

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 斉藤仁志

学位論文題名

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)

【背景・目的】これまで神経発達期における全身麻酔薬暴露が急性の神経細胞死や長期的な認知機能障害を引き起こすことは多くの実験動物モデルにおいて数多く報告されてきた。また、近年では幼少期の全身麻酔が成長後の知能障害、学習障害、発達障害、社会適応障害などをもたらす可能性を報告する論文が連続して発表された。それを受け、アメリカでは FDA 主導によって麻酔薬の臨床的な神経毒性を評価する前向き大規模研究が 2009 年から開始されることとなった。また、同様の前向き研究がその後も発表されていることから、それらの報告が待たれるところである。

一方、これまで多くの理論が提唱され研究されてきたものの、一般的な麻酔薬の作用機序は未だに全容が解明されているとは言い難い。しかしながら、全身麻酔薬の多くは NMDA 受容体拮抗作用や GABA 受容体刺激作用により鎮静状態を引き起こすことが報告されており、加えてこれらの結合部位に対する特異的作動薬が同様に麻酔作用に準じた鎮静効果を引き起こすことから、これらの受容体が麻酔の本質と深く関与している可能性は非常に高い。神経発達過程は様々な事象が各種のシグナリングを受けることで成立することが報告されているが、我々はその中でも海馬歯状回門において出生直後に観察される顆粒細胞前駆細胞に着目した。海馬は記憶形成や学習能力に関与する可能性が示唆されており、麻酔薬の神経障害が成長後も継続するのならば、これらの細胞が麻酔薬によって何らかの影響を受けるのではないかと考えたからである。

migration は海馬歯状回門で新生された前駆細胞が約 3 週間の期間を経て徐々に顆粒細胞層へと移動する現象であり、GABA 受容体や NMDA 受容体を介したシグナリングにより調節されていることが分かっている。新生顆粒細胞の中には顆粒細胞層へと到達せずに海馬歯状回門内に留まる細胞が一部存在することが知られており、これらは異所性顆粒細胞と呼ばれている。小山らは幼若期に人為的な熱刺激を与えて熱性痙攣を起こしたラットが成長後に側頭てんかんを発症するという事実を発見して報告した。これらのラットの海馬歯状回では異所性顆粒細胞が増加しており、これが成長後の側頭てんかん発作の原因であると考えた彼らはさらなる詳細な研究を行った。その結果、増加した異所性顆粒細胞には解剖学および機能的異常があること、この現象が GABA 受容体刺激薬によって増強されること、さらに熱性痙攣誘導後に Bumetanide (NKCC1 阻害薬) を投与することによって異所性顆粒細胞の数が減少して側頭てんかんの発症も抑制できることを報告した。

そこで我々は、幼若ラットへの麻酔薬曝露もまた、熱性痙攣刺激同様に海馬歯状回における異常な異所性顆粒細胞を増加させ、これが麻酔薬曝露後も継続する長期的な神経毒性を説明する要因のひとつとなるのではないかと考えた。

【方法と結果】この仮説を実証するために、我々は生後6日齢の雄性Wistar/STラットに5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を皮下投与して新生細胞を標識、7日齢に麻酔薬を腹腔内投与または吸入麻酔薬暴露を行い、21日齢に抗BrdU抗体と顆粒細胞のマーカーとして抗prospero-related homeobox 1 (Prox1)抗体を用いた蛍光二重免疫染色を行い、新生顆粒細胞の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。結果、顆粒細胞は緑色の細胞、新生細胞は赤色の細胞、新生顆粒細胞は共染色された黄色の細胞として観察されるため、歯状回門に存在する顆粒細胞と顆粒細胞層存在する顆粒細胞をカウントして、歯状回門に存在する顆粒細胞の割合をEctopic Ratio (ER)と定義、各種の介入によってこのERがどのように変化するかを調査した。

結果の詳細は別紙にゆずるが、比較的純粋なNMDA拮抗作用を持つ笑気への暴露によって、強い有意差をもったERの増加が認められた。一方で、比較的純粋なGABA刺激作用を持つペントバルビタールの単回投与ではERの増加がみられなかった。また、笑気曝露群に対してBumetanideを投与することにより、ERの上昇が抑制されることが判明した。

【考察・結論】

以上、本研究の背景、目的、方法、結果を概説した。本研究の結果として、(1)ペントバルビタールの単回投与ではERが増加しないこと、(2)120分以上の50%笑気曝露によってERが増加すること、(3)さらにERの増加がbumetanide投与によって拮抗されることが示された。また、過去の論文ではペントバルビタールの複数回投与によってERが上昇すると報告されていることから、GABA受容体刺激がERの増加をもたらすには、一定以上のGABA受容体刺激期間が必要である可能性があるものと思われた。一方、NMDA受容体拮抗薬が単回投与であってもERの上昇をもたらす理由としては、GABA作動性介在神経細胞に発現しているNMDA受容体がNMDA受容体拮抗薬によって上方調節を受けるためであると考えられる。大脳皮質を中心とした過去の論文から、この上方調節を受けたNMDA受容体は麻酔薬曝露後も長期的に残存し、細胞内カルシウム濃度を上昇させることによってGABAターミナルの増大をもたらしてGABA放出量を増加させることが分かっている。一方で、過剰なGABAシグナルが顆粒細胞前駆細胞の脱分極を誘導し、異所性顆粒細胞の増加をもたらすことが部分的に解明されていることを併せて考えると、麻酔薬はGABA作動性介在神経細胞を介したGABAシグナリングを修飾することでその神経毒性をもたらしている可能性がある。

麻酔薬の神経毒性の機序を解明してその副作用を減ずる手段を模索する研究は、基礎医学の発展に寄与するだけでなく、臨床的にも重要な意味を持つ研究であると考えられる。これらの推論の根拠を示すため、GABA作動性介在神経細胞に対する直接的な研究を引き続き行う予定である。