

論文の内容の要旨

1 背景および目的

近年発達期の脳において全身麻酔薬が悪影響を与えることが動物実験で示され、そのメカニズムの解明が急務となっている。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。その機序は、未熟な神経細胞には細胞内にクロライドイオンを汲み入れる Na-K-2Cl 共輸送体 1 (Na-K-Cl cotransporter 1: NKCC1) の発現が高く、K-Cl 共輸送体 2 (K-Cl cotransporter 2: KCC2) の発現が低く、その働きにより細胞内クロライドイオン濃度が高くなり、神経細胞が興奮性に作用すると考えられている。発達に伴い NKCC1 が減少し、KCC2 が増加するため細胞内クロライドイオンが低下し、神経細胞の作用が抑制性に変化すると考えられている。また、発達期において NKCC1 の選択的阻害薬 Bumetanide およびオキシトシン (Oxytocin: OT) を投与すると神経細胞の細胞内クロライドイオン濃度が低下すること、KCC2 の発現調節は脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) が関与していることが報告されている。

この細胞内クロライドイオン濃度およびその調節機構が発達期に特異的な麻酔薬暴露によるアポトーシス発生に関連している仮説を立て、以下の 3 つの検討を行った。

(1) 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

Bumetanide および OT を投与することで起こる細胞内クロライドイオン濃度の低下が、麻酔薬暴露による脳組織のアポトーシスに与える影響を検討した。

(2) 発達期の脳における全身麻酔薬投与が KCC2 および NKCC1 に与える影響の検討

細胞内クロライドイオン濃度を調節している KCC2 および NKCC1 の発現量が、麻酔薬暴露により受ける影響を検討した。

(3) 発達期の脳における全身麻酔薬投与が BDNF に与える影響の検討

KCC2 の発現調節に関わる BDNF の発現量が、麻酔薬暴露により受ける影響を検討した。

2 方法

(1) 6 日齢マウスに Bumetanide (腹腔内投与) および OT (脳室内投与) した後、3% セボフルランに 6 時間暴露し、脳組織における開裂 PARP の発現量をウェスタンブロット法により定量し、各群のコントロールと比較した。

(2) 6 日齢および 3 週齢マウスを 3% セボフルランに 6 時間暴露し、脳組織における KCC2, NKCC1 および開裂 PARP の発現量をウェスタンブロット法により定量し、各群のコントロールと比較した。麻酔濃度との関係を調べるためにセボフルラン濃度を 2%, 3% に設定し同様に比較した。麻酔時間との関係を調べるために麻酔暴露 2 時間後、4 時間後、6 時間後に設定し同様に比較した。麻酔暴露後時間との関係を調べるため、麻酔暴露後 1 日、3 日、7 日、14 日についても同様に比較した。

(3) 6 日齢および 3 週齢マウスを 3% セボフルランに 6 時間暴露し、脳組織における BDNF

の発現量を比較した。

(4) 統計は **GraphPad Prism version 5.0** for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) を使用し, t 検定, one-way ANOVA および two-way ANOVA で解析した。

3 結 果

(1) 6 日齢マウスを 3%セボフルランに 6 時間暴露したところ, Bumetanide および OT 投与によりセボフルラン暴露で生じるアポトーシスが有意に減少した。

(2) 6 日齢マウスに対し 3%セボフルランを 6 時間暴露したところ開裂 PARP 発現の増加, KCC2 発現の有意な低下を認めた。同様の実験を 3 週齢マウスに対し行ったところ, 開裂 PARP 発現量の増加, KCC2 発現の低下は認められなかった。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, 開裂 PARP 発現量は増加し, KCC2 発現量は減少していた。日齢 6 マウスを 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開裂 PARP 発現量が有意に増加し, KCC2 の発現量が有意に減少していた。KCC2 発現の減少は麻酔後約 2 週間で回復した。いずれの実験でも NKCC1 発現量には差を認めなかった。

(3) 6 日齢マウスを 3%セボフルランに 6 時間暴露したところ, セボフルラン暴露群において BDNF の発現量の有意な低下がみられた。

4 考 察

発達期のマウスにセボフルランを暴露すると, アポトーシスが起る。Bumetanide 投与および OT 投与は, 細胞内クロライドイオン濃度を低下させる。この働きが, 麻酔薬暴露によるアポトーシスを軽減したと考えられる。

KCC2 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 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。

KCC2 の発現調節に関係する BDNF が, セボフルラン暴露により低下することが判明した。この BDNF 発現の低下が KCC2 の減少に関わっている可能性も考えられるが, 時間経過, 麻酔濃度などの条件を変えたさらなる検討が必要である。

5 結 論

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。