



Erythropoietin attenuates isoflurane-induced neurodegeneration and learning deficits in the developing mouse brain.

土本, 鉄平

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5382

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005382>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Erythropoietin attenuates isoflurane-induced neurodegeneration and learning deficits in the developing mouse brain.

エリスロポエチンは発達期マウスの脳における
イソフルランによる神経変性及び記憶学習障害を軽減する。

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

麻酔科学

(指導教員：前川 信博教授)

土本 鉄平

<背景>

今日、多くの新生児を含む小児に全身麻酔が施行されている。2003 年に Jevtovic-Todorovic らによって、生後7日のマウスに、イソフルラン、笑気、ミダゾラムのカクテルを投与することにより新生児マウスに脳の神経障害および成長後の記憶学習障害が惹起されることが報告された。その後、多くの研究者によって、イソフルランを中心とする吸入麻酔薬の単独投与によっても、新生児期マウスの脳の神経変性や記憶学習障害が引き起こされることが報告されてきた。これらの結果を受けて、ヒトでも新生児期の全身麻酔暴露によって、同様のことが起こることを懸念する意見も少なくない。しかしながら、新生児期における全身麻酔暴露によって神経変性や記憶学習障害がヒトでも起こるということを裏付ける報告はなされていない。また、動物実験においても、全身麻酔薬による神経変性が起こるメカニズムに関して、確立されたものはない。

これらの障害を予防、治療する方法に関しては、あまり盛んには議論されて来なかった。一部の報告では、デクスメトミジンが有効であるとされている。一方、エリスロポエチン(EPO)は、新生児の貧血治療でも頻用されている。また、脳卒中治療にエリスロポエチンが有効であるとの報告や、動物実験で NMDA receptor antagonist である MK801 による脳の神経変性に対して、EPO が有効であるとの報告もなされている。

今回我々は、EPO がイソフルラン暴露によるマウスにおける脳の神経変性及

び記憶学習障害を軽減するかどうかを、ニッスル染色を用いた病理組織学的検討及び八方向放射状迷路を用いた行動実験により調べることにした。

<方法>

全ての動物実験は、動物実験委員会の承認を得たのちにその規約を遵守して行った。生後7日のマウス30匹を、各々10匹ずつの3群に無作為に分け実験を行った。一つ目のIE群のマウスは、50000IU/kgのrecombinant EPO(rEPO)を皮下注射した後、1.0%イソフルランに6時間暴露した。I群は、生理食塩水を皮下注射した後、IE群と同様イソフルランに暴露した。E群に関しては、50000IU/kgのrEPOを投与した後、6時間空気に暴露した。その後、日齢56日に八方向放射状迷路による行動実験を行った。八方向放射状迷路は、空間認知記憶機能の評価に有用であるとされている。直径22cmの円形のプラットフォームを中心に、幅6cm長さ25cmのアーム部分が8本放射状に出ている構造であり、餌はそれぞれのアームの先端に置かれ、中心部分のプラットフォームにいるマウスから餌はバーによって見えないようにされている。それぞれのマウスは、第1日目の試行の前日に、八方向迷路の先端にある餌を自由に食べ、迷路の構造、餌の置き場所などに慣れる訓練を受けた。第1日目からの実際の実験では、実験開始時にマウスは迷路の中心に置かれ、アームに入って先端にある餌を食べた場合を「成功」とし、餌のあるアームに入ってその餌を食べなかった場合、あるいは一度餌を食べたアームに再び誤って進入した場合を「誤選択」とした。実験開始後最初の8選択

における誤選択数を数え、4日間連続で実験を行った。2日目以降の誤選択数を、1日目の誤選択数で除したものをperformance ratio(誤選択率)とし、2日目、3日目、4日目のperformance ratioをIE、I及びE群に於いて確立した。八方向放射状迷路の後、各々のマウスは病理学的検査に供された。脳を取り出し、切片にしたのちニッスル染色を行い、海馬における神経細胞変性を中心に検討した。

<結果>

全てのマウスで明らかな体重減少や行動異常などは認めず、イソフルラン暴露中及び暴露後死亡したマウスも存在しなかった。また、暴露後の動脈血液ガス分析にて、低酸素血症、著明な高二酸化炭素血症はいずれも認めなかった。

八方向放射状迷路：第3日目の誤選択率(3日目の誤選択÷1日目の誤選択数)はIE群で 0.3 ± 0.2 ($p < 0.05$, vs. I)、I群で 0.8 ± 0.5 、E群で 0.6 ± 0.2 であり、第4日目の誤選択率はIE群で 0.3 ± 0.1 ($p < 0.05$, vs. I)、I群で 0.8 ± 0.5 、E群で 0.3 ± 0.2 ($p < 0.05$, vs. I)であった。誤選択率は回数を重ねることにより減少することも考慮すると、イソフルラン暴露による記憶学習障害(I群)を同様のイソフルラン暴露を受けたにもかかわらずrEPOが軽減したことが示唆された(IE群)。

病理：ニッスル染色にて、海馬の錐体細胞・顆粒細胞に於いては3群間とも正常範囲内の所見であった。一方歯状回門領域では、I群に於いて細胞の萎縮や核の濃縮など、神経細胞の変性が認められた。さらに歯状回門領域の狭小化も認めた。一方IE

群ではこのような神経細胞変性の所見は見られなかった。以上より、イソフルラン暴露に伴う、マウスの海馬歯状回門領域における神経細胞変性を、rEPO が防いだ可能性が示唆された。

<考察>

今回我々は、rEPO が新生児期マウスのイソフルラン暴露による脳の神経変性及び記憶学習障害を軽減するという事を初めて報告した。今回の実験では、生後 7 日のマウスを 1.0%イソフルランに 6 時間暴露したところ、日齢 56 日に成長した後、海馬の歯状回門領域に神経変性を認め、また八方向放射状迷路で記憶学習障害があることが明らかとなった(I 群)。一方、同様の麻酔に rEPO 50000IU/kg 投与した後に暴露したところ、病理組織学的異常は認められず、八方向迷路でも記憶学習障害は認めなかった(IE 群)。

今回の実験では、まず、臨床的濃度のイソフルラン単独の暴露でも、脳の神経細胞変性が起こることが明らかとなり、また記憶学習障害が起こることも明らかとなった。しかしながら、同様の麻酔薬暴露によっても、このような障害は起こらないとする報告もある。これらの違いを説明するにはさらなる実験が必要であるといえる。

EPO の受容体を欠損したマウスでは、脳に広範なアポトーシスが起ることの報告があり、EPO が脳の発達に重要な役割を果たしていることが示唆されている。今回、麻酔暴露前に rEPO を投与された IE 群では生理食塩水を投与された I 群に比べて、

明らかに目を追うごとの誤選択数の減少を認めた。このことから、神経変性や記憶学習障害を惹起しうるイソフルラン暴露に対して、rEPO が神経保護的に働くことがわかった。また、rEPO 50000IU/kg は非常に多い量であるが、少なくともマウスにいかなる害も与えていないこともわかった(IE 群)。いずれにしても、より少ない量で同じような rEPO の作用が得られるか否か、さらに検討する必要がある。

ニッスル染色で I 群に著明な神経細胞変性を認めた海馬の歯状回門領域は、学習や記憶に重要な役割を果たすことが知られており、このことは八方向迷路における行動実験との結果と矛盾しない。さらには、記憶学習障害の原因が海馬のこの部位における神経変性にある可能性も示唆された。

これらの結果はただちにヒトへ外挿できるものではない。そもそも、ヒトに於ける麻酔暴露時間とマウスに於けるそれは同等ではないとされ、実際に手術侵襲がある中での全身麻酔暴露と実験のそれとは大きく異なるという意見もある。さらに、新生児期に全身麻酔を施行されるような児は、そもそも何らかの基礎疾患を抱えている訳であって、成長後の記憶学習障害などがあつたとしても、その原因が全身麻酔そのものなのか、帰するのか否かを正確に判断することは困難を極める。以上のような理由から、ヒトにおける新生児期の全身麻酔暴露の影響をマウスによる動物実験の結果と全く同様に考えることは正しくないとと言える。しかしながら、少なくともヒトにおいてどの程度の全身麻酔薬を新生児期に暴露することが、マウスと同様の結果を招きうるのか、さらに研

究を重ねる必要がある。

我々は 1.0%イソフルランに 6 時間暴露した後生じる脳の神経変性および記憶学習障害を rEPO により防ぎうることを、初めて発見し報告した。rEPO がこの種の神経変性や記憶学習障害の治療薬の一つになりうることも示した。rEPO がなぜこのような作用を発揮するかは現時点ではわかっていない。さらなる研究を重ね rEPO が神経変性・記憶学習障害を軽減する機序を明らかにし、最終的には吸入麻酔薬による障害の発生机序を明らかにする必要がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2213号	氏 名	土本 鉄平
論文題目 Title of Dissertation	Erythropoietin attenuates isoflurane-induced neurodegeneration and learning deficits in the developing mouse brain. エリスロポエチンは発達期マウスの脳におけるイソフルランによる神経変性及び記憶学習障害を軽減する。		
審査委員 Examiner	主 査 甲村 英二 Chief Examiner 副 査 山口 秀人 Vice-examiner 副 査 寺島 俊雄 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

今日、多くの新生児を含む小児に全身麻酔が施行されている。2003年にJevtovic-Todorovicらによって、生後7日のマウスに、イソフルラン、笑気、ミダゾラムのカクテルを投与することにより新生児マウスに脳の神経障害および成長後の記憶学習障害が惹起されることが報告された。その後、多くの研究者によって、イソフルランを中心とする吸入麻酔薬の単独投与によっても、新生児期マウスの脳の神経変性や記憶学習障害が引き起こされることが報告されてきた。

エリスロポエチン(EPO)は、新生児の貧血治療でも頻用され、脳卒中治療にエリスロポエチンが有効であるとの報告や、動物実験で NMDA receptor antagonist である MK801 による脳の神経変性に対して、EPO が有効であるとの報告もなされ神経保護効果が期待される。

そこで、EPO がイソフルラン暴露によるマウスにおける脳の神経変性及び記憶学習障害を軽減するか否かを、ニッスル染色を用いた病理組織学的検討及び八方向放射状迷路を用いた行動実験により調べることにした。

全ての動物実験は、動物実験委員会の承認を得たのちにその規約を遵守して行った。生後7日のマウス30匹を、各々10匹ずつの3群に無作為に分け実験を行った。IE群のマウスは、50000IU/kgの recombinant EPO (rEPO) を皮下注射した後、1.0%イソフルランに6時間暴露した。I群は、生理食塩水を皮下注射した後、IE群と同様イソフルランに暴露した。E群に関しては、50000IU/kgの rEPO を投与した後、6時間空気に暴露した。その後、日齢56日に八方向放射状迷路による行動実験を行った。それぞれのマウスは、第1日目の試行の前日に、八方向迷路の先端にある餌を自由に食べ、迷路の構造、餌の置き場所などに慣れる訓練を受けた。第1日目からの実験では、実験開始時にマウスは迷路の中心に置かれ、アームに入って先端にある餌を食べた場合を「成功」とし、餌のあるアームに入ってその餌を食べなかった場合、あるいは一度餌を食べたアームに再び戻って進入した場合を「誤選択」とした。実験開始後最初の8選択における誤選択数を数え、4日間連続で実験を行った。2日目以降の誤選択数を、1日目の誤選択数で除いたものを performance ratio (誤選択率) とし、2日目、3日目、4日目の performance ratio を IE、I 及び E 群に於いて確立した。その後、マウスは病理学的検査に供された。脳を取り出し、切片にしたのちニッスル染色を行い、海馬における神経細胞変性を中心に検討した。

全てのマウスで明らかな体重減少や行動異常などは認めず、イソフルラン暴露中及び暴露後死亡したマウスも存在しなかった。また、暴露後の動脈血液ガス分析にて、低酸素血症、著明な高二氧化碳素血症はいずれも認めなかった。

第3日目の誤選択率(3日目の誤選択÷1日目の誤選択数)はIE群で 0.3 ± 0.2 ($p < 0.05$, vs. I)、I群で 0.8 ± 0.5 、E群で 0.6 ± 0.2 であり、第4日目の誤選択率はIE群で 0.3 ± 0.1 ($p < 0.05$, vs. I)、I群で 0.8 ± 0.5 、E群で 0.3 ± 0.2 ($p < 0.05$, vs. I) であった。誤選択率は回数を重ねることにより減少することも考慮すると、イソフルラン暴露による記憶学習障害(I群)を同様のイソフルラン暴露を受けたにもかかわらず rEPO が軽減したことが示唆された(IE群)。

・ニッスル染色にて、海馬の錐体細胞・顆粒細胞に於いては3群間とも正常範囲内の所見であった。一方歯状回門領域では、I群に於いて細胞の萎縮や核の濃縮など、神経細胞の変性が認められた。さらに歯状回門領域の狭小化も認めた。一方IE群ではこのような神経細胞変性の所見は見られなかった。以上より、イソフルラン暴露に伴う、マウスの海馬歯状回門領域における神経細胞変性を、rEPOが防いだ可能性が示唆された。

今回の実験では、まず、臨床的濃度のイソフルラン単独の暴露でも、脳の神経細胞変性が起こることが明らかとなり、また記憶学習障害が起こることも明らかとなった。神経変性や記憶学習障害を惹起するイソフルラン暴露に対して、rEPOが神経保護的に働くことが示された。rEPOがなぜこのような作用を発揮するかは現時点では解明されたいない。さらなる研究を重ねrEPOが神経変性・記憶学習障害を軽減する機序を明らかにし、最終的には吸入麻酔薬による障害の発生機序を明らかにする必要がある。

本研究は、発達期におけるイソフルラン暴露について、その後に生じる脳の神経変性および記憶学習障害を動物実験により検証したものであるが、従来ほとんど行われなかったエリスロポエチンによる改善効果を実証し重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。