

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293331

研究課題名(和文) 発達中の脳における麻酔薬の神経毒性に関する包括的研究

研究課題名(英文) Neurotoxicity of general anesthetics in the developing brain

研究代表者

風間 富栄 (KAZAMA, TOMIEI)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・その他部局等・教授)

研究者番号：40158837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、動物実験の結果から、小児期、胎児期などでは全身麻酔薬によって長期的には認知・精神機能が悪影響を受ける可能性が指摘されている。本研究では動物実験から臨床応用を視野に入れた対処法の開発、及びヒトでの疫学調査を含む包括的な研究を行った。その結果、幼若期マウスのセボフルランへの曝露は成長後に学習障害のみならず、種の生存に必要な母性行動にまで影響を及ぼすことがわかった。また発達期の脳においては麻酔薬によって酸化ストレスが増大し、その対応策として水素ガス毒性を大幅に防げることが判明した。一方、ヒトにおける疫学調査では、1時間程度の麻酔では自閉症の発症リスクには大きな影響が無いことが判明した。

研究成果の概要(英文)：In animal models, exposure to general anesthetics induces widespread increases in neuronal apoptosis in the developing brain. Subsequently, abnormalities in brain functioning are found as adulthood, long after the anesthetic exposure. Here we found that female mice that received neonatal exposure to sevoflurane in the developing period had impairments in maternal behaviors, indicating pervasive deficits in brain functioning. We also found that sevoflurane exposure in the developing period increased oxidative stress and mice co-administered of hydrogen gas as antioxidant during sevoflurane exposure did not exhibit the behavioral deficits. We also investigate whether there is an association between early childhood anesthesia exposure and the development of autistic traits in humans. However, no significant difference was found between autistic traits of male children who received anesthesia under 4 years of age and age-matched population sample.

研究分野：麻酔学

キーワード：全身麻酔薬 発達期 神経毒性 自閉症 マウス 水素 母性行動

### 1. 研究開始当初の背景

現在臨床で広く用いられている全身麻酔薬は、脳機能への不可逆的な影響は無いとして使われてきた。しかしながら近年、動物実験の結果から、小児期、胎児期などでは全身麻酔薬によって長期的には認知・精神機能が悪影響を受ける可能性が指摘されている。米国では官民連携プロジェクト SmartTots\* が進行中であり、乳幼児の脳に対する麻酔薬の長期的影響について調査している。小児の外科手術において、全身麻酔は不可欠なものである。現時点では動物実験の結果がヒトに外挿できるのかは明らかではないが、小児臨床医療への影響の大きさを考えると、この問題の解決が喫緊の課題である事は論を待たない。しかしながら我が国において、この問題に対する包括的な研究は著しく立ち遅れており、このままでは我が国の小児臨床医療水準の低下を招く危険性がある。

### 2. 研究の目的

当該研究では臨床応用を視野に入れた、臨床応用可能な対処法の開発やヒトでの疫学調査を含む包括的な研究を行い、小児麻酔の安全性の向上を目指すことを大きな目的とする。

動物レベルでは、発達期の脳に対する全身麻酔薬の毒性について、「行動レベルでの病態解明」、「短期間内での臨床応用実現を視野に入れた対処法の開発」、「分子レベルでの麻酔薬の神経毒性メカニズムの解明」を第一～第三の小目的とした。また、ヒトレベルでは臨床小児麻酔の専門家を核にして、小児科、産婦人科、精神科などの専門的な知識、協力を取り入れ、「ヒトにおける副作用の解析及び治療戦略の検討」を第四の小目的とし、動物による行動実験の結果を基に、ヒトにおいて疫学調査を行い、小児麻酔の毒性の実態を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)「行動レベルでの病態解明」

母性行動は哺乳類にとって極めて大切な行動であり、高度な脳神経機能に依存する。吸入麻酔薬セボフルランを生後6日目に曝露されたマウスが母親になった時、正常な母性行動ができるか行動学的手法を用いて解析し、高次脳機能障害の病態について詳細を明らかにする。本研究は、防衛医科大学校動物実験施設における倫理審査において承認を受けて実施した。

#### (2)「短期間内での臨床応用実現を視野に入れた対処法の開発」

小児麻酔の神経毒性対処法に関して、我々は水素の抗酸化作用が極めて有用である可能性を報告した。水素を用いた方法は安価、副作用が少ない、簡便であるなど利点が多く、臨床応用につながる可能性がある。本研究では生後6日目のマウスにセボフルランを曝

露する時にキャリアガスに高濃度(2.8%)の水素ガスを混入する。6時間麻酔直後にアポトーシスの量をウェスタンブロット法及び免疫染色法で解析し、水素の抗神経毒性効果を解析する。さらに同様の処置を行ったマウスについて、成長後の高次脳機能を行行動学的手法を用いて解析する。本研究は、防衛医科大学校動物実験施設における倫理審査において承認を受けて実施した。

#### (3)「分子レベルでの麻酔薬の神経毒性メカニズムの解明」

対処法の有用性、安全性を担保するものは毒性メカニズムの理解が必須である。本研究では生後6日目のセボフルランを曝露させ、特に酸化ストレスに注目して毒性メカニズムを検討する。本研究は、防衛医科大学校動物実験施設における倫理審査において承認を受けて実施した。

#### (4)「ヒトにおける副作用の解析及び治療戦略の検討」

4歳未満で全身麻酔を受けた患者において、その後の自閉症スペクトラム障害などの発生率を解析した。対象は防衛医科大学校病院において4歳未満で手術を受けた6歳から12歳までの男児(麻酔曝露群)と、東京都小平市の小学校の通常学級に通う同年齢の男児(コントロール群)。これらの男児の保護者に対して、自閉症スペクトラム障害を量的に評価することが可能な標準化された方法である Social Responsiveness Scale (SRS) アンケートへの回答を依頼し、両群間の SRS スコアの平均値を比較した。比較は t-test を用いた。本研究は、防衛医科大学校における倫理審査において承認を受けて実施した。

### 4. 研究成果

#### (1)「行動レベルでの病態解明」

生後6日齢のマウスを2群に分け、コントロール群(C群)はFiO<sub>2</sub> 0.3で6時間、セボフルラン群(S群)はFiO<sub>2</sub> 0.3、3%セボフルランに6時間曝露した。雌は7週齢から交配し、出産当日に各種母性行動実験を行い、雄は11週齢で行動実験を行った。仔の生存率は生後6日目まで観察した。統計学的検討は Student's t-test で行い、生存率は log-rank test で行い、P<0.05 を有意とした。その結果、S群の妊娠・出産はC群と変わらなかった。仔の生存率はS群が有意に低かった(P<0.0001, S群, n=110; C群, n=124)。行動実験はC群(n=11)と比べ、S群(n=10)が、巣を作らず(P<0.01)、巣外に仔を放置し(P<0.05)、養育行動をほとんど行わず(P<0.01)、新生仔回収試験(P<0.05)でも有意差を認め、S群から産まれた仔をC群が養育した場合、仔は生存し(P<0.0001, S群養育, n=45; C群養育, n=44)、S群の仔の生存率が低い原因は母親にあることがわかった。しかし、初産時に行動異常を示したS群も2回目の出産では母性行動が大幅に改善され、仔の生存率や行動実験で両群間に有意差は認め

なかった。また、雄(S群, n=13; C群, n=13)も仔を攻撃するような行動異常を示した。以上より、幼若期のマウスのセボフルランへの曝露は、成長後に種の生存に必要な本能行動である母性行動に重大な影響を与えることが分かった(図1)。

社会行動や母性行動の異常は、必ずしも原因を一つの因子に帰着できるわけではないが、神経細胞における細胞内情報伝達系の異常が大きく関わっている可能性が示唆された。本研究の結果は学会誌「Anesthesiology」などに発表した(Takaenoki et al., 2014)。

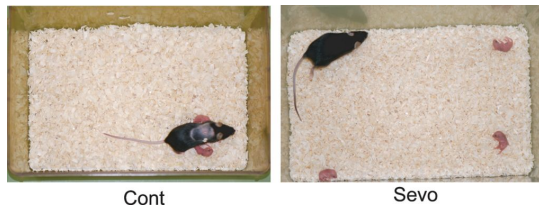


図1)

生後6日目に麻酔曝露されたマウスを成長させ、妊娠、出産直後の仔に対する行動を観察した。対照群(Cont)に比較して麻酔群(Sevo)は仔にあまり興味を示さず、母性行動に以上があった。

(2)「短期間内での臨床応用実現を視野に入れた対処法の開発」

我々はマウスを用いた実験で、1.3%の水素ガスは麻酔薬の毒性を劇的に減少させることを過去に報告したが(引用文献1)、本研究ではさらに濃度を上げ、2.8%とした。その結果、1.3%水素ガスに比較して麻酔薬による神経毒性がより減少していた(図2)。さらに、水素ガスは麻酔薬による酸化ストレスを軽減すると共に、ERKリン酸化(pERK)の阻害を抑えることを見出した(図2)。麻酔薬によるERKリン酸化阻害の意味については、下記第3項において解析した。これらの知見は分子状水素ガスの臨床応用に向けた重要な情報となると思われる。

(3)「分子レベルでの麻酔薬の神経毒性メカニズムの解明」

発達期の脳においては麻酔薬によって酸化ストレスが増大し、さらに細胞外情報シグナル伝達キナーゼ(ERK)のリン酸化が大きく阻害されることが分かった(図1)。さらにERKのリン酸化を薬剤(SL327)によって抑制しても麻酔薬の毒性の大部分を再現できる(図2)ことなどから、ERKリン酸化の阻害が毒性メカニズムに大きく関わっていることがわかった。また、これらの処置によって成長後に自閉症様行動などの異常が見られる。このような異常行動は我々は自ら作出したERK2ノックアウトマウス(引用文献)と非常に似ていた。

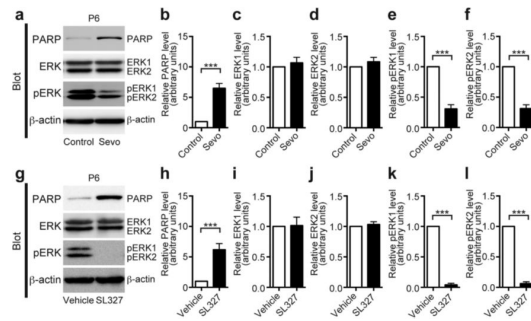


図1)麻酔薬曝露又はSL327投与によってERKリン酸化が阻害され、さらに脳においてアポトーシスが増加する。

(a)ウェスタンブロット法による、P6におけるセボフルラン投与群と対照群との比較(n=6 for each)。セボフルラン投与群においてアポトーシスを認めるが、対照群では認めない。(b-f)統計解析結果。(g)ウェスタンブロット法による、P6におけるSL327i.p.群と対照(DMSO投与)群との比較(n=6 for each)。SL327投与群においてアポトーシスを認めるが、対照群では認めない。(h-i)統計解析結果。Data are represented as mean ± SEM. \*\*\*P<0.001 (t test)。

これらの結果は英科学誌ネイチャー(Nature)系オンライン科学誌「サイエンティフィック・リポート(Scientific Reports)」などに発表した(Yufune et al., 2016, Yufune et al., 2015)。

(4)「ヒトにおける副作用の解析及び治療戦略の検討」

両群のスコアの平均値は、それぞれ、麻酔曝露群(n=58)で30.7(95%CI, 25.8-35.5)およびコントロール群(n=8699)で34.7(95%CI, 34.3-35.1)で両群間に有意差は認めなかった(t=1.63, p=0.10)。保護者の教育水準などの交絡因子やアンケートの回答者・非回答者間にバイアス等が存在する可能性があるものの、ヒトでは4歳未満での麻酔曝露は、その後の自閉症スペクトラム障害発症リスクに大きな影響を与えないということがわかった。

<引用文献>

- Yonamine R., Satoh Y., Kodama M., Araki Y., Kazama T. (2013) Co-administration of Hydrogen Gas as Part of the Carrier Gas Mixture Suppresses Neuronal Apoptosis and Subsequent Behavioral Deficits Caused by Neonatal Exposure to Sevoflurane in Mice. *Anesthesiology* 118 (1):105-113. doi: 10.1097/ALN.0b013e318275146d
- Satoh Y., Endo S., Nakata T., Kobayashi Y., Yamada K., Ikeda T., Takeuchi A., Hiramoto T., Watanabe Y., and Kazama T. (2011) ERK2 contributes to the control

of social behaviors in mice. *J. Neuroscience*. 31(33) 11953-67. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2349-11.

#### 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7件)

Yufune S., Satoh Y., Akai R., Yoshinaga Y., Kobayashi Y., Endo S., Kazama T., (2016) Suppression of ERK phosphorylation through oxidative stress is involved in the mechanism underlying sevoflurane-induced toxicity in the developing brain. *Scientific Reports*. 6:21859. doi: 10.1038/srep21859. 査読有

Yufune S., Satoh Y., Takamatsu I., Ohta H., Kobayashi Y., Takaenoki Y., Pagès G., Pouysségur J., Endo S., Kazama T. (2015) Transient Blockade of ERK Phosphorylation in the Critical Period Causes Autistic Phenotypes as an Adult in Mice. *Scientific Reports*. 20;5:10252. doi:10.1038/srep10252. 査読有

Takaenoki Y., Satoh Y., Araki Y., Kodama M., Yonamine R., Yufune S. Kazama T. (2014) Neonatal Exposure to Sevoflurane in Mice Causes Deficits in Maternal Behavior Later in Adulthood. *Anesthesiology* 120:403-415. 査読有

##### [学会発表](計18件)

Satoh Y., Neurotoxicity and general anesthetics in the critical period and strategy for the prevention, 21th Annual meeting of Korean Society of Obstetric Anesthesiologists, 21th Annual meeting of Korean Society of Obstetric Anesthesiologists (招待講演)、2017年6月17日、ソウル(大韓民国)

Satoh Y., Neurotoxicity and general anesthetics in the critical period and strategy for the prevention, 21th Annual meeting of Korean Society of Obstetric Anesthesiologists, the First Jinling International Anesthesia and Brain Function Forum (招待講演)、2017年5月21日、南京(中華人民共和国)

佐藤泰司、麻酔薬の発達段階の脳に対する神経毒性メカニズムと脳保護戦略、第64回日本麻酔科学会学術集会(招待講演)、2017年6月8日、国際会議場(神戸)

湯舟晋也、マウス幼若脳における全身麻酔薬の神経毒性に対する高濃度水素ガスの抑制効果、第64回日本麻酔科学会学術

集会(招待講演)、2017年6月8日、国際会議場(神戸)

嶋田哲也、小児への麻酔暴露が自閉症発症リスクへ与える影響、第90回日本薬理学会年会、2017年3月15日、長崎ブリックホール(長崎)

佐藤泰司、臨界期における全身麻酔薬の神経発達制御メカニズムへ及ぼす影響、第4回新胎児学研究会(招待講演)、2016年11月12日、ピアザ淡海(大津)

佐藤泰司、脳と水素、第20回日本医療ガス学会学術大会、2016年10月15日、秋田市にぎわい交流館AU(秋田)

佐藤泰司、分子状水素は生後発達期の薬物による神経回路形成障害を抑制する、2015年3月21日、第15回分子状水素シンポジウム(招待講演)ウインク愛知(名古屋)

佐藤泰司、神経発達とセボフルラン、第62回日本麻酔科学会学術集会(招待講演)、2015年5月29日、神戸ポートピアホテル(神戸)

佐藤泰司、小児麻酔の神経毒性に関する研究-小児麻酔の安全性向上のために-、第62回日本麻酔科学会学術集会(招待講演)、2015年5月28日、神戸ポートピアホテル(神戸)

Yufune S., Molecular hydrogen suppresses apoptosis in neurons and oligodendrocyte caused by neonatal exposure to general anesthetics in mice、2014年北米神経科学学会、2014年11月17日、ワシントンDC(米国)

Satoh Y., Innate behavior is impaired by neonatal exposure to sevoflurane in mice、欧州小児麻酔学会、2014年9月18日、プラハ(チェコ共和国)

Satoh Y., Innate behavior is impaired by neonatal exposure to sevoflurane in mice、欧州麻酔学会、2014年6月2日、ストックホルム(スウェーデン)

嶋田哲也、水素ガスは発達期脳に対するデスフルランの毒性を軽減する、第61回日本麻酔科学会学術集会、2014年5月15日、パシフィコ横浜(横浜)

石井絵理香、幼若期のマウスのセボフルラン曝露が母性行動に及ぼす、第61回日本麻酔科学会学術集会、2014年5月15日、パシフィコ横浜(横浜)

佐藤泰司、動物実験によって暴かれた麻酔薬の未知の毒性 麻酔薬の神経発達への影響、第60回日本麻酔科学会学術集会(招待講演)、2013年5月25日、ロイトン札幌(札幌)

佐藤泰司、発達期の脳に対する麻酔薬の神経毒性について-育児放棄とセボフルランの関係、第19回日本小児麻酔科学会(招待講演)、2013年9月29日、神戸国際会議場(神戸)

Yonamine R., Hydrogen gas suppresses

neuronal apoptosis and subsequent behavioral deficits caused by neonatal exposure to general anesthetics in mice、2013年北米神経科学学会、2013年11月13日、サンディエゴ(米国)

〔図書〕(計8件)

佐藤泰司 克誠堂出版、 吸入麻酔薬と神経発達、2013、191 - 200

佐藤泰司 克誠堂出版、 麻酔薬の神経毒性、2016、191 - 200

佐藤泰司 Springer Japan、Clinical findings including prevention and treatment、2017、17 - 31

〔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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

風間 富栄 (KAZAMA, Tomiei)  
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授  
研究者番号：40158837

(2) 研究分担者

佐藤 泰司 (SATO, Yasushi)  
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授  
研究者番号：10505267

照井 克生 (TERUI, Katsuo)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90256074

神尾 陽子 (KAMIO, Yoko)  
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 児童・思春期精神保健研究部・部長  
研究者番号：00252445

鈴木 康之 (SUZUKI, Yasuyuki)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・手術・集中治療部・部長  
研究者番号：60179265

遠藤 昌吾 (ENDO, Shogo)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長  
研究者番号：60192514

中田 隆博 (NAKATA, Takahiro)  
常葉大学・健康プロデュース学部・教授  
研究者番号：40273932

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし