

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791630

研究課題名(和文) 子供達に安全な麻酔を目指して～発達期マーモセットにおける全身麻酔薬の影響

研究課題名(英文) Effect of general anesthetic on central nervous system of neonatal marmoset

研究代表者

宮島 萌子 (Miyajima, Moeko)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第四部・客員研究員

研究者番号：90318147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円、(間接経費) 300,000円

研究成果の概要(和文)：脳の発達期にある小児が全身麻酔を受けると学習障害のリスクが高まることが報告された。マーモセットの新生児期に全身麻酔薬を投与し脳内での神経細胞死が増加するかどうかを目的に調べた。結果としてアポトーシスした細胞は大脳皮質の他に大脳白質にも存在していた。以上より神経細胞死のみならず神経細胞以外の細胞死の増加についても検討が必要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Recently it was reported that children who received general anesthesia repeatedly before 4 years were at significantly increased risk of learning disability. Many animal studies have shown that commonly used anesthetic agents have a neurotoxic effect on the developing brain. The purpose of this study is to examine whether general anesthetic causes neuroapoptosis in neonatal marmosets. We observed increased apoptosis not only in the cortex but also in the white matter.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：全身麻酔 幼弱期暴露 障害 霊長類

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系の発達と全身麻酔

ほ乳類においては、脳は出生前後に急速に発達し、この時期に神経細胞の増殖、プログラムされた細胞死(アポトーシス)、シナプス形成が起こる。このような発達時期に全身麻酔薬を投与するとアポトーシスが増加することが報告されている。今まで報告された全身麻酔薬はケタミン、ミダゾラム、プロポフォール、セボフルレン、イソフルレンなどである(ReviewとしてCurr Opin Anaesthesiol 29 395-99 2011)。ラットでは皮質と海馬を含む皮質下でアポトーシスが起こる。霊長類であるアカゲザルを用いた研究においては皮質の広範な部位にアポトーシスの増加が見られている。マーモセットについては全身麻酔薬による中枢神経系への影響は今までに報告されていない。予備実験としてマーモセットの神経発達を検討してみた。電気生理学的に膜の性質を調べたところ神経細胞の発達時期は出生後2週間までであると予想された。(J Physiol 590 5691-5706 2012)。出生後2週間までに全身麻酔薬を投与するとアポトーシスの増加が生じると予想される。

また、齧歯類とは異なり霊長類では出生前から脳の発達が始まっている(Early Human Dev 3 79-84 1979)ことから出生後早期に全身麻酔薬を投与することが必要と考え生後7日齢以内での投与を予定している。

(2) 神経伝達

脳の急速な発達時期に全身麻酔薬を投与し、電気生理学的手法を用いて神経伝達を調べた研究は少ない。ラットにおいては麻酔薬投与後、記憶に関わる海馬での長期増強(LTP)の抑制や海馬台における抑制性神経伝達の減少が報告されている(J Neurosci 23 876-82 2003, Anesthesiology 115 992-02 2011)。霊長類では未だ報告はない

(3) 記憶・学習: 全身麻酔薬の投与による行動学的な異常

ラットでは海馬が関わる空間記憶が障害されていた(J Neurosci 23 876-82 2003)。マウスではセボフルレンの投与によって情動記憶が障害されていた(Anesthesiology 110 628-37 2009)。霊長類ではアカゲザルを用いて生後5日齢(P5)にケタミンを投与するとオペラント学習テストでは成績が悪く、10ヶ月から3年に至るまで長期間見られている(Neurotoxicol Teratol 33 220-30 2011)。ヒトでは4才未満の小児について全身麻酔を複数回受けた場合、全身麻酔を受けなかった児に比べ学習障害の発生のリスクが高まるという後ろ向きの臨床報告がある(Anesthesiology 110 796-04 2009)。しか

しながら、後ろ向きの研究であるため全身麻酔そのものが原因なのか、手術や原疾患にまつわる様々な病的状態によって起こったのかは不明である。現在アメリカにおいて前向きの臨床研究が進行中であり、臨床における全身麻酔薬の影響が懸念されている。

これまでの報告より、マーモセットにおいて脳の発達時期に全身麻酔薬を投与すると、大脳皮質においてアポトーシスが増加すると予想される。記憶・学習は脳の高次機能のひとつであり、大脳皮質も関わっている。アポトーシスの増加のあった部位においては神経伝達に変化していると考えられる。全身麻酔薬による障害の生じた部位で神経伝達を調べることは記憶・学習障害を説明する有用な情報となりうる。脳の発達時期に投与された全身麻酔薬が中枢神経系に与える影響を明らかにするために必須の情報であり意義がある。

2. 研究の目的

霊長類であるマーモセットを用いて「脳の発達時期に投与された全身麻酔薬が中枢神経系に与える影響の解明」を目的とする。具体的にはマーモセットの新生児に5時間セボフルレンを投与し、神経細胞のアポトーシスの変化と、その変化のあった部位での神経伝達の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 全身麻酔薬の投与

生後2から6日齢(P2~6)のマーモセットに全身麻酔薬を投与した。

麻酔薬は小児の全身麻酔として現在用いられているセボフルレンを投与した。投与量はヒト新生児の最小肺泡内麻酔濃度(MAC)に相当する3%のセボフルレンを投与することとした(Anesthesiology 80 814-24 1994)。麻酔時間はアカゲザルを用いたイソフルレンの実験を参考に5時間とした(Anesthesiology 112 834-41 2010)。

導入用麻酔ボックスに麻酔器より空気500ml/分、酸素0.3L/分とセボフルレンを流し、マーモセットの麻酔を開始した。麻酔導入後、自発呼吸下にマスクよりセボフルレンを5時間投与した。心電図、非観血的血圧測定、経皮的酸素モニター、血液ガス分析を行い、循環動態、呼吸状態、電解質、血糖、電解質を評価した。

採血は2時間を目安に行った。体温管理のため直腸温を計測し、温水マットを用いて体温を保持した。経腹腔的に糖質を投与した。麻酔投与終了後、マーモセットは速やかに覚醒した。麻酔終了後3時間インキュベーターで観察した。コントロール群はセボフルレン

の投与を行わず、インキュベーターで5時間観察した。

(2) 組織学的検討：3時間の経過観察後、高容量のペントバルビタールを投与し、脳の灌流固定を行った。灌流固定された脳から凍結式滑走スライサーを用いて50 μ mの切片を作製した。アポトーシスの指標であるcleaved caspase-3の免疫染色を行いアポトーシスの増加と部位について非投与群(コントロール群)と比較検討した。Kluver-Barrera染色(K-B染色)を行いアポトーシスした細胞の部位についても調べた。

4. 研究成果

(1) 麻酔中の循環動態

麻酔投与中の心拍数は180台から200台と安定していた(図1)。収縮期血圧は尾部で測定し、麻酔投与中は70mmHg前後に保たれた(図1)。セボフルレンは個体ごとに呼吸、循環動態、体動を目安に調節した。セボフルレンの吸入濃度は平均で3%前後であった。吸入酸素濃度は平均で30%台であった。

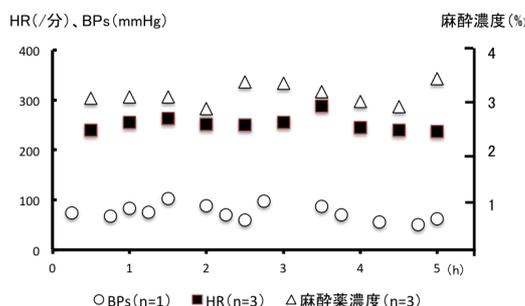


図1.麻酔中のHR、BPs、麻酔濃度

(2) 麻酔中の呼吸、体温、血糖値(図2)

麻酔中の呼吸の評価として経皮的酸素飽和度(SPO2)、血液ガス分析、呼吸数の測定を行った。

当初、動物用の舌モニターを使用し尾部と大腿部でのSPO2を計測した。SPO2の値が安定せず人用の経皮的酸素飽和度モニターにて尾部、大腿部にて測定したところ安定して測定が可能となった(図2)。静脈血中の二酸化炭素分圧(PvCO2)を麻酔開始後3時間で測定することができた。その結果PvCO2は血液ガス分析では50mmHg未満であった(図2)。呼吸数は30台から40台/分と安定していた。

直腸温は温水マットにて37度前後に保たれた。

血液ガス分析に加えて毛細管採血を行い血糖を計測した。40mg/dl未満となる個体があり、糖液の補充が必要なが分かった。経腹腔的に糖液を投与した。糖液の投与により血糖値は安定した(図2)。

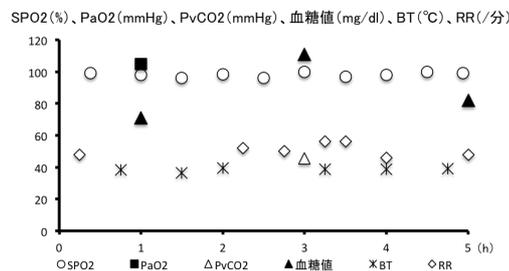


図2.麻酔中の呼吸状態と血糖値

(3) 麻酔終了後

5時間の全身麻酔後、マーモセットは投与終了後10分以内に覚醒した。麻酔投与終了後3時間インキュベーターで経過観察とした。

(4) アポトーシスの評価

前頭葉、後頭葉において主に灰白質5から6層を中心にアポトーシスの増加、白質においてもアポトーシスの増加が見られた。

当初は神経細胞のアポトーシス、大脳皮質でのアポトーシスの増加、を予測していた。K-B染色を行った結果、大脳皮質のみならず、白質においてもアポトーシスの増加が見られた。神経細胞は脳の皮質に存在するが、白質には神経細胞の線維の他にオリゴデンドロサイトも存在する。神経細胞以外のグリア細胞にも全身麻酔薬の影響がないか組織学的に検討が必要であると考えられた。

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 1件) Yamada D, Miyajima M, Ishibashi H, Wada K, Seki K, Sekiguchi M. Adult-like action potential properties and abundant GABAergic synaptic responses in amygdala neurons from newborn marmosets. J Physiol (Lond) (2012) 590, 5691-5706. (査読あり) doi:10.1113/jphysiol.2012.235010

[学会発表](計 0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 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

宮島萌子 (Moeko Miyajima)

国立精神・神経医療研究センター 神経研
究所 疾病研究第四部 客員研究員

研究者番号：90318147

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：