



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
Author(s)	斉藤, 仁志
Description	配架番号 : 2208
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12104号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12104
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70136
Type	doctoral thesis
File Information	Hitoshi_Saito.pdf



学 位 論 文

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

学 位 論 文

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

1. 論文発表目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文，及び学会で報告されている

論文発表目録

1. Hitoshi Saito, Rui Kato, Toshikazu Hashimoto, Yosuke Uchida, Tetsutaro Hase, Kenkichi Tsuruga, Koichi Takita, Yuji Morimoto
The influences of nitrous oxide on granule cell migration in dentate gyrus of neonatal rat. Hippocampus submitted

学会発表目録

1. Rui Kato, Kaori Tachibana, Toshikazu Hashimoto, Yosuke Uchida, Kenkichi Tsuruga, Kan Hasegawa, Tetsutaro Hase, Hitoshi Saito, Koichi Takita, Yuji Morimoto
Electrophysiological Impairments Caused by Sevoflurane Exposure Depended on Developmental Period in Rat.
American Society of Anesthesiology 2012 Annual Meeting, Oct, 13-17, 2012, Washington DC, USA
2. Rui Kato, Toshikazu Hashimoto, Hitoshi Saito, Yosuke Uchida, Tetsutaro Hase, Kenkichi Tsuruga, Koichi Takita, Yuji Morimoto
Neonatal sevoflurane exposure disturbs granule cell migration in the rat dentate gyrus.
American Society of Anesthesiology 2013 Annual Meeting, Oct, 12-16, 2013, San Francisco, USA
3. 斉藤仁志，加藤類，内田洋介，橋本聡一，森本裕二
ペントバルビタールの単独投与は神経発達期における海馬歯状回顆粒細胞の移動を阻害しない. Neonatal administration of pentobarbital doesn't disturb the migration of granule cells in the rat dentate gyrus.
日本麻酔科学会第 61 回年次集会, May, 15-17, 2014, 神戸, 日本

4. Hitoshi Saito, Rui Kato, Toshikazu Hashimoto, Yosuke Uchida, Tetsutaro Hase, Kenkichi Tsuruga, Koichi Takita, Yuji Morimoto.
Neonatal exposure to nitrous oxide disturbs granule cell migration in the rat dentate gyrus.
International Anesthesia Research Society 2014 Annual Meeting and International Science Symposium, May 17-20, 2014, The Fairmont Queen Elizabeth Montréal, Canada
5. Hitoshi Saito, Rui Kato, Toshikazu Hashimoto, Yosuke Uchida, Tetsutaro Hase, Kenkichi Tsuruga, Koichi Takita, Yuji Morimoto.
Neonatal exposure to nitrous oxide disturbs granule cell migration in the rat dentate gyrus in time dependent manner.
American Society of Anesthesiology 2014 Annual Meeting, Oct, 11-15, New Orleans, LA, USA

2. 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¹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²、セボフルラン³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⁴⁻⁸。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⁹⁻¹³、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¹⁴。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¹⁵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¹⁶。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¹⁷⁻¹⁹, 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^{20,21}。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²²⁻²⁴。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²⁵。その期間はラットで生後 2 週間程度であり²⁶、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^{27,28}。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^{25,29}。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^{30,31}。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³²。一方、歯状回門に残存する顆粒細胞の数は熱性痙攣³³、薬剤による人為的痙攣誘発³⁴、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^{32,36,37}、海馬の機能異常や³⁸てんかん発作の原因となることが報告³³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．

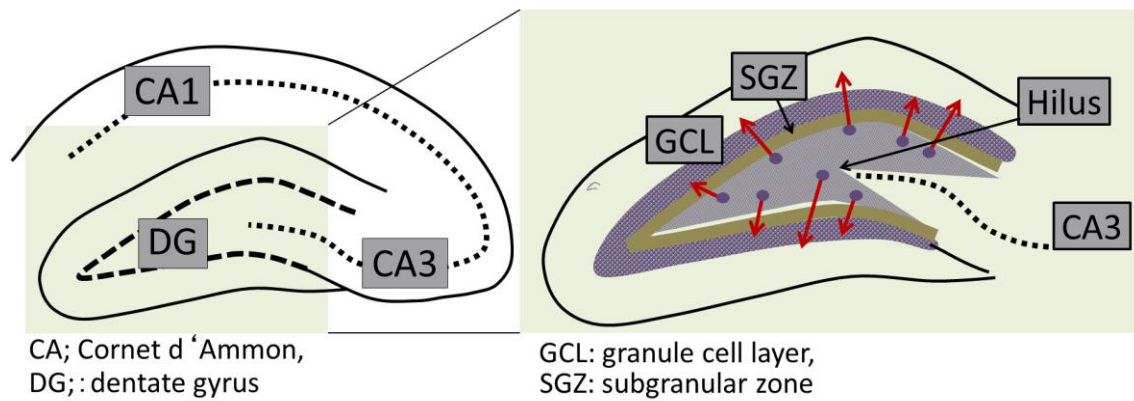


Fig.1 新生仔ラット海馬における細胞新生と細胞移動の様子．青丸は海馬歯状回門における新生顆粒細胞前駆細胞，赤矢印は顆粒細胞層への移動を示している．（図は Altman ら²⁵, Namba ら²⁸, Gould ら²⁹ の論文を元に作成）

3. 略語表

本文及び図中で使用した略語は以下のとおりである
(アルファベット順)

BrdU 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (5-bromo-2'-deoxyuridine)

CA アンモン角 (Cornet d'Ammon)

ER 異所性顆粒細胞数比 (Ectopic Ratio of Granule Cells)

hDG 歯状回門 (hilus of Dentate Gyrus)

hEGCs 歯状回門異所性顆粒細胞 (hilar Ectopic Granule Cells)

GABA γ -アミノ酪酸 (γ -amino-butyric acid)

GCL 顆粒細胞層 (Granule Cell Layer)

GCs 顆粒細胞 (Granule Cells)

KCC2 K^+Cl^- 共輸送体 (K^+Cl^- cotransporter)

MAS 松浪粘着性シラン Matsunami Adhesive Silane (商品名の一部)

N₂O 亜酸化窒素 (Nitrous Oxide)

NKCC1 $Na^+K^+2Cl^-$ 共輸送体 ($Na^+K^+2Cl^-$ cotransporter)

NMDA N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate)

OCT 最適切断温度 (Optimal Cutting Temperature)

PBS リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline)

PBST 0.3%TritonX 添加 PBS (Phosphate buffered saline with TritonX)

PFA パラホルムアルデヒド (Paraformaldehyde)

Prox1 Prospero Homeobox1

SGZ 歯状回顆粒細胞下層 (Subgranular Zone)

4. 実験材料及び実験方法

4-1. 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。

4-2. 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³⁹。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⁴⁰，新生細胞マーカーとして広く使用されている^{39,41,42}。BrdUは投与後4時間ほど生体内で生理活性を持つため⁴³，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。

4-3. 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。

4-4-1 【実験 I】 対照群の作成

上記 4-1 から 4-3 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。

4-4-2 【実験 I】 ペントバルビタール暴露群の作成

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^{9,10,44,45}。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⁹, 親和性を高める⁴⁵と共に, バルビツレート結合部位に結合して Cl⁻チャネルの開閉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⁴⁶。

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。

4-4-3 【実験Ⅱ】亜酸化窒素暴露群

N₂O 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¹³。N₂O 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% N₂O 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。N₂O 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。

4-5. 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。

4－5．組織切片の作成（全ての実験に共通）

4－4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（Opimal 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 μ m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グラスにマウントして十分に乾燥させた．

4－6．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⁴⁷，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^{48,49}．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．

4－7．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 $1\ \mu\text{m}$ 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．

4－8．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 4－4－1 から 4－4－3 において作成した各群の ER の群間比較を行った．

4－9．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．

4-10. 【追加実験；実験Ⅲ】 Bumetanide (NKCC1 inhibitor) の暴露後の追加投与に関する実験

これは上記、ペントバルビタールの影響を調査した【実験Ⅰ】と、N₂Oの影響を調査した【実験Ⅱ】の結果を受けて行われた追加実験である。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 Na⁺K⁺2Cl⁻共輸送体 (Na⁺K⁺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⁵⁰⁻⁵²。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^{17,53}、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³³。Bumetanide⁵⁴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⁵⁵。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、7日齢において 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、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。

5. 実験結果

5-1. 【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。

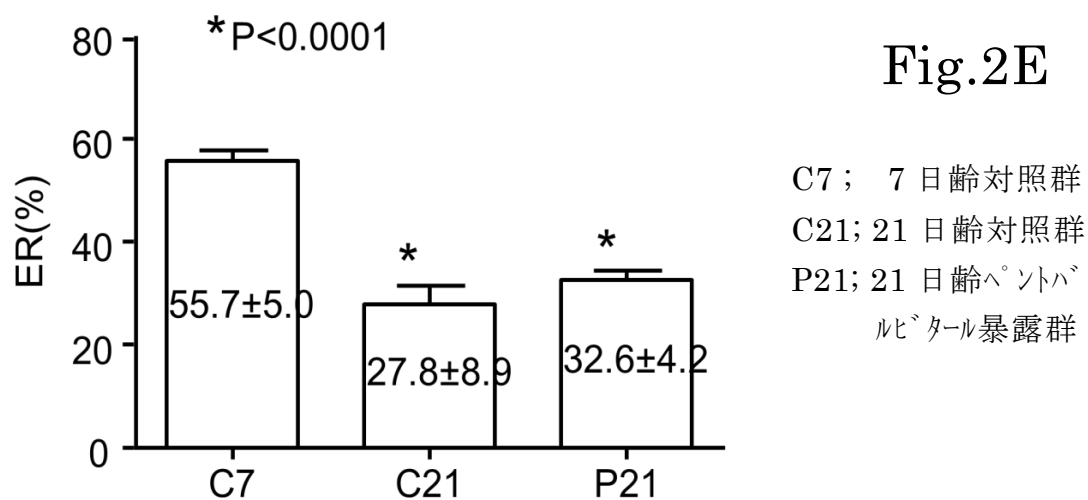
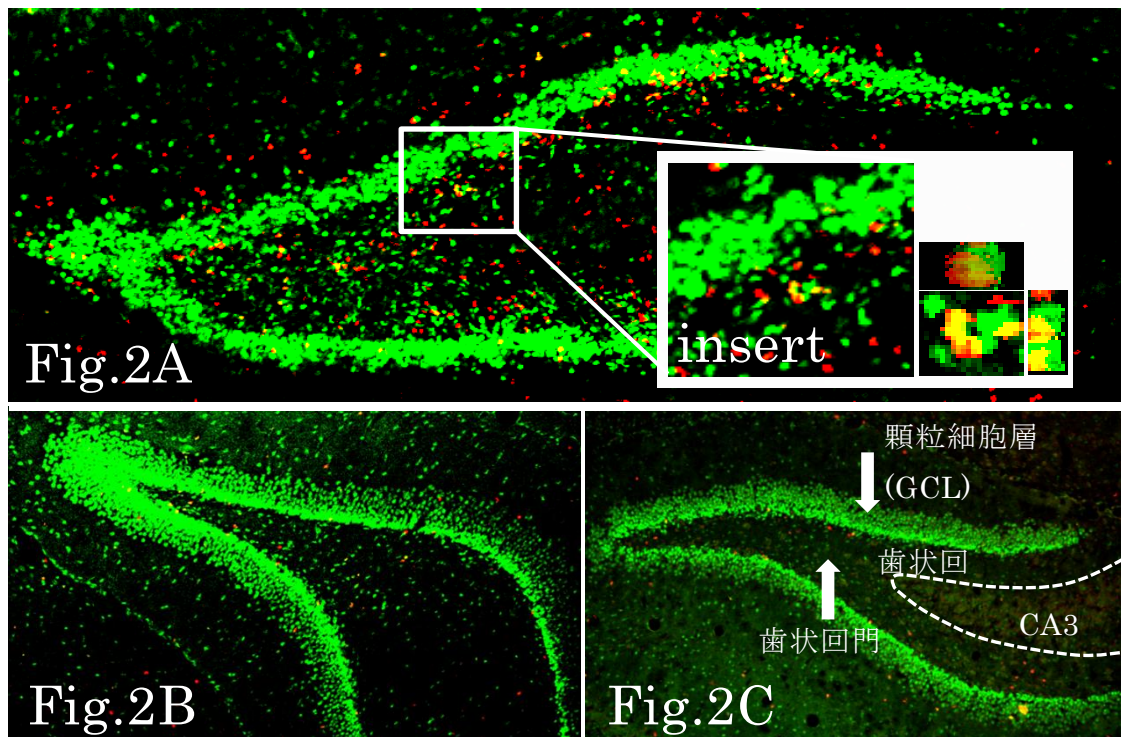


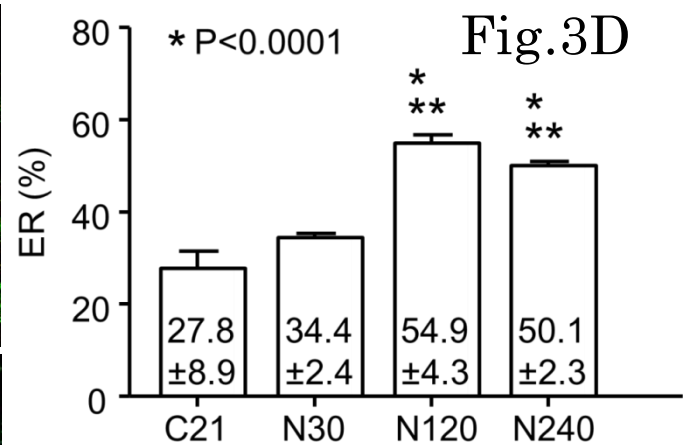
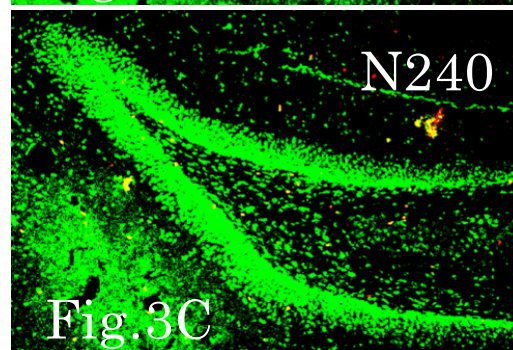
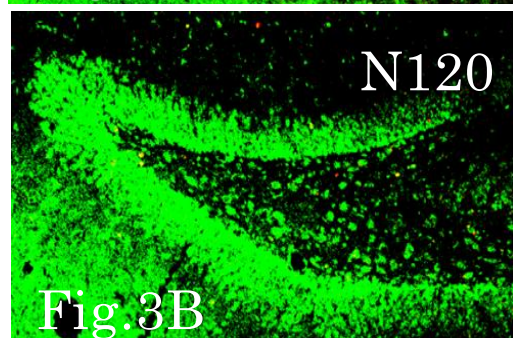
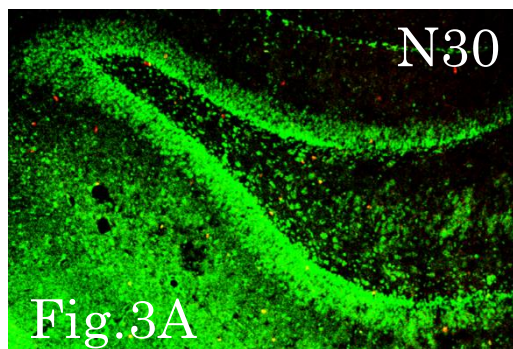
Fig.2A; C7 群海馬歯状回スライス（対物 20 倍）における Prox1 及び BrdU の代表的染色像．顆粒細胞が緑色に，新生神経が赤色に，これらを重ね合わせるにより新生顆粒細胞が黄色に観察されている． Fig.2; 白枠部分の拡大像．3D 再構成処理により x 軸，y 軸，z 軸方向から共染色された新生顆粒細胞が観察・計数された． Fig.2C; C21 群の代表的染色像．正常過程による移動によって新生顆粒細胞の多くは GCL に移動する． Fig.2D; ペントバルビタールに暴露した P21 群の代表的染色像．C21 群と比較して有意差を認めない． Fig.2E; 対照群の C7 群と C21 群，及びペンタバルビター

ルに暴露した P21 群の ER の比較.

5-2. 【実験Ⅱ】 亜酸化窒素への暴露に関する実験

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 N_2O 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 N_2O 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. 以上から, 暴露時間依存性に ER が増加する訳ではない可能性が示された.



C21;21 日対照群

N30; 30 分間 50%N₂O 暴露群

N120; 120 分間 50%N₂O 暴露群

N240; 240 分間 50%N₂O 暴露群

Fig.3A; N30 群の代表的画像. Fig.3B; N120 群の代表的画像, Fig.3C; N240 群の代表的画像. Fig.3D; C21 群, N30 群, N120 群, N240 群の 4 群における ER の比較結果. ER はそれぞれ $27.8 \pm 8.9\%$, $34.4 \pm 2.4\%$, $54.9 \pm 4.3\%$, $50.1 \pm 2.3\%$ であった.

5-3. 【追加実験；実験Ⅲ】 Bumetanide (NKCC1 inhibitor) の暴露後追加投与に関する実験

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±8.9%、54.9±4.3%、30.5±3.0%、26.5±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。

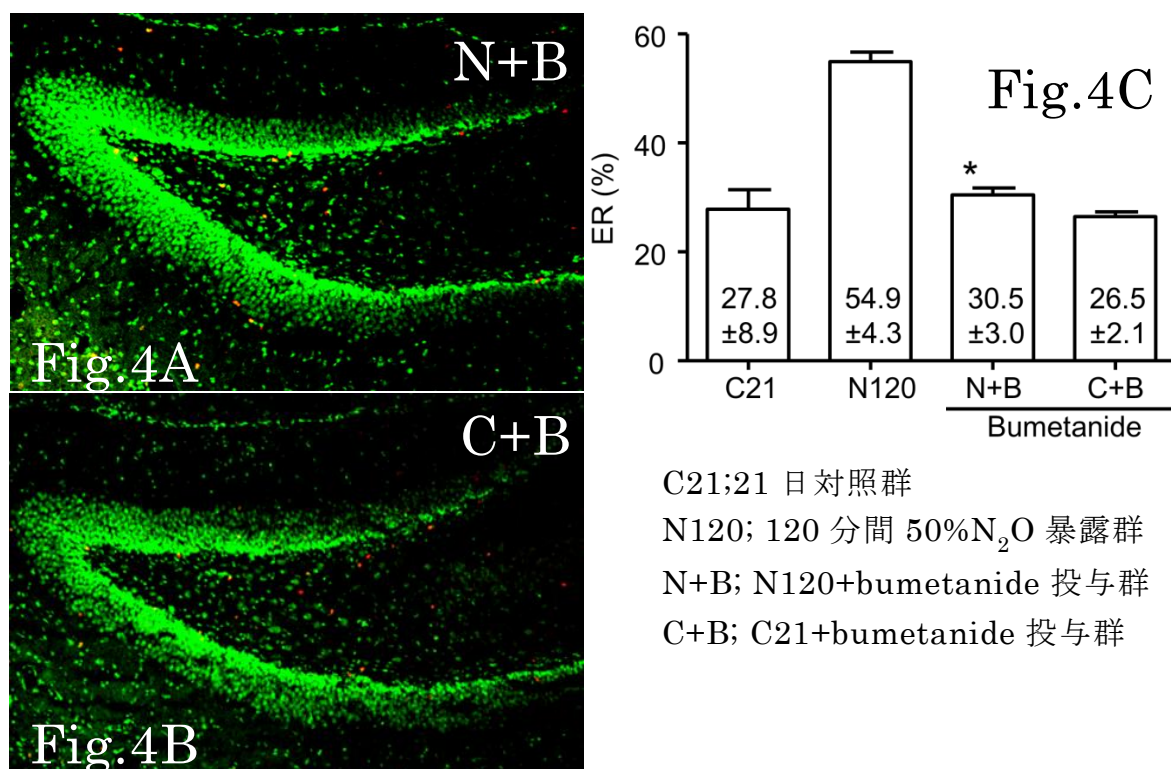


Fig.4A; N+B 群の代表的画像 Fig.4B; C+B 群の代表的画像 Fig.4C; N+B 群, C+B 群に加えて, 前出の C21 群と N120 群の ER を比較したグラフ. C21 群, N120 群, N+B 群, C+B 群の ER はそれぞれ $27.8 \pm 8.9\%$, $54.9 \pm 4.3\%$, $30.5 \pm 3.0\%$, $26.5 \pm 2.1\%$

6. 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^{28,43,56,57}，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²⁵⁻²⁷．ここで新生された前駆細胞の多くは GCL へ移動し²⁵，成熟して GCs となって海馬歯状回を形成するが^{32,58,59}，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⁶⁰．

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^{30,31}．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³²．その意義については不明な部分も多い．一方，熱性痙攣³³や，薬剤誘発性痙攣⁶¹，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^{32,37,62}，過剰な GABA 興奮性作用^{34,61}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³⁸，hEGCs の増加には GABA_A 受容体^{29,63}や NMDA 受容体^{19,64}を介した神経伝達に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^{65,66}、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⁴⁻⁶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⁶⁷⁻⁶⁹、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³³。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^{70,71}、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するとの報告^{61,63,70}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³³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⁵⁴、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⁵²。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^{17,72}。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⁵³や、神経ネットワークの形成⁷³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^{22,74,75}や海馬錐体細胞の障害⁷⁶、新生児期における痙攣発作の原因⁷⁷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。

7. 総括

「新知見」

1. ペントバルビタールの単回投与は新生仔ラット海馬歯状回における異所性顆粒細胞比を増加させない
2. 120 分以上の笑気暴露によって, 新生仔ラット海馬歯状回における異所性顆粒細胞比が増加する
3. NKCC1 阻害薬である **Bumetanide** の投与によって, 2. で示された異所性顆粒細胞比の増加は抑制される.

「新知見の意義」

幼少期の麻酔薬暴露によって長期的な神経障害が起こる可能性が指摘されたのは比較的最近のことであり, 麻酔薬が持つ神経毒性に関する知見が広く認知されるようになってきたのはここ数年のことである. その臨床的問題を検討するために複数の臨床的前向き研究が開始されているものの, その機序に関しては未だ明らかにされているとは言えず大きな検討の余地が残されている. その中で, アポトーシスではない麻酔薬が持つ神経毒性のひとつの形として海馬歯状回における異所性顆粒細胞に着目し, 臨床で使用されている麻酔薬により影響を受けることを確認した点で意義深いものである. さらにそれが **bumetanide** の追加投与によって抑制されることが示された点において, 将来的に麻酔薬の長期的神経毒性の機序を解明するだけでなく, その毒性を回避する手段を提示しうる点で意義のある研究であると思われる.

「今後の研究の展開」

麻酔薬の神経毒性に関する研究として, 有力と思われる仮説の設定とその検証方法を現在模索中である.

まず, **NMDA** 受容体拮抗薬として臨床で用いられている薬剤でもあることを考慮して **N₂O** を使用したが, **N₂O** にはそれ以外にもオピオイド受容体への作用や⁷⁸, 古くは長期暴露により骨髄抑制を誘導する事実なども報告されており⁷⁹, これらが **ER** の増加に影響を与えた可能性は否定できない. 一方で, 特異的な **NMDA** 受容体拮抗薬としては **MK-801** などが知られている. **MK-801** は **open channel blocker** として作用する純粋な **NMDA** 受容体拮抗薬であり^{80,81}, 単独での使用により麻酔作用を引き起こし⁸², イソフルレン及びハロセンに代表される吸入麻酔薬の必要投与量を減少させることなど

も知られている⁸³。N₂O と異なり純粋な NMDA 受容体の特異的な評価ができるため、今回観察された現象が再現されるかどうかを確認したい。

また、ペントバルビタールの単回投与では ER が増加しないのに対して、連日投与によって hEGCs の増加が起こると報告されており、この事実の相違を吟味したい。バルビツレートは長期的な投与によって NMDA 受容体の上方調節を誘導することが分かっているものの¹²、直接的な NMDA 受容体拮抗作用は持たず⁸⁴、事実、NMDA 受容体拮抗薬に対しての交差耐性を持ち合わせない⁸⁵。一方、大脳皮質や小脳における研究結果では、GABA 産生細胞である GABA 作動性介在神経細胞に NMDA 受容体が発現しており⁸⁶、NMDA 受容体拮抗薬を投与することで NMDA 受容体の上方調節が誘導され⁸⁷、結果として生じる細胞内カルシウム濃度の上昇が GABA 作動性介在神経細胞のシナプス前 GABA 終末のサイズを増加させ⁸⁸、最終的に GABA 作動性介在神経細胞からの GABA 放出量を増加させるという事実が報告されている⁸⁹。これらの上方調節された NMDA 受容体は長期にわたり残存することが知られていて⁸⁸、統合失調症⁹⁰やアルコール依存症⁹¹を説明しうる新たな機序として近年着目されているものである。

これらの事実に今回の実験結果を組み合わせ推測するに、今回の実験において ER の増加をもたらしたのは N₂O が持つ NMDA 受容体拮抗作用そのものではなく、それによる GABA 作動性介在神経細胞における NMDA 受容体の上方調節とその結果もたらされる過剰な GABA シグナリングであるとの仮説を立てるに至った。模式図を次ページ Fig.5 に示す。

これによれば、今回の実験において短時間の N₂O 暴露が ER を増加させなかった理由として、十分な NMDA 受容体の上方調節が起こらなかったからであると説明することができ、N₂O の単回暴露が ER を増加させた理由を上方調節の結果出現した持続的 GABA シグナリングによるものであると説明することが可能である。この仮説によれば、GABA_A 受容体刺激作用を持つペントバルビタールを連日投与した場合には、GABA 作動性介在神経細胞における NMDA 受容体の上方調節が起こらなくとも持続的な GABA シグナリングが発生した状態となるため、ER が増加するが、単回投与では ER は増加しないものと推察される。

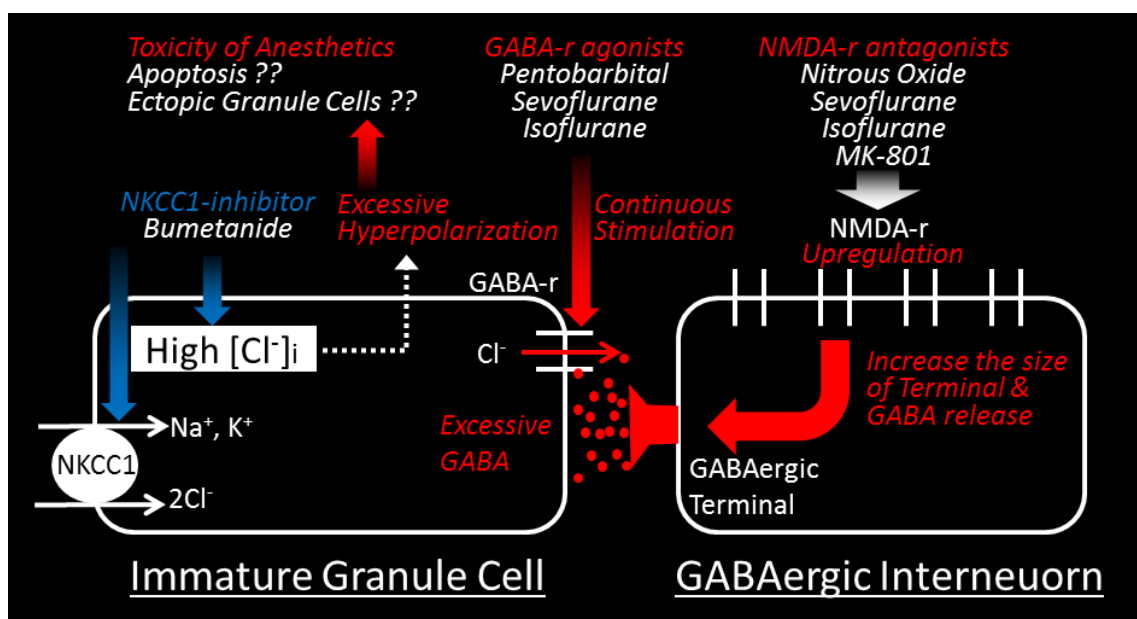


Fig.5 新生顆粒細胞と GABA 作動性介在神経細胞との相互関連と、それに対する麻酔薬の影響を示した仮想図.

しかしながら、今回の一連の実験の観察対象は海馬歯状回の新生顆粒細胞であるため、GABA 作動性介在神経細胞が関与する機序について言及することは不可能であり、今後さらなる追加実験が必要であると考ええる。具体的には、①麻酔薬の投与によって、GABA 作動性介在神経細胞に発現する NMDA 受容体が増加するかどうか、②NMDA 受容体の上方調節を受けた GABA 作動性介在神経細胞で実際に GABA 放出が増加しているかどうか、などの検証を行いたい。

また、NMDA 受容体と GABA 受容体を介する神経伝達が顆粒細胞前駆細胞に直接及ぼす影響に関しては未だ完全な解明には至っていない。事実、NMDA シグナリングが幼若顆粒細胞の細胞移動に関与していることを証明する論文は存在するが⁶⁴、これが顆粒細胞前駆細胞に対する直接作用によるものか GABA 作動性介在神経細胞を介した間接作用によるものかはいまだ不明であり、これらを明らかにするための実験も必要である。

「今後の課題」

前述の今後の研究の展開を考慮した場合、蛍光免疫染色法のみで解決できる問題は限られている。ウェスタンブロッティングなどの定量評価手法を導入して GABA 受容体や NMDA 受容体の発現量を調査するなどの方法によって、研究に深みを持たせたいと考えている。

8. 謝辞

本学位論文を作成するに当たり，研究の初端を与えてくださり，多大なるご支援を頂いた侵襲制御医学講座・森本 裕二教授に心より感謝いたします．また，直接のご指導を頂きました瀧田恒一先生，橋本聡一先生，加藤類先生，内田洋介先生に厚くお礼申し上げます．また，実験にご協力いただいた侵襲制御医学分野の皆様のご理解とご厚意に感謝いたします

9. 引用文献

- 1 Ikonomidou, C. *et al.* Blockade of NMDA Receptors and Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Brain. *Science* **283**, 70-74 (1999).
- 2 Cattano, D., Young, C., Straiko, M. M. & Olney, J. W. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth. Analg.* **106**, 1712-1714 (2008).
- 3 Satomoto, M. *et al.* Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology* **110**, 628-637 (2009).
- 4 Wilder, R. T. *et al.* Early Exposure to Anesthesia and Learning Disabilities in a Population-Based Birth Cohort. *Anesthesiology* **110**, 796-804 (2009).
- 5 Kalkman, C. J. *et al.* Behavior and development in children and age at the time of first anesthetic exposure. *Anesthesiology* **110**, 805-812 (2009).
- 6 DiMaggio, C., Sun, L. S., Kakavouli, A., Byrne, M. W. & Li, G. A retrospective cohort study of the association of anesthesia and hernia repair surgery with behavioral and developmental disorders in young children. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* **21**, 286-291 (2009).
- 7 Bartels, M., Althoff, R. R. & Boomsma, D. I. Anesthesia and cognitive performance in children: no evidence for a causal relationship. *Twin. res. hum. genet.* **12**, 246-253 (2009).
- 8 Hansen, T. G. *et al.* Academic Performance in Adolescence after Inguinal Hernia Repair in Infancy A Nationwide Cohort Study. *Anesthesiology* **114**, 1076-1085 (2011).
- 9 Asano, T. & Ogasawara, N. Chloride-dependent stimulation of GABA and benzodiazepine receptor binding by pentobarbital. *Brain Res.* **225**, 212-216 (1981).
- 10 Twyman, R. E., Rogers, C. J. & Macdonald, R. L. Pentobarbital and picrotoxin have reciprocal actions on single GABA A receptor channels. *Neurosci. Lett.* **96**, 89-95 (1989).
- 11 Brosnan, R. J. GABA(A) receptor antagonism increases NMDA receptor inhibition by isoflurane at a minimum alveolar concentration. *Vet. Anaesth. Analg.* **38**, 231-239 (2011).
- 12 Short, K. R. & Tabakoff, B. Chronic barbiturate treatment increases NMDA receptors but decreases kainate receptors in mouse cortex. *Eur. J. Pharmacol.*

- 230**, 111-114 (1993).
- 13 Jevtovic-Todorovic, V. *et al.* Nitrous oxide (laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant and neurotoxin. *Nat. Med.* **4**, 460-463 (1998).
 - 14 Loepke, A. W. *et al.* The effects of neonatal isoflurane exposure in mice on brain cell viability, adult behavior, learning, and memory. *Anesth. Analg.* **108**, 90-104 (2009).
 - 15 Fredriksson, A., Ponten, E., Gordh, T. & Eriksson, P. Neonatal exposure to a combination of N-methyl-D-aspartate and γ -aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits. *Anesthesiology* **107**, 427-436 (2007).
 - 16 Ikonomidou, C. *et al.* Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 401-405 (2001).
 - 17 Ben-Ari, Y. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 728-739 (2002).
 - 18 Young, S. Z. *et al.* NKCC1 Knockdown Decreases Neuron Production through GABA_A-Regulated Neural Progenitor Proliferation and Delays Dendrite Development. *J. Neurosci.* **32**, 13630-13638 (2012).
 - 19 Burgoyne, R. D., Graham, M. E. & Cambray-Deakin, M. Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *J. Neurocytol.* **22**, 689-695 (1993).
 - 20 Kilb, W. Development of the GABAergic System from Birth to Adolescence. *The Neuroscientist* **18**, 613-630 (2012).
 - 21 Cameron, H., McEwen, B. & Gould, E. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* **15**, 4687-4692 (1995).
 - 22 Erdo, S., Michler, A. & Wolff, J. R. GABA accelerates excitotoxic cell death in cortical cultures: protection by blockers of GABA-gated chloride channels. *Brain Res.* **542**, 254-258 (1991).
 - 23 Stratmann, G. *et al.* Effect of hypercarbia and isoflurane on brain cell death and neurocognitive dysfunction in 7-day-old rats. *Anesthesiology* **110**, 849 (2009).
 - 24 Stratmann, G., Sall, J. W., May, L. D., Loepke, A. W. & Lee, M. T. Beyond anesthetic properties: the effects of isoflurane on brain cell death, neurogenesis, and long-term neurocognitive function. *Anesth. Analg.* **110**, 431-437 (2010).

- 25 Altman, J. & Bayer, S. A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* **301**, 365-381 (1990).
- 26 Dobbing, J. & Sands, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* **3**, 79-83 (1979).
- 27 Schlessinger, A. R., Cowan, W. M. & Gottlieb, D. I. An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J. Comp. Neurol.* **159**, 149-175 (1975).
- 28 Namba, T. *et al.* The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 1928-1941 (2005).
- 29 Gould, E. & Cameron, H. A. Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus. *Dev. Neurosci.* **18**, 22-35 (1996).
- 30 McCloskey, D., Hintz, T., Pierce, J. & Scharfman, H. Stereological estimation of the number of EC-topic granule cells (EGCs) in the hilus following pilocarpine-induced status epilepticus (PILO). *Epilepsia* **46**, 295-296 (2005).
- 31 West, M., Slomianka, L. & Gundersen, H. J. G. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* **231**, 482-497 (1991).
- 32 Scharfman, H., Goodman, J. & McCloskey, D. Ectopic Granule Cells of the Rat Dentate Gyrus. *Dev. Neurosci.* **29**, 14-27 (2007).
- 33 Koyama, R. *et al.* GABAergic excitation after febrile seizures induces ectopic granule cells and adult epilepsy. *Nat. Med.* **18**, 1271-1278 (2012).
- 34 Zhan, R. Z., Timofeeva, O. & Nadler, J. V. High ratio of synaptic excitation to synaptic inhibition in hilar ectopic granule cells of pilocarpine-treated rats. *J. Neurophysiol.* **104**, 3293-3304 (2010).
- 35 Liu, J., Solway, K., Messing, R. O. & Sharp, F. R. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J. Neurosci.* **18**, 7768-7778 (1998).
- 36 Dashtipour, K., Tran, P. H., Okazaki, M. M., Nadler, J. V. & Ribak, C. E. Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer. *Brain Res.* **890**, 261-271 (2001).
- 37 Scharfman, H. E., Goodman, J. H. & Sollas, A. L. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3

- pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J. Neurosci.* **20**, 6144-6158 (2000).
- 38 Myers, C. E., Bermudez-Hernandez, K. & Scharfman, H. E. The Influence of Ectopic Migration of Granule Cells into the Hilus on Dentate Gyrus-CA3 Function. *PLoS One* **8**, e68208 (2013).
- 39 Wojtowicz, J. M. & Kee, N. BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat. Protocols* **1**, 1399-1405 (2006).
- 40 Shimizu, A. *et al.* S - Phase cells in diseased human liver determined by an in Vitro BrdU - anti - BrdU method. *Hepatology* **8**, 1535-1539 (1988).
- 41 Taupin, P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain res. rev.* **53**, 198-214 (2007).
- 42 Nagashima, T., DeArmond, S. J., Murovic, J. & Hoshino, T. Immunocytochemical demonstration of S-phase cells by anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody in human brain tumor tissues. *Acta Neuropathol.* **67**, 155-159 (1985).
- 43 Cameron, H. A. & McKay, R. D. G. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* **435**, 406-417 (2001).
- 44 Sawada, S. & Yamamoto, C. Blocking action of pentobarbital on receptors for excitatory amino acids in the guinea pig hippocampus. *Exp. Brain Res.* **59**, 226-231 (1985).
- 45 Willow, M. & Johnston, G. A. R. Pentobarbitone slows the dissociation of GABA from rat brain synaptosomal binding sites. *Neurosci. Lett.* **23**, 71-74 (1981).
- 46 Olsen, R. W., Fischer, J. B. & Dunwiddie, T. V. Barbiturate enhancement of γ -aminobutyric acid receptor binding and function as a mechanism of anesthesia. *Molecular and Cellular Mechanisms of Anesthetics*, 165-178 (1986).
- 47 Shiraishi, Y. & Ohtsuki, Y. SCE levels in Bloom-syndrome cells at very low bromodeoxyuridine (BrdU) concentrations: Monoclonal anti-BrdU antibody. *Mutat. Res.* **176**, 157-164 (1987).
- 48 Navarro - Quiroga, I., Hernandez - Valdes, M., Lin, S. L. & Naegele, J. R. Postnatal cellular contributions of the hippocampus subventricular zone to the dentate gyrus, corpus callosum, fimbria, and cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* **497**, 833-845 (2006).
- 49 Lavado, A., Lagutin, O. V., Chow, L. M. L., Baker, S. J. & Oliver, G. Prox1 Is

- Required for Granule Cell Maturation and Intermediate Progenitor Maintenance During Brain Neurogenesis. *PLoS Biol.* **8**, e1000460 (2010).
- 50 Ben-Ari, Y., Tyzio, R. & Nehlig, A. Excitatory action of GABA on immature neurons is not due to absence of ketone bodies metabolites or other energy substrates. *Epilepsia* **52**, 1544-1558 (2011).
- 51 Ganguly, K., Schinder, A. F., Wong, S. T. & Poo, M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* **105**, 521-532 (2001).
- 52 Yamada, J. *et al.* Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J. Physiol.* **557**, 829-841 (2004).
- 53 Cancedda, L., Fiumelli, H., Chen, K. & Poo, M.-m. Excitatory GABA Action Is Essential for Morphological Maturation of Cortical Neurons In Vivo. *J. Neurosci.* **27**, 5224-5235 (2007).
- 54 Isenring, P. & Forbush, B. Ion and Bumetanide Binding by the Na-K-Cl Cotransporter: IMPORTANCE OF TRANSMEMBRANE DOMAINS. *J. Biol. Chem.* **272**, 24556-24562 (1997).
- 55 Edwards, D. A. *et al.* Bumetanide alleviates epileptogenic and neurotoxic effects of sevoflurane in neonatal rat brain. *Anesthesiology* **112**, 567-575 (2010).
- 56 Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F. H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* **16**, 2027-2033 (1996).
- 57 Eriksson, P. S. *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* **4**, 1313-1317 (1998).
- 58 Gaarskjaer, F. B. & Laurberg, S. Ectopic granule cells of hilus fasciae dentatae projecting to the ipsilateral regio inferior of the rat hippocampus. *Brain Res.* **274**, 11-16 (1983).
- 59 Muramatsu, R., Ikegaya, Y., Matsuki, N. & Koyama, R. Early-life status epilepticus induces ectopic granule cells in adult mice dentate gyrus. *Exp. Neurol.* **211**, 503-510 (2008).
- 60 Kee, N., Teixeira, C. M., Wang, A. H. & Frankland, P. W. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* **10**, 355-362 (2007).
- 61 Zhan, R.-Z. & Nadler, J. V. Enhanced Tonic GABA Current in Normotopic and

- Hilar Ectopic Dentate Granule Cells After Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. *J. Neurophysiol.* **102**, 670-681 (2009).
- 62 Scharfman, H. E., Sollas, A. L. & Goodman, J. H. Spontaneous recurrent seizures after pilocarpine-induced status epilepticus activate calbindin-immunoreactive hilar cells of the rat dentate gyrus. *Neuroscience* **111**, 71-81 (2002).
- 63 Bolteus, A. J. & Bordey, A. GABA Release and Uptake Regulate Neuronal Precursor Migration in the Postnatal Subventricular Zone. *J. Neurosci.* **24**, 7623-7631 (2004).
- 64 Komuro, H. & Rakic, P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* **260**, 95-97 (1993).
- 65 Petrenko, A. B. & Shimoji, K. A possible role for glutamate receptor-mediated excitotoxicity in chronic pain. *J. Anesth.* **15**, 39-48 (2001).
- 66 Petrenko, A. B., Yamakura, T., Baba, H. & Shimoji, K. The Role of N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review. *Anesth. Analg.* **97**, 1108-1116 (2003).
- 67 Li, Y. *et al.* JNK pathway may be involved in isoflurane-induced apoptosis in the hippocampi of neonatal rats. *Neurosci. Lett.* **545**, 17-22 (2013).
- 68 Pontén, E. *Neonatal Exposure to Anaesthesia and Adjuvants [Elektronisk resurs] : Acute Effects on Cerebral Apoptosis and Neuroproteins, and Late Behavioural Aberrations in Mice.* 54 (Acta Universitatis Upsaliensis, 2012).
- 69 Kodama, M. *et al.* Neonatal desflurane exposure induces more robust neuroapoptosis than do isoflurane and sevoflurane and impairs working memory. *Anesthesiology* **115**, 979-991 (2011).
- 70 Heck, N. *et al.* GABA-A Receptors Regulate Neocortical Neuronal Migration In Vitro and In Vivo. *Cereb. Cortex* **17**, 138-148 (2007).
- 71 Manent, J. B. *et al.* A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J. Neurosci.* **25**, 4755-4765 (2005).
- 72 Yamada, J. *et al.* Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J. Physiol.* **557**, 829-841 (2004).
- 73 Pfeffer, C. K. *et al.* NKCC1-Dependent GABAergic Excitation Drives Synaptic Network Maturation during Early Hippocampal Development. *J. Neurosci.* **29**, 3419-3430 (2009).

- 74 Babot, Z., Cristòfol, R. & Suñol, C. Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABAA receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 103-112 (2005).
- 75 Beck, J., Lenart, B., Kintner, D. B. & Sun, D. Na-K-Cl Cotransporter Contributes to Glutamate-Mediated Excitotoxicity. *J. Neurosci.* **23**, 5061-5068 (2003).
- 76 Zhao, Y. L. *et al.* GABAergic Excitotoxicity Injury of the Immature Hippocampal Pyramidal Neurons' Exposure to Isoflurane. *Anesth. Analg.* **113**, 1152-1160 (2011).
- 77 Kristopher T. Kahle & Kevin J. Staley. The bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 as a potential target of a novel mechanism-based treatment strategy for neonatal seizures. *Neurosurg. Focus* **25**, E22 (2008).
- 78 Quock, R. M. & Graczak, L. M. Influence of narcotic antagonist drugs upon nitrous oxide analgesia in mice. *Brain Res.* **440**, 35-41 (1988).
- 79 Lassen, H. C. A., Henriksen, E., Neukirch, F. & Kristensen, H. TREATMENT OF TETANUS: SEVERE BONE-MARROW DEPRESSION AFTER PROLONGED NITROUS-OXIDE ANESTHESIA. *The Lancet* **267**, 527-530 (1956).
- 80 Wong, E. H. *et al.* The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 7104-7108 (1986).
- 81 Huettner, J. E. & Bean, B. P. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 1307-1311 (1988).
- 82 McCartney, C. J. L., Sinha, A. & Katz, J. A Qualitative Systematic Review of the Role of N-Methyl-d-Aspartate Receptor Antagonists in Preventive Analgesia. *Anesth. Analg.* **98**, 1385-1400 (2004).
- 83 Wagner, A. E., Walton, J. A., Hellyer, P. W., Gaynor, J. S. & Mama, K. R. Use of low doses of ketamine administered by constant rate infusion as an adjunct for postoperative analgesia in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **221**, 72-75 (2002).
- 84 Daniell, L. C. Effect of Anesthetic and Convulsant Barbiturates on N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Mediated Calcium Flux in Brain Membrane Vesicles. *Pharmacology* **49**, 296-307 (1994).
- 85 Rabbani, M., Wright, E. J. & Little, H. J. Tolerance to competitive NMDA

- antagonists, but no crosstolerance with barbiturates. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **50**, 9-15 (1995).
- 86 Nakazawa, K. *et al.* GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology* **62**, 1574-1583 (2012).
- 87 Follesa, P. & Ticku, M. NMDA receptor upregulation: molecular studies in cultured mouse cortical neurons after chronic antagonist exposure. *J. Neurosci.* **16**, 2172-2178 (1996).
- 88 Liu, F. *et al.* Ketamine-Induced Neuronal Damage and Altered N-Methyl-d-Aspartate Receptor Function in Rat Primary Forebrain Culture. *Toxicol. Sci.* **131**, 548-557 (2013).
- 89 Fiszman, M. L. *et al.* NMDA Receptors Increase the Size of GABAergic Terminals and Enhance GABA Release. *J. Neurosci.* **25**, 2024-2031 (2005).
- 90 Pitcher, G. M. *et al.* Schizophrenia susceptibility pathway neuregulin 1-ErbB4 suppresses Src upregulation of NMDA receptors. *Nat. Med.* **17**, 470-478 (2011).
- 91 Hu, X.-J., Follesa, P. & Ticku, M. K. Chronic ethanol treatment produces a selective upregulation of the NMDA receptor subunit gene expression in mammalian cultured cortical neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **36**, 211-218 (1996).