

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890032

研究課題名（和文）GABA 作動性ニューロンの可視化による成長期の脳神経回路構築への麻酔薬の影響

研究課題名（英文）The influence of the anesthetics on cerebral nerve circuit construction in period of growth by visible of the GABAergic neurons

研究代表者

久保 和宏 (KUBO KAZUHIRO)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：80546531

研究成果の概要（和文）：1.5%セボフルランを生後1日、3日、5日に各12時間、計36時間投与した。成熟後、Morris water maze testにより、海馬、基底核、大脳皮質、小脳などを介する学習能力を検討した。

その結果、セボフルラン麻酔群の学習能力、特に位置感覚の学習能力は、非麻酔群と比べても差がなかった。また、高架式十字迷路テストを行った。その結果、セボフルラン投与群では不安行動が強くなる傾向が見られた。

研究成果の概要（英文）：I administered 1.5% sevoflurane for each 12 hours on 1st day, 3rd day and 5th day after birth. After maturity, I examined teachability to go through a hippocampus, a base nucleus, a cerebral cortex, the cerebellum by Morris water maze test. As a result, the teachability of the sevoflurane treated group, the teachability of the sense of position in particular did not have a difference in comparison with the non-anesthesia group either.

Next, I examined Elevated plus maze test. As a result, the tendency that an anxiety behavior increased was seen with the sevoflurane treated group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	770,000	231,000	1,001,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,470,000	441,000	1,911,000

研究分野：麻酔学

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：GFP、GAD67、吸入麻酔薬

## 1. 研究開始当初の背景

胎児・新生児に対する麻酔薬の影響は、未解明である。麻酔薬の使用により短期的には一過性の睡眠障害や筋緊張が認められたとの報告もあるが、長期的な神経障害を認める報告は少なく現在の麻酔方法で長期的な安全性は保たれていると考えられている。しかし、脳の発達段階における麻酔薬の影響は本当に少ないのであろうか？Olney らのグループは、NMDA 受容体拮抗薬であるケタミンが、発達段階のラットの脳でアポトーシスを誘導し、さらに行動障害を起こすこと (Olney et al. *Anesthesiology* 2004) を報告し麻酔科医の間で大きな議論となっている。その他の麻酔薬でも動物実験においては投与量・投与期間で神経変性を起こすことが報告されている。

現在、世界では年間 150 万人の胎児や新生児が何らかの麻酔薬を母胎経由、もしくは直接投与されている。麻酔薬が脳の発達に影響を与える一因子である可能性が報告されているものの、胎児・新生児に対する影響は、未解明である。研究目的は、GABA 合成酵素 (GAD67) のプロモーターの下流に GFP を挿入し、GABA 作動性ニューロンが同定可能なノックインマウスを用いて、胎仔期、新生期の麻酔薬の曝露が発達段階の中樞神経系の構築においてどのような影響を与えるかを調べることである。そして、その影響が長期間続くものであるかを麻酔薬に対する感受性・疼痛閾値の変化を個体レベルで解析し、臨床使用されている麻酔薬の分子レベルにおける安全性を評価する新規アプローチである。

## 2. 研究の目的

哺乳類の脳の構造はその形成期に細胞増殖、

分化、移動、配置、シナプス形成を経て非常に精緻な神経ネットワークを構築し記憶、学習など様々な高次機能を有するようになる。近年では、これらの機構に関与する分子が次々に明らかになりその解明が進んでいる。GABA 作動性ニューロンは側脳室腹側の基底核原基から分化し接線方向の移動 (tangential migration) により大脳皮質内に配置されることが分かっている。本研究目的である麻酔薬のこれらの機構に対する影響はいまだ明らかでないが、大脳皮質における 6 層構造を形成する過程において GABA 作動性ニューロンの移動形式に関与する報告は多く見られる。また、その移動に関与する分子も遺伝子改変マウスにより同定されているが、まだ多くの分子が関与していると考えられる。それらに麻酔薬が作用し、神経細胞の分化、移動、定着に影響を与え、脳神経系の構築に異常を引き起こし、個体レベルでの行動異常を起こす可能性がある。

GAD67 (glutamate decarboxylase) は GABA 作動性ニューロンの細胞体に分布するグルタミン酸から GABA を合成する酵素の一つである。この遺伝子の下流に GFP 遺伝子を挿入し、GABA 作動性ニューロンが同定可能なノックインマウスを今回使用した。このマウスでは非常に高い精度で GABA 作動性ニューロンに一致することを確認してある (Tamamaki et al., *J. Comp. Neurol.*, 2003)。このマウスを用いることにより GABA 作動性ニューロンが可視化でき、それに対する麻酔薬の影響を確認することができる利点がある。

### 【研究その 1】

現在、臨床使用頻度の高い麻酔薬に対し、脳神経系の構築における GABA 作動性ニューロンの数と部位に対する影響の有無を投与時期、投与量の観点から明らかにする。

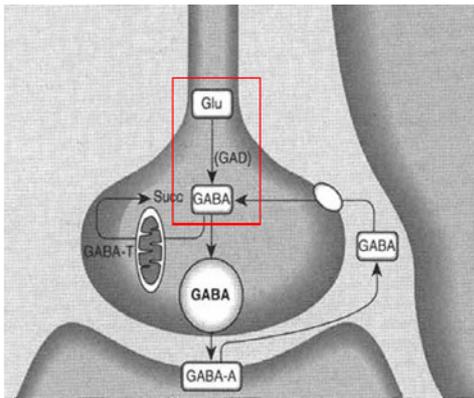
## 【研究その2】

脳神経系形成期における麻酔薬の長期的な影響を行動解析により評価する。

研究その1の結果と照らし合わせ分子レベルと個体レベルの両面から評価することにより、麻酔薬の分子レベルでの危険性、安全性を証明する。

### 3. 研究の方法

麻酔薬が胎児期、新生児期においてどのような影響を与えるかを明らかにするために、GAD67-GFPノックインマウスを用いて組織学的にGABA作動性ニューロンの脳各部位での分布や神経細胞の比率を求め、麻酔薬の有無で投与時期、麻酔薬の種類で比較検討する。また、その影響を成熟したマウス(12~16週齢)で麻酔薬感受性(duration of loss of righting reflex)、不安レベル(Open-field test)、協調運動(Rota-rod)、疼痛閾値(Hot plate test, Formalin test, Planter test)を用いて解析する。



### 4. 研究成果

1. 5%セボフルランを生後1日、3日、5日に各12時間、計36時間投与した。濃度1.5%としたのは、2.5%以上のセボフルランでは自発呼吸や循環を保てないと判断したから

である。そして、成熟後(4月齢)、海馬、基底核、大脳皮質、小脳などが関与する水中での動きから学習能力を検討した(Morris water maze test)。その結果、セボフルラン麻酔群の学習能力、特に位置感覚の学習能力は、非麻酔群と比べても差がなかった。また、学習に依存しない非学習系の不安を評価するため、高架式十字迷路テストを行った。その結果、セボフルラン投与群では不安行動が強くなる傾向が見られたため、さらに実験数を加え、原因を研究していく予定である。

### 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 Thermal hyperalgesia via supraspinal mechanisms in mice lacking glutamate decarboxylase 65.

Kubo K, Nishikawa K, Ishizeki J, Hardy-Yamada M, Yanagawa Y, Saito S.

The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 査読有 331(1):162-9. 2009

② Altered responses to propofol, but not ketamine, in mice deficient in the 65-kilodalton isoform of glutamate decarboxylase.

Kubo K, Nishikawa K, Hardy-Yamada M, Ishizeki J, Yanagawa Y, Saito S.

The Journal of pharmacology and experimental therapeutics

査読有 329:592-9. 2009

[学会発表](計1件)

① 天田早香

セボフルラン麻酔からの覚醒への低用量レミフェンタニル持続併用の影響

第57回日本麻酔科学会

福岡国際会議場(福岡市) 2010.6.3

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 和宏 (KUBO KAZUHIRO)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：80546531