

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 7 日現在

機関番号: 10101

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2010~2012

課題番号: 22591699

研究課題名(和文) 幼弱脳における麻酔薬の神経毒性の機序—高二酸化炭素血症との関連について—

研究課題名(英文) Mechanism of neurotoxicity by anesthetics in the developing brain—Effect of hypercapnia

研究代表者

森本 裕二(MORIMOTO YUJI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00250457

研究成果の概要(和文):

新生児期の低酸素性高二酸化炭素血症が、成長後の学習能力に関してどのような影響を与えるかを調査するために、ラットを用い成長後の海馬機能を検討した。生後 7 の日目新生児ラットを、高濃度二酸化炭素(CO₂;13%)に、2 または 4 時間暴露した。生後 10 週間目でのモリス水迷路テストで、CO₂へ暴露されたラットは学習習得能力が低下した。海馬 CA1 領域におけるシナプスの長期可塑性(long-term potentiation)形成は抑制された。一方、短期可塑性(paired-pulse responses)の反応は増強した。新生児期の低酸素性高二酸化炭素血症は、成長後の海馬シナプス可塑性障害を来とし、それが学習障害の一因となっている可能性が示された。

研究成果の概要(英文):

To investigate the possible long-term consequences of neonatal exposure to hypoxic hypercapnia regarding learning ability, we investigated the effect of neonatal hypoxic hypercapnia on later functions in the hippocampus. Neonatal rat pups (postnatal day 7; P7) were exposed to a high concentration of carbon dioxide (CO₂; 13%) for 2 or 4 h. Exposure to CO₂ in P7 rat pups disrupted later learning acquisition, as assessed in 10-week-old adult rats subjected to a Morris water maze test. Induction of long-term potentiation (LTP) in the synapses of the hippocampal CA1 area was also impaired, whereas the paired-pulse responses of population spikes exhibited a significant increase in CO₂-exposed rats. Such long-lasting modifications in hippocampal synaptic plasticity may contribute to the learning impairments associated with perinatal hypoxic hypercapnia and acidosis.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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: 麻酔薬、神経毒性、幼弱期、高二酸化炭素血症

1. 研究開始当初の背景

幼弱ラットが麻酔に暴露されると、脳の広範囲の部位に神経細胞死が起こることが、2003年に報告されて(J Neurosci 2003;23:876)以来、イソフルランなどの吸入麻酔薬、バルビタールやケタミンなどの静脈麻酔薬など、多くの麻酔薬に神経毒性効果があることが報告されている(Anesth Analg 2008;106:1681)。しかし、その機序については当時も、現在も解明されていない(Anesthesiology 2009;110:703)。幼弱動物が麻酔に暴露されると、呼吸、循環など種々の生理学的変化が生じるが(Anesth Analg 2006;102:75)、神経毒性が麻酔薬そのものによって起こるのか、それとも二次的に生じる生理学的変化によって生じるのかも明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、幼弱ラットに対する麻酔薬投与の結果二次的に生じる低酸素性高二酸化炭素血症自体が、成長後の学習能力や、シナプス可塑性に対してどのような変化を及ぼすかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には生後7日目のWister/ST雄性ラットを用いた。実験はすべて「北海道大学における動物実験に関する指針」に準拠して行った。

(2) 幼弱期の二酸化炭素負荷

新生児ラットを、酸素21%下に高濃度二酸化炭素(CO₂;13%)に、2または4時間暴露した。この濃度は以前我々が行ったペントバルビタール負荷による低酸素性高二酸化炭素血症(Brain Res 2011;1388:69)を模倣するように設定した。血液ガス分析は、経胸郭的に30ゲージ針を左心室に挿入し、約100μlの採血を行い(採血後ラット

は死亡)、ガス分析器(ABL510)で測定した。

(3) モリス水迷路試験:行動観察学的に成長後の学習機能を評価するため、生後9-10週齢にHidden platform testとProbe trialを施行した。Hidden platform testは1回90秒間のテストとし、platformへの到達時間を測定した。テストは連続2回施行し平均値を記録し、これを1セッションとした。1日2セッション、連続4日間(計8セッション)施行した。Probe trialは、platformを取り除いたプールに、ラットを60秒間泳がせ、その間Platformを留置していた4半円領域に滞在した割合を百分率で記録した。

(4) 電気生理学的検討

生後9-10週齢に、海馬の電気生理学的評価を行った。ハロタン麻酔下に、記録電極を海馬CA1領域の錐体細胞層に、刺激電極は同側のSchaffer側枝に挿入し、Schaffer側枝へ刺激電位によりCA1領域に誘発された細胞外集合電位(PSA)を記録した。海馬シナプス長期可塑性の指標として、長期増強(Long-term potentiation; LTP)を測定した。LTP誘導のため、高頻度電気刺激(HFS)を与え、HFS後のPSAの増強をもってLTP形成とした。HFS後、60分間測定した。短期シナプス可塑性の指標とされるpaired-pulse responseは、刺激を2発組み合わせ合わせて同じシナプス経路に与え、一つ目のPSAと二つ目のPSAを比較することで評価した。

4. 研究成果

(1) 血液ガス

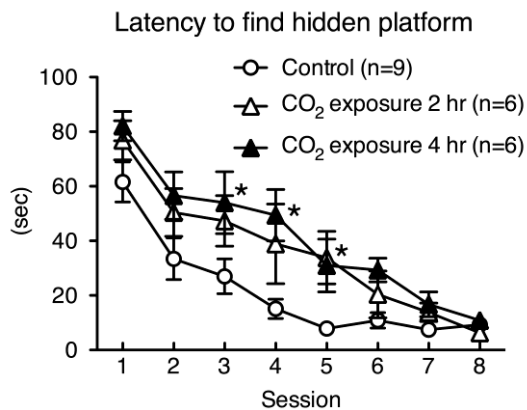
表に示すように、新生児ラットを13%CO₂に暴露することにより、低酸素性高二酸化炭素血症を生じた。

負荷時間	PaCO ₂	PaO ₂
------	-------------------	------------------

(分)	(mmHg)	(mmHg)
コントロール	40	115
60	73	69
120	69	70
180	71	80
240	89	69

(2) モリス水迷路試験

幼若時の二酸化炭素暴露が、成長後の学習効率に与える影響を Hidden Platform test を用い調査した。各セッションにおける Hidden platform test の結果を経時的に図1に示す。



<図1>

各群を比較すると、二酸化炭素暴露群において各セッションで Platform 到達時間の延長を認めたが、最終施行においては各群の Platform 到達時間は同程度であった。暴露群と時間経過を要素とし繰り返しのある二元配置分散分析を行った結果、暴露群で有意差を認めた ($F_{(2,19)}=20.2$; $P<0.001$)。各群の全セッションにおけるプラットフォーム到達時間の合計値はそれぞれ、コントロール群: 345.4 ± 31.9 秒、2時間二酸化炭素暴露群: 575.8 ± 65.8 秒、4時間二酸化炭素暴露群: 660.2 ± 68.7 秒であった。一元配置分散分析と post-hoc test を用い、各暴露群とコントロール群における群間比較を行った結果、 $P<0.01$ で有意差を認めた。次に、幼若時の二酸化炭素暴露が成長後の水泳速度に与える影響を調査した。各群の Probe Trial 施行中6

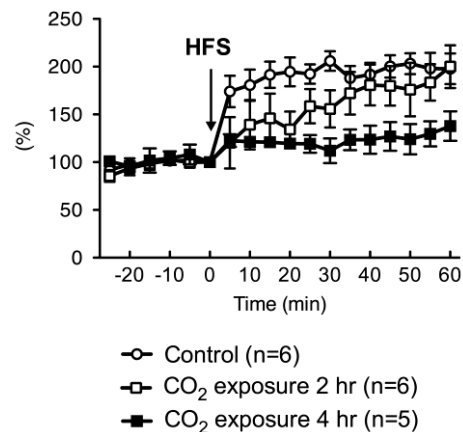
0秒間の平均水泳速度を一元配置分散分析を用い統計学的検討を行ったが、群間に有意差を認めなかった。すなわち、幼若時の二酸化炭素暴露は、成長後の水泳速度に影響を与えなかった。以上から、Hidden Platform test で見られた、二酸化炭素暴露群における Platform 到達時間の延長は、水泳能力の低下の結果ではなく、学習習得能力の低下によるものと考えられた。

最後に、記憶・学習の保持能力を Probe Trial を用い評価した。各群の N 領域滞在時間のテスト時間に占める割合は各群の間に有意差を認めなかった。以上から、幼若時の二酸化炭素暴露は、成長後の記憶の保持能力に影響しなかった。

(3) 電気生理学的検討

① 海馬シナプス長期可塑性(LTP)形成に及ぼす影響

幼若時の二酸化炭素暴露が成長後の海馬 LTP の形成に与える影響を調査し、PSA の前後の変化率を経時的に示した(図2)。



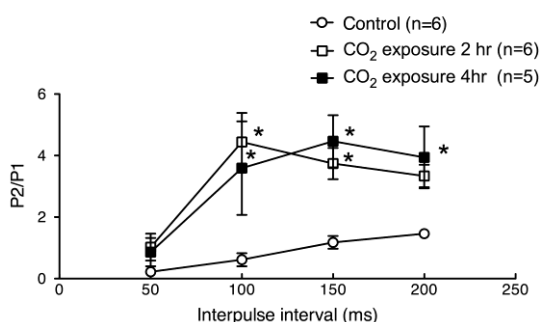
<図2>

コントロール群における、HFS 後の PSA の最大値は $214.1 \pm 29.82\%$ であった。二酸化炭素暴露群においては十分な LTP 形成を認めず、二元配置分散分析の結果、暴露群で有意差を認めた。LTP 形成が安定化したと思われる HFS30分後の PSA 値を、一元配置分散分析と

post-hoc test を用い、各暴露群とコントロール群における群間比較を行った結果、 $P < 0.01$ で有意差を認めた。

② 海馬シナプス短期可塑性 (Paired-pulse response) 形成に及ぼす影響

一般的に、海馬 CA1 領域の錐体細胞層の短期間の刺激では、二つ目の PSA は抑制性的の影響を受け、一つ目の PSA と比べて低下する。しかし、二酸化炭素暴露群では、すべての interpulse interval において、二つ目の PSA はむしろ大きくなった (図3)



<図3>

以上から、新生児期の低酸素性高二酸化炭素血症は、成長後の海馬シナプス可塑性障害を来し、それが学習障害の一因となっている可能性が示された。今回の低酸素性高二酸化炭素血症は、麻酔薬に暴露された程度のものであり、麻酔薬による神経毒性の機序として、麻酔暴露によって二次的に生じる呼吸性変化の影響も無視できない事が示唆された。

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2件)

(1) Kaori Tachibana, Toshikazu Hashimoto, Koichi Takita, Ryoko Ito, Rui Kato, Yuji Morimoto:

Neonatal exposure to high concentration of carbon dioxide produces persistent learning deficits with impaired hippocampal synaptic plasticity. Brain Research, 査読有, 1507, 2013, 83-90

DOI:10.1016/j.brainres.2013.02.045

(2) Kaori Tachibana, Toshikazu Hashimoto, Rui Kato, Yosuke Uchida, Ryoko Ito, Koichi Takita, Yuji Morimoto: Neonatal administration with dexmedetomidine does not impair the rat hippocampal synaptic plasticity later in adulthood, Pediatric Anesthesia, 査読有, 22, 2012, 13-9,

DOI:10.1111/j.1460-9592.2012.02.03810.x

[学会発表] (計7件)

(1) 加藤 類、シンポジウム 麻酔は脳にとって“悪”なのか: 幼若ラットの海馬機能に対する全身麻酔薬の長期的な障害作用、日本臨床麻酔学会 2012年11月1日、ビッグパレット福島 福島

(2) 橋 かおり、シンポジウム 麻酔は脳にとって“悪”なのか: 幼若動物での麻酔薬による神経毒性の評価において麻酔薬暴露時の血液ガス異常は無視できるか? 日本臨床麻酔学会 2012年11月1日、ビッグパレット 福島

(3) Rui Kato, Electrophysiological Impairments Caused by Sevoflurane Exposure Depended on Developmental Period in Rat, American Society of Anesthesiologists, 2012年10月15日、convention center, Washington DC, USA

(4) Yosuke Uchida, The Effect of Hypercapnea and Oxygen Concentration on Neuroapoptosis in Neonatal Rat Brain, American Society of Anesthesiologists, 2012年11月1日、convention center, Washington DC, USA

(5) 橘 かおり、新生ラットモデルにおける低酸素・高二酸化負荷による成長後の神経学的予後の検討、日本神経麻酔・集中研究会 2012年4月14日、岡山大学、岡山

(6) 森本 裕二、シンポジウム 幼弱脳に対する麻酔薬の神経毒性：幼弱脳に対する麻酔薬の神経毒性-概論—日本麻酔科学会学術集会 2011年5月21日、ポートピアホテル、神戸

(7) 橘 かおり、シンポジウム 幼弱脳に対する麻酔薬の神経毒性：幼若動物でみられる全身麻酔による神経毒性に、呼吸抑制による影響はないのだろうか？、日本麻酔科学会学術集会 2011年5月21日、ポートピアホテル、神戸

6. 研究組織

(1)研究代表者

森本 裕二 (MORIMOTO YUJI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号:00250457

(2)研究分担者

橘 かおり (TACHIBANA KAORI)
北海道大学病院・医員
研究者番号:50374468

敦賀 健吉 (TSURUGA KENKICHI)

北海道大学病院・助教
研究者番号:50399896

(3)連携研究者

無し