

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 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591709

研究課題名（和文） 妊娠中の吸入麻酔薬暴露が出生後の仔の脳神経発達に及ぼす影響

研究課題名（英文） Effects of Inhalational anesthetic exposure during pregnancy on neurodegeneration of neonatal mice

研究代表者

植木 正明 (UEKI MASAOKI)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：20213332

研究成果の概要（和文）：妊娠 17 日目での 6 時間のイソフルランの暴露は出生後の仔の学習機能及びシナプス形成に影響を及ぼし、海馬 BDNF mRNA は増加していたが、1 時間暴露では影響を与えなかった。さらに妊娠 10 日目では 1 時間及び 6 時間のイソフルラン暴露では影響を与えなかった。さらに、脳神経発達に影響を与える吸入麻酔薬の 6 時間暴露後でも、その成長過程で環境をエンリッチにして飼育することで、学習機能を改善することが出来、環境エンリッチメントは、まったく新しい治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Exposure of 1% isoflurane on pregnant mice (embryonic day 17) had an influence on learning function, morphological synapse formation (synaptophysin staining) and BDNF mRNA on postnatal day 7. Furthermore, environmental enrichment improved learning function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：吸入麻酔薬、脳神経変性、妊娠

1. 研究開始当初の背景

動物実験で NMDA 受容体の拮抗薬や GABA_A 受容体作動薬などの麻酔薬が生後 7 日目の発達過程の脳に器質的変化を伴う脳機能障害を起こすことが報告され、臨床小児麻酔学上の問題として注目を集めた。近年、妊婦が妊娠経過中に全身麻酔を受けることは決して稀でなく、その際の麻酔薬による胎児

への影響は議論されてきた。しかし、最近では、不妊治療や胎児治療、分娩時の鎮痛処置（無痛分娩）など、妊婦が妊娠経過中に全身麻酔薬に長時間暴露される機会が多くなってきたが、その後に生まれてきた児の脳の成長発達に及ぼす影響は検討されていない。妊娠中の麻酔薬の暴露時期と時間の点からその影響を検討し、妊娠中の母親の麻酔薬の暴

露による安全性の再評価を行なう必要がある。さらに、不幸にして、脳障害を持って生まれてきた児の脳の可塑性を引き出し、社会生活に少しでも適応できる治療法の開発が現在の重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の2つである。

(1) 妊娠マウスに対する全身麻酔薬であるイソフルレン暴露による、その後出生した仔マウスの脳の発達過程に及ぼす影響を、妊娠10日目、17日目のマウスに1、6時間のイソフルランを暴露させ、出産後の仔が成長した8週間目に行う8方向迷路学習実験による脳の高次機能検討から、妊娠中の全身麻酔薬暴露による安全性を妊娠時期と暴露時間の面から検討することである。さらに、その原因をイソフルラン暴露が仔マウスの神経ネットワーク形成時期に必要な神経成長促進因子の観点から探ることである。

(2) 脳の発達時期に受けた障害は、児の社会的環境（外界からの各種の刺激や親の愛情など）を豊かにすることで、脳の可塑性を引き出せる可能性があると考えられている。生後7日目にイソフルラン6時間暴露を受けたマウス（脳の発達障害が生じている）の離乳後に、通常の飼育ゲージ（1ゲージに5匹以内）で飼育する群と、トンネルや回し車などで環境をエンリッチ（環境エンリッチメント）にしたゲージで飼育する群に分けて、その後8週間目に8方向迷路学習実験による脳の高次機能検討から、脳障害を受けた仔マウスの飼育時の環境エンリッチメント効果により、脳の可塑性のポテンシャルを引き出せるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

① 妊娠10日、17日目のマウスにイソフルランの暴露時間を変えて吸入させ、出産後、8週間目の仔マウスに8方向放射状迷路を利用し、空間認知記憶学習と脳の組織学的検討を行う。

1) 対象動物：C57BLマウス

2) イソフルラン暴露：特製ボックスに飼育ゲージごと入れて、酸素濃度50%でイソフルラン1%を吸入させる。酸素およびイソフルラン濃度は麻酔ガスモニター（AS/3モニター、IMI社）で確認する。対照は酸素濃度50%ガスのみで暴露させる。

3) 実験群：妊娠10日、17日目のマウスに50%酸素濃度下に1%イソフルレンを1、6時間暴露する群（イソフルラン群、それぞれN=4腹）と、対照として、50%酸素濃度下に1、6時間暴露する群（対照群、それぞれN=4腹）分けて、暴露させる。1妊娠マウスから4-6匹出産すると仮定。その後生後8週間目に、仔マウスで空間認知記憶学習（N=15）と脳組織学的検討（N=5）を行う。

4) 空間認知記憶学習方法：生後8週間目に8方向放射状迷路を利用して空間認知記憶学習を行う。

5) 脳組織学的検討：生後8週間目での空間認知記憶学習終了後、脳を灌流固定し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色及びシナプトフィジン免疫染色を行う。

②妊娠中の麻酔薬暴露が生後7日目の仔脳の海馬でのBDNF(brain-derived neurotrophic factor) mRNA発現に影響を与えているかどうかを検討した。

1) 方法：イソフルラン曝露はマウスを妊娠10日、17日目に特製ボックスに飼育ゲージごと入れ、麻酔ガスモニター下に、酸素50%で1%イソフルラン6時間曝露した。対照は

50%酸素曝露である。出生1週間後に仔マウスの大脳皮質及び海馬BDNF mRNAをreal time PCRで比較検討した。

③生後7日目に1%イソフルラン6時間暴露を受けたマウス(脳の発達障害が生じている)の離乳後に飼育環境をエンリッチにすることで、脳高次機能障害が回復するかどうか検討した。

脳の発達時期に受けた障害は、児の社会的環境(外界からの各種の刺激や親の愛情など)を豊かにすることで、脳の可塑性を引き出せる可能性があると考えられる。

実験群

1) 麻酔薬曝露: C57BL 妊娠マウスを飼育し(それぞれ実験群3匹、1匹から仔マウス4-6匹仔マウス誕生の計算)、出産7日目の子マウスにイソフルラン6時間暴露させる(脳の発達障害が生じている)。

2) 実験群: 生後7日目に1%イソフルラン6時間の暴露を受けたマウスを対象に、離乳後4週間、通常の飼育ゲージで飼育する群(対照群、N=15)と、トンネルや回し車などで環境をエンリッチにしたゲージで飼育する群(環境エンリッチ群、N=15)に分けて、その後8方向迷路学習実験による脳の高次機能の解析と、実験終了後に脳を取り出し、BDNF(brain-derived neurotrophic factor)mRNAをreal time PCRで測定し、シナプト形成を免疫染色で組織学的に検討した。

3) 環境エンリッチメント: 飼育ゲージ内に、トンネルやはしご、回し車などの遊び道具を入れて、また寝床のための部屋を入れた特製ゲージで飼育する。

4. 研究成果

① 妊娠17日目に6時間の1%イソフルランで暴露され、出産した雄の仔マウスの空間認知学習機能は低下し、シナプトフィジン免疫染色性が大脳皮質および海馬で低下していた。一方、イソフルラン1時間暴露では空間認知学習機能及びシナプトフィジン免疫染色性に変化はなかった。

また、妊娠10日目での1時間及び6時間の1%イソフルラン暴露では空間認知学習機能およびシナプトフィジン免疫染色性は変化しなかった。

② 大脳皮質でのBDNFmRNAは両群間で差はなかったが、海馬では50%酸素群に比べて、1%イソフルラン6時間曝露群で高い傾向にあった。また、妊娠10日目では、大脳皮質および海馬でのBDNFmRNA発現に差は認められなかった。

③ 環境エンリッチ群では8方向迷路学習で失敗率が改善し、学習効果が認められ、BDNFmRNAは有意に低下していた。しかし、組織学的にはシナプス形成に差は認められなかった。

これらの結果から、妊娠中の子宮内での仔の脳神経発達がピークになる妊娠後期での6時間の吸入麻酔薬の曝露が出生後の仔の脳神経発達に影響を与える可能性がある。その後の迷路学習機能が低下した機序として、妊娠17日目という胎児の脳の成長期にある時期のイソフルラン曝露が胎児の脳、特に海馬領域に障害を与え、その結果、その障害を修復するためにBDNFmRNAが過剰発現したものと考えられる。しかし、マウスの6時間がヒトの何時間に相当するか、などはたしてヒトにすぐに

当てはまるかどうかは不明であるが、現在行われている妊娠中の胎児麻酔や非妊娠手術での麻酔方法の再検討が必要であることを示している。一方、環境エンリッチメントには効果のある時期、必要な飼育期間、どれぐらい持続するか、などの問題点もあるが、環境エンリッチメントは、麻酔薬による脳神経変性に対して、今までの薬物治療とは違う、まったく新しい治療法となる可能性が示唆された。

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

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)

[学会発表] (計4件)

- ① 植木 正明, 森下 淳, 上嶋 江利, 魚川 礼子, 大井 まゆ, 前川 信博. 環境エンリッチメントはイソフルラン麻酔後の脳発達障害を改善する. 第58回日本麻酔科学会学術集会. 2011.5.19、神戸
- ② 上嶋 江利, 植木 正明, 森下 淳, 魚川 礼子, 大井 まゆ, 前川 信博. 妊娠マウスへの吸入麻酔薬暴露は出生後の仔マウスに脳神経発達障害を及ぼす. 第58回日本麻酔科学会学術集会. 2011.5.19、神戸
- ③ Teppei Tsuchimoto, Masaaki Ueki, Jun Morishita, Hiroyuki Miyazaki, Nobuhiro Maekawa. Erythropoietin Attenuates Isoflurane-Induced Neurodegeneration and Learning Deficits in Mouse Brain. American Society of anesthesiologists 2010 Annual Meeting. 2010.10.19, San Diego, U. S. A.
- ④ Jun Morishita, Masaaki Ueki, Teppei Tsuchimoto, Nobuhiro Maekawa. Isoflurane Induces Neurodegeneration in Younger Mice but Not with the Exposure for Shorter Duration. Society of anesthesiologists 2010 Annual Meeting. 2010.10.19, San Diego, U. S. A.

6. 研究組織

(1)研究代表者

植木 正明 (UEKI MASA AKI)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20213332