



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	幼若期のイソフルラン暴露は海馬歯状回において新生顆粒細胞の移動を阻害する [全文の要約]
Author(s)	内田, 洋介
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2077 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11205号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55751
Type	doctoral thesis
File Information	Yosuke_Uchida_summary.pdf



学位論文（要約）

幼若期のイソフルラン暴露は海馬歯状回
において新生顆粒細胞の移動を阻害する
(Neonatal isoflurane exposure disturbs
granule cell migration in the rat dentate
gyrus)

2014 年 3 月

北海道大学

内田洋介

【背景】

これまでに様々な麻酔薬が出生後早期の幼若期に投与されると中枢神経の神経変性を惹起し、更に成長後の行動学的な異常を引き起こすことが種々の動物実験で確認されている。全身麻酔で汎用されているイソフルランの投与によって脳神経細胞のアポトーシスや成長後の海馬における電気生理学的な異常、および成長後の記憶障害、学習障害を引き起こすことが 2003 年に報告され、以後イソフルランのみでなくその他の様々な麻酔薬が神経毒性を有することが報告されている。麻酔薬が有する γ -amino- butyric acid A (GABA_A) 受容体刺激作用や N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体拮抗作用が幼若期の神経毒性に深く関与していることが明らかになってきているものの、未だ正確な機序は解明されていない。これまで麻酔薬投与後急性期に観察される神経細胞のアポトーシスが成長後の認知機能異常に関連があるとされてきた。しかし、中枢神経系における神経細胞のアポトーシスのみでは麻酔薬の神経毒性を説明するのには十分でないことも報告され、認知機能に深く関与するとされる海馬の機能異常などが引き起こされているものと推察されている。

近年、幼若期の熱性けいれん後の興奮性 GABA_A 受容体刺激や幼若期の GABA_A 受容体刺激作用をもつペントバルビタールの反復投与が海馬歯状回における新生顆粒細胞の移動を阻害し、成長後も顆粒細胞層に到達しない異所性顆粒細胞を増加させることが報告された。この他にも異所性顆粒細胞が海馬の異常な興奮性のネットワークに関与し、また海馬の機能異常に関係することも報告された。

イソフルランは GABA_A 受容体刺激作用を有する。従い我々は、幼若期のイソフルラン麻酔が海馬歯状回において異所性顆粒細胞の増加させるのでないかとの仮説を立てた。この仮説を検証するため免疫組織学的な手法を使用し、幼若期ラットへのイソフルラン暴露後の海馬歯状回異所性顆粒細胞の局在を評価した。

【対象と方法】

実験には雄性の Wistar 系ラットを用い、実験はすべて「北海道大学医学研究科における動物実験に関する指針」に準拠して行った。

日齢 6 の Wistar 系仔ラットに細胞新生のマーカーである 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の投与を行った。これにより日齢 6 に新生された細胞のみを標識した。

続けてラットを以下の 5 群に分けてガス暴露を施行した。(1) 日齢 7 に 2%イソフルランを 2 時間暴露, (2) 日齢 7 に 1%イソフルラン 2 時間暴露, (3) 日齢 7 に 13%二酸化炭素 2 時間暴露, (4) 日齢 14 に 2%イソフルラン 2 時間暴露, (5) 室内気に 2 時間暴露 (対照群)。

ガス暴露後に異なる時点においてラットを灌流固定し、脳組織を採取した。そして、目的とする海馬歯状回を含む凍結組織薄切切片を作成し、抗 BrdU 抗体と顆粒細胞マーカーである Prospero Homeobox 1 (Prox1) を標的とした抗 Prox1 抗体を用いて免疫二重染色を行った。

共焦点レーザ走査型顕微鏡を用いて海馬組織標本の観察を行い、標本の再構成画像を作成した。海馬歯状回門、海馬歯状回顆粒細胞層における共標識された顆粒細胞核を計数し、異所性顆粒細胞の割合(歯状回門にある共標識された顆粒細胞数/すべての共標識された顆粒細胞数)を算出し、統計学的検討を用いた群間比較を行った。

暴露中の呼吸状態を評価するため、日齢7において 2%イソフルランを暴露した群、13%二酸化炭素を暴露した群、室内気に暴露した群において動脈血ガス分析を施行した。

【結果】

イソフルラン暴露による急性の影響を評価するため日齢 7 で処置前群、対照群、イソフルラン暴露群の 3 群間で比較を行ったが異所性顆粒細胞の割合に有意差はなかった。異所性顆粒細胞の割合を経時的に観察したところ、日齢 7 に 2%イソフルランを 2 時間暴露した群では対照群と比較して、日齢 14 では有意差はなかったが日齢 21 に異所性顆粒細胞の割合は有意に増加し、その後も観察期間終了(日齢 70)まで同じ水準を維持していた。

日齢7に 2%イソフルランを暴露した群、1%イソフルランを暴露した群、対照群を日齢 21 で比較したところ、対照群と比較して 2%イソフルラン群で異所性顆粒細胞の割合が有意に増加していたが、1%イソフルラン群では有意差はなかった。

日齢7に 2%イソフルランを暴露した群、13%二酸化炭素を暴露した群、対照群を日齢 21 で比較したところ、対照群と比較してイソフルラン群では異所性顆粒細胞の割合が有意に増加していたが、二酸化炭素群では増加していなかった。

日齢7に 2%イソフルランを暴露した群、日齢 14 に 2%イソフルランを暴露した群、対照群を日齢 21 で比較したところ、対照群と比較して日齢 7 でイソフルランを暴露した群では異所性顆粒細胞の割合が有意に増加していたが、日齢 14 で暴露した群では増加していなかった。

動脈血ガス分析では 2%イソフルラン群と二酸化炭素暴露群において、対照群と比較し、有意なアシドーシスと PaCO_2 の上昇を認めた。 PaO_2 については各群間に有意差を認めなかった。2%イソフルラン群と二酸化炭素群の pH と PaCO_2 の値に有意差はなく、二酸化炭素群は 2%イソフルラン群における高二酸化炭素血症及びアシドーシスをよく再現していた。

【考察】

本研究によって幼若ラットに日齢 7 で 2%イソフルランを暴露すると海馬歯状回における顆粒細胞層の正常な移動が阻害され、顆粒細胞に到達しない異所性顆粒細胞が増加すること示された。また、異所性顆粒細胞の増加は 1%イソフルラン暴露や高二酸化炭素暴露、日齢 14 での 2%イソフルラン暴露では生じないことも示された。

海馬における顆粒細胞の新生は胎生期から始まり出生後も続くとされている。顆粒細胞の新生は歯状回門で行われ、放射状に顆粒細胞層に移動し成長後も存在する。顆粒細胞の新生は日齢 5-7 がピークとされており、本研究では日齢 6 に BrdU を投与し、Prox1 と共標識することによって新生顆粒細胞の観察を行った。新生顆粒細胞は日齢 19 までに顆粒細胞層への移動を完了するとされており、本研究結果は過去の報告に矛盾するものではな

った。

新生仔ラットの呼吸を麻酔中に調節することは技術的に困難であるため、麻酔暴露中の呼吸抑制が神経毒性に寄与する可能性を検証する必要がある。本研究では低酸素血症を回避するため酸素濃度を 50%として 13%の二酸化炭素暴露を行い、2%イソフルランを 2 時間暴露した呼吸状態を再現したが異所性顆粒細胞の割合には影響を与えなかった。この結果は、低酸素血症が存在しなければ高二酸化炭素血症は中枢神経系に影響しないとする過去の報告に矛盾しないものであった。

本研究の主な知見は日齢 7 に 2%イソフルランを 2 時間暴露すると、正常な顆粒細胞の移動が阻害され、その結果歯状回門に存在する異所性顆粒細胞が長期にわたって増加することである。幼若なニューロンでは、 $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ 共輸送体(NKCC1)が優勢で細胞内 Cl^- 濃度が相対的に高くなっており、出生後早期の GABA_A 受容体刺激は興奮性に作動する。近年、熱性けいれん後の過剰な興奮性の GABA_A 受容体刺激および、日齢 11-17 での GABA_A 受容体の反復刺激が顆粒細胞の移動を阻害することが報告された。これらを考慮すると、顆粒細胞の移動が阻害される機序として次の二つが考えられる。第一に、イソフルランは GABA_A 受容体刺激作用を有するので、イソフルラン自体が過剰な GABA_A 受容体刺激となり、その結果顆粒細胞の移動を阻害した。第二に、イソフルランは痙攣波誘発作用を有すると報告されているので、熱性痙攣と同様にイソフルラン暴露後で GABA_A 受容体増加し、その結果 GABA_A シグナルが増強され顆粒細胞の移動を阻害した。いずれにおいても興奮性の GABA_A シグナルがイソフルラン暴露後の顆粒細胞の移動を阻害するのに関与しているものと考えられる。

【結論】

幼若期イソフルラン暴露が海馬歯状回における新生顆粒細胞の正常な移動を阻害し、異所性顆粒細胞を増加させることが示された。幼若期イソフルラン暴露後の異所性顆粒細胞の増加には GABA_A 受容体を介したシグナルの関与が考えられるが、その機序に関しては今後更なる研究が必要である。