

発達期の脳とセボフルラン —最近の研究から—

防衛医科大学校麻酔学講座 講師
佐藤 泰司 先生

全身麻酔薬は、神経系を抑制する薬物としては、最も強力な薬物に分類される。しかしながら今日においても、脳機能への長期的な影響については、未解明な部分が多い。近年、発達期の脳に対して全身麻酔薬が悪影響を及ぼす可能性が動物実験によって示され、議論が活発になっている。今回は、発達期の脳に対する全身麻酔薬の影響に関する最近の知見を紹介するとともに、吸入麻酔薬の影響を軽減する方法に関する我々の最新の研究結果を紹介する。

2003年、Jevtovic-Todorovicら¹⁾は、麻酔薬(ミダゾラム、亜酸化窒素、イソフルラン)の単独投与群と、3剤併用群を設定し、7日齢ラットに対する6時間の麻酔の後、形態学的評価、行動学的評価ならびに電気生理学的評価を行い、発達期の脳に対する全身麻酔薬の影響を報告した。その後、げっ歯類、あるいはサルを用いた研究で、全身麻酔薬の発達期の脳に対する悪影響を示す報告が相次いだ。近年では分子メカニズムの解明や対処法の研究も盛んになりつつある。しかし、これらの実験結果がどの程度、ヒトに外挿できるのかが大きな議論となり、未だに決着がついていない。つまりヒトに関して、発達期脳に対する全身麻酔薬の悪影響の有無は、まだ確定していないといえる。米国食品医薬品局(FDA)は、2009年より「乳幼児への麻酔・鎮静薬の長期的影響に関する多施設共同研究プロジェクト(The Safety of Key Inhaled and Intravenous Drugs in Pediatrics: SAFEKIDS)」という大型研究プロジェクトを進めている。当初、2011年に中間報告が予定されていたが、現時点ではまだ報告はなされていない。

幼若動物の発達期の脳に対する 吸入麻酔薬の影響 (マウス)

我々は、マウスを用いて、吸入麻酔薬の発達期の脳への影響を研究している。実際にどのような評価法を用い、どのような結果が得られたのかを簡単に紹介する^{2,3)}。

6日齢のC57BL/6マウスを用い、3%セボフルランに6時間曝露した後、以下の評価を行った。

形態学的評価：麻酔直後に脳を摘出し、抗カスパーゼ-3抗体を用いて免疫染色し、アポトーシスの程度とその分布を検討した。対照群と比較して、セボフルラン群では、アポトーシスが增加していることがわかった(図1)。

生化学的評価：摘出脳組織をホモジナイズし、アポトーシスマーカーである開裂PARP (cleaved poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase) をウエスタンブロット法により定量すると、セボフルラン群で顕著な開裂PARPの増加が認められた(図2)。

行動学的評価：まず、長期記憶能力を評価するための恐怖条件付け学習テスト(fear conditioning test)の結果を紹

図1 3%セボフルラン麻酔後の6日齢マウスの脳のカスパーゼ-3抗体による免疫染色²⁾
rs: retrosplenial, dhc: dorsal hippocampal commissure, cp: caudate/putamen

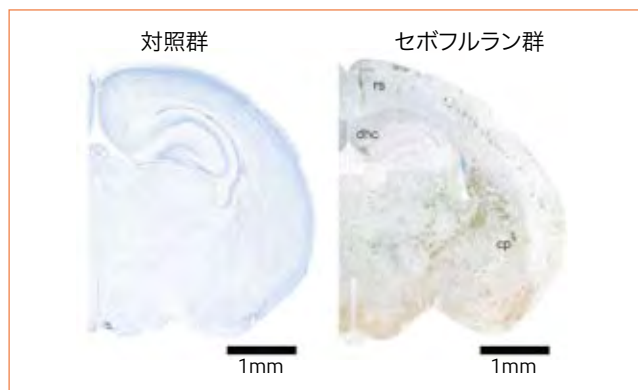
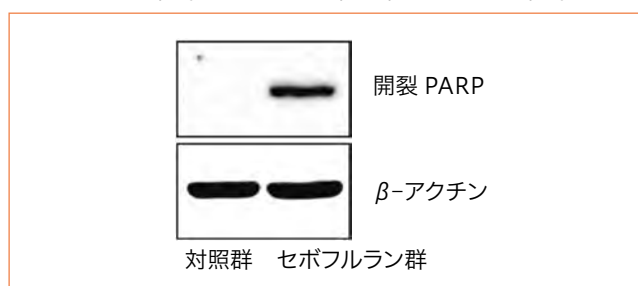


図2 ウエスタンブロット法によるアポトーシスの評価²⁾
6日齢マウスに3%セボフルランによる麻酔を行った後、脳を摘出し、抗開裂PARP抗体を用いたウエスタンブロット法にて定量。
PARP: poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase



介する。マウスを、透明ケージの中の電極の上に置き、スピーカーから音 (white noise) を聞かせ (音刺激)、同時に電気刺激を与える。48時間後に、音刺激のみを与えるとマウスの動きが止まるようになり (すくみ反応)、このすくみ反応が大きいほど長期記憶能力が高いと評価する。8週齢に成長したマウスに試験を行うと、セボフルラン群では、対照群に比べて有意にすくみ反応が小さく、長期記憶能力が劣っていた (図3)。

また、マウスは社会性行動をとることが知られており、その程度を社交性試験 (social interaction test) (図4) で評価することができる。スリットで仕切られているが、接触が可能な2つのケージを置き、一方のケージには生きたマウス、片方のケージにはぬいぐるみを入れる。すると、通常は生

図3 恐怖条件付け学習テストによる長期記憶の評価²⁾
6日齢マウスに麻酔し、8週齢に成長した後にテストを実施。

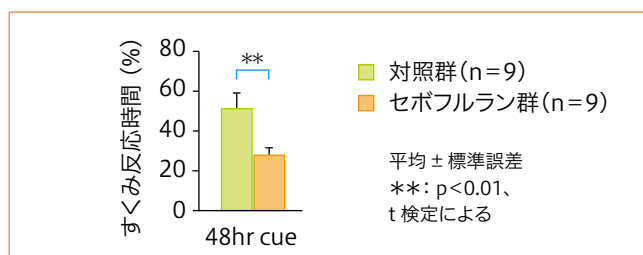
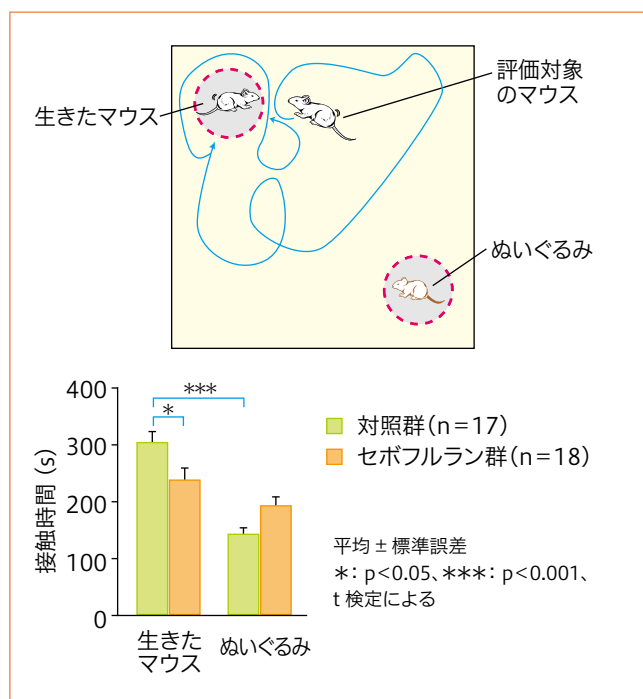


図4 社交性テストによる社会性行動の評価²⁾
6日齢マウスに麻酔し、15週齢に成長した後にテストを実施。マウスは通常、動きのないぬいぐるみよりも、生きたマウスと接触しようとする時間が長くなる。セボフルラン群マウスでは、対照群と異なり、生きたマウスとの接触時間とぬいぐるみとの接触時間との間に有意差がみられなかった。



きたマウスと長時間接触するが、セボフルラン群では生きたマウスとの接触時間とぬいぐるみとの接触時間の間で有意差は認められなかった。この結果は、セボフルラン群の社会性行動に異常があることを示している。

このような発達期の脳に対する麻酔の影響は、他の吸入麻酔薬にもみられる。我々は、3種の吸入麻酔薬 (8% デスフルラン、3% セボフルラン、2% イソフルラン) をそれぞれ用い、6日齢マウス (n=60) に6時間の全身麻酔を行い、発達期の脳に対する影響を検討した³⁾。3種の吸入麻酔薬とも、形態学的評価、生化学的評価 (図5) によりアポトーシスの増強が認められ、行動学的評価により、長期記憶の異常が認められた。また興味深いことに、発達期の脳に対する影響の評価全般において、3% セボフルランは他の吸入麻酔薬よりも、その影響が小さい傾向がみられた³⁾。

吸入麻酔薬とミトコンドリアの関係 (ラット)

Jevtovic-Todorovicらは最近、生後間もないラットへの麻酔が、シナプス前末端のミトコンドリア密度を著しく低下させるという結果を報告した (図6)⁴⁾。吸入麻酔薬とミトコ

図5 6日齢マウスにおける3種の吸入麻酔薬によるアポトーシスの誘発³⁾

6日齢マウスに麻酔 (8% デスフルラン、3% セボフルラン、2% イソフルラン) を行った後、脳を摘出し、抗開裂 PARP 抗体を用いたウエスタンブロット法にて定量。PARP : poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase

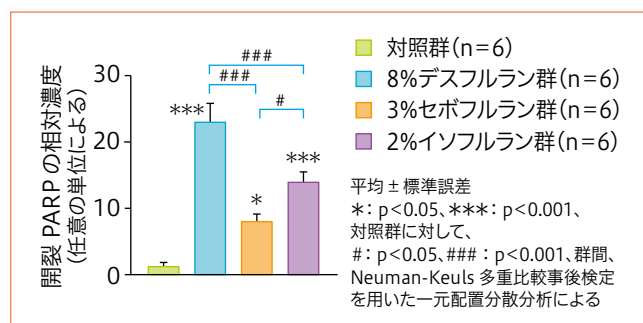
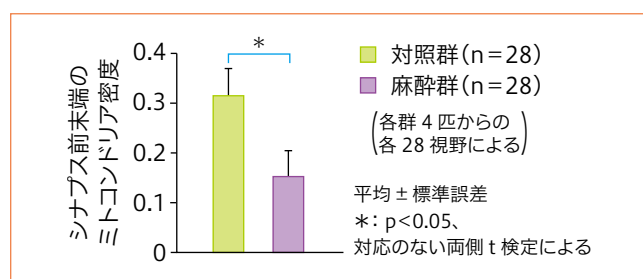


図6 シナプス前末端のミトコンドリア密度に及ぼす麻酔の影響⁴⁾
7日齢ラットに麻酔 (75% 亜酸化窒素、0.75% イソフルラン、24% 酸素) し、3週齢に成長した後に測定。



ンドリアの関係の詳細は不明であるが、①吸入麻酔薬がミトコンドリアに何らかの障害を与え、その結果、電子伝達系より電子が漏れて、ヒドロキシルラジカル(OH \cdot)が生成し、酸化ストレスが生じる、または、②吸入麻酔薬が何らかの酸化ストレスを与える結果、ミトコンドリアに障害が引き起こされる、の2つの可能性が示唆されている。

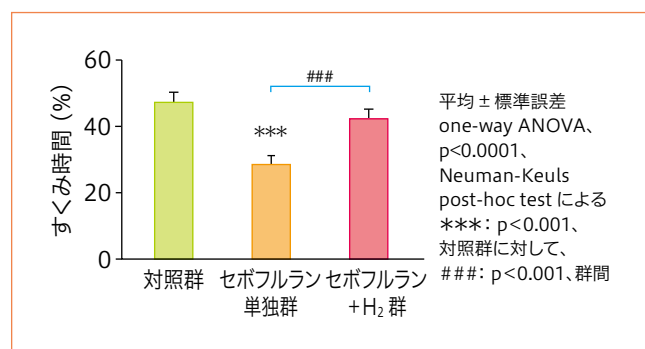
抗酸化剤を用いた治療戦略(マウス及びラット)

こうした知見により、抗酸化剤によりOH \cdot を除けば発達期の脳への吸入麻酔薬の影響を抑えられる可能性が期待される。ところが、抗酸化剤を用いる場合、①いかに到達するか(accessibility)と、②副作用、が問題となる。①について、*in vitro*の実験で有効でも、動物やヒトで実際に服用しても効かないということが多々ある。それは、分子量が大きいと、生体内では比較的、患部に到達するのが難しいためである。②について、抗酸化剤の長期投与時の副作用が報告されている。これは、OH \cdot 以外の活性酸素種であるスーパーオキシドアニオンラジカル(O $_2^{\cdot-}$)や、過酸化水素(H $_2$ O $_2$)、一酸化窒素(NO)などには、脳にとって重要な働きがあり、必要不可欠なためである。多くの抗酸化剤はこうした必要な活性酸素種も除くため、副作用があらわれる。

このようなことから、我々は水素(H $_2$)に注目した。H $_2$ の特徴として、OH \cdot を減少させ、有用な活性酸素種(H $_2$ O $_2$ 、NO)などには影響がない点⁵⁾が挙げられる。また、H $_2$ は電気的に中性で、分子サイズも小さく、血液脳関門も通過でき、到達性の面からも期待が持てる。さらに麻酔薬のキャリアガスに水素を加えるだけでよい面からも期待が持てる。

図7 幼若マウスのセボフルラン麻酔による長期記憶能力への影響に対する水素添加の効果⁶⁾

6日齢マウスに対して麻酔(対照、3%セボフルラン、3%セボフルラン+H $_2$)を行い、8週齢に成長後に恐怖条件付け学習テストを実施。



幼若動物の発達期の脳に対する吸入麻酔薬の影響における水素添加の効果(マウス)

我々は、先に紹介したマウスの実験系を用い、セボフルラン麻酔時に、キャリアガスに水素を1.3%加えて実験した⁶⁾。その結果、セボフルラン+H $_2$ 群では、セボフルラン群に比べて有意にアポトーシスが減少していた。また、長期記憶能力を評価するための恐怖条件付け学習テストにおいても、セボフルラン+H $_2$ 群は、セボフルラン群よりも有意にすくみ反応が多く、長期記憶能力が保たれた(図7)。そして、社会性行動も、H $_2$ 添加によりセボフルランの影響が軽減された。

このような結果より、H $_2$ を加えることにより、幼若動物の発達期の脳に対するセボフルランの影響は、大きく抑制されることがわかった。

総括と展望

幼若動物の発達期の脳に対する吸入麻酔薬の影響について、幼若マウスを用いた実験系において、①セボフルラン麻酔により長期記憶能力や社会性行動に障害があらわれること、②セボフルラン麻酔時にH $_2$ を添加することで、長期記憶能力や社会性行動における障害が抑制されること、の2点が明らかになった。

H $_2$ はすでに潜水病の治療などに実用化されており、大きな副作用は報告されていない。また、特別な装置を必要とせず、キャリアガスにH $_2$ を加えるだけで済むことや、H $_2$ 自体も安価であり供給も容易なこともあり、臨床使用に期待が持てると考えている。

最後に、今回の講演にあたり、防衛医科大学校麻酔学教室の風間富栄教授、与那嶺龍二助教ならびに児玉光厳助教にご助力いただいた。謹んで謝意を表したい。

引用文献

- 1) Jevtovic-Todorovic V, et al. : Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 23 : 876-882, 2003
- 2) Satomoto M, et al. : Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology* 110 : 628-637, 2009
- 3) Kodama M, et al. : Neonatal desflurane exposure induces more robust neuroapoptosis than do isoflurane and sevoflurane and impairs working memory. *Anesthesiology* 115: 979-991, 2011
- 4) Sanchez V, et al. : General anesthesia causes long-term impairment of mitochondrial morphogenesis and synaptic transmission in developing rat brain. *Anesthesiology* 115: 992-1002, 2011
- 5) Ohsawa I, et al. : Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 13: 688-694, 2007
- 6) Yonamine R, et al. : Coadministration of hydrogen gas as part of the carrier gas mixture suppresses neuronal apoptosis and subsequent behavioral deficits caused by neonatal exposure to sevoflurane in mice. *Anesthesiology* 2012, in press