

学位論文題名

幼若期の麻酔薬暴露が成長後のラット海馬機能に及ぼす
障害作用

学位論文内容の要旨

【背景と目的】近年、幼若期の全身麻酔薬投与が、広範な脳神経細胞死と成長後の行動異常を引き起こしたという報告が多数なされている。これらの報告によれば、NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗作用もしくは GABA 受容体刺激作用を示す全身麻酔薬は、脳神経細胞死と行動異常を引き起こすと考えられるが、その詳細は未だ解明されていない。海馬は記憶学習の過程に重要な役割を果たしており、特に長期増強(LTP)は記憶、学習能力の基盤となる現象と考えられている。幼若時の全身麻酔薬投与が成長後の海馬の電気生理学的機能に及ぼす影響に関する研究は少ない。そこで我々は、代表的な麻酔薬であるプロポフォール(研究 1)とセボフルラン(研究 2)を用い、成長後の海馬内神経回路に与える電気生理学的な影響を調査した。あわせて行動観察試験を行い行動学的異常との関連を調査した。

研究 1

【対象と方法】生後 7 日齢に雄性の Wistar 系ラットに対し、以下の 4 群の処置を行った。(1)プロポフォール 50mg/kg、(2)プロポフォール 25mg/kg、(3)イントラリピッド、(4)生理食塩水(対照群)。電気生理学的研究:生後 9-10 週齢に、海馬の電気生理学的評価を行った。ハロタン麻酔下に、記録電極を海馬 CA1 領域の錐体細胞層に、刺激電極は同側の Schaffer 側枝に挿入し、Schaffer 側枝へ刺激電位により CA1 領域に誘発された細胞外集合電位(PSA)を記録した。LTP 誘導のため、高頻度電気刺激(HFS)を与え、HFS 後の PSA の増強を以って LTP 形成とした。行動観察学的研究:生後 9-10 週齢にオープンフィールド試験を施行し、全般的な運動量を評価した。

【結果】電気生理学的検討:HFS 後の PSA の最大値は、生理食塩水群 $217.8 \pm 29.64\%$ 、イントラリピッド群 $216.1 \pm 11.88\%$ 、プロポフォール 25mg/kg 群 $212.5 \pm 41.92\%$ 、プロポフォール 50mg/kg 群 $125.6 \pm 9.98\%$ で、プロポフォール 50mg/kg 投与群において正常な LTP 形成を認めなかった。各群の AUC を統計学的に比較した結果、50mg/kg プロポフォール群は、生理食塩水群とイントラリピッド群との間に有意差を認めた。オープンフィールド試験:群間に有意差を認めなかった。

【考察】今回の実験より、幼若期プロポフォール投与が、成長後の海馬の LTP 形成を障害する事を初めて示した。今回認められた海馬 LTP 形成障害は学習障害などの行動異常と関連があると考えられる。脳神経系の分化成熟に GABA 受容体と NMDA 受容体の作用は重要であり、GABA 作動薬であるプロポフォール投与が海馬の分化成熟に異常を引き起こした可能性がある。プロポフォールの呼吸抑制作用の影響を、オープンフィールド試験を用い成長後の全般的な運動能力を調査する事により評価し、有意な異常は認めなかった。しかし幼若時の呼吸抑制が成長後の脳機能に及ぼす影響に関しては、更なる研究が必要である。

【結論】プロポフォールの幼若期の投与が成長後の海馬の LTP 形成障害を引き起こす事が示唆された。

研究 2

【対象と方法】対照:研究1と同様。生後7日齢に以下の4群の処置を2時間行った。(1)1%セボフルラン+酸素99%、(2)2%セボフルラン+酸素98%、(3)8%二酸化炭素+92%酸素、(4)100%酸素(対照群)。動脈血液ガス分析:セボフルランによる呼吸抑制を、動脈血液ガス分析により評価した。電気生理学的検討:研究1と同様。モリス水迷路試験:生後10-11週齢行動観察学的に学習機能を評価するため、Hidden platform testとProbe trialを施行した。Hidden platform testは1回90秒間のテストとし、platformへの到達時間を測定した。テストは連続2回施行し平均値を記録し、これを1セッションとした。1日2セッション、連続4日間(計8セッション)施行した。Probe trialは、platformを取り除いたプールに、ラットを60秒間泳がせ、その間Platformを留置していた4半円領域に滞在した割合を百分率で記録した。水泳速度:ラットの運動能力を平均水泳速度(cm/s)で評価した。オープンフィールド試験:研究1と同様。

【結果】動脈血液ガス分析:2%セボフルランと二酸化炭素群で、有意なアシドーシスと高二酸化炭素血症を認めた。電気生理学的検討:HFS後のPSAの最大値はそれぞれ、酸素群 $214.1 \pm 29.82\%$ 、二酸化炭素群 $218.6 \pm 25.39\%$ 、1%セボフルラン群 $170.7 \pm 20.08\%$ 、2%セボフルラン群 $130.9 \pm 10.47\%$ であった。1%セボフルラン群、2%セボフルラン群においては十分なLTP形成を認めなかった。各群のAUCを統計学的に検討した結果、2%セボフルラン群は、対照群と二酸化炭素群と間に有意差を認めた。モリス水迷路試験:Hidden Platform testにおいて複数のセッションで、2%セボフルラン群と他の3群との間に有意差を認めた。また全セッションにおける到達時間の合計値はそれぞれ、酸素群 214.5 ± 19.79 秒、二酸化炭素群 214.6 ± 14.40 秒、1%セボフルラン群 253.6 ± 15.06 秒、2%セボフルラン群 323.2 ± 18.71 秒で、2%セボフルラン群は他の3群と比較し有意差を持ってプラットフォーム到達時間の延長を認めた。Probe Trial、水泳速度の結果、各群の間に有意差を認めなかった。オープンフィールド試験:有意差を認めなかった。

【考察】幼若時の2%のセボフルラン暴露は、統計学的有意差を持って成長後の海馬LTPの形成障害とモリス水迷路試験における学習効率の低下を同時に引き起こした。この結果により幼若時のセボフルラン麻酔によって引き起こされた成長後の海馬LTP形成障害と学習能力の障害と強く結びつく事が示唆された。セボフルランはGABA受容体ならびにNMDA受容体の両方に作用するとされており、前述のとおり幼若期のGABA受容体とNMDA受容体刺激は神経系の成熟に重要であり、幼若期のセボフルラン暴露が成長後の海馬内神経の成熟に異常をきたした可能性が考えられる。本実験において、二酸化炭素群を用い、セボフルランによる呼吸抑制の影響を評価したが、成長後の海馬LTPの形成や学習能力に障害を認めず、2%セボフルラン群で観察された成長後のLTP形成や学習能力の障害に、呼吸抑制は影響しない事が示唆された。水泳速度及びオープンフィールド試験の結果、モリス水迷路試験の結果はラットの運動能力に影響されていないことが確認された。

【結論】幼若期のセボフルラン暴露は、成長後の海馬シナプス可塑性ならびに学習能低下を引き起こし、その間に明確な関連があることが示された。またセボフルラン曝露による呼吸抑制の影響は否定された。

【結語】本研究から、幼若期におけるプロポフォールとセボフルラン投与により、それぞれ成長後の海馬シナプス可塑性に異常が生じることが示された。また、海馬シナプス可塑性の異常は、学習能の低下と密接に関連する可能性が示唆された。幼若期麻酔薬による神経毒性の一端に、成長後の海馬機能の低下が存在する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	吉岡	充弘
副査	教授	神谷	温之
副査	教授	佐々木	秀直
副査	教授	森本	裕二

学位論文題名

幼若期の麻酔薬暴露が成長後のラット海馬機能に及ぼす 障害作用

本論文において著者らは、代表的な全身麻酔薬であるプロポフォール及びセボフルランを幼若ラットに暴露し、海馬と関連のある脳神経機能に与える影響を、成長後に電気生理学的手法と行動観察学的手法を用い調査した。電気生理学的手法として海馬 CA1 領域の長期増強現象 (Long term potentiation: 以下 LTP) の in vivo recording method を用い、また行動観察学的手法として Morris water maze test 及び Open-field test を用いた。その結果、LTP 形成不全と学習能力の低下を同時に認めた。海馬 LTP 形成は記憶学習のプロセスと深く関連があると考えられており、本論文において幼若期の全身麻酔薬暴露が長期的に海馬 LTP 形成を障害し、学習障害の原因となっている可能性が示唆された。また、幼若動物への麻酔薬暴露により必発と考えられる呼吸抑制が脳神経系に与える影響を、呼吸不全モデルを作製し評価したが、LTP の形成や学習機能に異常を認めず、本論文においては麻酔による呼吸抑制の影響は除外できる事が示唆された。

上記の報告に対し副査の神谷教授より、脳機能の評価にあたり研究素材として海馬を選択した理由について質問がなされた。海馬における LTP 形成と記憶学習のプロセスの強い関連を報告した文献は多く、また手技的に電気生理学的研究を行いやすい部位であり、麻酔薬による学習障害を電気生理学側面より調査するのに適していると考えられたため、と回答された。また幼若期の GABA / NMDA シナプスの特性に関する質問がなされ、クロライドホメオスタシスの異常等に関する文献を引用した回答がなされた。さらに本論文中の電気生理学的手法に関して、input-output 特性の評価や、他の電気生理学的手法を用いたシナプスレベルの研究の必要性などが指摘されたが、実験手法の限界により、本論文においてシナプスレベルの評価・考察は困難であり、今後の研究課題としていく方針である、と回答された。副査の佐々木教授より、モリス水迷路試験の結果の評価に関して質問がなされた。本論文では学習効率の低下を認めたが、記憶保持能力は保たれていた。記憶学習の過程には未だ不明な点も多く、電気生理学の結果を以って行動観察学的結果を全て解明するためには、より詳細な研究が必要と考えられる、と回答された。副査の森本教授より、組織学的結果と行動観察学的結果の関連に関して質問がなされた。プロポフォール、セボフルランによる組織障害の報告は多数あるが、行動観察学的結果と相関関係が乏しい事が報告されている。本論文では電気生理学異常が、行動観察学的結果とよく相関しており、組織学的検討より有用であると考えられると回答された。さらに、本論文の結果をヒトへ適応出来るか質問された。ヒトを用いた電気生理学的もしくは組織学的研究は不可能であり、また幼若期の麻酔薬の影響を調査するためには大規模かつ良いデザインの臨床研究が必要であるが、現在までエビデンスレベルの強い報告はなされていない。ヒ

トに対する幼若期の麻酔薬暴露の影響に関しては不明な点が多く、本論文の結果をヒトへ適応するのは困難と考えられると回答された。主査の吉岡教授より、使用した麻酔薬の用量、暴露時期の妥当性に関する質問がなされた。用量に関しては両剤の麻酔量に関する文献に準拠している。投与時期に関しては、生後 7 日齢が最も麻酔薬に対して脳神経の脆弱性が高いと報告されており、本論文における用量、投与時期は適切と考えられると回答された。また呼吸抑制の影響に関して、より高度の呼吸抑制モデルでは脳神経障害が起こるのではないかと指摘された。本論文より高レベルの呼吸抑制モデルを用いた研究では脳神経機能の障害が報告されており、呼吸抑制の程度によって結果が異なる可能性がある旨、回答された。さらにGABA/NMDA シナプス作動薬と神経障害の関係に関して質問がされた。GABA/NMDAシナプスの活動が脳神経系の分化、成熟、選別に重要な役割を果たすことが報告されており、麻酔薬による神経毒性の発現に関与していることが考えられる旨回答がなされた。

本研究は麻酔薬による神経毒性のメカニズムの解明に寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。