学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 内田 洋介

学 位 論 文 題 名

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)

【背景】

これまで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、以降イソフルランだけ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することが明らかになってきているものの、正確な機序は解明されていない。麻酔薬投与後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が、神経細胞のアポトーシスだけでは麻酔薬の神経毒性を説明する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。

【対象と方法】

日齢 6 の Wistar 系新生仔ラットに細胞新生のマーカーである 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の投与を行い、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)。ガス暴露後の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。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。共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察を行い、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。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、対照群において暴露中の呼吸状態を評価するため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移動が阻害され、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低濃度のイソフルラン暴露や高二酸化炭素暴露、日齢14での暴露では生じないことも示された。

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という点である。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、幼若期の熱性けいれん後の興奮性の過剰な 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ということが報告された。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 受容体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。