



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	新生仔ラット海馬歯状回における新生顆粒細胞に対する麻酔薬暴露の影響に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	斉藤, 仁志
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 : 2208 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12104号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61798
Type	doctoral thesis
File Information	Hitoshi_Saito_summary.pdf



学 位 論 文 (要 約)

新生仔ラット海馬歯状回における新生顆粒細胞に
対する麻酔薬暴露の影響に関する研究

(Effect of Anesthetics Exposure on Emerging
Granule Cells in Dentate Gyrus of Neonatal Rat)

2016 年 3 月

北海道大学

斉藤仁志

目次

1. 緒言	1 頁
2. 実験材料及び実験方法	4 頁
3. 実験結果	10 頁
4. 考察	12 頁

1. 緒言

全身麻酔薬は鎮静作用や鎮痛作用を有しており、手術時の麻酔や鎮静に頻用されている。全身麻酔薬の主な作用は γ -amino-butyric acid (GABA) A 受容体刺激作用もしくは N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体拮抗作用を介して発現すると考えられているが、未だ不明な点も多い。特に近年では脳神経系の発達期における全身麻酔薬暴露が、脳神経系の広範なアポトーシスを誘導する事が報告されており、麻酔薬が発達期の脳神経系に対してどのような神経毒性を有するか注目されている。

1990 年代後半に Ikonomidou らは日齢 7 のラットに NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗作用薬である MK801 を投与し、脳神経系にアポトーシスが誘導される事を報告した。その後の研究によって、ミダゾラム、イソフルラン、亜酸化窒素、プロポフォール、セボフルランなど、臨床的に広く用いられている多くの麻酔薬においても神経細胞のアポトーシス、神経細胞変性、海馬内神経回路における電気生理学的異常、成長後の行動観察学的異常等を引き起こす事が報告された。これらの報告により、動物実験モデルにおいては神経発達期の全身麻酔薬投与が脳神経系に対して神経毒性を有するという事は広く認められた事実であると考えられている。一方ヒトにおける麻酔薬の神経毒性については、研究によって結果が相反しており、明らかなエビデンスは未だ確立されていない。現在も小児に対する全身麻酔薬の神経毒性の有無を検討する多施設前向き試験である Smart Tots Project が進行中であり、麻酔の安全性を確立する上でも、これらの臨床研究の結果は重要であると考えられる。

全身麻酔薬の神経毒性発現のメカニズムに関しては、GABA 受容体刺激作用および NMDA 受容体拮抗作用が関与していると考えられているが、多くの研究報告があるにも関わらずその詳細については十分に解明されていない。また、麻酔薬暴露直後は神経細胞のアポトーシスが著増しているが、成長後の神経細胞密度は正常群と有意差が無いことが報告されている。さらに全身麻酔薬投与により誘導されるアポトーシスの程度と、行動観察学的研究における認知機能障害等の行動学的異常の程度に相関が認められない事が報告されている。このように発達期の脳神経系に対して全身麻酔薬暴露が及ぼす影響は多岐にわたり、互いの連関についてはさらなる研究が必要であると考えられる。そもそも麻酔薬が神経毒性を発現する神経系の発達期には、

正常な神経細胞のアポトーシスの他、シナプス形成や神経細胞の分化、発達、移動等の神経細胞の様々な発達過程が同時に進行している。これらの過程は GABA 受容体と NMDA 受容体を介したシグナルに強い修飾を受けていることが報告されており、両受容体のバランスにより正常な発達過程が進行すると考えられている。この様な神経の発達期において、強力な NMDA 受容体阻害作用と GABA 受容体刺激作用をもつ全身麻酔薬暴露は、神経細胞のアポトーシスのみならず、シナプス形成や神経細胞の分化、発達、細胞の移動など神経系の発達全般に影響を与える可能性が考えられる。

海馬は認知・学習の過程において重要な役割を果たしていると考えられており、発達期の麻酔薬暴露によってアポトーシスの増加が認められる部位である。海馬歯状回顆粒細胞下層 (subgranular zone: SGZ) では生後も継続的に細胞新生が継続する部位の一つであるが、生後早期の一定期間は海馬歯状回門 (hilus of Dentate Gyrus: hDG) においても細胞新生が行われている。その期間はラットで生後 2 週間程度であり、特に日齢 5 から 7 日にかけて hDG における細胞新生が最も盛んに起こる事が報告されている。この期間に hDG で新生された顆粒細胞 (Granule cell: GCs) は GABA 受容体や NMDA 受容体を介した調整を受け、周囲の顆粒細胞層 (Granule Cell Layer: GCL) へ移動し、成熟顆粒細胞となり海馬内神経回路の構築に関与していると考えられている。正常な海馬組織においても、全顆粒細胞の内 0.1-0.2% の GCs は hDG に残留することが知られている。その意義については不明な部分も多いが GCL に存在する GCs と同様の特徴を持って神経回路の一部を形成している可能性が報告されている。一方、歯状回門に残存する顆粒細胞の数は熱性痙攣、薬剤による人為的痙攣誘発、もしくは虚血³⁵などによって増加することが報告されている。これらの異常に増加した異所性顆粒細胞 (Ectopic Granule Cells of hilus: hECGs) は、正常な顆粒細胞とは異なったシナプス構造を持ち、海馬の機能異常やてんかん発作の原因となることが報告されている。

発達期の全身麻酔薬が、神経細胞の移動にどのような影響を与えるか調査した報告は未だ少ない。hDG における新生 GCs の移動は NMDA 受容体及び GABA 受容体が関与する為、幼若期の麻酔薬暴露により GCs の移動が影響を受ける可能性がある。そこで我々は、臨床において頻用されている 2 つの麻酔薬、GABA_A 受容体作動薬であるペントバルビタールと、NMDA 受容体拮抗薬である亜酸化窒素 (N₂O) を用い、これらの麻酔薬暴露が幼若期

に歯状回門で新生された GCs の移動にどのような影響を与えるか，免疫組織学的手法を用いて調査した．

2. 実験材料及び実験方法

2-1. 実験材料（全ての実験に共通）

実験にはWistar/STラットを使用した。出生数日での処置を要するため、出産予定母ラットを購入し、出生仔は母ラットと同じケージで飼育した。ラットは、室温は22-25℃の範囲、照度・照明サイクルは自動で12時間毎の明暗サイクル環境下で飼育された。また、以下に示される実験は、全て国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定（平成19年4月1日海大達第61号，平成21年4月1日 海大達第49号，平成26年4月1日 海大達第48号，平成27年4月1日 海大達第40号）に準拠して行われた。

2-2. BrdU投与（全ての実験に共通）

6日齢の雄性仔ラットに、5-bromo-2'-deoxyuridine（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA：以下BrdU）300mg/kgを皮下に投与した。BrdUは45℃の加温生理食塩水で15mg/mlとなるよう溶解した。BrdUはチミジンアナログであり細胞周期のS周期においてDNAに取り込まれるため、新生細胞マーカーとして広く使用されている。BrdUは投与後4時間ほど生体内で生理活性を持つため、この方法により6日齢において新生された細胞を選択的に標識することが出来る。

2-3. 麻酔薬暴露環境

BrdU 投与 20 時間後，7 日齢のラットに対して麻酔薬への暴露を行った（麻酔薬の種類や暴露時間については後述する）。麻酔薬暴露は自作の透明なアクリル製のグローブボックス（麻酔ボックス）を使用し，ボックス内の酸素濃度，二酸化炭素濃度，N₂O 濃度はガスモニター（5250RGM, Detex-Ohmeda, Chalfont St. Giles, UK）を用いて測定した。処置中のラットの体温は Thermofocus（日本テクニメッド，東京）を用いて計測し，体

温が 35.5℃から 36.5℃となるようにグローブボックス底部にヒーターを配置して適宜加温した.

2-4. 各実験の詳細について

2-4-1 【実験 I】 対照群

上記 2-1 から 2-3 で示した実験材料, 前処置, 暴露環境を使用して実験を行った. 対照群は麻酔ボックス内で 50%酸素と 50%窒素の混合ガスに 2 時間暴露することで作成した. 組織学的評価は処置 2 時間後 (7 日齢, C7 群; n=6) と 21 日齢 (C21 群; n=6) で行った. それぞれの群を, 以後 C7 群, C21 群と表記する.

2-4-2 【実験 I】 ペントバルビタール暴露群

ペントバルビタールはバルビツール酸系の催眠鎮静薬であり GABA_A 受容体に作用する. 中枢神経系においては, GABA_A 受容体の結合部位数を増加させ, 親和性を高めると共に, バルビツレート結合部位に結合して Cl⁻チャネルの開口時間を大幅に延長させることによって Cl⁻流入を引き起こし, シナプス後抑制を惹起することによって催眠鎮静作用を引き起こす.

新生細胞のマーカーである BrdU の投与 20 時間後, 7 日齢新生仔ラットにペントバルビタール 20mg/kg を腹腔内に投与して麻酔状態とした. ペントバルビタールは生理食塩水を用いて 1mg/mL に希釈 (体重 10g のラットに対し 0.2mL を投与) し, 投与は前述の麻酔ボックス内で行い, 処置中ボックス内は 50%酸素と 50%窒素の混合ガスで灌流した. 麻酔ボックス内で 120 分間経過を観察し, 麻酔からの回復を確認して母ラットのいるケージに戻し, 21 日齢で組織学的評価を施行した (P21 群; n=6). 以下, この群を P21 群と表記する.

2-4-3 【実験Ⅱ】亜酸化窒素暴露群

N_2O は NMDA 受容体拮抗作用を持つ吸入麻酔薬で、臨床麻酔一特に小児の全身麻酔において頻用されている。 N_2O の神経毒性は時間依存性であることが報告されているため、暴露時間の異なる 3 群を作成し、合わせて暴露時間が GCs の移動に与える影響を評価した。

4-4-2 と同様に、新生細胞マーカーである BrdU 投与 20 時間後、7 日齢の新生仔ラットを麻酔ボックス内で 50% N_2O と 50%酸素の混合ガスに暴露した。30 分間暴露した群 (N30 群; $n=6$)、120 分暴露した群 (N120 群; $n=6$) および 240 分暴露した群 (N240 群; $n=6$) を作成した。 N_2O 暴露終了後、麻酔からの回復を確認し、母ラットのケージに戻し、21 日齢でそれぞれ組織学的評価を行った。以下、それぞれの群を N30 群、N120 群、N240 群と表記する。

2-4-4 【実験Ⅲ】Bumetanide (NKCC1 inhibitor) の追加投与群

発達期の神経細胞では成熟細胞と異なり K^+Cl^- 共輸送体 (K^+Cl^- cotransporter: KCC2) よりも $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ 共輸送体 ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ cotransporter: NKCC1) が優位に発現しているために細胞内 Cl^- 濃度が成熟細胞より高くなっており、そのため GABA 受容体刺激によって外向き Cl^- 電流が生じうるため、成熟した神経細胞よりも興奮性が強いと考えられている。この幼若期特有の GABA 受容体の応答は、神経発達過程において重要な役割を果たすことが知られているが、一方でこの時期における過剰な GABA 受容体刺激が hEGCs の増加をもたらす要因となる可能性が示唆されている。Bumetanide は NKCC1 を阻害することで細胞内の Cl^- 濃度を低下させ、幼若期の GABA 受容体の応答を修飾する可能性があり、実際に麻酔薬による影響と思われる神経学的後遺症が Bumetanide の投与により正常化したとの報告も存在する。したがって、今回の実験で観察された、麻酔薬の神経毒性のひとつの表現型と考えられる ER の増加が、Bumetanide の投与により抑制されうるのではないかと考えた。

そこで、実験Ⅱ同様に 7 日齢において 50% N_2O と 50%酸素に 2 時間暴露した新生仔ラットに対して、暴露後 8 日齢から 14 日齢の間の 7 日間連続で 1mg/kg の Bumetanide 投与を行った群 (N+B 群; $n=6$) と、対照群として C21 群と同様に 7 日齢に 50%酸素と 50%窒素の暴露を行い、その後の 8 日

齢から 14 日齢の 7 日間連続で 1mg/kg の bumetanide 投与を行った群(C+B 群 ; n=6) の 2 群を作成して 21 日齢で同様の組織的評価を行い, Bumetanide が GCs の移動に与える影響を調査した.

2-5. 灌流固定 (全ての実験に共通)

対照群は 7 日齢と 21 日齢, ペントバルビタール暴露群と N₂O 暴露群は 21 日齢に組織学的評価を施行した.

ハロタン (フローセン, 武田薬品工業, 東京) を用いて麻酔し, 体重測定後に外科的に心臓を露出し, 心尖部から金属針を左心室内に挿入した. pH7.4 のヘパリン加 0.1M リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) をシリンジポンプ (テルフュージョンシリンジポンプ TE-331S, テルモ, 東京) を用いて 300ml/h の速度で灌流し, 右房切開より廃液した. 続いて 4%パラホルムアルデヒド (Paraformaldehyde: PFA) を用い, 灌流固定を行った. その後, 断頭, 頭蓋骨の除去を行い脳を摘出し, 後固定として 4%PFA に浸漬した上で 4℃の冷暗所環境下で一晩保存した. 翌日, 4%PFA を 20%スクロース液に置換し, 組織が沈降したことを確認した後にさらに 30%スクロース液に置換し, 同様に組織が沈降するまで冷暗所環境下で保存した.

2-6. 組織切片の作成 (全ての実験に共通)

2-4 で作成した脳組織から海馬歯状回を含むよう適宜切り出し, OCT (Oprial Cutting Temperature) コンパウンド (サクラファインテックジャパン, 東京) で包埋して -25℃で凍結させた. これをクリオスタット (CM1850, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) を使用して 40 μm 厚の冠状断薄切切片を作製し, 3 切片ごとに 1 切片を採取, MAS (Matsunami Adhesive Silane) コーティングスライドガラスにマウントして十分に乾燥させた.

2-7. 蛍光二重免疫染色（全ての実験に共通）

十分に乾燥させた切片を 0.1M PBS で洗浄後、45℃に加温した 1N 塩酸に 30 分間浸漬することにより DNA 変性処理を行い、0.1M PBS を用いた塩酸中和処理を行った。次に、3%正常ロバ血清と 0.1M の 0.3%TritonX 添加 PBS（Phosphate buffered saline with TritonX; PBST）を使用してブロッキング処理を行った。抗 BrdU 抗体（1:1000, mouse monoclonal, Sigma-Aldrich B-2531, St. Louis, MO, USA）を用いて海馬歯状回新生細胞を標識し⁵³、更に抗 Prospero Homeobox1（Prox1）抗体（1:500, Rabbit polyclonal, AngioBio 11-002, Princeton, NJ, USA）を使用し、海馬歯状回顆粒細胞を標識した。2 次抗体として AlexaFluoro597（1:500, Donkey anti-Mouse, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を用いて BrdU 陽性の新生顆粒細胞を赤色に、AlexaFluoro 488（1:500, Donkey anti-Rabbit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を用いて Prox1 陽性の顆粒細胞を緑色にそれぞれ蛍光標識した。以上の処理により局在を調査する新生顆粒細胞は AlexaFluoro597（赤）と AlexaFluoro 488（緑）に共標識され、蛍光顕微鏡下で黄色に観察される。

2-8. 共焦点レーザー走査型顕微鏡による観察（全ての実験に共通）

組織の観察には共焦点レーザー走査型顕微鏡（FV1000, オリンパス, 東京）を使用した。切片に対して 10 倍もしくは 20 倍対物レンズを用いて垂直方向に 1 μ m 毎の連続撮影を行った、付属ソフトウェアである FLUOVIEW（version 3.1a, オリンパス, 東京）を用いて画像のレンダリング処理を行い、1 個体につき 6 切片分の再構築立体画像を作成した。この処理により黄色に蛍光染色された細胞が、共標識されている細胞であるのか、もしくは垂直方向に異なる細胞が重なって黄色に観察されているだけなのかの判別が可能となった。

2-9. 細胞局在の評価（全ての実験に共通）

処置内容を知らされていない観察者が、hDG と GCL に存在する細胞数を 2 度にわたり計数し、全 GCs 数に対する hEGCs 数の割合を異所性顆粒細胞比（Ectopic Ratio; ER）と定義した。後述する統計学的手法を用いて 2-4-1. から 2-4-4. において作成した各群の ER の群間比較を行った。

2-10. 統計学的解析（全ての実験に共通）

全ての統計学的解析には GraphPad Prism version 5.04 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) を使用した。群間評価には Mann Whitney test と ANOVA を使用し、post hoc として Tukey's test を用いた検定を行った。また、全てのデータは平均値±標準誤差の形式とし、P 値<0.05 を有意水準とした。

3. 実験結果

3-1. 【実験Ⅰ】 対照群及びペントバルビタール投与群

この実験は新生仔ラットの海馬歯状回における新生された GCs の正常移動がペントバルビタール暴露による影響を受けるかを調査する目的で実施されたものである。

7 日齢で評価を行った対照群である C7 群, 21 日齢で評価を行った対照群である C21 群, 7 日齢でペントバルビタール暴露を行い 21 日齢で評価を行った P21 群の 3 群を対象とした。次ページ Fig.2 に蛍光二重免疫染色法により得られたそれぞれの群の代表的な組織画像と ER を比較したグラフを示す。ER は C7 群で $55.7 \pm 5.0\%$, C21 群で $27.8 \pm 8.9\%$, P21 群で $32.4 \pm 4.2\%$ であり, C7 群と C21 群, 及び C7 群と P21 群の間で $P < 0.0001$ の強い有意差を認めた (One-way ANOVA with post hoc Tukey's, $F_{(3,15)}=32.7$, $P < 0.0001$)。

C7 群での組織学的評価では海馬歯状回門に新生顆粒細胞が $55.7 \pm 5.0\%$ 存在するのに対して C21 群では $27.8 \pm 8.9\%$ しか存在せず, 新生された GCs の経時的な移動の結果を反映していると考えられ, この結果は過去の報告と矛盾しない。一方, ペントバルビタールを投与することによって ER が増加するのではないかと予想したが, P21 群と C21 群との間には有意差は見られなかった。

3-2. 【実験Ⅱ】 亜酸化窒素暴露群

この実験は, ペントバルビタールが GABA_A 受容体刺激作用を持つのに対して, 同様に麻酔薬の効果部位であるとされている NMDA 受容体への拮抗作用を持つ N₂O への暴露によって, ER が増加するかどうかを調査する目的で実施されたものである。

30 分間, 120 分間, 240 分間の N₂O 暴露を行ったそれぞれ N30 群, N120 群, N240 群の代表的組織画像, 及びその ER の比較を次ページ Fig.3 に示す。ER はそれぞれ $27.8 \pm 8.9\%$, $34.4 \pm 2.4\%$, $54.9 \pm 4.3\%$, $50.1 \pm 2.3\%$ であり, 統計学的検討の結果, N120 群と N240 群では対照群である C21 群と比較して有意に増加していることが判明した (one-way ANOVA with post hoc Tukey's, $F_{(3, 21)}=36.3$, $P < 0.0001$)。一方, N30 群では C21 と比較して有

意な ER の変化は確認できなかった。また、N120 群と N240 群の比較においても ER の有意差は認められなかった。

3-3. 【実験Ⅲ】 Bumetanide (NKCC1 inhibitor) 追加投与群

この実験は、ER が増加した N120 群に Bumetanide を追加投与することで、ER の増加を抑制できるのではないかとの仮説を検証するために行った追加実験である。N120 群と同様に 7 日齢で 50%N₂O と 50%酸素に 2 時間暴露した新生仔ラットに対して暴露後 8 日齢から 14 日齢の間の 7 日間連続で 1mg/kg の bumetanide 投与を行った群 (N+B 群; n=6) と、C21 群と同様に 7 日齢で 50%酸素と 50%窒素に 2 時間暴露した新生仔ラットに対して暴露後 8 日齢から 14 日齢の 7 日間連続で 1mg/kg の bumetanide 投与を行った群 (C+B 群; n=6) の 2 群の 21 日齢での代表的画像、及び、これらに C21 群と N120 群を加えた ER の比較結果を Fig.4 に示す。C21 群, N120 群, N+B 群, C+B 群の ER はそれぞれ $27.8 \pm 8.9\%$, $54.9 \pm 4.3\%$, $30.5 \pm 3.0\%$, $26.5 \pm 2.1\%$ であり、N+B 群及び C+B 群は N120 群に対して ER の有意な低下を認めた (one-way ANOVA with post hoc Tukey's, $F_{(3, 21)}=39.2$, $P<0.0001$)。C21 群と C+B 群に有意差は認めないことから、bumetanide 自体が ER の変化に関与せず、また、N120 群と N+B 群に明らかな有意差が認められることから、bumetanide は N₂O 暴露後に観察される ER の増加を抑制することが示された。

4. 考察

これらの研究により，7日齢の幼若ラットに NMDA 受容体拮抗作用を持つ N_2O を作用させると，海馬歯状回における新生顆粒細胞の正常な細胞移動が阻害され，海馬歯状回門における hEGCs の比率が増加すること，それに対して GABA_A 受容体刺激作用を持つペントバルビタールの単回投与では同様の变化が観察されないことが確認された．また，30 分間の 50% N_2O 暴露でこの現象は確認されず，120 分間，240 分間の 50% N_2O 暴露により hEGCs が増加することが確認された．この事実は N_2O がもたらす作用には一定の暴露時間依存性が存在する可能性を示すものである．さらに，NKCC1 阻害薬である Bumetanide の投与によりこの現象が観察されなくなることから，hEGCs の増加には NKCC1 チャネルが関与することが示唆された．

海馬における顆粒細胞新生は，hDG と SGZ において観察される．SGZ の神経細胞新生は成人になっても観察されるが，hDG における神経細胞新生は 5-7 日齢をピークとしてその後急速に減少し，2 から 3 週間程度で終息する事が知られている．ここで新生された前駆細胞の多くは GCL へ移動し，成熟して GCs となって海馬歯状回を形成するが，成長後も長期にわたって存在して周囲の神経細胞と新たなネットワークを形成することにより，認知・記憶機能に深く関与すると考えられている．

一方で前述のとおり，わずかな GCs は正常状態で hDG に残存することが知られていて．これらは GCL に存在する GCs と同様の特徴を持って神経回路の一部を形成している可能性が報告されているものの．その意義については不明な部分も多い．一方，熱性痙攣や，薬剤誘発性痙攣，または遺伝学的な特性³⁸によって hDG の GCs が異常増加する現象が知られている．つまり，何らかの理由により異常増加したこれらの GCs が hEGCs と呼ばれるものであり，正常の GCs と違い異常な神経ネットワークを形成し，過剰な GABA 興奮性作用をもたらすことで，発育後の障害をもたらすことが知られており，hEGCs の増加には GABA_A 受容体や NMDA 受容体を介した神経伝達が関与するとも報告されている．

今回の実験では、新生仔ラットを NMDA 受容体拮抗薬である N₂O に暴露することにより、歯状回門に残存する新生顆粒細胞の割合である ER が増加した。NMDA 受容体は学習、記憶、痛みなどといった長期的現象の中心的役割を果たすことが知られていることから、これらと同様に長期的現症とされる麻酔薬による神経毒性がもたらされる機序を説明する要因となるかもしれない。

ただし、今回の実験で我々が評価したのは GCs 局在比であるため、顆粒細胞前駆細胞の移動が N₂O 暴露による影響を受けたかを断定するにはいくつかの交絡因子があることを考慮する必要がある。即ち、幼若期の麻酔薬暴露によるアポトーシスが起こる比率が hilus と GCL で著しく異なっており、それが GCs の局在比に影響を与えた可能性や、移動ではなく歯状回門の新生顆粒細胞がアポトーシスを受けにくくなった可能性も否定できない。しかしながら、過去の論文では麻酔薬はアポトーシスを誘導するとされており、さらに Koyama らが 5 日齢で同様に標識された顆粒細胞前駆細胞の連続的な経時的解析を行った結果、hEGCs の増加は hDG で新生された顆粒細胞前駆細胞の正常移動が阻害されたことが原因であると結論付けている。従って、今回の我々の実験で観察された ER の増加もまた、正常な細胞移動が阻害されことによって hEGCs の増加が観察されたと考えるのが妥当であると思われる。

一方で、GABA_A 受容体刺激作用を持つペントバルビタールの単回投与は hEGCs の増加をもたらさなかった。これについては過去の論文なども参考としつつ、メカニズムの全体像を推察する必要がある。何故なら、胎生期や出生直後における神経発達には興奮性の GABA_A 受容体シグナルが重要な役割を果たすことが知られており、皮質、hDG、SGZ において発生した新生顆粒細胞前駆細胞の移動には GABA 受容体を介した神経伝達が強く関与するとの報告や、20mg/kg のペントバルビタールを 11-17 日齢において連続的に投与することによって hEGCs が増加したとの報告が存在するからである。我々の実験ではペントバルビタールを単回投与したが、ER の増加には持続的または累積的な GABA_A 受容体刺激作用なのかもしれない。またその一方で、N₂O が単回かつ僅か 120 分間の暴露によって ER の増加を引き起こしたという事実を鑑みると、N₂O は 2 週間程度の期間をかけて完了するとされる顆粒細胞の移動を持続的に阻害しうる変化を誘導した可能性が示唆される。

また、【実験Ⅲ】によって、N₂O 暴露後に Bumetanide を投与した群では本来観察されるべき ER の増加がみられないことが確認された。Bumetanide は NKCC1 阻害薬であり、NKCC1 は前述のとおり幼若ラットの海馬新生顆粒細胞に優位に発現する Cl⁻トランスポーターである。この NKCC1 は細胞内 Cl⁻濃度を高く保つ役割を果たしており、平衡膜電位は静止膜電位より脱分極側に位置するため、GABA 刺激を受けた際には外向き Cl⁻電流が発生して細胞は脱分極を起こしやすい状態となっている。この興奮性 GABA シグナリングは正常な発達過程でも観察される現象であって、未熟な神経細胞の成熟や、神経ネットワークの形成に重要な役割を果たしているとされるが、過剰となった場合には神経細胞のアポトーシスや海馬錐体細胞の障害、新生児期における痙攣発作の原因となることが報告されており、麻酔薬の神経毒性が同様の反応を経て引き起こされたとしても何ら不思議はない。

さらに、ER の増加が NKCC1 の阻害薬によって抑制されたという事実を考慮すると、NMDA 受容体拮抗薬である N₂O が GABA 作動性介在神経細胞と顆粒細胞前駆細胞の細胞間情報伝達を含めた GABA 受容体応答に何らかの影響を与えているのかもしれない。

以上、NMDA 受容体拮抗作用を持つ N₂O への暴露によって新生仔ラット海馬歯状回における新生された GCs の ER が増加し、NKCC1 阻害薬である Bumetanide により ER の増加が抑制されたという事実は、発達期中枢神経系に対する麻酔薬の神経毒性を研究する上で非常に興味深い内容である。しかし、今回の実験では表面的な事実が観察されたにすぎず、その機序を含む詳細な論理を構築、検証するには未知の部分や疑問が数多く残されている。今後も引き続き研究を進め、麻酔薬が持つ神経毒性の本質に迫ることができればと考える。