



Effects of sevoflurane exposure during late pregnancy on brain development of offspring mice

Suehara, Tomomi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6516号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006516>

※ 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

Effects of sevoflurane exposure during late pregnancy on brain development of offspring mice

妊娠後期マウスへのセボフルラン曝露が

仔の脳発達に及ぼす影響

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

麻酔科学

(指導教員： 溝渕 知司 教授)

末原 知美

<緒言>

これまでに世界中で多くの小児が手術室や集中治療室などにて麻酔を受けているが、その大部分は何も問題なく成長していると考えられている。しかし 20 世紀末になると、幼若期に麻酔薬に曝露されるとその後の脳神経発達に影響を受けるのではないかと、ということが危惧され始めた。現在では動物モデルにおいて、幼若期の麻酔薬曝露が神経変性や神経アポトーシス、あるいは行動面でも学習障害を引き起こすことが明らかにされている。麻酔薬の種類や濃度、曝露時期や曝露時間が、このような神経障害の程度に影響を及ぼす因子であることが示されているものの、詳細な機序については不明である。

最近の臨床研究においては、ヒトにおいても幼少期に麻酔薬に曝露されると、認知学習機能障害が生じる可能性が示唆されている。胎生期は急速に脳が発達する時期であることを考慮すると、不可避の手術を受けることになった妊婦が麻酔薬による胎児への影響を不安に感じることとは想像に難くない。セボフルランは最も普及している全身麻酔薬（揮発性吸入麻酔薬）の一つであるが、高濃度での使用が発達段階の脳や成長後の認知機能に影響を及ぼす可能性が示されている一方で、臨床使用相当の濃度による影響については未だ十分に検討されていない。今回我々は、妊娠後期マウスへの低濃度セボフルラン単独曝露が、その胎仔や出生した仔マウスの脳発達にどのような影響を及ぼすかを調査した。

<方法>

妊娠 17 日のマウスを無作為に 2 群に分け、1.5 %セボフルラン（50 %酸素下）を 6 時間曝露したマウス (n=9) の仔をセボフルラン群 (Sevo 群)、50 %酸素のみに 6 時間曝露したマウス (n=9) の仔を対照群 (Ctrl 群) とした。曝露終了 6 時間後、各群の親マウスから無作為に選んだ 2 匹に開腹操作を施して胎仔を取り出し、その胎仔の全脳を採取した（胎仔脳）。一方、残りの親マウスについては自然分娩を待ち、出生した仔を生後 8 週まで成長させた。成長後の仔マウスの一部から脳を採取して（成熟脳）生化学的および組織学的実験に使用し、残りの仔マウスは行動実験に用いた。

まず、セボフルランの脳神経系への影響を生化学的に評価するために、両群の胎児脳および成熟脳（海馬）について、アポトーシスに関与する caspase-3、代表的な神経栄養因子である脳由来神経栄養因子 (BDNF)、神経成長因子 (NGF) 及び LIM キナーゼ (LIMK-1) の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR で定量した。つまり、各サンプルから TRIzol®試薬を用いて全 RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作製した後、StepOnePlus®を用いたリアルタイム PCR 法で解析を行った。なお、 β -actin をハウスキーピング遺伝子として使用した。胎児脳および成熟海馬にける各遺伝子について、Ct (threshold cycle) 値を両群間で比較した。

次に、シナプス形成の指標となるシナプトフィジン (SYN) について、成熟脳の海馬領域で

のタンパク発現レベルを免疫組織染色法で評価し、ウェスタンブロット法で定量、両群を比較した。免疫組織染色では一次抗体として抗 SYP ウサギモノクローナル抗体を用い、ペルオキシダーゼ法で検出した。対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。ウェスタンブロット法では、サンプルのホモジネートを SDS-PAGE でタンパク分離し、PVDF 膜に転写後、一次抗体として抗マウス SYP ウサギ抗体を用いて反応させ、化学発光法にて検出、定量した。

最後に、空間認知記憶学習機能を評価するために、曝露マウスから出生し成長した両群の成熟雄マウス（8 週齢）を用いて 8 方向迷路学習実験を行った。8 方向迷路は中心部（プラットホーム）から放射状に 8 本のアームが伸びた構造となっており、それぞれのアームの先端に餌を置くことで、動物（マウス）が自由に移動し餌を獲得できるようにしたものである。餌のあるアームを正しく選べなかった（一度訪れたアームに再度侵入する、アームの途中で引き返すなど）ものを 1 エラー（不成功）とカウントする。最初の 8 選択について成功、不成功を記録する。この実験を 4 日間連続で施行し、各実験日のマウス体重の変化率、全ての餌を食べるまでの所要時間、移動速度を計測した。そして performance ratio of error（エラー率：各実験日のエラー数を実験初日のエラー数で除した値）を記憶学習機能として算出、両群を比較した。

<結果>

胎児脳、および成熟脳（海馬）のいずれにおいても、caspase-3、BDNF、NGF、LIMK-1 の各因子の mRNA 発現について、Ct 値は両群間に有意差を認めなかった。また、SYP タンパクの発現は免疫組織染色において、両群とも海馬領域を中心として神経突起に免疫活性を認めたが、ウェスタンブロット法による定量解析の結果、発現量は両群で同レベルであった。8 方向迷路学習では、各実験日の体重変化率、所要時間について両群間に有意差は認められなかったが、移動速度について、実験 4 日目に Sevo 群が Ctrl 群よりも有意に速度が大きい (7.34 ± 1.93 cm/sec vs. 4.72 ± 1.55 cm/sec, $P < 0.05$) という結果が得られた。記憶学習機能を示すエラー率については、いずれの実験日においても両群間に有意差を認めなかった。

<考察>

過去に我々は、生後 7 日目の幼若マウスを、セボフルランと同様に臨床使用されている揮発性吸入麻酔薬であるイソフルラン（1.0 %）に 6 時間曝露すると神経変性を引き起こすことを明らかにした。しかしながら、妊娠動物が臨床使用相当の濃度の揮発性吸入麻酔薬に曝露された場合、その影響が発達段階にある胎仔に及ぼされるか否かは未だ不明である。

今回は産科領域でも多用されているセボフルランについて、マウスを用いて胎仔への影響を調査したところ、アポトーシス、神経発生・発達や成長、シナプス形成に関与する各因子について、それぞれの発現の差は検出されなかった。すなわち、今回の我々が行った麻酔法ではこ

れらに影響を及ぼさないことが示唆された。一般に caspase-3 はアポトーシスのマーカーとされ、本研究の結果からセボフルラン曝露でも脳神経系の異常アポトーシスは生じないことが示唆されるが、caspase-3 を介さない神経脱落とそれに引き続いて生じる認知機能発達障害との関連が最近の研究で明らかにされており、今後検討が必要である。また、BDNF に関して、幼若脳（出生後のマウス）が麻酔薬（イソフルラン）に曝露されると BDNF 依存性の神経アポトーシスが生じるという報告があり、これは我々の結果と異なるが、麻酔薬の種類や濃度・曝露期間・胎盤通過性などの違いによる可能性が考えられる。SYP はシナプス形成の指標となるが、齶歯類ではシナプス形成期は生後から始まるとされているため、今回の条件では SYP タンパク発現に変化が認められなかった可能性がある。しかし、胎生期においてもシナプス形成がセボフルラン曝露による影響を受ける時期が存在することを示唆する報告がある。

一般に 8 方向迷路は空間認知記憶能を評価する実験であり、performance ratio of error（エラー率）が高く維持される（エラー率が改善しない）場合は「学習記憶能が障害されている」と解釈する。今回の結果は、セボフルランに曝露されたマウスの仔に短期記憶障害は生じなかったことを示している。ただ、実験 4 日目に、移動速度が Sevo 群で有意に大きいという結果が得られたことは、親マウスのセボフルラン曝露によりその仔の活動性が変化した可能性を示唆している。セボフルラン曝露と恐怖・無関心・多動などの感情異常や行動異常との関係を示した動物実験が報告されており、またヒトを対象にした後向き研究においても、2 歳以前に全身麻酔を反覆して受けた小児は、後に注意欠陥障害のリスクが上がることを示した研究がある。実験・研究の相違はあるものの、胎生期を含む幼若期に麻酔薬に曝露されるとその後の感情・行動に関する脳発達に何らかの影響を及ぼす可能性は否定できない。

今回の実験はいくつかのリミテーションが存在する。第一に、麻酔中の妊娠マウスの酸素化状態や体温を持続的に計測していない、麻酔中に侵害刺激を加えていない、など臨床状況に完全に一致させた実験デザインではないことが挙げられる。麻酔薬曝露終了時の妊娠マウスの動脈血液ガス分析を施行しているが、結果に両群間で差は認められなかった。第二に、1.5 %セボフルランは臨床使用相当濃度としたが、臨床では通常これに加えて他の麻酔薬を併用する。今回は低濃度セボフルラン自体の胎仔脳の発達に及ぼす影響を評価するのが目的であった。第三に、限られた生化学パラメーターでもってセボフルランの影響を評価したことである。神経発達のアウトカムをより正確に評価するには、網羅的な研究が必要である。第四に、1 種類の学習記憶能を評価する行動実験しか施行しなかったことである。他の行動実験を併用した場合、社会感情異常も評価することができるかもしれない。

本研究によって、妊娠後期にあたる妊娠 17 日のマウスを臨床使用相当の濃度である 1.5 %セボフルランに 6 時間曝露しても、胎生期の発達段階にある仔マウスの脳神経系は影響を受けな

婦におけるセボフルラン使用の安全性を確認できるのではないか、と期待している。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2541号	氏 名	末原 知美
論文題目 Title of Dissertation	Effects of sevoflurane exposure during late pregnancy on brain development of offspring mice 妊娠後期マウスへのセボフルラン曝露が仔の脳発達に及ぼす影響		
審査委員 Examiner	主 査 飯島 一誠 Chief Examiner 副 査 古屋敷 智之 Vice-examiner 副 査 菅 良 一郎 Vice-examiner		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

近年、幼若期の麻酔薬曝露が神経変性や神経アポトーシス、あるいは行動面でも学習障害を引き起こすことが動物モデルにおいて明らかにされている。

現在、臨床で最も多く使用される全身麻酔薬のセボフルランは、高濃度での使用が発達段階の脳や成長後の認知機能に影響を及ぼす可能性が示されているが、臨床使用相当の濃度による影響については未だ十分に検討されていない。

そこで申請者は、妊娠後期マウスへの低濃度セボフルラン単独曝露が、その胎仔や出生した仔マウスの脳発達にどのような影響を及ぼすかを検討した。

方法は以下のとおりである。

妊娠17日のマウスを2群に分け、50%酸素下1.5%セボフルランを6時間曝露させたマウスの仔をセボフルラン群、50%酸素のみに曝露させたマウスの仔を対照群とした。曝露終了6時間後、各群から無作為に選んだ親マウスから胎仔を取り出し、その全脳を採取した（胎仔脳）。一方、残りの親マウスについては自然分娩により出生した仔を生後8週まで成長させた。成長後の仔マウスの一部から脳を採取し（成熟脳）生化学的及び組織学的実験に用いた。また、残りは行動実験に用いた。

検討項目として、両群の胎仔脳及び成熟脳の海馬について、アポトーシスに関与するcaspase-3、神経栄養因子である脳由来神経栄養因子(BDNF; Brain-derived Neurotrophic Factor)、神経成長因子(NGF; Nerve Growth Factor)及びLIMキナーゼ(LIMK-1; LIM Kinase-1)のmRNA発現レベルをリアルタイムRT-PCRで定量した。さらに、シナプス形成の指標であるシナプトフィジン(SYP)について、成熟脳の海馬領域での発現レベルを免疫組織染色法で評価するとともに、ウェスタンブロット法で定量し両群を比較した。

空間認知記憶学習機能を評価するため、両群の成熟雄マウス(8週齢)を用いて8方向迷路学習実験を行った。エラー率(各実験日のエラー数を実験初日のエラー数で除した値)を記憶学習機能として算出、両群を比較した。

申請者は、本研究において、胎児脳、成熟脳の海馬のいずれにおいても、caspase-3及び各神経栄養因子のmRNA発現について、両群間に有意差を認めなかった。SYPタンパクの発現は免疫組織染色及びウェスタンブロット法により両群で同レベルであった。8方向迷路学習では、各実験日のエラー率は両群間に有意差は認められなかった。

以上より、申請者は、「妊娠後期のマウスを臨床使用相当の濃度である 1.5%セボフルランに 6 時間曝露させても、胎生期の発達段階にある仔マウスの脳神経系は影響を受けないということが示唆された。今後、臨床により近づけた条件での研究を行うことで、ヒトの妊婦へのセボフルラン使用の安全性を確認できるのではないかと考える。」と結論した。

以上が本論文の要旨であるが、本研究は、妊娠後期マウスへの低濃度セボフルラン単独曝露が、その胎仔や出生した仔マウスの脳発達にどのような影響を及ぼすかを初めて検討し、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。