

## 論文の内容の要旨

### 1 申請者

防衛医科大学校 嶋田哲也

### 2 論文題目

発達期における全身麻酔薬による脳の細胞毒性と ERK 日内変動に関する研究

### 3 背景

動物実験において、発達期に全身麻酔薬に曝露すると脳のアポトーシスが増加し、成長後に種々の精神神経学的異常を引き起こすことが報告されている。しかしながら、全身麻酔曝露後の脳の細胞毒性に関する動物実験の結果がヒトにも当てはまるのかについては一定の見解が得られておらず、発達期における全身麻酔薬曝露が脳の細胞毒性を来す機序の解明は、非常に重要である。

発達期の全身麻酔薬曝露による中枢神経毒性に関しては、いくつかの分子メカニズムが示唆されており、我々は MAP キナーゼ (Mitogen-activated protein kinase、以下 MAPK) カスケードの一つである細胞外シグナル制御キナーゼ (Extracellular Signal-Regulated Kinase、以下 ERK) 経路との関連性に注目している。過去の研究で、発達期マウスに対する全身麻酔薬の曝露で脳のアポトーシスが増加すると共にリン酸化 ERK (pERK) 発現量が減少することや、逆に pERK 発現量の抑制が脳のアポトーシスの増加を誘発することが報告されている。また、過去の報告で成獣マウスの海馬には pERK 発現量の日内変動があること、またこのリズムを MAPK/ERK kinase (MEK) 阻害薬で阻害すると、長期記憶障害を来すことが明らかになっている。しかしながら、発達期マウスの脳で pERK の日内変動がみられるのか、また全身麻酔薬曝露による脳の細胞毒性に日内変動がみられるのか不明である。

### 4 目的

本研究では、発達期マウスへの全身麻酔薬曝露による脳の pERK 発現やアポトーシス誘導に日内変動存在するかを検討し、全身麻酔薬曝露による脳の細胞毒性に与える時間薬理学的影響とその機序を解明することを目的とした。

### 5 方法

防衛医科大学校動物実験倫理審査で承認後、発達期にあたる生後 6 日齢 (P6) の C57BL/6J マウスを用いて、脳の pERK 発現量をウェスタンブロット法および免疫染色法を用いて検証した。ま

たこの結果に基づき、P6 マウスに対する昼夜の全身麻酔薬セボフルランを曝露による、脳のアポトーシスおよび pERK 発現量の違いをウェスタンブロット法および免疫染色法で検証した。さらに P6 マウスへのセボフルラン曝露で生じる脳の細胞毒性の程度の昼夜の違いが、成長後(生後 12-14 週齢)の行動に与える影響を、各種行動学的実験により検証した。また、P6 マウスに対して昼夜に MEK 阻害薬(SL327)を投与し、脳のアポトーシスおよび pERK 発現量をウェスタンブロット法および免疫染色法で検証した。最後に、セボフルラン曝露による脳の細胞毒性の昼夜の曝露による違いと ERK の関連性を調べるため、ERK 経路下流の転写因子の一つである c-Fos の発現を免疫染色法で検証した。

## 6 結果

P6 マウスの脳には昼で高く夜で低い pERK 発現量の日内変動が存在することが判明した。また、P6 の脳におけるセボフルラン曝露による脳のアポトーシス発現量は昼より夜で多く、pERK 発現量は昼夜共に同程度まで抑制されることがあきらかになった。P6 マウスに対するセボフルラン曝露の成長後に Y-maze test、Fear conditioning test、Open field test、および Elevated plus-maze test を実施した。この結果、発達期におけるセボフルラン曝露は、昼夜に関係なく成長後の短期記憶に影響を与えないこと、昼夜に関係なく成長後の長期記憶障害を来すこと、夜の曝露でのみ成長後の不安様行動を亢進することが判明した。P6 マウスに対する SL327 の投与で生じる脳のアポトーシスは昼より夜で多いことが明らかになった。さらに、P6 マウスの脳における c-Fos 発現は、セボフルラン曝露や昼夜の曝露時間帯の違いによらないことが判明した。

## 7 考察

発達期マウスに対する全身麻酔薬で生じる脳のアポトーシスは、昼と比較して夜の曝露で多く、また夜の曝露でのみ不安様行動を亢進することが判明した。脳のアポトーシスと不安様行動の関連の詳細は不明だが、不安様行動と扁桃体の関連については、多くの報告がある。本研究でも夜の全身麻酔薬曝露で扁桃体におけるアポトーシスの増加を認めた。

全身麻酔薬曝露後の神経毒性の昼夜の違いは、全身麻酔薬が日内変動を有する ERK 活性化と神経回路形成を夜で強く阻害することに由来しているのかもしれない。また、ERK 経路の下流にある転写因子等の関与の可能性もあるが、本研究から ERK 経路の下流にあたる転写因子の c-Fos は関与していないことが示唆された。さらにメラトニンや cAMP といった ERK 活性化以外の要因も脳の細胞毒性の昼夜の違いに関与している可能性もあるが、証明にはさらなる検証を要する。

## 8 結論

発達期における全身麻酔薬による脳の細胞毒性には、昼より夜で強い日内変動が存在する。