

題 目

発達期の脳に対する
麻酔薬暴露による神経アポトーシス
とその制御機構に関する研究

防衛医科大学校

産科婦人科学 専攻

吉永 洋輔

目 次

緒言	4 頁
----	-----

歴史および背景	5 頁
---------	-----

第1章	発達期の脳に対する全身麻酔薬投与に対する Bumetanide およびオキシトシンの神経保護作用の検討	
-----	---	--

第1節	目 的	14 頁
第2節	方 法	14 頁
第3節	結 果	19 頁
第4節	考 察	20 頁
第5節	結 論	21 頁

第2章	発達期の脳に対する全身麻酔薬投与が KCC2 および NKCC1 に与える影響の検討	
-----	--	--

第1節	目 的	22 頁
第2節	方 法	22 頁
第3節	結 果	27 頁
第4節	考 察	31 頁

第5節	結 論	33 頁
第3章 発達期の脳に対する全身麻酔薬投与が脳由来神経栄養因子に与える影響		
第1節	背 景	34 頁
第2節	目 的	35 頁
第3節	方 法	35 頁
第4節	結 果	37 頁
第5節	考 察	37 頁
第6節	結 論	38 頁
第4章	総括	39 頁
第5章	結語	40 頁
謝辞		41 頁
参考文献		43 頁
図表の解説		49 頁
図表		61 頁

緒言

麻酔薬は、神経系を抑制する最も強力な薬物の一つに分類されるが、脳機能への中長期的な影響については未解明な部分が多い。近年、発達期の脳に対する麻酔薬の使用が悪影響を与えることが動物実験で示されており、大きな問題点となっている。麻酔薬の作用が及ぼす詳細な分子メカニズムは未だ不明な部分が多く、その臨床使用における安全性の評価は不十分である。また、麻酔による中長期的な影響については、見逃されている部分も多く、評価及び検討の試みがなされているものの、不十分な状況である。現在のところ、動物における麻酔薬により影響を受ける時期が、ヒトにおいてどの時期に相当するのかということすら不明であり、動物実験の結果をそのままヒトに当てはめることは困難な状況である。仮にヒトの発達期である胎児期、小児期において使用される麻酔薬が神経発達に重篤な影響を及ぼすのであれば、今後の安全な産科や小児科領域における麻酔のためにも、そのメカニズムの解明が急がれる。そこで本研究は、発達期の脳に対し麻酔薬が与える影響のメカニズムを探ることを目的とした。本研究は防衛医科大学校動物実験倫理審査の承認(承認番号 13009)を得ている。

背景および歴史

1. げっ歯類での発達期における脳への麻酔薬の影響

げっ歯類における麻酔薬の神経発達に対する影響については、1980年代頃よりその可能性が示唆されていた。1999年に Ikonomidou ら(1)がラットの胎児および新生児期に N-methyl-D-aspartate (NMDA) 阻害薬やケタミンを投与すると脳の広範な部分でアポトーシスが起ることを報告した。全身麻酔に使用される薬剤は、NMDA レセプターの阻害の作用や γ -aminobutyric acid (GABA)レセプター作動の作用を持つが、2003年に Todorovic ら(2)がミダゾラム、亜酸化窒素、イソフルランの併用麻酔を生後7日目のラットに6時間暴露したところ、脳におけるアポトーシスが増加することを報告した。さらに長期的な影響を評価するため、成長後に水迷路テストを用いて空間記憶能力を行った。また、記憶や学習に重要な役割を持つといわれているシナプス可塑性を知るために、シナプスにおいて長期的にシグナル伝達効率が上昇する現象である長期増強(long-term potentiation: LTP)を、海馬スライスを用いて解析した。その結果、麻酔薬投与群は対照群に比べて、成長後の記憶障害と LTP の異常が確認された。現在の研究結果でほとんどの麻酔薬が発達期の神経に対してなんらかの毒性を持つことが判明している(1-7)。

発達期の脳では、まず始めに過剰なシナプスの形成が行われ、シナプスを形成しな

った神経細胞は抑制性神経による絞り込みが行われる。逆に生き残った神経細胞はシナプスが増加して、成熟した神経回路が形成される。シナプス形成の時期に抑制性や興奮性神経の働きがうまくいかないと神経回路の正常な形成が妨げられると考えられている。原因は不明であるが、発達期の神経は、麻酔薬に対し非常に感受性の高い時期があることが報告されており、げっ歯類においてはシナプス形成の時期とおおむね一致する。この時期を過ぎると神経におけるアポトーシスの増加が観察されないことも分かっている(8)。

吸入麻酔薬においても、臨床に使用する濃度で神経細胞にアポトーシスをもたらし、不可逆的な脳機能障害をもたらすことが示されている。ラット脳における正常の発達経過においては、アポトーシスの極大期は生後 5 日から 8 日の間にあるという報告(9)や、マウス脳においてカスパーゼ 3 は生後 1 日から 12 日にかけて多くみられ、その後減少するという報告(10)がある。現在動物を用いた研究で使用された薬剤はセボフルラン、イソフルラン、デスフルランであり、いずれも前述の通り発達期の脳において神経細胞のアポトーシスを起こすことが報告されている。特にセボフルランは吸入での導入が容易であるため、小児麻酔で多用されている。Satomoto ら(7)は、本研究と同様の手法で生後 6 日齢のマウスに 3%セボフルランを 6 時間暴露後、対照群と比較して脳におけるアポトーシスが増加していた。さらに成長後、恐怖条件付けテストを行ったところ、長期記憶に異常を認めた。また、これらのマウスには成長後、社会性行動の異常がみられた。現時点では少なく

とも麻酔薬による直接的な影響が、神経のアポトーシスの原因の一つであるという考えが主流となっているが、そのメカニズムについては未だ不明である。

2. げっ歯類以外での発達期における脳への麻酔薬の影響

Brambrink ら(11)は、生後 6 日齢のサルに吸入麻酔薬のイソフルランを 5 時間暴露し、脳組織を採取して解析したところ、アポトーシスの増加がみられ、さらに特定の大脳皮質部分に顕著に増加していることを報告した。Slikker ら(12)は小児麻酔によく使用されるケタミンをアカゲザルに、妊娠 122 日目(満期=165 日)の経母体投与、生後 5 日齢および生後 35 日齢の新生期に 24 時間持続静脈内投与した。その後脳組織の分析を行ったところ、妊娠 122 日目の胎児および生後 5 日齢では対照群に比べアポトーシスが増加していたが、生後 35 日例では対照群と差がなかった。アポトーシスの増加という即時的な影響は、発達期の霊長類においても確認された。さらに長期的な影響に関して、生後 5 日齢のサルに 24 時間ケタミン持続投与を行ったところ、成長後に認知障害などが起こることが同じチームの Paule ら(13)により報告された。

Gentry ら(14)は、*Caenorhabditis elegans* に対し、イソフルラン又はセボフルランを 4 時間投与した。その結果、孵化後早い発生移行段階で麻酔薬の投与を受けると、成虫における誘因行動に異常をきたしたが、より遅い発生移行段階では異常は観察されなか

った。発達期における神経の麻酔薬に対する脆弱性が、線虫のような原始的な生物にも存在していることは、原始生物から高等生物に至る生物の進化の過程においても共通のメカニズムとして保存されていることを示唆している。

3. ヒトの発達期における麻酔薬の影響

古くから小児麻酔による神経毒性の可能性は指摘されており、1945 年に Levy らが、当時使用されていたエーテル麻酔後の小児の行動異常を報告している。手術時の年齢が 2 歳以下では顕著な行動異常が見られたのに対し、8 歳以上ではそのような異常はほとんど観察されなかったというものであったが、当時はあまり大きな関心を集めなかった。ヒトでの前向き研究は、倫理的な問題や手術、薬物、投与量の違い、現疾患、環境因子などの理由で、当初は動物実験が主流であった。近年、動物研究での発達期の神経における麻酔薬の危険性が明らかにされたものの、動物実験の結果をどこまでヒトに適応が可能なのか、前述した線虫、げっ歯類、霊長類における発達期が、ヒトにとってのどの時期に当てはまるか、未だ明確に分かっていない。

近年、大規模な疫学的研究が企画されており、米国 FDA では、麻酔・鎮静薬の乳幼児における中枢神経系と認知力の発達に与える影響を検討するプロジェクト

SAFEKIDS(The Safety of Key Inhaled and Intravenous Drugs in Pediatrics)を2009 年からスタートさせた。その後、SmartTots(Strategies for Mitigating Anesthetic-Related neuroToxicity in Tots)に2010 年より名称が変更となった今もプロジェクトは継続中である。2012 年12 月の報告では、幼若動物あるいは乳幼児に対する麻酔薬の影響が直接的なものか、あるいは現疾患や手術操作など他の要因によるものかについての結論は出ていない。その他の大規模研究として Sun ら(15)は約23 万人を対象とした研究を行い、3 歳以下に手術の適応を受けた小児は学習障害のリスクが高まると報告している。Wilder ら(16)は5357 症例の小児を対象とした後ろ向き試験を行い、その結果4 歳までに2 回以上の麻酔を受けると学習障害が増加することや、Kalkman ら(17)は6 歳までに施行された泌尿器科手術314 症例のうち、2 歳までの施行症例はそれ以降の施行症例に比べて異常行動が増加することを報告した。DiMaggio ら(18)は3 歳以下でそ径ヘルニアの手術を全身麻酔で施行した383 名と麻酔を受けていない背景をマッチさせた対照群5050 名と比較したところ、麻酔を受けた群で発達障害や行動異常のリスクが上昇したと報告した。逆に、Hansen ら(19)はデンマーク国内において全身麻酔下で手術を施行した2457 名を対象に、15 歳時点での学習能力を対照群と比較したところ有意な差はなかったと報告している。発達障害や学習障害は、診断基準が神経学的に客観的な尺度とできない面があり、評価が困難である。また家庭・学習環境などの因子も結果に影響

響を及ぼすと考えられるため、双生児による研究も行われている。Bartels ら(20)はオランダの一卵性双生児 1143 組を対象として研究を行い、片方が 3 歳以下で麻酔による手術を受けた児の 12 歳時点での学習能力を解析したところ有意に学習障害が認められた。また麻酔を受けていない双生児間では 12 歳の時点で有意な学習障害は認められなかったと報告している。さらに双生児における研究として DiMaggio ら(21)は 10450 人の一卵性だけではない双生児において、3 歳以下で手術を受けた児は受けていない児に比べて、有意に成績の低下がみられたが、麻酔を受けていない双生児間での成績に有意差はなかった。産科における帝王切開での麻酔について Sprung ら(22)は帝王切開中に短時間の麻酔を受けた児の 5 歳における学習障害への影響を調べたところ、有意な差はなかったと報告している。このように大規模研究の結果にもかなりの差があり、現時点で発達期のヒトにおける麻酔薬の影響は確定的ではない。

Huttenlocher ら(23)はヒトにおける新生児から 90 歳の老人までの 21 名の剖検脳組織を調べたところ、シナプス密度は乳児期(生後 8~12 カ月)ですでにピークを迎え、15 歳までに 3 分の 1 程度にまで減少し、その後漸減することを報告している。注目すべき点は、脳の重量が増加する時期とシナプス形成が盛んな時期は必ずしも一致しないということである。また、アルコールを常用する妊婦から出生した児が、特徴的な顔貌、発育の遅れ、中枢神経障害を起こす胎児性アルコール症候群がある(24)。エタノールは NMDA

受容体および GABA 受容体の両方に作用を及ぼす。動物実験における神経病態や行動異常を見る限りアルコールと麻酔薬の神経発達に及ぼす影響はとてもよく似ている(25)。

4. 発達期の神経細胞における細胞内クロライドイオン調節機構

発達期の神経細胞は細胞内クロライドイオン濃度が高く保たれている (Ben-Ari ら(26-28)。細胞内にクロライドイオンを汲み入れる Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1)が多く発現しており(29-31)、細胞内クロライドイオンをくみ出す K-Cl cotransporter (KCC2)の発現が少ない(32-34)ため、細胞内クロライドイオン濃度が高く維持されると考えられている。このため、GABA 受容体チャネルの開口により、クロライドイオンが細胞内から細胞外へ流出し、細胞膜は脱分極し、結果的に興奮性に作用する(32, 33)。神経細胞は発達に伴い NKCC1 の発現が減少し(29, 30, 35)、KCC2 の発現が増加するため(36, 37)、細胞内クロライドイオン濃度が低くなり、GABA 受容体チャネルの開口により、クロライドイオンが細胞外から細胞内へ流入する。すると、細胞膜は過分極となり、結果的に抑制性に作用すると考えられている(35, 38-40)。

5. 発達期の神経細胞における細胞内クロライドイオン濃度の変化の影響

オキシトシン(Oxytocin: OT)は 1984 年に Ivell ら(41)によりその構造が確定された。子宮収縮や射乳に関するホルモンとして古くから知られており、視床下部・下垂体後葉から発見され、その構造は 9 個のアミノ酸によるペプチドホルモンである。OT は神経機能にも影響を与えることが報告されており、Tyzio ら(42)は、胎仔および新生仔ラットの海馬スライスを用いて、電気生理学的な検討を行った。ラット仔の胎生 20 日から生後 1 日齢にかけての神経細胞に対し OT を投与することで、細胞内クロライドイオン濃度が変化し、depolarizing(脱分極)性から hyperpolarizing(過分極)性に変化した。OT 投与により起こる神経細胞の膜電位の低下(過分極)は、OT の受容体拮抗薬 Atosiban (ATO)にて拮抗され、さらに ATO による拮抗状態に対し NKCC1 の阻害薬である Bumetanide を添加すると、OT 投与状態と同じ過分極状態に戻ることを示した (Fig. 1)。

以上のことより第 1 章では、神経細胞におけるクロライドイオン濃度の変化が、発達期の神経に対する麻酔薬暴露によるアポトーシスの発生に関与しているであろうと仮説を立て、細胞内クロライドイオン濃度を変化させる Bumetanide と OT が、麻酔薬暴露による神経アポトーシスの軽減効果をもつかどうか検証した。また、第 2 章においては麻酔薬によって起こる神経アポトーシスが、神経細胞における細胞内クロライドイオン調節機構に麻酔薬が作用することで起こる変化が原因ではないかと考え、神経細胞における主要な細胞内クロライドイオン調節チャネルである NKCC1 および KCC2 の発現変化を調べることに

した。仮説に基づくシェーマを Fig.2 に示す。

第1章 発達期の脳における全身麻酔薬投与に対する Bumetanide およびオキシトシンの神経保護作用の検討

第1節 目的

Bumetanide および OT の、神経細胞におけるクロライドイオン濃度を低下させる働きが、セボフルラン暴露による神経アポトーシスに対しどのように作用するかを検証することを目的とした。

第2節 方法

1. 使用動物

本動物実験は、防衛医科大学校(Tokorozawa, Saitama, Japan) 動物実験施設における倫理審査において承認(承認番号 13009)を受けて実施した。本動物実験施設にて管理及び飼育をした C57BL/6 マウスを使用し、実験を行った。マウスは 12 時間の明暗サイクル(明サイクル:午前 7 時～午後 7 時) で、室温は $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、適切な給水および給

餌で管理された。

Bumetanide 投与実験での使用動物総数は 23 匹で内麻酔中に 3 匹が死亡した(死亡率 13%)。(対照群 n = 6, Bumetanide 投与セボフルラン非暴露群 n = 5, Bumetanide 非投与セボフルラン暴露群 n = 5, Bumetanide 投与セボフルラン暴露群 n = 4)

OT 投与実験での使用動物総数は 16 匹で、内 2 匹が麻酔中に死亡した(死亡率 12%)。(対照群 n = 7, セボフルラン暴露群 n = 7)

2. 薬剤

麻酔薬はセボフルラン(Maruishi Pharmaceutical Co, Osaka, Japan)を、投与薬剤はオキシトシン(Peptide institute Inc, Osaka, Japan)および Bumetanide (Wako pure chemical Industries, Osaka, Japan)を使用した。Bumetanide については Dimethyl Sulfoxide (以下 DMSO)に溶解した後生理食塩水で希釈し、セボフルラン暴露直前にマウス腹腔内に 0.5 $\mu\text{M}/\text{kg}$ 投与した。DMSO 最終濃度は 0.05%とした。OT については、生理食塩水で OT を 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に希釈調製し、ハミルトン社製のシリンジにて 4 μL をセボフルラン暴露直前に脳室内投与した。

3. 麻酔方法

C57BL/6 マウスを 6 日齢および 3 週齢で、温度と湿度を管理した麻酔チャンバーに入れてセボフルランに暴露した。セボフルラン濃度、暴露時間に関しては、以前の研究を参照した(6, 7)。同じ母親であるマウスでの検討を行った。麻酔はキャリアーガスの総流量が 2 L/min、酸素濃度は 30%に設定した。セボフルラン濃度および酸素濃度はガス分析装置(Capnomac Ultima, GE health care, Tokyo, Japan)で持続的に計測した。チャンバー内温度は $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に維持した。セボフルランに暴露する場合は、セボフルラン濃度を 3%に維持した酸素濃度 30%のチャンバーに 6 時間収容した。セボフルランを暴露しない場合は、酸素濃度 30%のチャンバーに 6 時間収容した。

4. サンプル調製

脳組織からサンプルを調製するため使用した Buffer の組成は、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% sodium dodecyl sulfate、protease inhibitor cocktail (Complete, Roche diagnosis, Penzberg, Germany)、phosphatase inhibitors (PhosSTOP, Roche diagnosis, Penzberg, Germany)で作成した。脳組織をマッシャーで Buffer に溶解させた後、遠心機にて 15000 r.p.m.、 4°C 、30 分間遠心し、上清のみを採取し、使用までは -80°C で保存した。蛋白量の定量を行うため、Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) を使用した。96 穴マイクロプレートに BCA コントロール、サンプルをそれぞれ

Buffer で希釈した後、Assay kit A,Bを混合し添加した。30 分、37 度でインキュベーションした後、Sunrise R マイクロプレートリーダー(Tecan Japan, Tokyo, Japan) にて、620 nm のフィルターを使用し、吸光度を測定した。測定後、Buffer にてサンプルを 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるように希釈、Sample Buffer Solution with Reducing Regant for SDS-PAGE (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を添加し、95°C、5 分間加熱処理後、氷冷した。作成検体の保存は-20°Cで行った。

5. ウェスタン・ブロッティング

SDS-PAGE 用に 8%ポリアクリルアミドゲルを NA-3000 (Nihon eido, Tokyo, Japan) 上で作成した。泳動および転写には Power Station 1000VC (ATTO, Tokyo, Japan) を使用した。泳動は電圧 100V で 2 時間行った。転写は PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Immobilon-P; Millipore , Bedford, MA, USA)を使用し、電圧 100 V で 4 時間行った。その後 5%スキムミルク添加 TBS-T (25 mM Tris(pH 7.5)、150 mM NaCl、1% Tween-20)にてブロッキングを室温で 30 分行った後、1 次抗体を加えた。

使用した1次抗体は、anti-cleaved PARP[anti-cleaved poly (adenosine diphosphate-ribose)polymerase]抗体(rabbit polyclonal; Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)を 1 : 4,000 にて 4°C ・ Over night で使用した。抗

PARP 抗体を使用した理由は、活性型カスパーゼと比較して分解しにくく、安定してアポトーシスを定量できる点で選択した(43)。anti-BDNF 抗体(rabbit polyclonal; Santa cruz biotechnology, Dallas, TX, USA)を 1 : 200 で 4°C ・ Overnight、抗 β -actin 抗体(mouse monoclonal; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)を 1 : 4,000 希釈で室温 1 時間、それぞれ反応させた。2 次抗体は anti-Rabbit IgG HRP-linked Antibody (Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)および anti-mouse IgG HRP-linked Antibody (Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)を使用していずれも室温で 1 時間反応させた。1 次抗体と 2 次抗体の間の洗浄は TBS-T を室温で使用し、15 分を 1 回に 5 分を 3 回、2 次抗体と化学発光剤の間の洗浄は 15 分を 1 回と 5 分を 4 回行った。化学発光剤は SuperSignal West Femto (Pierce, Rockford, IL, USA)を使用した。検出は LAS-3000 (Fuji Film Corporation, Tokyo, Japan) を使用し撮影を行った。

撮影されたバンドの濃度測定には Multi Gauge (Fuji Film Corporation, Tokyo, Japan) を使用した。内部対照には抗 β -actin 抗体を用いて、それぞれの抗体におけるバンドの濃度を抗 β -actin 抗体のバンドの濃度で除して算出した。

6. 統計解析

統計解析は Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc, La Jolla, CA,

USA)を使用した。2群における比較には、t検定を使用し、3群以上での比較を行う際は、one-way ANOVA 検定及び Newman-Keuls Multiple Comparison *post hoc test*を行った。薬剤投与の有無での検定では Two-way ANOVA 検定及び Bonferroni Multiple Comparison *post hoc test* を使用した。p < 0.05 を統計学的有意と判定した。

第3節 結果

1. Bumetanide 投与による開裂 PARP 発現量の変化

6日齢マウスに Bumetanide 0.5 μ M/kg 投与後、3%セボフルラン 6 時間暴露後の開裂 PARP、 β -actin の発現量をウエスタンブロット法で対照群と比較した結果を Fig.3 に示す。開裂 PARP の発現は Bumetanide 投与群において対照群に比べ有意に抑制されていた。Two-way ANOVA ではセボフルラン暴露の要因において、有意な主効果が認められた(F = 15.66, p = 0.001)。また、Bumetanide 投与の要因においても有意な主効果が認められた(F = 5.118, p = 0.037)。また、セボフルラン暴露と Bumetanide 投与の交互作用も認められた(F = 5.491, p = 0.032)。

2. オキシトシン脳室内投与と開裂 PARP 発現量の変化

6 日齢マウスに OT を脳室内投与した後、3%セボフルランに 6 時間暴露した。

脳組織を取り出し開裂 PARP、 β -actin の発現量をウェスタンブロット法で対照群と比較した結果を Fig.4 に示す。麻酔直前の OT 脳室内投与により開裂 PARP の発現量が対照群に比べて約半分程度にまで減少していた(t 検定 ; $t = 4.289$, $p = 0.005$)。

第4節 考察

Bumetanide は NKCC1 共輸送体の阻害薬であり、その投与により細胞内クロライドイオン濃度が低下し、アポトーシスが減少したと考えられる。Bumetanide 投与による NKCC1 の発現量に変化はなかったが、これは Bumetanide が NKCC1 の発現量を抑制したのではなく、機能を阻害することで作用していたと考えられる。OT に関しても、細胞内クロライドイオン濃度の低下によりアポトーシスの減少がもたらされたと考えられる。

Caoら(44)は、OTの長時間作用型アナログである Carbetocin をラットの脳室内に 1.5 μg 投与したのちセボフルランを投与したところ、てんかん様脳波および Caspase-3 発現の低下を認めたと報告している。今回の検討では通常型の OT により同様の結果が得られたが、Caoらの検討では、OTでは効果がなかったとされており、この理由としてマウスと

ラットの種別、投与量、麻酔時間の違いなどが原因として考えられる。

以上の結果は細胞内クロライドイオン濃度が麻酔薬によるアポトーシスの発生に強く関与している可能性を示唆する。

第5節 結論

発達期のマウスにセボフルランを暴露するとアポトーシスが起ころが、Bumetanide 腹腔内投与および OT 脳室内投与は、神経細胞における細胞内クロライドイオン濃度を低下させることでアポトーシスを軽減させる。

第2章 発達期の脳に対する全身麻酔薬投与が KCC2 および NKCC1 に与える影響の検討

第1節 目的

第 1 章において細胞内クロライドイオン濃度の変化が麻酔薬によるアポトーシスの発生に強く関与している可能性が示唆された。本章では、発達期におけるセボフルラン暴露が、細胞内クロライドイオン濃度の調節に重要な役割を果たしているチャンネルである KCC2 および NKCC1 に直接影響を与えている可能性を考え、その発現量の変化を調べることを目的とした。

第2節 方法

1. 使用動物

第 1 章参照。

6 日齢マウスにおけるセボフルラン暴露による KCC2 発現量の変化実験における総使用動物数は 11 匹で内 1 匹が麻酔中に死亡した(死亡率 9%)(対照群 n = 5, セボフルラン暴露群 n = 5)。

3 週齢マウスにおける麻酔薬暴露と KCC2 発現量の変化実験における総使用動物数は 14 匹で死亡はなかった。(対照群 n = 6, セボフルラン暴露群 n = 8)

6 日齢マウスにおける麻酔濃度の違いによる KCC2 の変化実験における総使用動物数は 28 匹で内 2 匹が麻酔中に死亡した(死亡率 7%)。(対照群 n = 8, 2%セボフルラン暴露群 n = 9, 3%セボフルラン暴露群 n = 9)

6 日齢マウスにおける麻酔時間の違いによる KCC2 の変化実験における総使用動物数は 32 匹で内 2 匹が麻酔中に死亡した(死亡率 6%)。(麻酔 2 時間：対照群 n = 5, セボフルラン暴露群 n = 5、麻酔 4 時間：対照群 n = 5, セボフルラン暴露群 n = 5、麻酔 6 時間：対照群 n = 5, セボフルラン暴露群 n = 5)。

6 日齢マウスにおける麻酔後経過時間の違いによる KCC2 の変化実験における総使用動物数は 70 匹で内 5 匹が麻酔中に死亡した(死亡率 7%)。(麻酔後 1 日：対照群 n = 10, セボフルラン暴露群 n = 10、麻酔後 3 日：対照群 n = 11, セボフルラン暴露群 n = 11、麻酔後 7 日：対照群 n = 6, セボフルラン暴露群 n = 5、麻酔後 14 日：対照群 n = 6, セボフルラン暴露群 n = 6)

Bumetanide 投与後のセボフルラン暴露による KCC2 の変化実験での使用動物総数は 20 匹で内麻酔中に 1 匹が死亡した(死亡率 5%)。(対照群 n = 5, Bumetanide 投与セボフルラン非暴露群 n = 5, Bumetanide 非投与セボフルラン暴露群 n = 5, Bumetanide 投与セボフルラン暴露群 n = 4)

2. 薬剤

麻酔薬はセボフルラン(Maruishi Pharmaceutical Co, Osaka, Japan)を、投与薬剤は Bumetanide (Wako pure chemical Industries, Osaka, Japan)使用した。Bumetanide 腹腔内投与については DMSO に溶解した後生理食塩水で希釈し、0.5 $\mu\text{M}/\text{kg}$ で投与した。DMSO 最終濃度は 0.05%とした。

3. 麻酔方法

C57BL/6 マウスを 6 日齢に温度と湿度を管理した麻酔チャンバーに入れてセボフルランによる麻酔を行った。同じ母親である同腹マウスでの検討を行った。麻酔はキャリアガスの総流量が 2 L/min、酸素濃度は 30%に設定した。セボフルラン濃度および酸素濃度はガス分析装置(Capnomac Ultima, GE health care, Tokyo, Japan)で持続的に計測した。実験中にチャンバー内は $38 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持した。セボフルランに暴露する場合は、セボフルラン濃度を 2%もしくは 3%に維持した酸素濃度 30%のチャンバーに 6 時間収容した。セボフルランを暴露しない場合は、酸素濃度 30%のチャンバーに 6 時間収容した。

4. サンプル調製

第 1 章参照。

5. ウェスタン・ブロッティング

SDS-PAGE 用に 8%ポリアクリルアミドゲルを NA-3000 (Nihon eido, Tokyo, Japan) に作成し、それぞれのウェルに上記で作成したサンプルを 2~5 μ L ずつ加え、両端にはダミーサンプル、マーカーを加えた。泳動および転写には Power Station 1000VC (ATTO, Tokyo, Japan) を使用した。泳動は電圧 100 V で 2 時間行った。転写は PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA, USA) を使用し、電圧 100V で 4 時間行った。その後 5%スキムミルク添加 TBS-T (25 mM Tris(pH 7.5)、150 mM NaCl、1% Tween-20) にてブロッキングを室温で 30 分行った後、1 次抗体を加えた。

使用した1次抗体は、anti-cleaved poly (adenosine diphosphate-ribose)polymerase 抗体(PARP; rabbit polyclonal; Cell signaling technology, Beverly, MA,USA)を 1:4,000 にて 4°C ・ Over night、anti-KCC2 抗体(mouse monoclonal; Stress Marq, Victoria, Canada)を 1:2,000 で 4°C ・ Over night、anti-NKCC1 抗体(rabbit polyclonal; Merck Millipore, Billerica, MA, USA)を 1:1,000 で 4°C ・ Over night、抗 β -actin 抗体(mouse monoclonal; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)を 1:4,000 で室温 1 時間、それぞれ反

応させた。2 次抗体は anti-Rabbit IgG HRP-linked Antibody (Cell signaling technology, Beverly, MA, USA) および anti-mouse IgG HRP-linked Antibody (Cell signaling technology, Beverly, MA, USA) を使用していずれも室温で 1 時間反応させた。1 次抗体と 2 次抗体の間の洗浄は TBS-T を室温で使用し、15 分を 1 回に 5 分を 3 回、2 次抗体と化学発光剤の間の洗浄は 15 分を 1 回と 5 分を 4 回行った。化学発光剤は SuperSignal West Femto (Pierce, Rockford, IL, USA) を使用した。検出は LAS-3000 (Fuji Film Corporation, Tokyo, Japan) を使用し撮影を行った。

撮影されたバンドの濃度測定には Multi Gauge (Fuji Film Corporation, Tokyo, Japan) を使用した。内部対照には抗 β -actin 抗体を用いて、それぞれの抗体におけるバンドの濃度を抗 β -actin 抗体のバンドの濃度で除して算出した。

6. 統計解析

統計解析は Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc, La Jolla, CA, USA) を使用した。NKCC1 および KCC2 の 2 群における比較には、t 検定を使用し、対照群、2% および 3% セボフルラン暴露のように 3 群以上での比較を行う際は、One - way ANOVA 及び Newman - Keuls Multiple Comparison *post*

*hoc test*を行った。また Bumetanide 投与のように薬剤投与群におけるセボフルラン暴露群と非暴露群における比較には Two-way ANOVA 及び Bonferroni *post hoc test* を行った。p < 0.05 を統計学的有意と判定した。

第3節 結果

1. 6 日齢マウスにおけるセボフルラン暴露による KCC2 発現量の変化

6 日齢マウスに対し 3%セボフルランを 6 時間暴露後の脳における KCC2、NKCC1、開裂 PARP、 β -actin の発現量をウェスタンブロット法で対照群と比較した結果を Fig.5 に示す。セボフルラン暴露により KCC2 の発現量が有意に減少していた(t 検定 ; t = 3.036, p = 0.008)。NKCC1 発現量に有意差はなかった(t 検定 ; t = 0.159, p = 0.877)。開裂 PARP の発現量はセボフルラン暴露群で有意に増加していた。

2. 3 週齢マウスにおける麻酔薬暴露と KCC2 発現量の変化

神経発達期と考えられる 6 日齢マウスにおいて、セボフルラン暴露により KCC2 の発現低下、開裂 PARP の発現増加が起こることが判明した。そこで、より成熟した 3 週

齢マウスにおいて同じく 3%セボフルランを 6 時間暴露し、脳組織を取り出し KCC2、NKCC1、開裂 PARP、 β -actin の発現量をウェスタンブロット法で対照群と比較した結果を Fig.6 に示す。

3 週齢マウスは麻酔薬暴露による、KCC2 の発現量は対照群と比べて有意差を認めなかった(t 検定 ; $t = 0.853$, $p = 0.409$)。同様に NKCC1 の発現量は対照群と比べて有意差を認めなかった(t 検定 ; $t = 0.059$, $p = 0.954$)。セボフルラン暴露の有無にかかわらず、3 週齢マウスの脳には開裂 PARP の発現はほとんどなかった。マウスに対するセボフルラン暴露によるアポトーシスの出現は明らかに時期特異的であることが分かった。

3. セボフルラン麻酔濃度の違いによる KCC2 発現変化の検討

セボフルラン麻酔濃度を変えて投与し、KCC2 の発現に与える影響を検討した。6 日齢マウスにおいて対照群、2%および 3%セボフルラン 6 時間暴露群における KCC2、NKCC1、開裂 PARP、 β -actin の発現量をウェスタンブロット法で対照群と比較した結果を Fig.7 に示す。3%セボフルラン暴露群では、対照群と比べ KCC2 発現量の低下を認めた (One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison *post hoc test*, $F=4.597$, $p=0.021$)。NKCC1 発現量についての検討では、いずれも差を認めなかった (One-way ANOVA 及び Newman-Keuls Multiple Comparison *post hoc test*,

$F = 1.203$, $p = 0.349$)。有意差は検出されなかったが、開裂 PARP の発現量はセボフルラン濃度が上昇するにつれ増加傾向があった。

4. セボフルラン麻酔暴露中におけるマウス脳での KCC2 発現変化の検討

麻酔時間による KCC2 の発現量の違いを検討した。6 日齢マウスに対し 3%セボフルラン暴露 2 時間、4 時間、6 時間における、KCC2、NKCC1、開裂 PARP、 β -actin の発現量をウエスタンブロット法で対照群と比較した結果を Fig.8 に示す(麻酔開始 2 時間後、t 検定、 $t = 1.073$, $p = 0.304$; 麻酔開始 4 時間後、t 検定、 $t = 1.724$, $p = 0.113$; 麻酔開始 6 時間後、t 検定、 $t = 3.036$, $p = 0.008$)。3%セボフルラン暴露群 2 時間と 4 時間では対照群と比べて KCC2 の発現量に有意差はないものの、徐々に低下傾向を示した。NKCC1 の発現量についてはいずれも差を認めなかった(麻酔開始 2 時間後: t 検定、 $t = -0.25$, $p = 0.809$ 、麻酔開始 4 時間後、t 検定; $t = -0.916$, $p = 0.386$; 麻酔開始 6 時間後、t 検定、 $t = -0.953$, $p = 0.377$)。また有意差はなかったものの、麻酔時間が長くなるにつれ、開裂 PARP の発現量が増加する傾向があった。

5. セボフルラン麻酔暴露後におけるマウス脳での KCC2 発現変化の検討

6 日齢マウスにおける 3%セボフルラン 6 時間暴露群において、麻酔終了直後にお

ける KCC2 の発現量は、対照群と比べて平均約 3 割低下していることが判明した。この KCC2 発現量の低下が、どのくらいの期間持続するのかを検証するため、麻酔終了後、母親マウスの元に仔マウスを戻し、1 日目、3 日目、7 日目、14 日目のマウスで同様に検討を行った。

6 日齢マウスに対し 3%セボフルラン暴露終了後 1 日目、3 日目、7 日目、14 日目における、KCC2、NKCC1、開裂 PARP、 β -actin の発現量をウエスタンブロット法で対照群と比較した結果を Fig.9 に示す。KCC2 の発現量低下は、麻酔終了直後をピークとして、徐々に回復しながらも麻酔終了後 2 週間程度(P20)持続していることが判明した(麻酔後 1 日目、t 検定、 $t = 3.146$, $p = 0.005$;麻酔後 3 日目、t 検定、 $t = 3.688$, $p = 0.0012$;麻酔後 7 日目、t 検定、 $t = 3.511$, $p = 0.007$;麻酔後 14 日目、t 検定、 $t = 1.021$, $p = 0.331$)。NKCC1 の発現量は差が見られなかった(麻酔後 1 日目、t 検定、 $t = -1.241$, $p = 0.23$;麻酔後 3 日目、t 検定、 $t = 1.761$, $p = 0.09$;麻酔後 7 日目、t 検定、 $t = -0.618$, $p = 0.552$;麻酔後 14 日目、t 検定、 $t = 1.353$, $p = 0.206$)。開裂 PARP の発現量は、麻酔終了後 1 日でほとんど消失していることが判明した。

6. Bumetanide 投与後麻酔暴露によるマウス脳での KCC2 発現変化の検討

第 1 章で検討した Bumetanide 投与が KCC2 や NKCC1 の発現量に影響を与えるかを検討した。Bumetanide 0.5 μ M/kg 腹腔内投与直後、3%セボフルランに 6

時間暴露し、KCC2、NKCC1、開裂 PARP、 β -actin の発現量をウェスタン・ブロット法で対照群と比較した結果を Fig.10 に示す。KCC2 に関しては Two-way ANOVA 及び Bonferroni *post hoc test* でセボフルラン暴露の要因に関して有意な主効果が認められた ($F = 24.72$, $p = 0.0002$)。Bumetanide 投与の要因に関しては有意な主効果は認められなかった ($F = 0.2962$, $p = 0.5943$)。KCC2 発現量におけるセボフルラン暴露と Bumetanide 投与の交互作用は認められなかった ($F = 0.4449$, $p = 0.5149$)。NKCC1 の発現量におけるセボフルラン暴露の主効果では、Two-way ANOVA で差がみられなかった ($F = 0.0717$, $p = 0.7925$)。NKCC1 の発現量における Bumetanide 投与の主効果では、Two-way ANOVA で差がみられなかった ($F = 0.1426$, $p = 0.7110$)。NKCC1 発現量におけるセボフルラン暴露と Bumetanide 投与の交互作用では、差がみられなかった ($F = 0.6127$, $p = 0.446$)。

第4節 考察

今回の研究の大きな注目点は、麻酔薬暴露により発達期の脳における KCC2 が減少することが発見されたことである。それは麻酔薬の濃度および時間に依存して低下傾向を認め、2 週間程度持続する。成熟期の神経細胞においては、神経障害

(45-47)、運動ニューロンの軸索切断(48, 49)、代謝障害(50)、てんかん(51-53)、虚血(45)等特殊な条件下で神経細胞は発達期の神経のように脱分極や場合により興奮性に変化する。この変化は、KCC2 の発現低下がその原因と考えられている(45, 48, 49, 51-54)。KCC2 減少は、KCC2 のチロシン基の急速な脱リン酸化が起こり、その結果として KCC2 蛋白・mRNA の減少が起こり、KCC2 の発現が低下すると考えられている(47)。

成熟した神経が障害された際に KCC2 の低下が起こるが、この機序が何らかの形で神経回路の再編成や神経保護に関与していると考えられている(45, 47, 54, 55)。

しかしながら今回の 3 週齢マウスに対するセボフルラン暴露により KCC2 の発現は低下しなかった。麻酔薬による発達期神経における KCC2 の発現低下は、成熟期における神経再編の役割を持つ KCC2 低下とはメカニズムが異なる可能性がある。元々 KCC2 の発現が少ない発達期において、セボフルラン暴露によりさらに KCC2 発現が減少することが明らかになり、この現象が発達期の麻酔薬により引き起こされる悪影響の原因の一つである可能性が示唆された。この KCC2 発現量の変化は麻酔濃度が高くなるほど高い減少率を示し、麻酔時間に比例して発現が減少し、麻酔終了後徐々に回復しながら 2 週間程度持続することが確認された。またアポトーシスと KCC2 の低下はほぼ同じ時間軸（数時間単位）で起こっていることが分かった。このことは、アポトーシスの発生が麻酔薬の直接的影響だけではなく、

KCC2 の変化により起こっていることを示唆する。また、この KCC2 の減少が持続することは、神経回路形成、再構成などの時期に比較的長時間大きな影響を与えている可能性がある。Bumetanide 投与によって、KCC2 の発現量に Bumetanide は影響を与えていなかった。また、NKCC1 の機能抑制が KCC2 の発現に影響を与えてアポトーシスの変化が起きているわけではなかった。神経細胞における KCC2 と NKCC1 のバランスが細胞内クロライドイオンを変化させることにより、アポトーシスおよび成長後の障害が起きていると示唆される。この作用は発達期の神経に対する麻酔薬の及ぼす影響の一つであると考えられる。

第5節 結論

発達期のマウスに対するセボフルラン暴露により、KCC2 の発現が低下することが示された。KCC2 低下は非常に時期特異的であり、その程度はセボフルラン濃度と暴露時間に比例し、暴露後約 14 日間程度継続することも判明した。Bumetanide 投与により KCC2 および NKCC1 の発現量は変化しなかった。

第3章 発達期の脳における全身麻酔薬投与が脳由来神経栄養因子に与える影響の検討

第1節 背景

KCC2 の発現調節は、脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor:BDNF) とその受容体である TrkB(Tyrosin receptor kinase B)を介し、その下流の Shc/FRS-2(src homology 2 domain containing transforming protein/FGF receptor substrate 2)および PLC γ (phospholipase C γ)-cAMP にて行われている(55)。Shc/FRS-2 はTrkBの515チロシン残基に結合し、PLC γ はTrkBの816チロシン残基に結合するが、Rivera ら(55)は515チロシン残基をフェニルアラニンに変換したトランスジェニックマウスでは、KCC2 の低下は対照群とほぼ変わらず、816チロシン残基をフェニルアラニンに変換したトランスジェニックマウスでは逆に BDNF により KCC2 発現が増加することを報告した。一般的には BDNF は KCC2 の発現を低下させるが、発達期における BDNF は KCC2 の発現を増加させるという報告もある(56)。Head ら(57)は、イソフルラン暴露により、proBDNF を mBDNF (mature BDNF)に変換するプラスミンをプラスミノゲンより変化させる tPA (tissue – plasminogen activator)の放出が抑えられることでアポトーシスを起こすが、proBDNF のレセプターである p75を阻害することでアポトーシスを抑制出来たと報告している。また、Lu ら(58)は、全身麻酔薬暴露により大脳皮質では BDNF の増加、視

床では BDNF の減少がセリン/スレオニンキナーゼである Akt の活性低下を引き起こし、caspase-9 や caspase-3 活性の上昇の結果アポトーシスが起こると報告している。以上の報告から、BDNF は KCC2 と同様に全身麻酔薬によるアポトーシスメカニズムに密接に関係していると考えられる。第 2 章でセボフルラン暴露による KCC2 の低下がみられたが、セボフルランが BDNF に与える影響は未だ不明である。

第2節 目的

セボフルラン暴露が BDNF の発現に与える影響を調べる。

第3節 方法

1. 使用動物

第 1 章参照。

6 日齢マウスにおけるセボフルラン暴露による BDNF 発現量の変化実験における総使用動物数は 12 匹で麻酔中に 1 匹死亡した(死亡率 8 %)。(対照群 n = 6, セボフルラン暴露群 n = 5)

2. 薬剤

第 1 章参照。

3. 麻酔方法

第 1 章参照。

4. サンプル調製

第 1 章参照。

5. ウェスタン・ブロッティング

第 1 章参照。

anti-BDNF 抗体(rabbit polyclonal; Santa cruz biotechnology, Dallas, TX, USA)を 1 : 200 で 4℃・Over night で使用した。BDNF は pre-proBDNF として産生され、これが分子量 32 k-Da の proBDNF になり、またプラスミン等の酵素の影響を受けて分子量 14 k-Da の mature BDNF (mBDNF) となる。今回は mBDNF (以下 BDNF)の量を解析した。

6. 統計解析

第 1 章参照。

第4節 結果

6 日齢マウスに 3%セボフルランを 6 時間暴露後の BDNF、開裂 PARP、 β -actin の発現量をウエスタンブロット法で対照群と比較した結果を Fig.11 に示す。セボフルラン暴露群において BDNF の発現量の減少および開裂 PARP の発現量の有意な増加がみられた(t 検定 ; $t = 3.556$, $p = 0.006$)。

第5節 考察

セボフルラン暴露により、BDNF の低下がみられたことは今回が初めての報告となる。イソフルランと同様に tPA および p75 に関連してアポトーシスが起きているかどうかを今回は確認できなかった。KCC2 と BDNF は密接に関係しており、いずれも 6 時間において発現の低下がみられていることから、同じ時間軸での変化と考えられる。基本的には BDNF 発現が KCC2 発現の上流ではあるが、BDNF 発現の低下に引き続く KCC2 発現の低下がみられているのか、それぞれ単独の変化であるのかは今回の検討で

は評価できなかった。今後の検討課題としたい。また第 2 章で KCC2 に対して行った、麻酔濃度における BDNF 発現の違いや麻酔後経過時間における BDNF 発現の変化も今後検討すべきである。

第6節 結論

セボフルラン暴露により BDNF の発現が低下する。

第4章 総括

①発達期のマウスにセボフルランを暴露すると、アポトーシスが起こる。この作用に対し Bumetanide 投与により NKCC1 の働きを抑制する、もしくは OT を投与することにより、神経細胞の細胞内クロライドイオン濃度を低下させることによりアポトーシスの発生を抑制することができる。このことは、発達期の神経細胞内のクロライドイオン濃度が高いことが、アポトーシスと関連があることを示唆している。

②KCC2 は発達期の神経回路形成、再編成に非常に重要な役割を果たしている。セボフルラン暴露により時期特異的に起こる BDNF および KCC2 の発現低下が、発達期における麻酔薬の悪影響の原因の一つとなっている可能性がある。(Fig.12)

③今回、発達期の麻酔薬暴露により、脳神経における KCC2 および BDNF の低下が認められたが、この低下減少の詳細なメカニズムが判明し、その機序がアポトーシスや長期予後に関わりを持つのであれば、治療法開発の一助になるかもしれない。

結語

発達期の脳に対するセボフルラン暴露により神経細胞の細胞内クロライドイオン濃度が変化することが、神経細胞の性質に影響を与え、発達期の脳神経に悪影響を及ぼしている可能性がある。

謝 辞

論文の作成にあたり多大なる御指導を賜りました防衛医科大学校産科婦人科学教室教授、古谷健一先生に深謝致します。本論文を作成するにあたり、大変有用な御指導を頂きました防衛医科大学校麻酔科学教室教授、風間富栄先生に深謝致します。本研究遂行にあたり昼夜を問わず研究構想、基本的実験手技、結果の評価、論文作成に至るまで全般的な御指導を賜りました防衛医科大学校麻酔科講師、佐藤泰司先生に特に感謝申し上げます。

動物管理、実験物品管理その他全般の基本的実験手技について御指導頂きました防衛医科大学校産婦人科講師、牧村紀子先生に深謝いたします。切片作成から免疫染色まで基本技術を御指導頂きました防衛医科大学校産婦人科、鈴木亜矢子技官に深謝いたします。動物管理、検体作成についての手技について御指導頂きました、防衛医科大学校麻酔科実験助手、高宮希代子様に深謝いたします。論文作成、学内審査の準備等をお手伝いいただきました防衛医科大学校産婦人科、宮武敬子様に深謝いたします。実験動物管理をして頂きました防衛医科大学校動物実験施設長 福田孝一先生および動物実験施設の皆様に深謝いたします。本研究に際し、実験機器を使用させて頂いた共同利用研究棟の皆様に感謝いたします。今回の研究全般について御支持を頂きました防衛医科大学校産婦人科医局一同様、防衛医科大学校麻酔科医局一同様に深謝い

たします。また研究生生活を充実して送れるように全面的にサポートしてくれた家族に感謝しています。

参考文献

1. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. 1999 Jan 1;283(5398):70-4.
2. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci*. 2003 Feb 1;23(3):876-82.
3. Cattano D, Young C, Straiko MM, Olney JW. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth Analg*. 2008 Jun;106(6):1712-4.
4. Istaphanous GK, Howard J, Nan X, Hughes EA, McCann JC, McAuliffe JJ, et al. Comparison of the neuroapoptotic properties of equipotent anesthetic concentrations of desflurane, isoflurane, or sevoflurane in neonatal mice. *Anesthesiology*. 2011 Mar;114(3):578-87.
5. Johnson SA, Young C, Olney JW. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the developing brain of nonhypoglycemic mice. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2008 Jan;20(1):21-8.
6. Kodama M, Satoh Y, Otsubo Y, Araki Y, Yonamine R, Masui K, et al. Neonatal desflurane exposure induces more robust neuroapoptosis than do isoflurane and sevoflurane and impairs working memory. *Anesthesiology*. 2011 Nov;115(5):979-91.
7. Satomoto M, Satoh Y, Terui K, Miyao H, Takishima K, Ito M, et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology*. 2009 Mar;110(3):628-37.
8. Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience*. 2005;135(3):815-27.
9. Spreafico R, Frassoni C, Arcelli P, Selvaggio M, De Biasi S. In situ labeling of apoptotic cell death in the cerebral cortex and thalamus of rats during development. *J Comp Neurol*. 1995 Dec 11;363(2):281-95.
10. de Bilbao F, Guarín E, Nef P, Vallet P, Giannakopoulos P, Dubois-Dauphin M. Postnatal distribution of cyp32/caspase 3 mRNA in the mouse central nervous system: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 1999 Jul 5;409(3):339-57.

11. Brambrink AM, Evers AS, Avidan MS, Farber NB, Smith DJ, Zhang X, et al. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the neonatal rhesus macaque brain. *Anesthesiology*. 2010 Apr;112(4):834-41.
12. Slikker W, Jr., Zou X, Hotchkiss CE, Divine RL, Sadovova N, Twaddle NC, et al. Ketamine-induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey. *Toxicol Sci*. 2007 Jul;98(1):145-58.
13. Paule MG, Li M, Allen RR, Liu F, Zou X, Hotchkiss C, et al. Ketamine anesthesia during the first week of life can cause long-lasting cognitive deficits in rhesus monkeys. *Neurotoxicol Teratol*. 2011 Mar-Apr;33(2):220-30.
14. Gentry KR, Steele LM, Sedensky MM, Morgan PG. Early developmental exposure to volatile anesthetics causes behavioral defects in *Caenorhabditis elegans*. *Anesth Analg*. 2013 Jan;116(1):185-9.
15. Sun LS, Li G, Dimaggio C, Byrne M, Rauh V, Brooks-Gunn J, et al. Anesthesia and neurodevelopment in children: time for an answer? *Anesthesiology*. 2008 Nov;109(5):757-61.
16. Wilder RT, Flick RP, Sprung J, Katusic SK, Barbaresi WJ, Mickelson C, et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort. *Anesthesiology*. 2009 Apr;110(4):796-804.
17. Kalkman CJ, Peelen L, Moons KG, Veenhuizen M, Bruens M, Sinnema G, et al. Behavior and development in children and age at the time of first anesthetic exposure. *Anesthesiology*. 2009 Apr;110(4):805-12.
18. DiMaggio C, Sun LS, Kakavouli A, Byrne MW, Li G. A retrospective cohort study of the association of anesthesia and hernia repair surgery with behavioral and developmental disorders in young children. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2009 Oct;21(4):286-91.
19. Hansen TG, Pedersen JK, Henneberg SW, Pedersen DA, Murray JC, Morton NS, et al. Academic performance in adolescence after inguinal hernia repair in infancy: a nationwide cohort study. *Anesthesiology*. 2011 May;114(5):1076-85.
20. Bartels M, Althoff RR, Boomsma DI. Anesthesia and cognitive performance in children: no evidence for a causal relationship. *Twin Res Hum Genet*. 2009 Jun;12(3):246-53.
21. DiMaggio C, Sun LS, Li G. Early childhood exposure to anesthesia and risk of developmental and behavioral disorders in a sibling birth cohort. *Anesth Analg*. 2011 Nov;113(5):1143-51.
22. Sprung J, Flick RP, Wilder RT, Katusic SK, Pike TL, Dingli M, et al. Anesthesia for cesarean delivery and learning disabilities in a population-based

birth cohort. *Anesthesiology*. 2009 Aug;111(2):302-10.

23. Huttenlocher PR. Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain Res*. 1979 Mar 16;163(2):195-205.

24. Jones KL, Smith DW. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet*. 1973 Nov 3;302(7836):999-1001.

25. Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*. 2000 Feb 11;287(5455):1056-60.

26. Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Sep;3(9):728-39.

27. Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci*. 1996 Oct 15;16(20):6414-23.

28. Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci*. 2003 Apr;26(4):199-206.

29. Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet*. 1999 Jun;22(2):192-5.

30. Plotkin MD, Snyder EY, Hebert SC, Delpire E. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol*. 1997 Nov 20;33(6):781-95.

31. Sun D, Murali SG. Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in immature cortical neurons: A role in intracellular Cl⁻ regulation. *J Neurophysiol*. 1999 Apr;81(4):1939-48.

32. Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, Shimano Y, Hida H, Fujimoto I, et al. Changes in intracellular Ca²⁺ induced by GABAA receptor activation and reduction in Cl⁻ gradient in neonatal rat neocortex. *J Neurophysiol*. 1998 Jan;79(1):439-46.

33. Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*. 1999 Jan 21;397(6716):251-5.

34. Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzaki H, Ogawa T, et al. Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002 Nov 15;139(1):59-66.

35. Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol.* 2004 Jun 15;557(Pt 3):829-41.
36. Lu J, Karadsheh M, Delpire E. Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol.* 1999 Jun 15;39(4):558-68.
37. Ludwig A, Li H, Saarma M, Kaila K, Rivera C. Developmental up-regulation of KCC2 in the absence of GABAergic and glutamatergic transmission. *Eur J Neurosci.* 2003 Dec;18(12):3199-206.
38. Balakrishnan V, Becker M, Lohrke S, Nothwang HG, Guresir E, Friauf E. Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem. *J Neurosci.* 2003 May 15;23(10):4134-45.
39. DeFazio RA, Keros S, Quick MW, Hablitz JJ. Potassium-coupled chloride cotransport controls intracellular chloride in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2000 Nov 1;20(21):8069-76.
40. Jarolimek W, Lewen A, Misgeld U. A furosemide-sensitive K⁺-Cl⁻ cotransporter counteracts intracellular Cl⁻ accumulation and depletion in cultured rat midbrain neurons. *J Neurosci.* 1999 Jun 15;19(12):4695-704.
41. Ivell R, Richter D. Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Apr;81(7):2006-10.
42. Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hubner CA, Represa A, et al. Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science.* 2006 Dec 15;314(5806):1788-92.
43. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* 1994 Sep 22;371(6495):346-7.
44. Cao W, Pavlinec C, Gravenstein N, Seubert CN, Martynyuk AE. Roles of aldosterone and oxytocin in abnormalities caused by sevoflurane anesthesia in neonatal rats. *Anesthesiology.* 2012 Oct;117(4):791-800.
45. Jaenisch N, Witte OW, Frahm C. Downregulation of potassium chloride cotransporter KCC2 after transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2010 Mar;41(3):e151-9.
46. van den Pol AN, Obrietan K, Chen G. Excitatory actions of GABA after neuronal trauma. *J Neurosci.* 1996 Jul 1;16(13):4283-92.
47. Wake H, Watanabe M, Moorhouse AJ, Kanematsu T, Horibe S, Matsukawa

- N, et al. Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress result in functional downregulation. *J Neurosci*. 2007 Feb 14;27(7):1642-50.
48. Nabekura J, Ueno T, Okabe A, Furuta A, Iwaki T, Shimizu-Okabe C, et al. Reduction of KCC2 expression and GABAA receptor-mediated excitation after in vivo axonal injury. *J Neurosci*. 2002 Jun 1;22(11):4412-7.
49. Toyoda H, Ohno K, Yamada J, Ikeda M, Okabe A, Sato K, et al. Induction of NMDA and GABAA receptor-mediated Ca^{2+} oscillations with KCC2 mRNA downregulation in injured facial motoneurons. *J Neurophysiol*. 2003 Mar;89(3):1353-62.
50. Matsumoto N, Noda E, Nabekura J. Run down of GABAergic depolarization during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons. *Life Sci*. 2006 Aug 8;79(11):1021-6.
51. Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R, et al. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2007 Sep 12;27(37):9866-73.
52. Palma E, Amici M, Sobrero F, Spinelli G, Di Angelantonio S, Ragozzino D, et al. Anomalous levels of Cl^- transporters in the hippocampal subiculum from temporal lobe epilepsy patients make GABA excitatory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 30;103(22):8465-8.
53. Pathak HR, Weissinger F, Terunuma M, Carlson GC, Hsu FC, Moss SJ, et al. Disrupted dentate granule cell chloride regulation enhances synaptic excitability during development of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2007 Dec 19;27(51):14012-22.
54. Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, et al. Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med*. 2010 Mar;16(3):302-7.
55. Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipila S, et al. Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Neurosci*. 2004 May 12;24(19):4683-91.
56. Aguado F, Carmona MA, Pozas E, Aguilo A, Martinez-Guijarro FJ, Alcantara S, et al. BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K^+/Cl^- co-transporter KCC2. *Development*. 2003 Apr;130(7):1267-80.
57. Head BP, Patel HH, Niesman IR, Drummond JC, Roth DM, Patel PM. Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system. *Anesthesiology*. 2009

Apr;110(4):813-25.

58. Lu LX, Yon JH, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V. General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis*. 2006 Sep;11(9):1603-15.

Fig.1

発達過程における神経細胞の変化および Bumetanide と OT による神経細胞の変化

Fig.2

今回の検討における仮説

第 1 章においては薬剤投与による細胞内クロライドイオン濃度を変化させることで麻酔薬投与によるアポトーシスへの影響を検討した。

第 2 章においては細胞内クロライドイオン濃度を調節する主要なチャネルである NKCC1 および KCC2 の麻酔薬投与による発現変化を検討した。

第 3 章においては BDNF の発現変化を検討した。

Fig.3

Bumetanide 投与により、3%セボフルラン 6 時間暴露によって誘起されるアポトーシスの減少がみられる。(A) ウェスタンブロット法による解析の結果。抗開裂 PARP 抗体 を用いたウェスタンブロット法では、Bumetanide 投与セボフルラン暴露群はセボフルラン暴露群と比べて開裂 PARP の発現量が減少していた。Bumetanide 投与セボフルラン非暴露群と対照群では開裂 PARP の発現はほぼみられなかった。内部対照として β -actin を使用した。(B) Two-way ANOVA Bonferroni *post hoc test* による KCC2 発現量の定量 (対照群 $n = 6$, Bumetanide 投与セボフルラン非暴露群 $n = 5$, Bumetanide 非投与セボフルラン暴露群 $n = 5$, Bumetanide 投与セボフルラン暴露群 $n = 4$)。*は $p < 0.05$ を示す。####は対照群に対して $p < 0.001$ を示す。

Fig.4

6 日齢マウスに対し OT 脳室内投与後、3%セボフルラン 6 時間暴露によりアポトーシスの減少がみられる。(A)ウエスタンブロット法による解析の結果。抗開裂 PARP 抗体を用いたウエスタンブロット法では、OT 投与セボフルラン暴露群はセボフルラン暴露単独群と比べて開裂 PARP の発現量が減少していた。セボフルラン非暴露群においては OT 投与による開裂 PARP の変化はみられなかった。内部対照として β -actin を使用した。(B) PARP 発現量の定量 (t 検定 ; $t = 4.289$, $p = 0.005$ 、対照群 $n = 7$, セボフルラン暴露群 $n = 7$)。**は $p < 0.01$ を示す。

Fig.5

6 日齢マウスに対し、3%セボフルラン 6 時間暴露により KCC2 発現量の減少がみられる。(A) ウェスタンブロット法による解析の結果。抗 KCC2 抗体を用いたウェスタンブロット法では、セボフルラン暴露群は対照群と比べて KCC2 の発現量の減少が確認された。抗 NKCC1 抗体を用いたウェスタンブロット法では、セボフルラン暴露群は対照群と比べて NKCC1 の発現量に有意差を認めなかった。一方、抗開裂 PARP 抗体を用いたウェスタンブロット法では、セボフルラン暴露群は対照群と比べて開裂 PARP の発現量が増加していた。内部対照として β -actin を使用した。(B) KCC2 発現量の定量 (t 検定 ; $t = 3.036$, $p = 0.008$ 、対照群 $n = 5$, セボフルラン暴露群 $n = 5$)。NKCC1 発現量の定量 (t 検定 ; $t = 0.159$, $p = 0.877$ 、対照群 $n = 5$, セボフルラン暴露群 $n = 5$)。** は $p < 0.01$ を示す。

Fig.6

3 週齢マウスに対し、3%セボフルラン 6 時間暴露による KCC2 発現量に有意差はなかった。(A) ウェスタンブロット法による解析の結果。抗 KCC2 抗体を用いたウェスタンブロット法では、セボフルラン暴露群は対照群と比べて KCC2 の発現量に有意差はなかった。抗 NKCC1 抗体を用いたウェスタンブロット法では、セボフルラン暴露群は対照群と比べて NKCC1 の発現量に有意差を認めなかった。抗開裂 PARP 抗体を用いたウェスタンブロット法では、セボフルラン暴露群は対照群と同じく、開裂 PARP の発現がほとんどみられなかった。内部対照として β -actin を使用した。(B) KCC2 発現量の定量 (t 検定 ; $t = 0.853$, $p = 0.409$ 、対照群 $n = 6$, セボフルラン暴露群 $n = 8$)。NKCC1 発現量の定量 (t 検定 ; $t = 0.059$, $p = 0.954$ 、対照群 $n = 6$, セボフルラン暴露群 $n = 8$)。

Fig.7

6 日齢マウスに対し、2%および 3%セボフルランに 6 時間暴露したところ、セボフルラン濃度の上昇に伴い、PARP 発現量は増加し、KCC2 発現量は減少している。(A) ウェスタンブロット法による解析の結果。抗 KCC2 抗体を用いたウェスタンブロット法では、3%セボフルラン暴露群は対照群と比べて KCC2 の発現量が減少していた。2%セボフルラン暴露群は対照群と比べて KCC2 発現の低下傾向は認めたが、有意差はなかった。抗 NKCC1 抗体を用いたウェスタンブロット法では、いずれの群においても NKCC1 の発現量に有意差を認めなかった。抗開裂 PARP 抗体を用いたウェスタンブロット法では、麻酔濃度の上昇に伴い、開裂 PARP の発現量が上昇していた。内部対照として β -actin を使用した。(B) One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison *post hoc test* による KCC2 発現量の定量(対照群 $n = 8$, 2%セボフルラン暴露群 $n = 9$, 3%セボフルラン暴露群 $n = 9$, $F = 4.597$, $p = 0.021$)。(C) One-way ANOVA Newman-Keuls Multiple Comparison *post hoc test* による NKCC1 発現量の定量(対照群 $n = 4$, 2%セボフルラン暴露群 $n = 4$, 3%セボフルラン暴露群 $n = 3$, $F = 1.203$, $p = 0.349$)。*は $p < 0.05$ を示す。

Fig.8

6 日齢マウスに対し、3%セボフルランに暴露したところ、麻酔時間経過とともに PARP 発現量の増加と、KCC2 の発現量の減少がみられる。(A) ウェスタンブロット法による解析の結果。抗 KCC2 抗体を用いたウェスタンブロット法では、麻酔時間経過とともに KCC2 の発現量が減少し、麻酔暴露 6 時間で対照群に比べて有意差があった。抗 NKCC1 抗体を用いたウェスタンブロット法では、いずれの群においても NKCC1 の発現量に有意差を認めなかった。抗開裂 PARP 抗体を用いたウェスタンブロット法では、麻酔時間の経過に伴い、開裂 PARP の発現量が上昇する傾向がみられた。内部対照として β -actin を使用した。(B) 麻酔時間と KCC2 および NKCC1 発現量の定量。麻酔 2 時間における KCC2 発現量の定量 (t 検定; $t = 1.073$, $p = 0.304$ 、対照群 $n = 5$, セボフルラン暴露群 $n = 5$)。麻酔 4 時間における KCC2 発現量の定量 (t 検定; $t = 1.724$, $p = 0.113$ 、対照群 $n = 5$, セボフルラン暴露群 $n = 5$)。麻酔 6 時間における KCC2 発現量の定量 (t 検定; $t = 3.036$, $p = 0.008$ 、対照群 $n = 5$, セボフルラン暴露群 $n = 5$)。麻酔 2 時間における NKCC1 発現量の定量 (t 検定; $t = -0.25$, $p = 0.809$ 、対照群 $n = 5$, セボフルラン暴露群 $n = 5$)。麻酔 4 時間における NKCC1 発現量の定量 (t 検定; $t = -0.916$, $p = 0.386$ 、対照群 $n = 5$, セボフルラン暴露群 $n = 5$)。麻酔 6 時間における NKCC1 発現量の定量 (t 検定; $t = -0.953$, $p = 0.377$ 、対照群 $n = 5$, セボフルラン暴露群 $n = 5$)。**は $p < 0.01$ を示す。

Fig.9

6 日齢マウスに対し、3%セボフルランに 6 時間暴露後、時間経過とともに KCC2 の発現量が回復している。(A)ウエスタンブロット法による解析の結果。抗 KCC2 抗体を用いたウエスタンブロット法では、麻酔後時間経過とともに KCC2 の発現量が回復し、麻酔暴露から 14 日目に対照群と有意差のないレベルまで回復した。抗 NKCC1 抗体を用いたウエスタンブロット法では、いずれの群においても NKCC1 の発現量に有意差を認めなかった。抗開裂 PARP 抗体を用いたウエスタンブロット法では、セボフルラン暴露のすべての群で開裂 PARP の発現がほとんどなかった。内部対照として β -actin を使用した。(B) 麻酔後経過時間と KCC2 および NKCC1 発現量の比較。麻酔後 1 日における KCC2 発現量の定量 (t 検定 ; $t = 3.146$, $p = 0.005$ 、対照群 $n = 10$, セボフルラン暴露群 $n = 10$)。麻酔後 3 日における KCC2 発現量の定量 (t 検定 ; $t = 3.688$, $p = 0.0012$ 、対照群 $n = 11$, セボフルラン暴露群 $n = 11$)。麻酔後 7 日における KCC2 発現量の定量 (t 検定 ; $t = 3.511$, $p = 0.007$ 、対照群 $n = 6$, セボフルラン暴露群 $n = 5$)。麻酔後 14 日における KCC2 発現量の定量 (t 検定 ; $t = 1.021$, $p = 0.331$ 、対照群 $n = 6$, セボフルラン暴露群 $n = 6$)。麻酔後 1 日における NKCC1 発現量の定量 (t 検定 ; $t = -1.241$, $p = 0.23$ 、対照群 $n = 10$, セボフルラン暴露群 $n = 10$)。麻酔後 3 日における NKCC1 発現量の定量 (t 検定 ; $t = 1.761$, $p = 0.09$ 対照群、 $n = 11$, セボフルラン暴露群 $n = 11$)。麻酔後 7 日における NKCC1 発現量の定量 (t 検定 ; $t = -0.618$, $p = 0.552$ 、対照群 $n = 6$, セボフルラン暴露群 $n = 5$)。麻酔後 14 日における NKCC1 発現量の定量 (t 検定 ; $t = 1.353$, $p = 0.206$ 、対照群 $n = 6$, セボフルラン暴露群 $n = 6$)。**は $p < 0.01$ を示す。

Fig.10

6日齢マウスに対し、Bumetanide投与後3%セボフルランに6時間暴露したところ、KCC2の発現量はBumetanide投与に関係なく減少しており、NKCC1の発現量はBumetanide投与に関係なく差がなかった。(A) ウェスタンブロット法による解析の結果。抗KCC2抗体を用いたウェスタンブロット法では、Bumetanide投与の有無にかかわらずセボフルラン暴露によりKCC2の発現低下がみられたが、KCC2の発現量に有意差はなかった。抗NKCC1抗体を用いたウェスタンブロット法では、Bumetanide投与の有無にかかわらず、セボフルラン暴露群は対照群と比べてNKCC1の発現量に有意差を認めなかった。抗開裂PARP抗体を用いたウェスタンブロット法では、Bumetanide投与セボフルラン暴露群はセボフルラン暴露群と比べて開裂PARPの発現量が減少していた。Bumetanide投与セボフルラン非暴露群と対照群では開裂PARPの発現はほぼみられなかった。内部対照として β -actinを使用した。(B) Two-way ANOVA Bonferroni *post hoc test*によるPARP発現量の比較(対照群 $n = 5$, Bumetanide投与セボフルラン非暴露群 $n = 5$, Bumetanide非投与セボフルラン暴露群 $n = 5$, Bumetanide投与セボフルラン暴露群 $n = 4$)。####は対照群に対して $p < 0.001$ を示す。

Fig.11

6日齢マウスに対する3%セボフルラン6時間暴露により脳組織BDNFの減少がみられる。(A) ウェスタンブロット法による解析の結果。抗BDNF抗体を用いたウェスタンブロット法では、セボフルラン暴露群は対照群と比べてBDNFの発現量の減少が確認された。一方、抗開裂PARP抗体を用いたウェスタンブロット法では、セボフルラン暴露群において対照群と比べて開裂PARPの発現量が増加していた。内部対照として β -actinを使用した。(B)BDNF発現量の定量(t検定; $t = 3.556$, $p = 0.006$ 、対照群 $n = 6$, セボフルラン暴露群 $n = 5$)。**は $p < 0.01$ を示す。

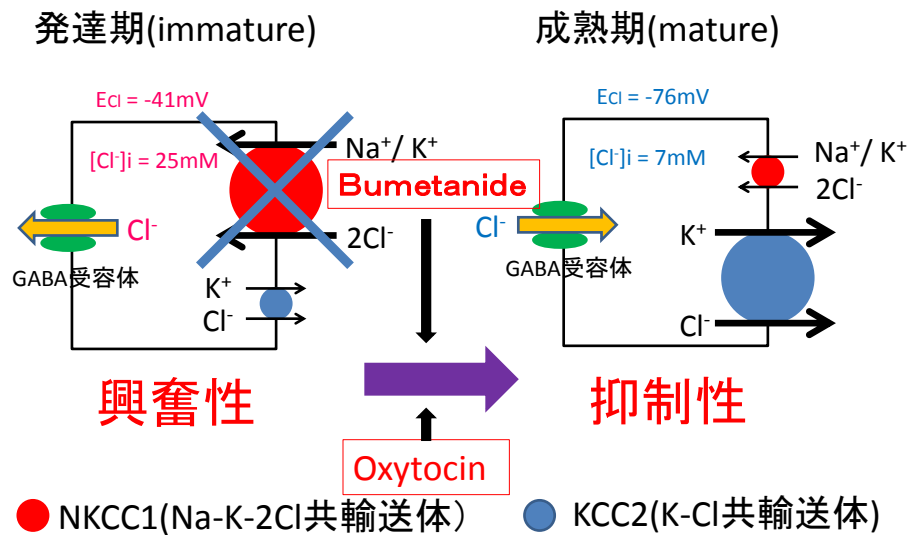
Cont: 対照群 Sevo: セボフルラン暴露群

Fig.12

発達期における麻酔薬暴露が脳神経に与える影響の機序の模式図

Fig.1

神経細胞の変化



Ben-Ari Y. Nat Rev Neurosci. 2002 Sep;3(9):728-39. を改変

Fig.2

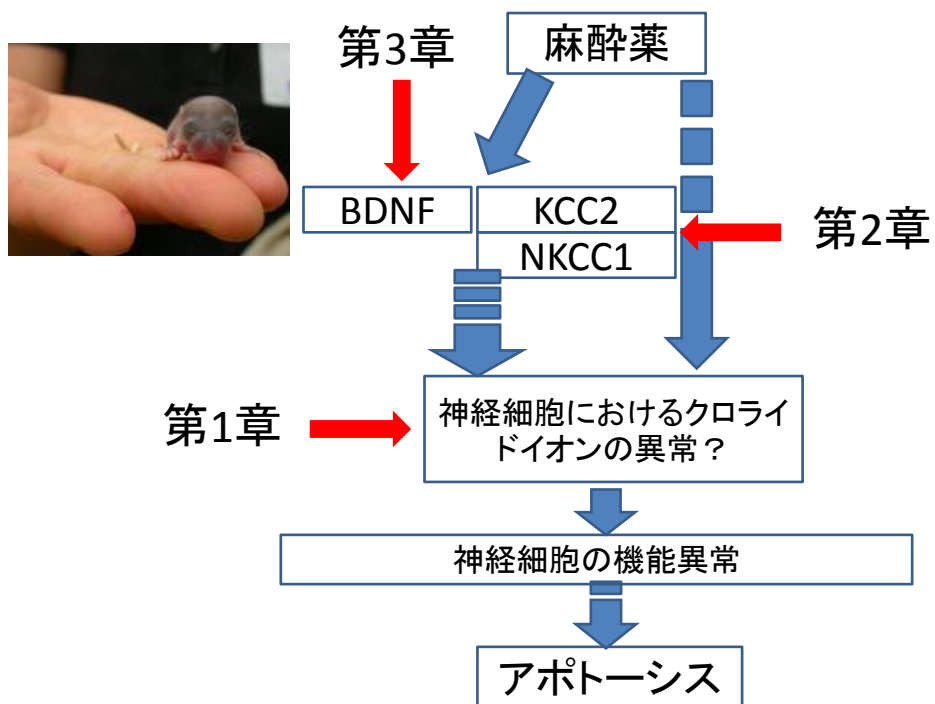


Fig.3

Bumetanide投与とPARPの変化

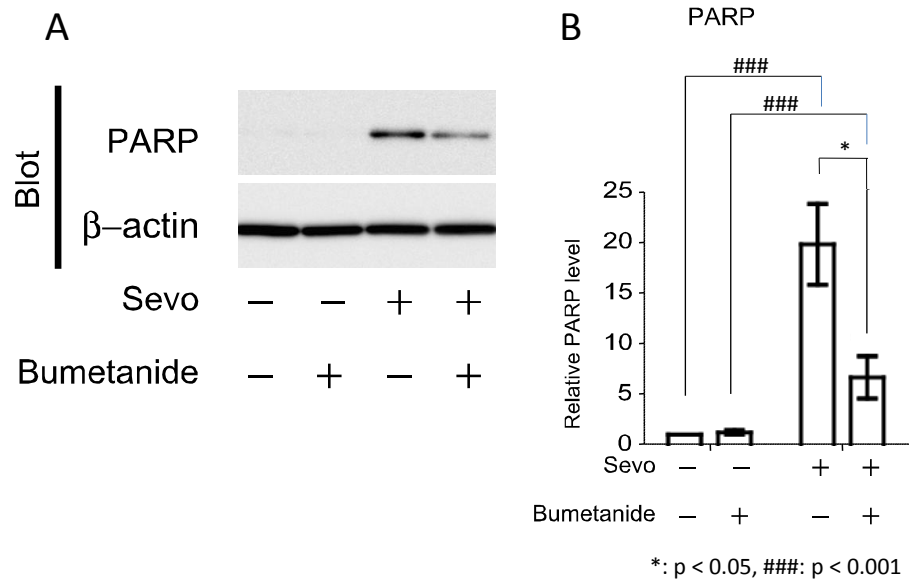


Fig.4

Oxytocin投与とPARPの変化

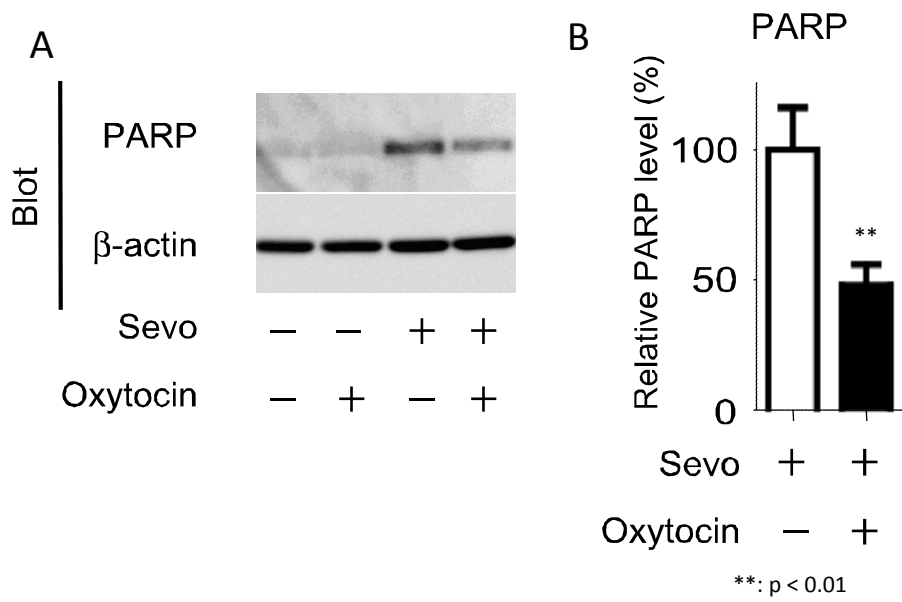


Fig.5

6日齡マウスにおけるKCC2変化

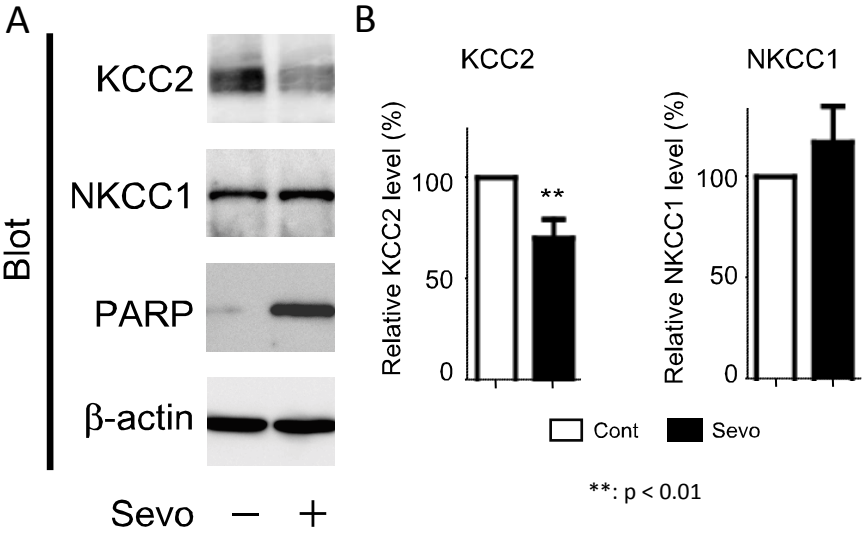


Fig.6

3週齢マウスにおけるKCC2変化

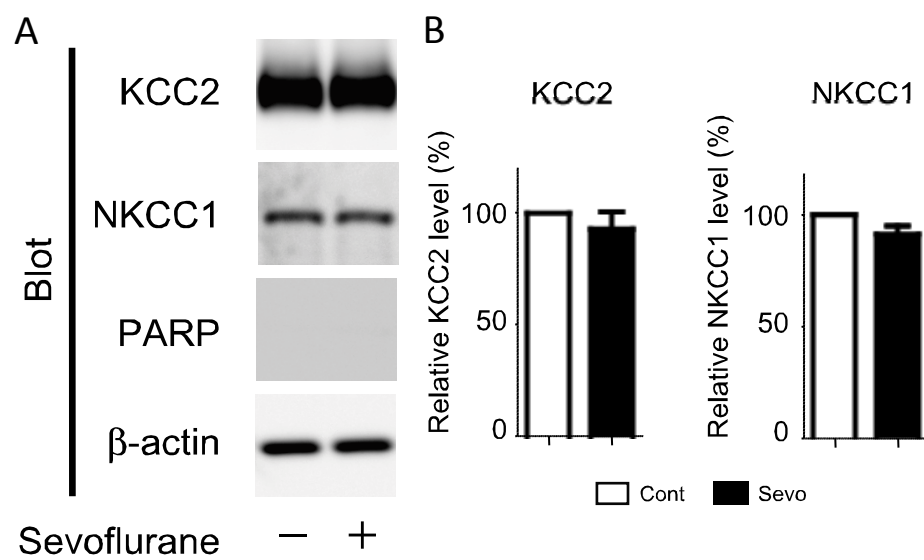


Fig.7

麻酔濃度とKCC2変化

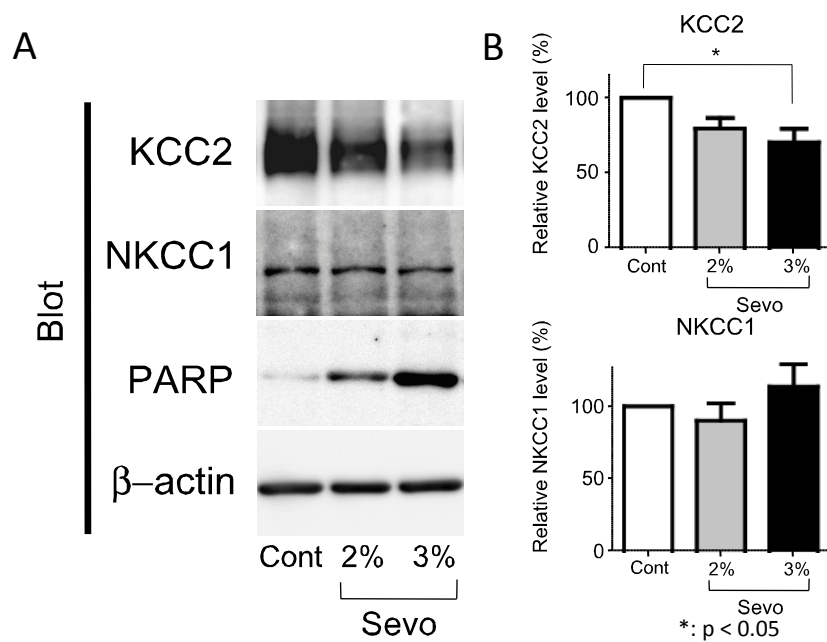


Fig.8

麻醉時間とKCC2変化

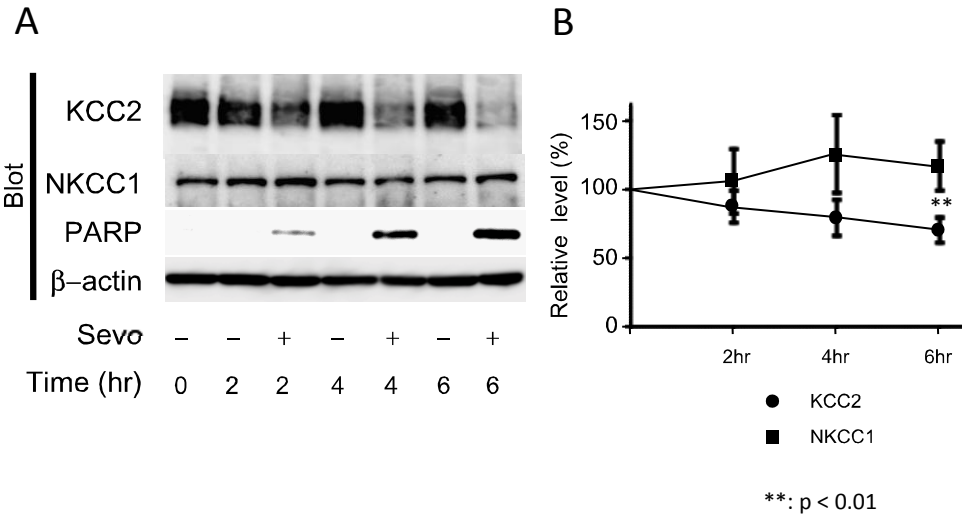


Fig.9

麻酔後のKCC2の変化

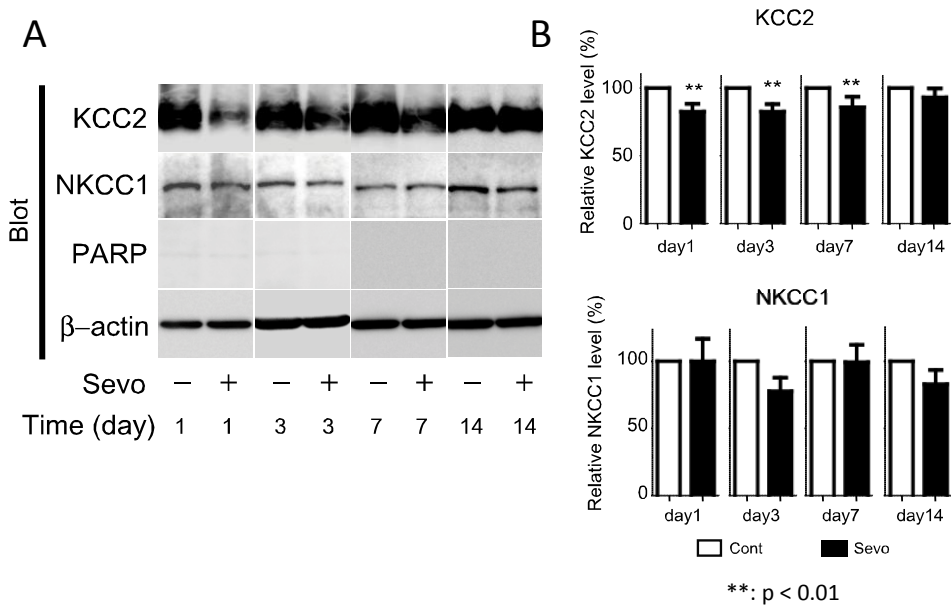


Fig.10

Bumetanide投与とKCC2変化

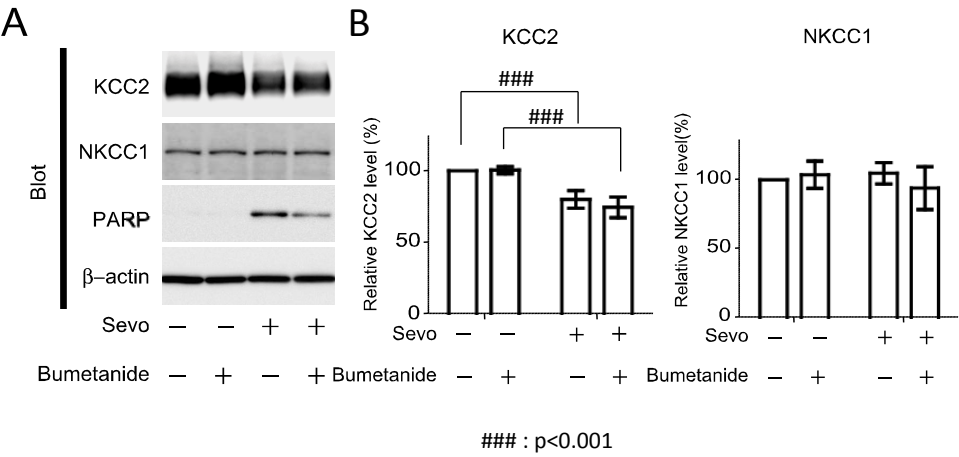


Fig.11

全身麻酔薬投与とBDNFの変化

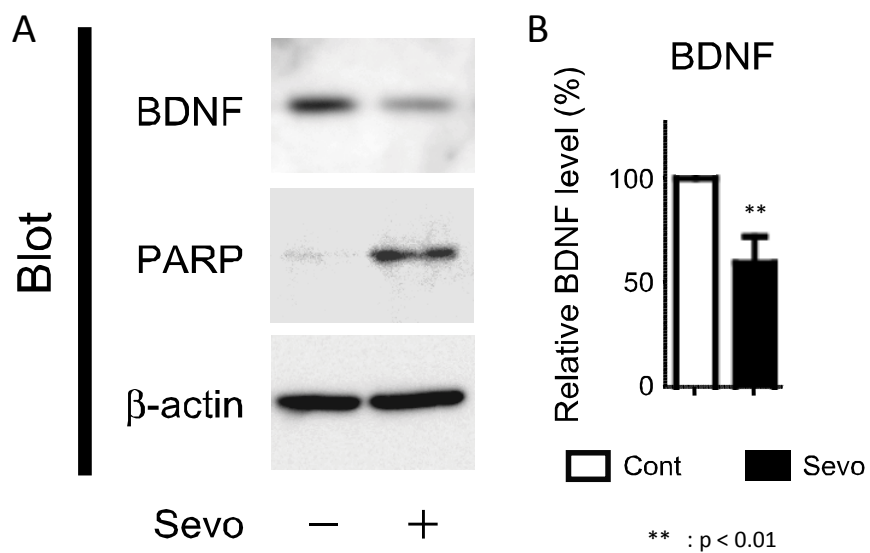


Fig.12

