

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462325

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬が幼若ラット海馬歯状回の顆粒細胞移動に及ぼす影響

研究課題名(英文) Influence of inhalation anesthetics on granule cell migration in the dentate gyrus of the neonatal rat

研究代表者

橋本 聡一 (HASHIMOTO, Toshikazu)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：40281810

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)：動物モデルにおいては、幼若期に麻酔薬を投与すると神経変性や成長後の行動異常を引き起こすことが報告されている。一方、熱性けいれんモデルのラットでは、幼若期の海馬歯状回において、過剰なγ-アミノ酪酸(GABA)A受容体を介する信号が顆粒細胞の正常な移動を阻害することが報告されている。吸入麻酔薬はGABA性の作用を持つことが知られている。本研究では、免疫組織学的手法により、幼若期のラットに吸入麻酔薬を投与すると、海馬歯状回の顆粒細胞の移動が阻害されること、およびGABA(A)受容体はその抑制作用に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that neonatal exposure to anesthetics causes neurodegeneration and subsequent behavioral abnormalities in animal models. On the other hand, the inhibitory effect of excessive gamma-aminobutyric acid (GABA) type A receptor signaling on the granule cell migration in the neonatal rat dentate gyrus was reported in a febrile seizure model. Inhaled anesthetics is known to have GABAergic effect. In the present study, using immunohistochemical methods, it is revealed that neonatal exposure to inhaled anesthetics agents disturbs the migration of granule cell in the rat dentate gyrus and GABA(A) receptor is implicated in the inhibitory effect.

研究分野：麻酔科学

キーワード：吸入麻酔薬 イソフルラン セボフルラン 亜酸化窒素 海馬歯状回 顆粒細胞 GABA

1. 研究開始当初の背景

動物モデルにおいては、幼若期の麻酔薬暴露が成長後の学習・記憶障害を引き起こすことが知られている[1]。その正確な機序は不明であるが、海馬など記憶に関わる部位での神経ネットワークが正常に発達しない可能性が注目されている[2]。幼若期の海馬に過剰なGABAシグナルが作用すると、新たに誕生した顆粒細胞が歯状回門を放射状に移動して歯状回顆粒細胞層に到達することを阻害し、異所性の顆粒細胞を増加させることが示されている[3]。吸入麻酔薬はGABA様の作用を持つことが知られている[4]。以上から、幼若脳に吸入麻酔薬を負荷すると、顆粒細胞の正常な移動が阻害され、海馬歯状回の神経ネットワークの形成に影響を及ぼすことが予想された。

2. 研究の目的

今回の研究では、幼若脳に吸入麻酔薬を負荷すると、海馬歯状回の顆粒細胞の正常な移動が阻害されるか、また、阻害されるとすればGABA受容体が関与しているかを明らかにすることを目的とした。実験動物としてはラットを用い、免疫組織学的手法で研究を行うこととした。

具体的には、1)セボフルラン、イソフルランといった現在臨床で広く使用されている吸入麻酔薬を生後7日のラットに負荷し、歯状回顆粒細胞の移動の状態を経時的に観察する。移動の抑制が認められるか、またどの程度の割合の顆粒細胞で移動が阻害されるかを、成長に伴って経時的、定量的に評価する。2)生後14日で同様の負荷をした場合は、顆粒細胞移動の抑制は起きるかを同様に評価する。3)吸入麻酔薬負荷後にGABA(A)受容体拮抗薬を投与すると、顆粒細胞移動は正常化するかを明らかにする。正常化するなら仮説の通り、吸入麻酔薬の持つGABA(A)受容体作動薬としての作用が原因であるといえる。4)NKCC1抑制作用のある薬物を投与すれば、Cl⁻トランスポーターのバランスが変わり、幼若期でもGABAが興奮性では無く抑制的に作動するようになる。この状態で吸入麻酔薬を負荷すると、顆粒細胞の移動は正常化するかを明らかにする。以上が当初の目的であった。

3. 研究の方法

(1)【7日齢ラットに対する吸入麻酔薬負荷が歯状回顆粒細胞の移動に及ぼす影響】
6日齢ラットにBrdUを300mg/kg皮下注射する。BrdUの溶解や投与は標準的な方法で行った[5]。この方法によりBrdU投与後に分化した細胞を標識することができる[5]。Prox1は海馬では顆粒細胞にのみ存在する[6]。このため顆粒細胞のマーカーとして利用できる。
BrdU投与20時間後(7日齢)に保温機能付きアクリル製チャンバーにラットを入れ、1%イソフルラン、2%イソフルラン、3%セボ

フルラン、50%亜酸化窒素を120分間負荷した。50%亜酸化窒素については30分と240分間負荷群も作成した。酸素濃度は50%とした。対照群として1)空気に120分間暴露する群(空気暴露群)と、2)50%酸素+13%二酸化炭素の混合ガスを120分間負荷する群(二酸化炭素負荷群)を設定した。2)は吸入麻酔負荷によって生じる高二酸化炭素血症の影響を検討するためのものである。吸入麻酔薬、酸素、二酸化炭素濃度は麻酔ガスモニターで連続的に計測した。

ガス負荷の直前とガス負荷の2時間後(BrdU投与24時間後)にそれぞれ一部のラットをパラホルムアルデヒドで灌流固定し脳を摘出した。他のラットは飼育を継続し、2%イソフルラン負荷群と対照群(空気暴露群)は14、21、28、35および70日齢で、3%セボフルラン群は21および35日齢で、また、1%イソフルラン群、50%亜酸化窒素負荷群(30分、120分、240分)および対照群(13%二酸化炭素負荷群)は21日齢で灌流固定し脳を摘出した。

摘出した脳は大脳縦裂で半切し、さらに海馬を含むブロックを切り出し、クリオスタットを用いて海馬の冠状断凍結切片(厚さ40μm)を作成した。免疫組織染色は、1次抗体として抗BrdU抗体と抗Prox1抗体を使用し、2次抗体として蛍光標識した抗体(Alexa Fluor 594(赤)およびAlexa Fluor 488(緑))を用いて二重染色を行った。

各標本から6-10切片を選び、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて切片を1μm間隔でスキャンし、z軸スタック画像を作成した。歯状回顆粒細胞層と歯状回門で、それぞれ二重染色された細胞数を計測した。二重染色された細胞核は6日齢に新生した顆粒細胞である。二重染色された細胞核が顆粒細胞層に存在していれば正常に移動を完了したものであり、歯状回門に存在するものは移動が抑制された異所性の顆粒細胞である。7日齢のガス負荷前後、14、21、28、35および70日齢の標本で、顆粒細胞層まで正常に移動した細胞と移動が抑制され歯状回門に残った細胞の割合を算出した。つまり[歯状回門にある二重染色細胞数]を[全ての二重染色細胞数]で割った値が歯状回門に残存する異所性顆粒細胞の割合であり、これが高ければ正常な移動が抑制されたことを示し、対照群と同等の低さであれば正常に移動したことになる。

(2)【吸入麻酔薬を7日齢と14日齢で負荷した場合の比較】

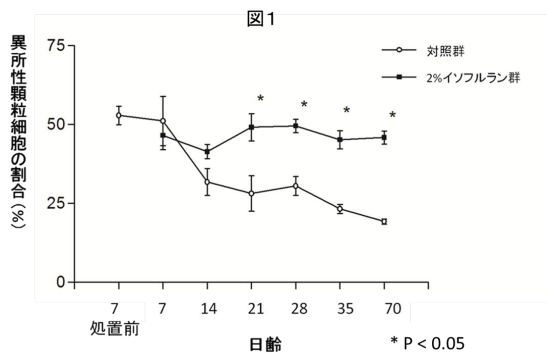
2%イソフルランを(1)同様の方法で、7日齢に120分負荷した群と、14日齢に120分間負荷した群、および対照群として7日齢に120分間空気暴露した群を作成し、21日齢まで飼育した。21日齢にパラホルムアルデヒドで灌流固定し脳を摘出し、(1)と同様に海馬の冠状断凍結切片を作成し、抗BrdU抗体と抗Prox1抗体で二重染色して、歯状回門に残存

する異所性顆粒細胞の割合を比較した。
 (3)【吸入麻醉薬負荷と GABA(A) 受容体拮抗薬投与】

(1)と同様の方法で、7日齢に3%セボフルランを120分間負荷、または空気に120分間暴露(対照群)し、GABA(A)受容体拮抗薬であるピクロトキシン(PTX)1mg/kgまたは同容量の生理食塩水(PS)を8日齢から14日齢まで連日腹腔内投与した。すなわち、1)空気+PS、2)空気+PTX、3)セボフルラン+PTX、4)セボフルラン+PSの4群を作成した。21日齢に灌流固定、凍結切片を作成し二重染色を行って異所性顆粒細胞の割合を比較した。

4. 研究成果

(1)【7日齢ラットに対する吸入麻醉薬負荷が歯状回顆粒細胞の移動に及ぼす影響】
 2%イソフルラン負荷群と空気暴露対照群の歯状回門に残存する異所性顆粒細胞の割合を比較すると、21日齢から70日齢で、2%イソフルラン群で異所性細胞の比率が有意に高かった(Student's t test, $P < 0.05$) (図1)。



21日齢での比較では、異所性顆粒細胞の割合は2%イソフルラン群のみで高く、1%イソフルラン負荷群は空気暴露対照群と差はなかった(図2)。

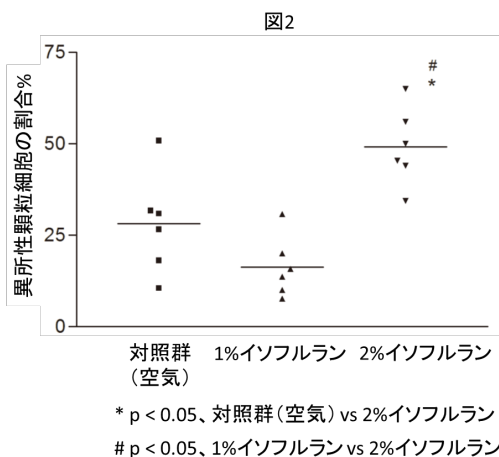
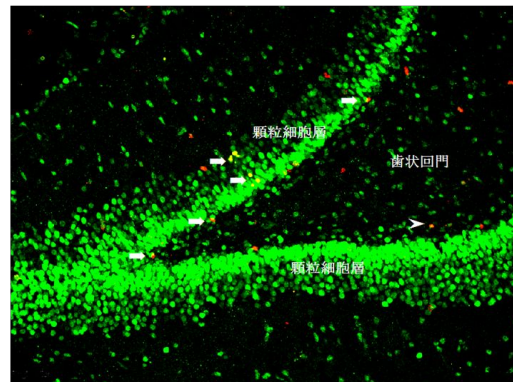


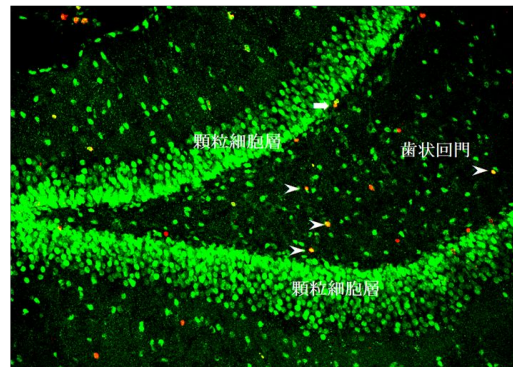
図3に21日齢での免疫組織染色画像を示す。2%イソフルラン群では、BrdUとProx1で二重染色された顆粒細胞が歯状回門により多く存在している。

図3

21日齢 対照群(空気暴露群)

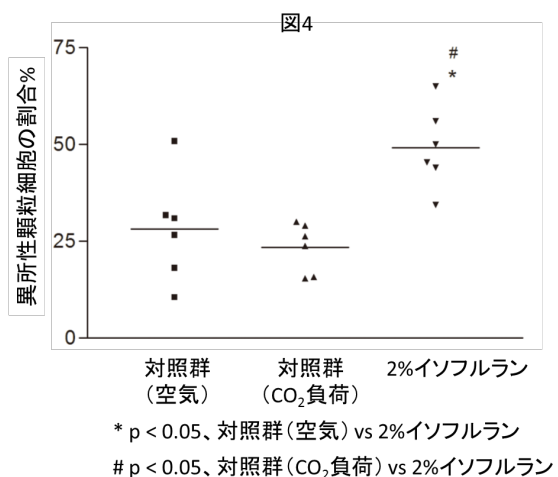


21日齢 2%イソフルラン群

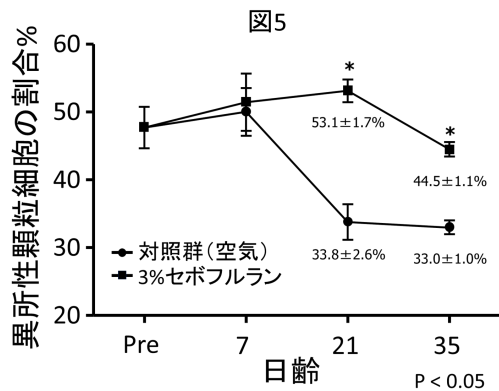


➡: 顆粒細胞層にある共標識された顆粒細胞
 ➤: 歯状回門にある共標識された顆粒細胞

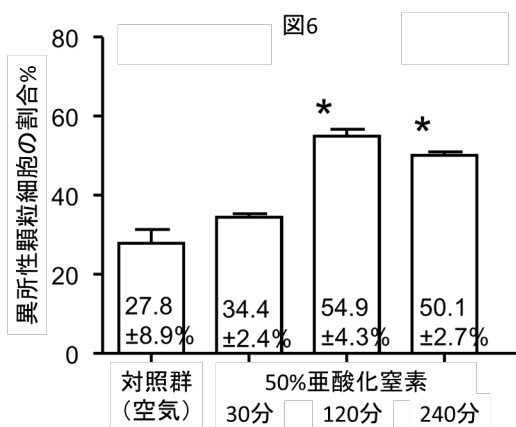
また、21日齢の比較では、二酸化炭素負荷群と空気暴露対照群に差はなく、2%イソフルラン負荷群のみで異所性顆粒細胞の割合が高かった(図4)。



3%セボフルラン群と空気暴露対照群との比較でも、21日齢と35日齢で3%セボフルラン群の異所性細胞の割合が高かった(図5)。

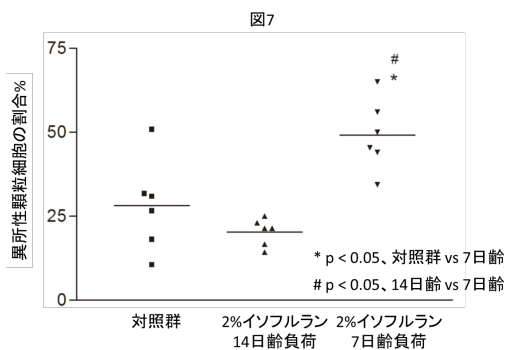


21日齢の比較では、50%亜酸化窒素を120または240分間負荷した群では、異所性顆粒細胞の割合が高かった(図6)。



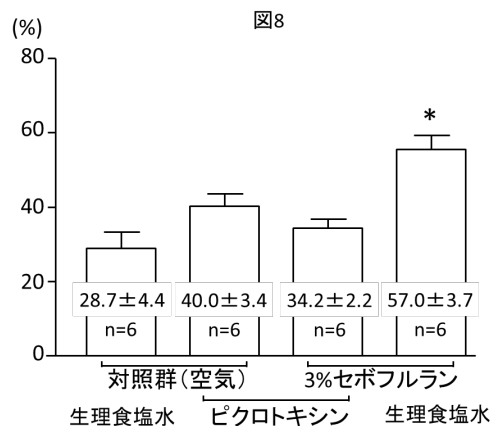
(2)【吸入麻酔薬を7日齢と14日齢で負荷した場合の比較】

2%イソフルランを7日齢に負荷すると異所性顆粒細胞の割合が高いが、14日齢に負荷した場合は対照群と差がなかった(図7)。



(3)【吸入麻酔薬負荷とGABA(A)受容体拮抗薬投与】

3%セボフルランを7日齢に負荷し、8-14日齢に生理食塩水を投与した群では、異所性顆粒細胞の割合が増加したが、8-14日齢にピクロトキシンを投与した群では、異所性顆粒細胞の割合は対照群と差がなかった(図8)。



* p < 0.05 : vs 対照群, セボフルラン+ピクロトキシン

以上の結果をまとめると、2%イソフルラン、3%セボフルラン、50%亜酸化窒素を7日齢のラットに120分間負荷すると、海馬歯状回顆粒細胞の正常な移動が抑制される。これは吸入麻酔薬負荷による呼吸抑制で高二酸化炭素血症になるためではない。低濃度(1%イソフルラン)や、短時間(50%亜酸化窒素30分間)の負荷では、移動抑制は現れない。また、14日齢まで成長した時点で2%イソフルランを負荷しても、移動抑制は生じない。さらに、GABA(A)受容体拮抗薬のピクロトキシンは、3%セボフルラン負荷による移動抑制効果を阻害する(移動が正常化する)。

幼若脳ではGABAが抑制性ではなく興奮性に作用するためと考えられており、その点まで明らかにするために、NKCC1抑制作用のある薬物を投与する実験も計画していたが、実行できなかった。

7日齢までのラット幼若脳では、吸入麻酔薬のもつGABA受容体刺激作用のため海馬歯状回顆粒細胞の正常な移動が阻害されることが示された。しかしヒトにおいては、幼児期の吸入麻酔薬の使用が、成長後の学習・記憶障害を引き起こすことはないといわれている。本研究で示された現象がヒトでも同様に起こるか、起こったとしても臨床的な影響が現れるかは、慎重に検討する必要がある。

<引用文献>

[1] Jevtovic-Todorovic, V., et al., Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci*, 2003. 23: 876-82.

[2] Briner, A., et al., Volatile anesthetics rapidly increase dendritic spine density in the rat medial prefrontal cortex during synaptogenesis. *Anesthesiology*, 2010. 112: 546-56.

[3] Koyama, R., et al., GABAergic excitation after febrile seizures induces ectopic granule cells and adult epilepsy. *Nat Med*, 2012. 18: 1271-8.

[4] Hemmings HC, Jr., Akabas MH, Goldstein PA, Trudell JR, Orser BA, Harrison NL: Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. Trends Pharmacol Sci 2005; 26: 503-10

[5] Wojtowicz, J.M. and N. Kee, BrdU assay for neurogenesis in rodents. Nat Protoc, 2006. 1: 1399-405.

[6] Iwano, T., et al., Prox1 postmitotically defines dentate gyrus cells by specifying granule cell identity over CA3 pyramidal cell fate in the hippocampus. Development, 2012. 139: 3051-62.

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)

SAITO Hitoshi, KATO Rui, HASHIMOTO Toshikazu, UCHIDA Yosuke, HASE Tetsutaro, TSURUGA, Kenkichi, TAKITA Koichi, MORIMOTO Yuji, Influence of nitrous oxide on granule cell migration in the dentate gyrus of the neonatal rat. Biomedical Research (Tokyo), 査読有, 39 巻, 2018, p39-45

DOI: 10.2220/biomedres.39.39

〔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

橋本 聡一 (HASHIMOTO, Toshikazu)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・

客員研究員

研究者番号: 40281810

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

斉藤 仁志 (SAITO, Hitoshi)

長谷 徹太郎 (HASE, Tetsutaro)