

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592291

研究課題名(和文) 幼若神経細胞に及ぼす吸入麻酔薬の影響とその対策

研究課題名(英文) The effects and measures of inhalational anesthesia exposure on the developing rat brain

研究代表者

合谷 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) 3,900,000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。長時間の麻酔薬暴露や併用した酸素濃度がその影響に関連するのかを検討した。3%セボフルラン長時間暴露と酸素濃度により、暴露直後のカスパーゼ陽性細胞が増加し、アポトーシスが増加して、水迷路の空間認知機能に影響すること示された。デクスメトミジンやエリスロポイエチンの併用投与により、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。また、海馬の神経細胞の電位の長期増強効果にも幼若時の麻酔薬暴露が影響した。

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 sevoflurane anesthesia with or without additional oxygen induce neuronal apoptosis and long-term cognitive dysfunction in neonatal rats. 3% sevoflurane exposure for long hours with low oxygen increased caspase positive cells in cortex and hippocampus and impaired the long-term cognitive function in neonatal rats. Moreover, the administration of dexmedetomidine or erythropoietin improved the spatial memory, and increased the normal cells in the brain 6 weeks after anesthesia exposure. In addition, sevoflurane exposure attenuated the long-term potentiation of CA1 cells in 6 weeks aged rats.

研究分野：麻酔科学、神経科学

キーワード：anesthetic toxicity developing brain neonatal brain neural apoptosis neural degeneration sevoflurane dexmedetomidine erythropoietin

1. 研究開始当初の背景

麻酔は、新生児にも必要不可欠であり、脳の成長発達期に麻酔薬に暴露されることがある。近年、幼少時に麻酔薬に暴露されると脳の発達障害を起こす危険性が予測されており、後ろ向きの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た。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_A 受容体の促進やカリウムチャネルの活性化などで作用しているため、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。いずれの報告でも短期的には暴露された後、組織の変性がおきるが、長期的な行動へ影響には異論があり一致してはいない。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、セボフルランに関しての人でのデータはなく、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り、学習記憶障害が起きる報告のみである。本研究で行うラットでの報告は見られない。

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たとの報告がある。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。しかし、麻酔薬による障害作用を減弱させる薬物は未だ不明であり、早急に研究開発が必要である。

このため、本当に麻酔薬によって脳の変性や学習機能障害が起きるのか、起きるのであれば原因、防止策を講じるのは、これからの新生児の麻酔に不可欠であり重要な課題である。

2. 研究の目的

広く臨床使用されているセボフルランを用いて、今までの報告では人に換算すると2週間と長時間の投与であった点を考慮して、まず、1) 生後7日のラットに暴露した場合の脳の変性を起こす投与量時間を決定する。そして、その暴露が長期的に学習機能障害、社会的な行動障害を起こすのかを検討する。麻酔によるラットの呼吸抑制などの生理的な変化が脳の変性や学習障害を悪化させるのか検討する。2) その麻酔薬の至適投与量と時間において、デクスメトミジンおよびエリスロポイエチンの併用投与がラットの脳の変性や学習機能障害を減弱させるかを検討する。3) 電気生理学的に海馬 CA1 領域の電位を測定して生後7日に麻酔薬の暴露が神経組織へ影響を及ぼしているかを検討

する。

3. 研究の方法

(1) 生後7日目のラットへのセボフルラン暴露による組織学的変化と学習機能へ及ぼす影響

- 1) 生後7日目の Wistar ラットを用いる。
- 2) 吸入麻酔薬セボフルランの暴露は、クリアクリルボックス内へ酸素、空気と3%セボフルランを投与して吸入させる。酸素濃度、吸入時間により下記のグループに分ける。
- 3) グループ (各グループ n=6):
 - 酸素 30% + 3%セボフルラン 6 時間
 - 酸素 21% + 3%セボフルラン 6 時間
 - 酸素 30% + 3%セボフルラン 4 時間
 - 酸素 21% + 3%セボフルラン 4 時間
 - 酸素 30% + 3%セボフルラン 2 時間
 - 酸素 21% + 3%セボフルラン 2 時間
 - 酸素 21% (空気のみ、コントロール群)
- 4) 麻酔後は覚醒させゲージに戻す。
- 5) 生理学的評価: 麻酔薬による呼吸状態を評価するため、麻酔開始 2, 4, 6 時間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、パラフォ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、CA2、歯状回におけるカパーゼ陽性細胞数を計測する。
- 9) 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 週後に更に恐怖条件付けテストと再度モーリス水迷路を行う。モーリス水迷路: 3 週目と 6 週目に、それぞれ 5 日間連続で、学習させプラットフォームまでの時間と距離を計測する。6 週目のプラットフォームの場所は 3 週目と同一で記憶障害を検討する。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、1 週間後に同じゲージに戻した時白色雑音を聞かせ freezing する時間を計測する。

(2) 生後7日目のラットへのセボフルラン暴露による組織学的変化と学習機能へ及ぼすデクスメトミジンおよびエリスロポイエチン併用投与の抑制効果

- 1) 平成 24 年度で明らかになった障害を起こすセボフルラン 4 時間を以下の実験で投与する。
- 2) 生後7日の Wistar ラットを使用し、下記のグループに分ける。
- 3) グループ (各グループ n=5):
 - 酸素濃度 21% + 3%セボフルラン 4 時間

酸素濃度 21% + 3%セボフルラン 4 時間 + デクスメトミジン 6.6 μg/kg

酸素濃度 21% + 3%セボフルラン 4 時間 + デクスメトミジン 12.5 μg/kg

酸素濃度 21% + 3%セボフルラン 4 時間 + デクスメトミジン 25 μg/kg

酸素濃度 21% + 3%セボフルラン 4 時間 + エリスロポイエチン 60 U/kg

酸素濃度 21% + 3%セボフルラン 4 時間 + エリスロポイエチン 120 U/kg

酸素濃度 21% + 3%セボフルラン 4 時間 + エリスロポイエチン 600 U/kg

- 1) 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、5 週後には恐怖条件付けテストを行う。暴露 6 週後に再度モーリス水迷路テストと恐怖条件付けテストを行い記憶の保持について検討する。
- 2) 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。
- 3) 長期的な免疫組織学的評価: NeuN 染色を行い正常細胞の割合を評価する。

(3) 生後 7 日目のラットへのセボフルラン暴露による組織学的変化と学習機能へ及ぼす影響の電気生理学的評価

- 1) 生後 7 日の Wistar ラットを使用し、下記のグループに分ける。
- 2) グループ (各グループ n=5):
酸素濃度 21% + 3%セボフルラン 4 時間
酸素濃度 21% (コントロール)
麻酔後は覚醒させゲージに戻す。
- 3) 電気生理学的評価: 成長 6 週後、ハロタン麻酔自発呼吸下に、経頭蓋的に海馬 CA1 領域 (bregma より尾側 3mm、側方 2.2mm、深さ 1.8mm) に記録電極フレキシブルマルチ電極アレーを挿入固定し、Schaffer 側枝 (bregma より尾側 3.5mm、側方 3mm、深さ 2.5mm) の刺激による CA1 領域における集合スパイク電位 (シナプス長期増強: long-term potentiation) を測定する。

4. 研究成果

(1) 生後 7 日目のラットへのセボフルラン暴露による組織学的変化と学習機能へ及ぼす影響

1) 血液ガス分析

Group	pH	PCO ₂ (mmHg)	PO ₂ (mmHg)	BE (mmol/L)
Control (n=3)	7.409 ± 0.02	51.8 ± 3.5	72.1 ± 12.7	6.6 ± 0.5
2hSevo 21% (n=4)	7.205 ± 0.06	62.4 ± 13.0	48.2 ± 9.3	-0.6 ± 3.1

4hSevo 21% (n=3)	7.305 ± 0.07	56.0 ± 4.3	50.9 ± 3.6	0.8 ± 3.1
6hSevo 21% (n=3)	7.252 ± 0.11	65.4 ± 11.9	54.0 ± 5.6	0.6 ± 4.3
2hSevo 30% (n=7)	7.245 ± 0.09	71.6 ± 13.6	59.8 ± 11.3	2.3 ± 2.8
4hSevo 30% (n=3)	7.197 ± 0.04	83.2 ± 11.9	55.3 ± 7.7	2.0 ± 0.3
6hSevo 30% (n=3)	7.254 ± 0.09	72.7 ± 19.7	54.3 ± 10.8	2.6 ± 1.0

各群に有意差はなく、PaCO₂ は高値を示した。

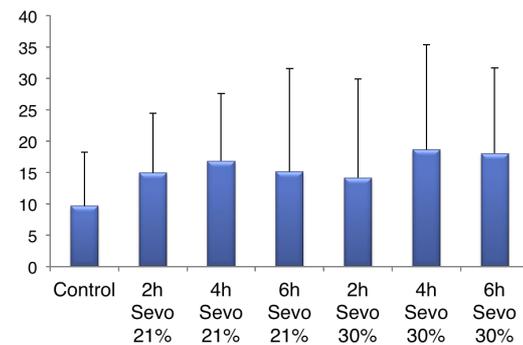
2) カスパーゼ 3 陽性細胞数

Group	Cortex	Hippocampus
Control (n=3)	0.3 ± 0.5	0 ± 0
2h Sevo 21% O ₂ (n=3)	7 ± 3	4 ± 1
4h Sevo 21% O ₂ (n=3)	21 ± 4*	9 ± 5*
6h Sevo 21% O ₂ (n=3)	26 ± 4*†	12 ± 5*†
2h Sevo 30% O ₂ (n=3)	4 ± 3	2 ± 2
4h Sevo 30% O ₂ (n=3)	15 ± 8*	3 ± 3
6h Sevo 30% O ₂ (n=3)	15 ± 6*	6 ± 2

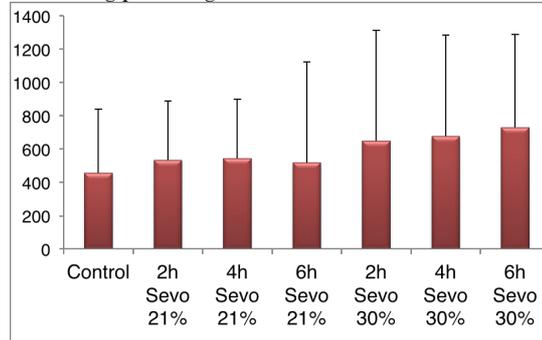
Values are the number of cells/0.1728mm² (mean ± SD). Sevo=sevoflurane. *P<0.05 vs control, †P<0.05 vs 6 h 30% O₂.

3) 学習評価: 水迷路 3 weeks after exposure

Swimming time (sec)

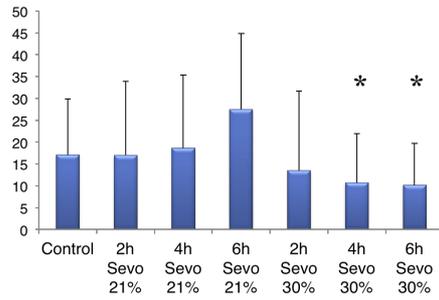


Swimming path length (cm)

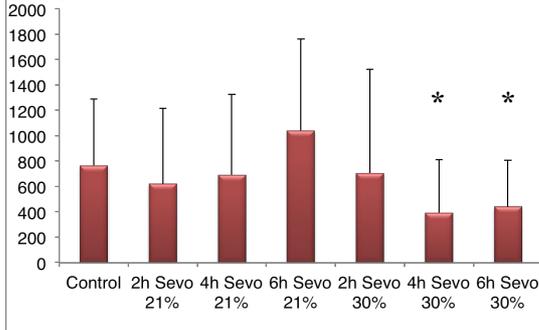


6 weeks after exposure

Swimming time (sec)

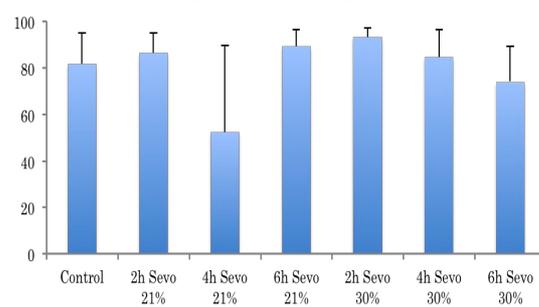


Swimming path length (cm)



*P<0.05 vs 6h Sevo 21%

Fear conditioning test: freezing time (%)



セボフルラン暴露は酸素濃度によりそのアポトーシスの効果が影響され、水迷路による空間認知機能へも酸素濃度が影響されることが示唆された。

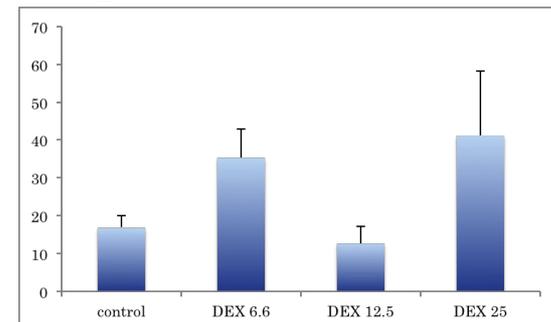
(2) 生後7日目のラットへのセボフルラン暴露による組織学的変化と学習機能へ及ぼすデクスメドミジンおよびエリスロポイエチン併用投与の抑制効果

1) 学習機能評価

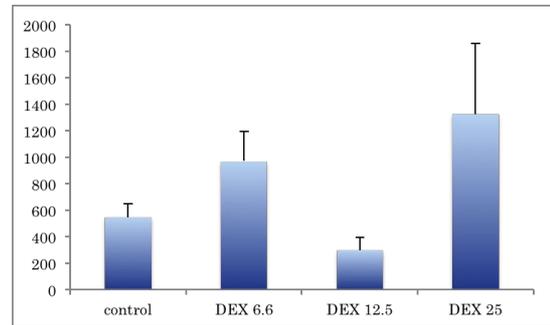
デクスメドミジンの効果

3 weeks after exposure

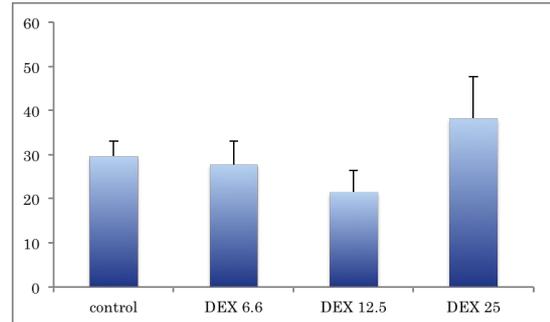
Swimming time (sec)



Swimming path length (cm)

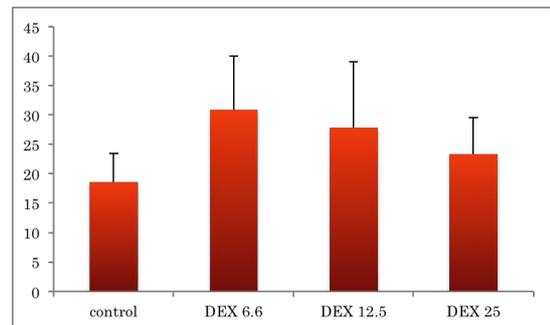


%Time in target quadrant area

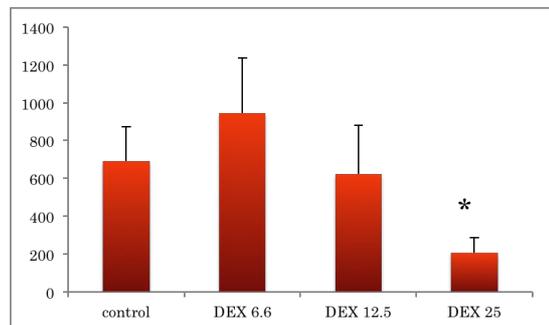


6 weeks after exposure

Swimming time (sec)

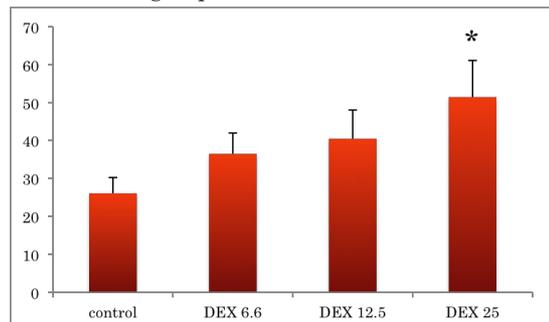


Swimming path length (cm)



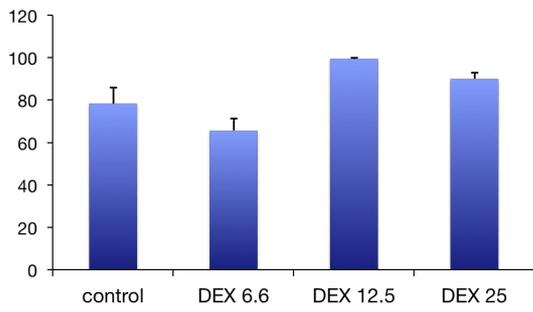
*P<0.05 vs control

% Time in target quadrant area



*P<0.05 vs control

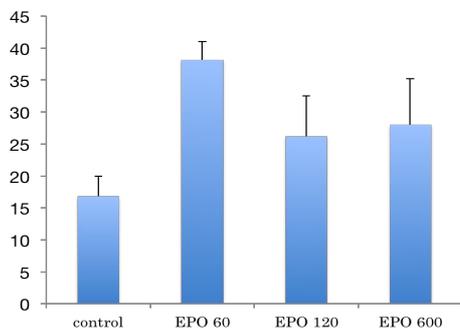
Fear conditioning test: freezing time (%)



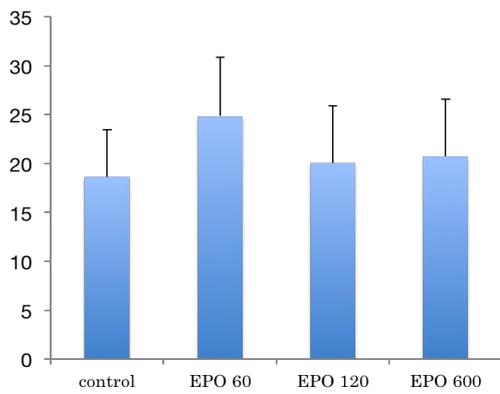
エリスロポイエチンの効果

3 weeks after exposure

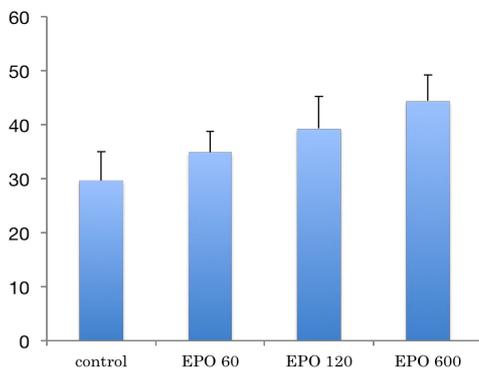
Swimming time (sec)



Swimming path length (cm)

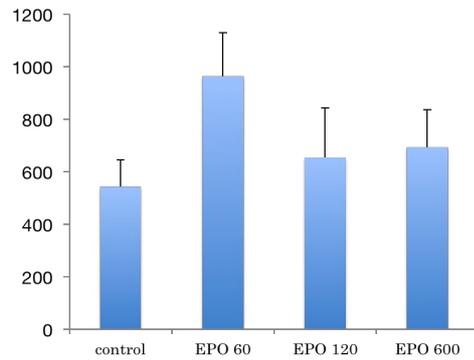


%Time in target quadrant area

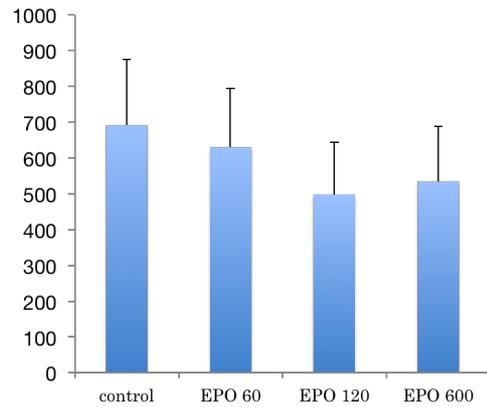


6 weeks after exposure

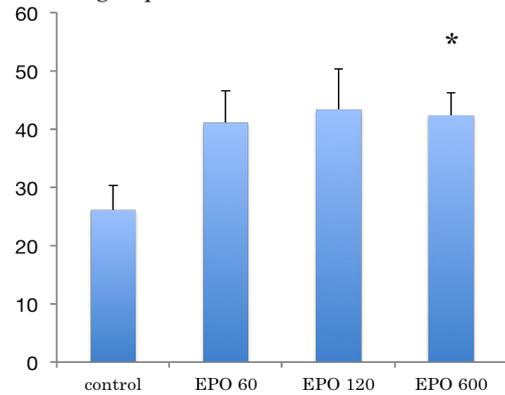
Swimming time (sec)



Swimming path length (cm)

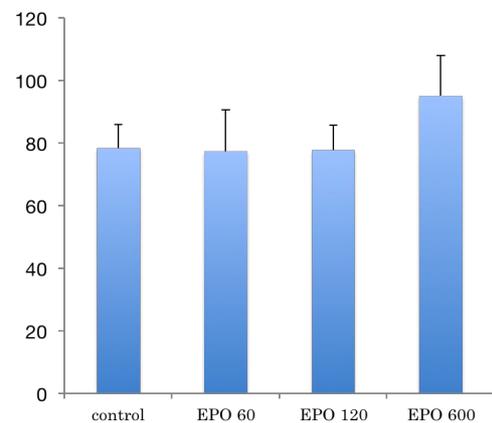


% Time in target quadrant area



*P<0.05 vs control

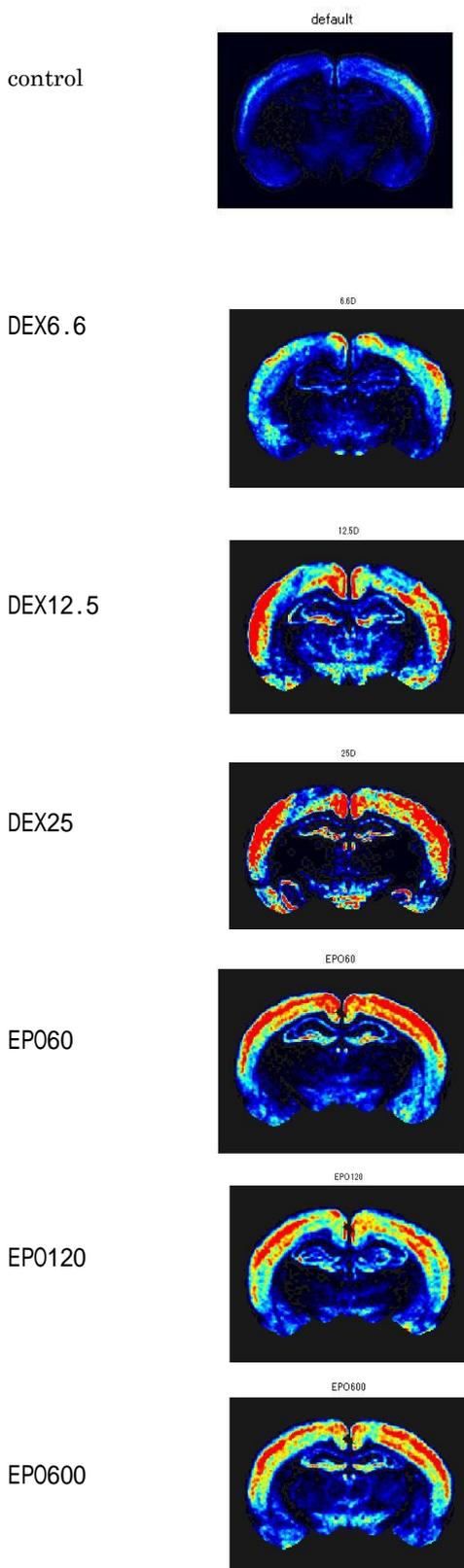
Fear conditioning test: freezing time (%)



デクスメトミジンおよびエリスロポイエチンの投与によりセボフルラン暴露による認知機能への影響を改善させる可能性があることが示唆された。

2) 組織学的評価

bregma より 3 mm 後方の冠状断で NueN 染色をした後、画像処理をおこない、細胞密度にそって赤が高密度、青が低密度に表現した。



デクスメトミジンおよびエリスロポイエチンの投与により、新生児期にセボフルラン暴露を行った後の 6 週後の正常細胞数に影響を与えることが示唆された。

(3) 生後 7 日目のラットへのセボフルラン暴露による組織学的変化と学習機能へ及ぼす影響の電気生理学的評価

セボフルラン暴露していない群では、テタヌス刺激後の LTP は観察されたが、セボフルラン暴露群では、LTP の減弱が観察された。幼若ラットにセボフルラン暴露によって、海馬の神経構築に影響を与え、認知機能に影響を与える原因の 1 つに神経変性が考えられることが示唆された。

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 5 件)

The 66th American Society of Anesthesiologists, Annual Meeting
第 18 回日本神経麻酔集中治療研究会
日本麻酔科学会第 61 大会
日本蘇生学会第 33 回大会
第 19 回日本神経麻酔集中治療学会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

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