 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
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

児玉 光徹(防衛医科大学校 麻酔学講座)

研究者番号：00597528

##### (2)研究分担者

佐藤 泰司(防衛医科大学校 麻酔学講座)

研究者番号：10505267

##### (3)連携研究者

風間 富栄(防衛医科大学校 麻酔学講座)

研究者番号：40158837