

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890054

研究課題名（和文） 発達期の脳に対する麻酔薬の影響

研究課題名（英文） The effect of common anesthetic agents to the developing mouse brain

研究代表者

里元 麻衣子（SATOMOTO MAIKO）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10611551

研究成果の概要（和文）：セボフルランを含む麻酔薬の投与により、発達段階の中枢神経細胞で、アポトーシスを起こすなどの毒性があることが明らかとなっているが、予防・治療法はわかっていない。麻酔薬曝露 1 時間前に微量のニコチン腹腔内投与を行うことにより、3%6 時間セボフルランにより引き起こされるアポトーシス陽性細胞が有意に減少することが確認された。ニコチンの微量の単回投与により、げっ歯類において、3%セボフルラン 6 時間麻酔により起こる神経細胞死を抑制できる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Early exposure to general anesthesia causes widespread apoptotic neurodegeneration in the developing rodents and rhesus monkeys brain.

In this study, we observed that preinjection of nicotine markedly reduced neuronal apoptosis caused by sevoflurane exposure in the developing brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：麻酔・蘇生学

科研費の分科・細目：研究活動スタート支援

キーワード：幼若脳、麻酔薬、アポトーシス、学習障害

## 1. 研究開始当初の背景

（1）麻酔薬の脳に対する安全性は古くから注目されてきた話題であるが、従来は臨床で使用される濃度・時間の範囲であれば、脳への作用は可逆的であり安全であると考えられてきた。ところが、2003 年に Jevtovic-Todorovic らが生後 7 日齢のラットに臨床使用濃度の麻酔薬（笑気、イソフルラン、ミダゾラム）を 6 時間使用したところ、脳に広範なアポトーシスが発生し成長後に学習障害が認められたことを報告し

てから、麻酔薬の持つ神経毒性についての関心が高まってきた。さらに 2009 年の Wilder らによる 5357 名を対象とした後方視的臨床研究で、4 歳までに全身麻酔を受けた小児のうち 2 回以上の麻酔と手術を受けた小児に学習障害のリスクが高いことが報告されるに至り、麻酔薬の発達期中枢神経に対する毒性は臨床的に無視できない問題として世界的に注目されてきている。しかしこの様な臨床研究で観察された学習障害は、果たして麻酔薬そのものが原因なの

か、手術に至った原疾患が原因なのか、あるいは手術そのものが原因なのか明らかでない。

(2) そこで私達はこの問題を明らかにするために、新生仔マウスに一般臨床で用いられる麻酔薬（セボフルラン）を通常濃度（3%）で6時間使用して、麻酔薬そのものが発達期の中枢神経系に及ぼす影響についてコントロール群と比較し検討した。その結果対象群ではコントロール群に比べ、麻酔直後から中枢神経細胞のアポトーシスが有意に増加し、成長後には文脈の恐怖条件付け試験においてすくみ反応が有意に増加、さらに社会的相互作用試験でも異常が出現し、セボフルランそのものが脳の発達および成長後の学習記憶障害を引き起こすことを世界に先駆けて報告した (Satomoto et al. 2009)。

## 2. 研究の目的

(1) 麻酔薬がアポトーシスを引き起こすメカニズムの解明を目的とする。これまでの他分野での研究によりアポトーシスに至る経路には細胞外のシグナルが細胞表面の受容体を介して引き起こす経路、ミトコンドリアから発生する経路、細胞内小胞体から発生する経路などが知られているが、麻酔薬がどの経路により中枢神経細胞のアポトーシスを引き起こすのかについては、明らかにされていない。アポトーシスを抑制する治療法を考える上で、この経路を解明することは必須であることから、これまでに私達が確立した動物実験モデル、免疫染色法などを総合的に駆使して明らかにする。

## (2) アポトーシスの発生時期と至適治療時期 (therapeutic window) の解明

これまでの研究で幼若動物においては麻酔直後に既にアポトーシス細胞が増加しており、成長後に学習記憶障害を引き起こすことを明らかにしてきたが、これが麻酔中のみに発生する神経細胞死なのか、あるいは麻酔後も引き続き遅発性に発生する神経細胞死なのかは不明であり、これを明らかにすることは至適治療時期を検討する上で重要である。したがって、これまでに確立した動物実験モデルを用い、麻酔直後、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後におけるアポトーシス細胞、あるいは残存している神経細胞の数を組織学的に定量化し、どの時期に治療するのが最も効果的か（麻酔開始前、麻酔中、麻酔後など）を解明する。

## (3) 効果的な神経細胞保護法、治療薬の検討

これまで神経細胞の保護方法として低体温療法、また保護薬としてリチウム、エリスロポエチンなどが報告されているが、臨床応用できるほどの効果は認められていない。そこで(1)、(2)の結果を考慮して、投与方法、投与時期などを工夫、さらには最近注目されている新規薬剤（オキシトシン製剤、バゾプレッシン製剤、NMDA レセプター拮抗薬）などを用いて、神経細胞保護作用をアポトーシス細胞数、残存神経細胞数、動物行動学から多面的に検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 新生仔マウスに麻酔し、脳にアポトーシスが誘導されるメカニズムの確定

新生仔マウスをチャンバーに入れ、セボフルランで6時間麻酔をし、その後、脳の灌流固定、脳標本を薄切、免疫組織染色を行う。これまでアポトーシス細胞の確認は、Activated cleaved caspase-3 陽性細胞およびTUNEL法で評価していたが、アポトーシスに至る経路としては、他分野での研究により、細胞外のシグナルが細胞表面の受容体を介して引き起こす経路、ミトコンドリアから発生する経路、細胞内小胞体から発生する経路などが知られている。麻酔薬がどの経路により中枢神経細胞のアポトーシスを引き起こすのかについては、明らかにされていない。アポトーシスを抑制する治療法を考える上で、この経路を解明することは必須であることから、これまでに私達が確立した動物実験モデル、免疫染色法などを総合的に駆使して明らかにする。具体的には、チトクロームCの免疫染色を行う必要がある。

### (2) アポトーシスの発生時期と至適治療時期 (therapeutic window) の解明

これまでの研究で幼若動物においては麻酔直後に既にアポトーシス細胞が増加しており、成長後に学習記憶障害を引き起こすことを明らかにしてきたが、これが麻酔中のみに発生する神経細胞死なのか、あるいは麻酔後も引き続き遅発性に発生する神経細胞死なのかは不明であり、これを明らかにすることは至適治療時期を検討する上で重要である。したがって、これまでに確立した動物実験モデルを用い、麻酔直後、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後におけるアポトーシス細胞、あるいは残存している神経細胞の数を組織学的に定量化する。

### (3) 効果的な神経細胞保護法、治療薬の検討

これまでの神経細胞の保護方法として低温療法、また保護薬としてリチウム、エリスロポエチンなどが報告されているも、臨床応用できるほどの効果を上げていない。最近注目されている新規薬剤（オキシトシン、バゾプレッシン、NMDA レセプター拮抗薬）などを用いて神経細胞保護効果をアポトーシス細胞数、残存神経細胞数、行動実験などで多面的に評価を行う。さらに1、2の結果を考慮して、投与時期や投与方法の工夫を行う。幼若期にセボフルランを6時間投与し、成獣に育ったマウスは、社会性の異常も認められ、自閉症のモデルとしての可能性もある。最近、自閉症児の社会性の改善に下垂体後葉から分泌される神経ペプチドであるオキシトシンが有効であることが臨床の小規模研究で認められている (Andari E, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:4389-4394)。研究代表者の予備的実験では、幼若期にオキシトシンと麻酔薬を同時に投与したマウスでは、学習記憶も社会性も改善は認めていない。オキシトシンの長期投与ではオキシトシン受容体のダウンレギュレーションも考慮されるため、麻酔曝露時ではなく、成獣後にオキシトシンを投与後、行動実験で確認してみたい。オキシトシン以外にも神経ペプチドの PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) の欠損マウスで数々の精神行動変化を示し (Hashimoto H, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:13355-13360)、自閉症のモデルとしても考えられていることから、補充による行動実験の変化も確認したい。

## 4. 研究成果

### (1) 新生仔マウスに麻酔し、脳にアポトーシスが誘導されるメカニズムの解明

本研究開始とほぼ同時に、他の論文から明確に示されたため、速やかに (2) アポトーシスの発生時期と至適治療時期 (therapeutic window) の解明の研究に移行した。

(2) アポトーシスの発生時期と至適治療時期 (therapeutic window) の解明についてこれまでの研究で麻酔直後にアポトーシス細胞が増加しており、成長後に学習記憶障害を引き起こすことを明らかにしてきたが、麻酔中のみに発生する神経細胞死なのか、麻酔後も遅発性に発生する神経細胞死なのかは不明であり、至適治療時期を検討する上で重要であった。麻酔直後、1、2、3週間後におけるアポトーシス細胞および残存している

神経細胞の数を組織学的に定量化したところ、アポトーシスは麻酔中のみに発生する神経細胞死であり、さらに成獣後の神経細胞数はコントロール群と比較して有意差がなかった。以上から考察されることは、麻酔中に神経細胞保護薬の使用がアポトーシスの誘導を抑え、治療薬として有効でないかと考えられた。

### (3) 効果的な神経細胞保護法、治療薬の検討

これまで神経細胞の保護方法として低温療法、また保護薬としてリチウム、エリスロポエチンなどが報告されているが、臨床応用できるほどの効果は認められていない。そこで、投与方法、投与時期などを工夫、さらには最近注目されている新規薬剤（オキシトシン製剤、バゾプレッシン製剤、NMDA レセプター拮抗薬）などを用いて、神経細胞保護作用をアポトーシス細胞数、残存神経細胞数から検討を行った。

各種薬剤の最適時期や最適経路、最適量の検討を行い、検討を行った。

麻酔薬曝露1時間前に微量のニコチン腹腔内投与を行うことにより、3%6時間セボフルランにより引き起こされるアポトーシス陽性細胞が有意に減少することが確認された。ニコチンはタバコ葉に含まれ、その毒性が広く認められているが、過去の報告によるとニコチンパッチ貼付により、注意欠陥・多動性障害の認知障害を改善したという報告もある。ニコチンの微量の単回投与により、げっ歯類において、3%セボフルラン6時間麻酔により起こる神経細胞死を抑制できる可能性があることが示唆された (図1)。

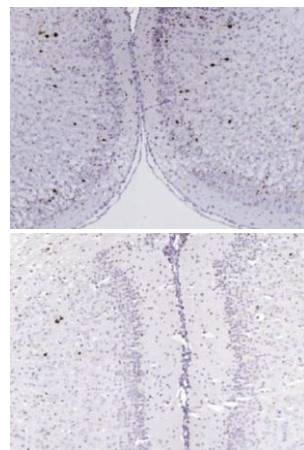


図1 セボフルラン麻酔後の脳における Activated cleaved caspase-3 免疫染色  
セボフルランによりアポトーシス陽性細胞は著しく増加する (図1上) が、麻酔に先立ってニコチンを投与することでアポトーシ

ス陽性細胞数が減少できた (図 1 下)

## 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 1 件)

里元麻衣子、伊藤裕之、内田篤治郎、槇田浩史、レスベラトロールのセボフルラン曝露前投与は、幼若なマウス脳へのアポトーシス誘導を阻止できない、麻酔、査読有、in press

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 山内 (里元) 麻衣子、麻酔と小児の神経発達、日本臨床麻酔学会第 32 回シンポジウム、2012 年 11 月 1 日～11 月 3 日、ビックパレットふくしま (福島県郡山市)
- ② 山内 (里元) 麻衣子、幼若なマウス脳へのセボフルラン曝露と成長後の学習障害及び社会性障害に対する検討、日本麻酔科学会代 58 回学術集会、2011 年 5 月 19 日～5 月 21 日、神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

里元 麻衣子 (MAIKO SATOMOTO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10611551