

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

しまだ てつや

嶋田 哲也

(薬理学専攻)

防衛医科大学校

令和元年度

## 目次

背景 .....	1
第 1 章 発達期マウスの脳におけるリン酸化 ERK 発現量の日内変動に関する検討 .....	5
第 1 節 目的 .....	5
第 2 節 方法 .....	5
第 3 節 結果 .....	12
第 4 節 考察 .....	14
第 2 章 発達期マウスに対する全身麻酔薬曝露による脳の細胞毒性の昼夜の違いに関する検討 .....	15
第 1 節 目的 .....	15
第 2 節 方法 .....	15
第 3 節 結果 .....	18
第 4 節 考察 .....	22
第 3 章 発達期マウスに対する全身麻酔薬曝露が成長後の行動表現型に与える影響の昼夜の違いに関する検討 .....	23
第 1 節 目的 .....	23

第2節 方法 .....	23
第3節 結果 .....	28
第4節 考察 .....	30
第4章 発達期マウスに対するMEK阻害薬投与による脳の細胞毒性の昼夜の 違いに関する検討 .....	32
第1節 目的 .....	32
第2節 方法 .....	32
第3節 結果 .....	34
第4節 考察 .....	40
第5章 発達期マウスに対する全身麻酔薬曝露による脳のc-Fos発現量の昼夜の 違いに関する検討 .....	42
第1節 目的 .....	42
第2節 方法 .....	42
第3節 結果 .....	44
第4節 考察 .....	44
第6章 総括 .....	45
第7章 結論 .....	48

謝辞 .....	49
附記 .....	50
引用文献 .....	51
図表および解説 .....	59

## 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中枢神経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以降(1, 2)、小児麻酔で一般的に用いられるほぼ全ての全身麻酔薬が脳の細胞毒性を持つことが明らかにされてきた(3)。例えば、全身麻酔薬のイソフルラン、亜酸化窒素および鎮静薬のミダゾラムを生後 7 日齢のラットに投与することで、中枢神経に広範なアポトーシスを誘発すると共に、成長後の学習、記憶障害を来すことが報告されている(2)。また、発達期のマウスに全身麻酔薬のセボフルランを曝露することで、中枢神経のアポトーシスの増加と共に、成長後の学習、記憶障害や自閉症様行動(4)、育児放棄(5)を引き起こすことも報告されている。同様の報告はげっ歯類だけにとどまらず、ヒトと同じ霊長類においても報告されている(6, 7)。なお、この現象は時期特異的であり、例えば、生後 6 日齢から 7 日齢のげっ歯類や霊長類で全身麻酔薬による脳の細胞毒性を認める一方(2, 4)、成獣に対する全身麻酔薬曝露ではこのような現象は認められない(8)。

霊長類を含めた動物実験の結果を受けて、発達期のヒトにおいても、全身麻酔薬曝露が成長後の精神神経学的異常を来すのではないかと危惧されている。2009 年、4 歳未満で複数回の全身麻酔手術を受けると、成長後に学習異常をきたすことがヒトで初めて報告された(9)。それ以降も、小児期の全身麻酔薬曝露が成長後の精神神経

障害を来すとする多くの報告がある(10-12)一方で、発達期のヒトに対する全身麻酔薬曝露は、成長後の精神神経学的異常を来さないとする報告もされていて(13-15)、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いない(16, 17)。実際、これらの研究結果を受けたアメリカ食品医薬品局(FDA)の勧告も、小児、産科領域に関わる医療従事者や患者家族に対して、3歳未満の小児に対する長時間あるいは複数回の全身麻酔薬の使用に伴う危険性を警告する一方で、さらなる研究の必要性を強調している(18)。以上のことから、全身麻酔薬曝露の小児への影響を明らかにする上でも、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が脳の細胞毒性を来す詳細な機序は未だ不明な点が多いが、いくつかの分子メカニズムが考えられている。例えば、細胞内小器官であるミトコンドリアや小胞体の障害が指摘されている。過去の研究で、全身麻酔薬がミトコンドリア依存性のアポトーシス経路を活性化させる(8)と同時に、ミトコンドリアの融合と分裂の過程を阻害することで生じる過剰な活性酸素種が、発達期の神経シナプスを傷害すると報告されている(19)。また、全身麻酔薬がイノシトール 1, 4, 5-トリスリン酸(IP3)受容体を活性化することで、小胞体から過剰なカルシウムが放出して、アポトーシスに抑制的に働く蛋白質の Bcl-xL を傷害し、ミトコンドリア依存性の神経アポトーシスを促進することも示唆されている(20)。

また、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) 経路と全身麻酔薬曝露後の脳の細胞毒性との関連性も指摘されている。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中枢神経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 発現量の抑制が神経アポトーシスの増加を誘発することが報告されている(21)。

一方、ショウジョウバエの羽化のリズムが *period* により規定されることが示されて以降(22)、哺乳類を含めた生命の多くの機能は、概日リズムを有することが明らかになっている(23, 24)。概日リズムの乱れは、高血圧(25, 26)や冠動脈疾患(27)、2 型糖尿病(28)など多くの病態との関連が示唆されている。また、周術期においても、コルチゾール分泌の概日リズムの障害がせん妄や認知機能障害の発生率上昇を引き起こす可能性が示唆されている(29)。さらに、全身麻酔薬のプロポフォールをラットに投与すると、メラトニンの概日リズムが乱れ(30)、休息期活動期サイクルや体温の概日リズムに位相変位を来す(31)ことが明らかになっている。

過去の研究で、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(32)。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、また発達期の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。そこで本研究では、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、発達期の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。



## 第 1 章 発達期マウスの脳におけるリン酸化 ERK 発現量の日内変動に関する検討

### 第 1 節 目的

過去の研究で、成獣マウスの海馬において、昼に高く夜に低い pERK 発現量の日内変動が存在することが報告された(32)。しかしながら、発達期のマウスの中枢神経細胞において pERK 発現量に日内変動が存在するかは明らかでない。

そこで本章では、発達期マウスの脳に pERK 発現量の日内変動が存在するか検証した。なお本研究を通して、全身麻酔薬曝露による脳の細胞毒性を認める特異的な時期である、生後 6 日齢の(以下 P6)マウスを使用した。

### 第 2 節 方法

#### 1. 倫理

本研究は、防衛医科大学校(Saitama, Japan)において定められた動物実験規則(平成 20 年防衛医科大学校達第 3 号)に基づいて実施した。本研究のプロトコールは同規則に従った動物実験倫理審査で承認された(承認番号 16074 および 19024)。

#### 2. 使用動物

防衛医科大学校動物実験施設で管理、飼育した C57BL/6J マウスを使用した。マウスは、室温:  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $46 \pm 2\%$  の環境下において、大きさ約 170 mm x 290 mm x 150 mm の飼育ケージ内で管理され、適切な給水給餌で飼育された。本研究では、実験の時間軸として Zeitgeber time (以下 ZT と略す) を使用した。ZT は、明暗など環境の周期性に規定される時刻のことである。本研究では、明期を ZT0-ZT12 (午前 7 時から午後 7 時)、暗期を ZT12-ZT24 (午後 7 時から午前 7 時) とする時間軸を用いて、12 時間/12 時間の明暗サイクル下でマウスを出生前から実験終了まで管理した。

### 3. 脳組織検体の摘出

ウェスタンブロット法では、P6 マウスに対して断頭による安楽死を行い、直後に脳組織検体 (大脳) を摘出した。免疫染色法では、セボフルランを極短時間曝露して無動化を得た直後に灌流固定処置を行った。

検体摘出は ZT0、4、8、12、16、20 の各時刻に行った。

### 4. ウェスタンブロット法

20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、2 mM ethylene diamine tetraacetic acid、protease inhibitor cocktail (Complete; Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)、phosphatase inhibitors (PhosSTOP; Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて作成

したバッファー内で脳組織(大脳)をホモジナイズし、4°C、15,000 rpm、30 分間遠心した後に、上清を採取した。サンプルが 5 µg/mL になるように上清をバッファーで希釈して、Sample Buffer Solution with Reducing Reagent for SDS-PAGE (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を添加し、95°Cに設定した恒温槽(Cool Thermo Unit CTU – Mini; TAITEC, Saitama, Japan)を用いて 5 分間加熱処理により不活化後、氷冷した。調整したサンプルは、以降の手順に進むまで-80°Cで保存した。

サンプル中の蛋白質は、ドデシル硫酸ナトリウムとポリアクリルアミドゲルを利用した電気泳動(SDS-PAGE)を用いて分離した。泳動槽 NA-3000 (Nihon Eido, Tokyo, Japan)にゲル板をセットし固定した後、8% PAGE ゲルを作成した。PAGE ゲル中のレーンにサンプルを注入後 100 V、2 時間で電気泳動を行った。PAGE ゲルからメンブレン基質上への蛋白質の転写は、タンク(Mini-PROTEAN Tetra System; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いたエレクトロニックトランスファーを 100 V、4 時間行った。メンブレンは PVDF (polyvinylidene difluoride)製メンブレン(Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA, USA)を使用した。なお通電には、泳動、転写共に Power Station III: WSE-3200 (ATTO, Tokyo, Japan)を使用した。

蛋白質を転写したメンブレンに対しては 2.5%スキムミルク添加 TBS-T 溶液(組成は 25 mM Tris (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% Tween-20)を用いて室温で 30 分間ブロッキング処理をした。その後、メンブレン上の標的蛋白質に対する一次抗体を後述のよう

にそれぞれ希釈し、4°Cで一晩インキュベートした。Rabbit polyclonal anti-cleaved poly-(adenosine diphosphateribose) polymerase (cleaved PARP)は、生体内において caspase-3 が切断する主要な標的であり、その開裂は多くのアポトーシスモデルにおいて容易に検知され、アポトーシスの指標とされる(33)。そこで、本研究における中枢神経アポトーシスの定量では、cleaved PARP 抗体(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)を、2.5%スキムミルクで 1:2000 に、ERK1および ERK2 の定量では、rabbit polyclonal anti-ERK1/2 抗体 (Cell Signaling Technology)を 1:1000 に、pERK1、ERK2 (pERK1/2)の定量では、rabbit polyclonal anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)抗体(Cell Signaling Technology)を 1:1250 に、それぞれ希釈して使用した。

TBS-T 溶液を用いて標的蛋白質に未結合の一次抗体を十分洗浄した後、goat polyclonal horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-rabbit IgG 抗体(Cell Signaling Technology)を 2.5%スキムミルク添加 TBS-T 溶液で 1:2500 に希釈した二次抗体添加し室温で 2 時間インキュベートした。

再び TBS-T 溶液を用いて未結合の二次抗体を十分洗浄し、SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)および ImmunoStar LD (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を用いた化学発光法で標的蛋白質のバンドを検出した。バン

ドの検出および撮影には LAS-3000 (Fuji Film Corporation, Tokyo, Japan)もしくは

Amersham Imager 600 (General Electric, Boston, MA, USA)を使用した。

検出バンドの濃度測定は、Multi Gauge (Fuji Film Corporation)もしくは Amersham Imager 600 Analysis Software (General Electric)を使用した。内部標準には、rabbit monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)抗体(Cell Signaling Technology)を使用した。なお、pERK1/2 の内部標準には、rabbit polyclonal anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)抗体(Cell Signaling Technology)を併用した。

## 5. 免疫染色法

まず、4% paraformaldehyde (PFA)を用いて P6 マウスの全脳組織を灌流固定した。4% PFA は、60-70°Cに加熱した DDW (double distilled water) 90 ml に PFA 4 g を NaOH で pH を調整しながら完全に溶解させた。溶解後、10x Phosphate buffered saline (PBS; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 10 ml を加え、4°Cに冷却した。

P6 マウスをセボフルランで曝露し、痛覚刺激に反応しなくなった後に速やかに解剖台に固定した。固定後、露出した左心室に穿刺針を挿入し、4% PFA を十分に灌流させた後に断頭し、脳を 4% PFA にて 4°Cで一晩外固定した。

次に、1x PBS の入った容器に移し、パラフィン包埋を行った。包埋した全脳組織の検体は、ロータリーマイクローム(MICROM HM355S; Microm International GmbH, Walldorf, Germany)を用いて、厚さ 5  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作成した。組織切片は、スライドガラスにのせた後、38°Cで一晩乾燥させた。

作成したスライドガラスを、キシレンで脱パラフィン処理した後、100%エタノール、95%エタノール、75%エタノールに順次浸漬した。その後、抗原賦活化処理のため、Antigen unmasking solution (Vector H3300; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)の入った耐熱容器にスライドガラスを浸し、121°Cで 5 分間、オートクレーブ (LSX-300 high-pressure steam sterilizer; Tomy Seiko Company, Tokyo, Japan)による熱処理を行い、緩徐に冷却した。冷却後、PBS で洗浄し、非特異性ブロッキング剤 (Protein Block Serum-Free Ready-To-Use; Dako, Glostrup, Denmark)を切片に滴下して 30 分間反応させ、バックグラウンドにおける非特異性反応をブロックした。ブロッキング後、組織切片を一次抗体で完全に覆い、加湿環境下において、4°Cで一晩反応させた。一次抗体は、rabbit monoclonal anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)抗体(Cell Signaling Technology)を 1:100 に希釈したものを使用した。

一次抗体反応後、組織切片を PBS で洗浄し、標識二次抗体で完全に覆い、室温で 2 時間反応させた。二次抗体は、peroxidase conjugated secondary antibody (Dako EnVision+ system; Dako)を使用した。二次抗体反応後、組織切片を PBS で洗浄し、

発色基質溶液である 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Dako)で完全に覆い、常温で 10 分間反応させた。反応後、DDW で洗浄し、ヘマトキシリン(Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan)にスライドガラスを浸漬した後流水で洗浄した(対比染色)。

最後に、100%アルコールで脱水、キシレンで透徹し、疎水性封入剤であるマリノール(Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan)で封入した。封入後にスライドガラスを十分乾燥させた後、pERK 陽性細胞数をカウントした。

## 6. 統計解析

解析には、Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA)を使用した。各群間における pERK および ERK 発現量の比較には、one-way ANOVA 検定及び Bonferroni's multiple comparison test を用い、 $p\text{-value} < 0.05$  を統計学的有意と判定した。

また、免疫染色法による昼夜の pERK 陽性細胞数の比較には、Student's t-test を用いた。なお、 $p\text{-value} < 0.05$  を統計学的有意と判定した。

### 第3節 結果

#### 1. ウェスタンブロット法

P6 マウスの大脳において、cleaved PARP、pERK、および ERK に関して、ZT0 から ZT20 まで 4 時間ごとの発現量の時間変化をウェスタンブロット法で評価した結果を Figure 1a に、pERK1/2 および ERK1/2 の発現量を定量化した結果を Figure 1b-g に、それぞれ示した。

アポトーシスの指標である cleaved PARP の発現は、確認した全ての時間でほとんど認められなかった。pERK1/2 は、内部標準(GAPDH もしくは ERK1/2)に関わらず、ZT4-8 で最大、ZT20 で最小となる日内変動を示した。One-way ANOVA 検定において、各時間における pERK1/2 発現量で有意差を認めた。Post hoc テストにより、pERK1/2 の発現量は、内部標準(GAPDH もしくは ERK1/2)に関わらず、ZT4 と 20、ZT8 と 20 で有意差を示した。一方、one-way ANOVA 検定において、ERK1/2 共に総発現量で有意差を認めなかった(Figure 1b, pERK1/GAPDH:  $F = 3.914$ ,  $P = 0.0075$ ; Figure 1c, pERK2/GAPDH:  $F = 4.903$ ,  $P = 0.0021$ ; Figure 1d, pERK1/ERK1:  $F = 5.693$ ,  $P = 0.0008$ ; Figure 1e, pERK2/ERK2:  $F = 4.776$ ,  $P = 0.0025$ ; Figure 1f, ERK1/GAPDH:  $F = 0.6259$ ,  $P = 0.6813$ ; Figure 1g, ERK2/GAPDH:  $F = 0.4659$ ,  $P = 0.7985$ )。



## 2. 免疫染色法

P6 マウスの頭頂葉皮質第II層(Cortex layer II)、扁桃体(Amygdala)、視床(Thalamus)、海馬台(Subiculum)における pERK の発現を、昼夜で比較した結果を Figure 2a に示す。なお、前述のウェスタンブロット法の結果を基にして、pERK2 発現量が最大となる ZT8(午後 3 時)を昼、pERK1/2 の発現量最小となり、かつ昼の 12 時間後にあたる ZT20(午前 3 時)を夜と定義した。各部位の強拡大像において、茶色に染色された細胞が、pERK 陽性細胞である。

脳組織の各部位ごとに、昼に対する夜の pERK 陽性細胞数の割合を示した結果を Figure 2b-i に示す。頭頂葉皮質第 II 層、扁桃体、視床、海馬台、海馬の Cornet d'Ammon (CA) 1 領域、尾状核、被核(Caudate/putamen)および頭頂葉皮質第V層(Cortex layer V)の各部位において、夜と比較し昼で有意な陽性細胞数の増加を認めた。一方で、CA3 領域、歯状回(Dentate gyrus)、脳梁膨大部皮質(Retrosplenial cortex)においては、昼夜で pERK 陽性細胞数に有意差を認めなかった(Figure 2b, Cortex layer II:  $t = 3.029$ ,  $P = 0.0127$ ; Figure 2c, Amygdala:  $t = 4.671$ ,  $P = 0.0009$ ; Figure 2d, Thalamus:  $t = 2.729$ ,  $P = 0.0212$ ; Figure 2e, Subiculum:  $t = 2.231$ ,  $P = 0.0497$ ; Figure 2f, CA1:  $t = 2.351$ ,  $P = 0.0406$ ; Figure 2g, CA3:  $t = 0.2883$ ,  $P = 0.7790$ ; Figure 2h, Dentate gyrus:  $t = 0.4702$ ,  $P = 0.6483$ ; Figure 2i, Caudate/putamen:  $t =$

3.162,  $P = 0.0101$ ; Figure 2j, Retrosplenial cortex:  $t = 0.4173$ ,  $P = 0.6853$ ; Figure 2k, Cortex layer V:  $t = 2.237$ ,  $P = 0.0493$ ).

#### 第 4 節 考察

本研究で、発達期のマウスの大脳において、昼に高く夜に低い pERK 発現量の日内変動が存在することが判明した。

過去の研究で、成獣マウスの海馬の CA1 および CA3 領域における pERK 発現量は、夜と比べ昼で有意に増加することが報告されている。今回発達期マウスの大脳における pERK 発現量は、CA1 領域で夜と比べ昼で有意に増加することを認めた一方で、CA3 領域では昼夜の有意差を認めなかった。CA3 領域における pERK 発現量の日内変動は、成長するにしたがって獲得される可能性が示唆された。

## 第2章 発達期マウスに対する全身麻酔薬曝露による脳の細胞毒性の昼夜の違いに関する検討

### 第1節 目的

第1章では、発達期マウスの脳には昼に高く夜に低い pERK 発現量の日内変動が存在することが判明した。過去の研究で、成獣マウスの海馬には pERK 発現量の概日リズムが存在し、このリズムを MEK 阻害薬で阻害すると長期記憶障害を来すと報告されている(32)。また、過去の報告で、発達期のマウスに対して全身麻酔薬セボフルランを曝露すると、脳のアポトーシスが増加すると共に pERK 発現量が減少することが判明している(21)。

そこで本章では、P6 マウスに対して昼夜の異なる時間帯に全身麻酔薬セボフルランを曝露することで、脳のアポトーシス発現量および pERK 発現量に異なる影響を及ぼすか検討した。

### 第2節 方法

#### 1. 倫理

第1章と同様である。

## 2. 使用動物

第 1 章と同様である。

## 3. 使用麻酔薬

使用麻酔薬として、ヒトの全身麻酔時にも一般的に使用されている吸入麻酔薬である、セボフルラン(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(fluoromethoxy)propane)(Maruishi, Osaka, Japan)を使用した。

## 4. 麻酔薬曝露方法

酸素濃度 30%に調整した酸素と空気の混合気をキャリアーガスとして 2%セボフルランと混合し、温度  $30 \pm 3^{\circ}\text{C}$  のチャンバー内に入れたマウスへ、昼または夜に曝露した。なお、昼のセボフルラン曝露群には、第 1 章で定義した昼(ZT8)を中央値とする 6 時間(ZT5-ZT11)、夜の曝露群には、同じく第 1 章定義した夜(ZT20)を中央値とする 6 時間(ZT17-ZT23)、それぞれセボフルランを曝露した。一方、対照群の P6 マウスには、セボフルラン曝露群と同環境のチャンバー内で、昼または夜に酸素濃度 30%のキャリアーガスをそれぞれ 6 時間ずつ曝露した。

## 5. 脳組織検体の摘出

酸素濃度 30%のキャリアーガスあるいは 2%セボフルランを 6 時間曝露した直後に、断頭(ウェスタンブロット法)もしくは、灌流固定処置(免疫染色法)を行った。対照群に対する灌流固定処置は、セボフルランを極短時間曝露して無動化を得た直後に行った。

## 6. ウェスタンブロット法

第 1 章と同様である。

## 7. 免疫染色法

第 1 章と同様である。なお、一次抗体はアポトーシスの指標である rabbit polyclonal anti-active caspase-3 antiserum (activated caspase-3、AC-3)抗体(Cell Signaling Technology)を antibody diluent (Dako)で 1:100 に希釈したものを使用した。

## 8. 統計解析

解析には、Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software Inc)を使用した。各群における cleaved PARP、pERK1/2、ERK1/2 の発現量および AC-3 陽性細胞数の比較には、two-way ANOVA 検定及び Bonferroni's multiple comparison test を用い、p-value < 0.05 を統計学的有意と判定した。

### 第3節 結果

#### 1. ウェスタンブロット法

P6 マウスにセボフルランを6時間曝露した直後に脳組織(大脳)を摘出し、cleaved PARP、pERK、および ERK の発現量を、ウェスタンブロット法で昼夜ごとに、それぞれ対照群と比較した結果を Figure 3a に示す。また、内部標準(GAPDH または ERK1/2)を用いて定量化した結果を Figure 3b-h にそれぞれ示す。Figure 3b の結果から、アポトーシスの指標である cleaved PARP 発現量について、two-way ANOVA 検定により、曝露時期の主効果とセボフルラン曝露の主効果を認め、交互作用も有意差を認めた。Post hoc テストにより、cleaved PARP 発現量は、昼夜共にセボフルラン曝露により増加すること、また、昼のセボフルラン曝露

と比べ夜の曝露で有意に増加することが判明した(Figure 3b , Day/Night:  $F = 27.16$ ,  $P = 0.0002$ ; Sevoflurane:  $F = 84.73$ ,  $P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 15.08$ ,  $P = 0.0022$ )。

Figure 3c-f の結果から、pERK1/2 の発現量について、two-way ANOVA 検定により、曝露時期の主効果とセボフルラン曝露の主効果を認め、交互作用もそれぞれ有意差を認めた。Post hoc テストにより、pERK1/2 の発現量は、昼のセボフルラン非曝露群で夜と比べ高値であること、セボフルラン曝露で pERK1/2 の発現量が昼夜同程度にまで抑制されることが判明した(Figure 3c, pERK1/GAPDH, Day/Night:  $F = 94.48$ ,  $P < 0.0001$ ; Sevoflurane:  $F = 1075$ ,  $P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 72.88$ ,  $P < 0.0001$ ; Figure

3d, pERK2/GAPDH, Day/Night:  $F = 54.9, P < 0.0001$ ; Sevoflurane:  $F = 560.6, P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 43.01, P < 0.0001$ ; Figure 3e, pERK1/ERK1, Day/Night:  $F = 22.17, P = 0.0005$ ; Sevoflurane:  $F = 177.5, P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 6.691, P = 0.0238$ ; Figure 3f, pERK2/ERK2, Day/Night:  $F = 12.01, P = 0.0047$ ; Sevoflurane:  $F = 102.5, P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 7.262, P = 0.0195$ 。

なお、Figure 3g-h の結果から、ERK1/2 の発現量について、two-way ANOVA 検定により、曝露時期の主効果とセボフルラン曝露の主効果を共に認めず、交互作用も有意差を認めなかった(Figure 3g , ERK1/GAPDH, Day/Night:  $F = 0.1789, P = 0.6798$ ; Sevoflurane:  $F = 4.181, P = 0.0635$ ; 交互作用:  $F = 2.177, P = 0.1658$ ; Figure 3h, ERK2/GAPDH, Day/Night:  $F = 0.0159, P = 0.9018$ ; Sevoflurane:  $F = 2.744, P = 0.1235$ ; 交互作用:  $F = 0.09826, P = 0.7593$ )。

## 2. 免疫染色法

P6 マウスにセボフルランを 6 時間曝露した直後に全脳組織を摘出し、頭頂葉皮質第 II 層(Cortex layer II)、扁桃体(Amygdala)、視床(Thalamus)、海馬台(Subiculum)における AC-3 の発現を対照群と比較した結果を Figure 4a-d に示す。各部位の強拡大像において茶色に染色された細胞が、アポトーシスの指標となる AC-3 陽性細胞である。

脳組織の各部位ごとに、昼または夜におけるセボフルラン曝露群と対照群の AC-3 陽性細胞数を定量化した結果を Figure 4e-n に示す。Figure 4f-i, m の結果から、扁桃体、視床、海馬台、CA1 領域、脳梁膨大部皮質(Retrosplenial cortex)における AC3 陽性細胞数の発現量について、two-way ANOVA 検定により、曝露時期の主効果とセボフルラン曝露の主効果を認めた。交互作用については、CA1 領域のみ有意差を認めず、その他の領域では有意差を認めた。Post hoc テストにより、扁桃体、視床、海馬台、CA1 領域、脳梁膨大部皮質における AC-3 陽性細胞数は、対照群に対して夜のセボフルラン群での有意な増加を認め、昼のセボフルラン曝露と比べ夜の曝露で有意に増加することが判明した。なお、脳梁膨大部皮質では、AC-3 陽性細胞数が、対照群に対して昼のセボフルラン群でも有意な増加を認めた(Figure 4f, Amygdala, Day/Night:  $F = 12.27$ ,  $P = 0.0020$ ; Sevoflurane:  $F = 46.23$ ,  $P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 9.083$ ,  $P = 0.0064$ ; Figure 4g, Thalamus, Day/Night:  $F = 14.96$ ,  $P = 0.0008$ ; Sevoflurane:  $F = 56.70$ ,  $P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 15.72$ ,  $P = 0.0007$ ; Figure 4h, Subiculum, Day/Night:  $F = 9.596$ ,  $P = 0.0053$ ; Sevoflurane:  $F = 18.73$ ,  $P = 0.0003$ ; 交互作用:  $F = 7.146$ ,  $P = 0.0139$ ; Figure 4i, CA1, Day/Night:  $F = 5.273$ ,  $P = 0.0316$ ; Sevoflurane:  $F = 24.60$ ,  $P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 3.175$ ,  $P = 0.0886$ ; Figure 4m, Retrosplenial cortex, Day/Night:  $F = 8.410$ ,  $P = 0.0083$ ; Sevoflurane:  $F = 41.24$ ,  $P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 4.758$ ,  $P = 0.0401$ )。



Figure 4l, n の結果から、尾状核、被核(Caudate/putamen)、頭頂葉皮質第V層 (Cortex layer V)における AC3 陽性細胞数の発現量について、two-way ANOVA 検定により、曝露時期の主効果とセボフルラン曝露の主効果を認め、交互作用はそれぞれ有意差を認めなかった。Post hoc テストにより、尾状核、被核、頭頂葉皮質第V層における AC-3 陽性細胞数は、対照群に対して夜のセボフルラン群での有意な増加を認め、昼のセボフルラン曝露と比べ夜の曝露で有意に増加することが判明した。尾状核、被核では、AC-3 陽性細胞数が、対照群に対して昼のセボフルラン群でも有意な増加を認めた(Figure 4l, Caudate/putamen, Day/Night:  $F = 8.359$ ,  $P = 0.0085$ ; Sevoflurane:  $F = 40.72$ ,  $P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 3.418$ ,  $P = 0.0780$ ; Figure 4n, Cortex layer V, Day/Night:  $F = 7.073$ ,  $P = 0.0143$ ; Sevoflurane:  $F = 27.63$ ,  $P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 3.672$ ,  $P = 0.0684$ )。

Figure 4e, j-k の結果から、頭頂葉皮質第 II 層(Cortex layer II)、CA3 領域、歯状回 (Dentate gyrus)における AC3 陽性細胞数の発現量について、two-way ANOVA 検定により、曝露時期の主効果を認めず、セボフルラン曝露の主効果を認めた。交互作用はそれぞれ有意差を認めなかった。Post hoc テストにより、頭頂葉皮質第 II 層、CA3 領域、歯状回における AC-3 陽性細胞数は、対照群に対して夜のセボフルラン群での有意な増加を認めた。なお、CA3 領域、歯状回では、対照群に対して昼のセボフルラン群でも AC-3 陽性細胞数の有意な増加を認めた(Figure 4e, Cortex layer II,

Day/Night:  $F = 1.160$ ,  $P = 0.2931$ ; Sevoflurane:  $F = 27.22$ ,  $P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 3.037$ ,  $P = 0.0954$ ; Figure 4j, CA3, Day/Night:  $F = 0.0316$ ,  $P = 0.8605$ ; Sevoflurane:  $F = 21.91$ ,  $P = 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 0.0316$ ,  $P = 0.8605$ ; Figure 4k, Dentate gyrus, Day/Night:  $F = 0.1219$ ,  $P = 0.7303$ ; Sevoflurane:  $F = 18.46$ ,  $P = 0.0003$ ; 交互作用:  $F = 0.0007211$ ,  $P = 0.9788$ ).

#### 第 4 節 考察

本研究で、発達期のマウスがセボフルランに曝露することで生じる脳のアポトーシスは、昼より夜の曝露でより増加することが判明した。さらに、発達期のマウスの脳における pERK 発現量は、昼または夜のセボフルラン曝露で同程度にまで抑制されることが判明した。

セボフルラン曝露後の脳のアポトーシスが昼と比べ夜で有意に増加する機序の詳細は不明である。しかし、過去の研究で、発達期のマウスに対するセボフルラン曝露後の脳のアポトーシスの増加と pERK 発現量減少の関連性が指摘されており(21)、第 1 章で判明した脳における pERK 発現量の日内変動が、脳の細胞毒性の昼夜の違いに関与している可能性がある。

### 第3章 発達期マウスに対する全身麻酔薬曝露が成長後の行動表現型に与える影響の昼夜の違いに関する検討

#### 第1節 目的

第2章では、発達期のマウスが全身麻酔薬であるセボフルランに曝露されると、脳のアポトーシスが昼より夜の曝露で増加することが判明した。過去の研究で、全身麻酔薬を発達期のマウスに曝露すると、曝露直後に脳のアポトーシスが増加するだけでなく、成長後に行動、学習障害を来たすことが報告されている(2, 4)。

本章では、セボフルランの曝露で生じる脳の細胞毒性の程度の昼夜の違いがマウスの成長後の行動に与える影響を、各種行動学的実験により検討した。

#### 第2節 方法

##### 1. 倫理

第1章と同様である。

##### 2. 使用動物

第1章と同様である。

### 3. 使用麻酔薬

第 2 章と同様である。

### 4. 麻酔薬曝露方法

第 2 章と同様に、P6 で 2%セボフルランもしくは酸素濃度 30%のキャリアーガスに曝露したマウスを、母マウスのいる飼育ケージへ戻して 12-14 週齢まで飼育し、下記の行動実験を行った。

### 5. 行動実験

各行動実験は 12-14 週齢で実施した。全ての実験は、ZT6-ZT10 の間に実施した。

#### 1) オープンフィールドテスト(Open field test)

新奇空間に置かれた際の不安様行動や活動量を評価する試験である。不安が強いマウスほど壁際を好み、不安が軽度なほど中央部に滞在する時間が長くなる性質を利用している。

具体的には、照度 70 ルクスの環境下に設置した、大きさが 50 x 50 x 40 cm で正方形の白いアクリル製フィールド(O'Hara & Co., Ltd., Tokyo, Japan)にマウスを入れた後、10 分間で移動した総移動距離(メートル)およびフィールドの中央部に滞在した時

間の割合(%)を測定した(34)。移動距離およびフィールド中央部滞在時間の測定は、computer-operated video tracking system (SMART, Barcelona, Spain)を使用した。使用したフィールドは、各測定終了後に十分洗淨した。

## 2) 高架式十字迷路テスト(Elevated plus-maze test)

マウスの示す不安様行動を評価する試験である。

壁がない白いアクリル製アーム(オープンアーム:25 x 5 cm)、高さ 15 cm の透明なアクリル板の壁を白いアクリル製アームに取り付けたアーム(クローズドアーム)、およびアーム間を接続する白いアクリル板(5 x 5 cm)で構成され、同種のアームが一直線に並ぶように十字型に組み合わせ、高さ 50 cm の位置に設置した。この高架式迷路の中央に位置する正方形の白いアクリル板上に、オープンアームの方向を向けた状態のマウスを置き、10 分間のうちオープンアームに滞在した時間を測定した(34)。オープンアーム滞在時間を不安様行動の指標として用いた。使用したアクリル板は、各測定終了後に十分洗淨した。

## 3) Y 迷路テスト(Y-maze test)

マウスの自発的交替行動を利用して、短期空間作業記憶を評価する試験である。この試験には事前の学習や報酬、罰刺激は含まれず、マウスが探索行動において、自発的に直近に入ったアームと異なるアームに入る性質を利用している。

高さ 15 cm の壁を有する 3 本のアクリル製アーム(25 x 5 cm)間の角度を 120°とした Y 字型の迷路の中央にマウスを置き、8 分間自由に移動させた。マウスが侵入したアームの順序を記録した後、マウスが連続して 3 回異なるアームに侵入した回数を、3 回異なるアームに侵入しうる最大の回数(すなわち、マウスのアームへの総侵入数 - 2)で除した割合を、交替行動率として評価した(34)。使用したアクリル板は、各測定終了後に十分洗浄した。

#### 4) 恐怖条件付けテスト(Fear conditioning test)

マウスの恐怖記憶の固定化を通して長期記憶を評価する試験である。本研究では、恐怖文脈条件付けテスト(contextual test)と恐怖音条件付けテスト(cued test)を行った(34)。

具体的には、ステンレス製の格子状にひかれた電線を床に敷いたプラスチック製のチャンバー内にマウスを入れ、contextual test で 5 分間、cued test で 3 分間、それぞれ環境に慣れさせた後、条件刺激と非条件刺激のペアを 1 分間隔で 3 回与えた。なお、本研究における条件刺激は 80dB、30 秒間のホワイトノイズ、非条件刺激は 1

mA、1 秒間の電気ショックである。ホワイトノイズは、チャンバー近傍に設置したスピーカーから与えた。電気ショックはチャンバー内の床に張られた電線から、ホワイトノイズの終了間際に与えた。

恐怖文脈条件付けテストは、上記の条件付けを行った 24 時間後に再度電気ショックを与えたチャンバーにマウスを 5 分間戻し、ホワイトノイズがない状況下でのマウスのすくみ反応(身体のいかなる部分も動かなくなる反応)の時間を測定した。

恐怖音条件付けテストは、恐怖文脈条件付けテストのさらに 24 時間後に行った。電気ショックを与えたチャンバーとは視覚的に異なるチャンバーを異なる部屋に設置してマウスを入れ、まず新しいチャンバーにより生じる非特異的すくみ反応を除外するため、3 分間環境に慣れさせた。その後 3 分間ホワイトノイズを鳴らした際のマウスのすくみ反応の時間を測定した。

## 6. 統計解析

解析には、Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software Inc)を使用した。各群間における比較には、two-way ANOVA 検定及び Bonferroni's multiple comparison test を用い、 $p\text{-value} < 0.05$  を統計学的有意と判定した。

### 第3節 結果

#### 1. オープンフィールドテスト(Open field test)

Figure 5a は、P6 でセボフルランを夜に曝露した群とその対照群のマウスが、成長後にオープンフィールドで移動した軌跡の例を示している。また Figure 5b-c は、P6 において昼または夜にセボフルランを曝露した群とそれぞれの対照群の計 4 群で、フィールド内の総移動距離と、フィールド中央部滞在時間を比較した結果である。

フィールド内の総移動距離について、two-way ANOVA 検定により、曝露時期の主効果とセボフルラン曝露の主効果を共に認めず、交互作用も有意差を認めなかった (Figure 5b, Distance, Day/Night:  $F = 0.1202$ ,  $P = 0.7303$ ; Sevoflurane:  $F = 0.3521$ ,  $P = 0.5557$ ; 交互作用:  $F = 0.578$ ,  $P = 0.4508$ )。

また、フィールド中央部滞在時間について、two-way ANOVA 検定により、曝露時期の主効果を認めず、セボフルラン曝露の主効果を認めた。なお、交互作用は有意差を認めなかった。Post hoc テストでは、フィールド中央部滞在時間は、夜にセボフルランを曝露した群のみ、その対照群と比較して有意に短かった (Figure 5c, Center, Day/Night:  $F = 0.02856$ ,  $P = 0.8665$ ; Sevoflurane:  $F = 6.449$ ,  $P = 0.0144$ ; 交互作用:  $F = 2.81$ ,  $P = 0.1002$ )。



## 2. 高架式十字迷路テスト(Elevated plus-maze test)

Figure 5d は、P6 において昼または夜にセボフルランを曝露した群とそれぞれの対照群の計 4 群で、オープンアーム滞在時間を比較した結果である。

オープンアーム滞在時間について、two-way ANOVA 検定により、曝露時期の主効果を認めず、セボフルラン曝露の主効果を認めた。交互作用は有意差を認めなかった。Post hoc テストでは、オープンアーム滞在時間は、夜にセボフルランを曝露した群のみ、その対照群と比較して有意に短かった(Figure 5d, Elevated plus-maze, Day/Night:  $F = 1.189$ ,  $P = 0.2810$ ; Sevoflurane:  $F = 4.444$ ,  $P = 0.0403$ ; 交互作用:  $F = 3.429$ ,  $P = 0.0702$ )。

## 3. Y 迷路テスト(Y-maze test)

Figure 5e は、P6 において昼または夜にセボフルランを曝露した群とそれぞれの対照群の計 4 群で、自発的交替行動率を比較した結果である。

自発的交替行動率について、two-way ANOVA 検定により、曝露時期の主効果とセボフルラン曝露の主効果を共に認めず、交互作用も有意差を認めなかった(Figure 5e, Y-maze, Day/Night:  $F = 1.003$ ,  $P = 0.3200$ ; Sevoflurane:  $F = 0.00851$ ,  $P = 0.9268$ ; 交互作用:  $F = 0.503$ ,  $P = 0.4804$ )。

#### 4. 恐怖条件付けテスト(Fear conditioning test)

Figure 5f-g は、P6 において昼または夜にセボフルランを曝露した群とそれぞれの対照群の計 4 群で、恐怖文脈条件(context)および恐怖音条件(cued)下でのすくみ反応時間を比較した結果である。

恐怖文脈条件および恐怖音条件下でのすくみ反応時間について、two-way ANOVA 検定により、いずれの恐怖条件下でも曝露時期の主効果を認めず、セボフルラン曝露の主効果を認めた。交互作用は共に有意差を認めなかった。Post hoc テストでは、いずれの恐怖条件下でも昼夜の曝露時間帯の違いによらず、対照群と比べてセボフルラン群ですくみ反応時間は有意に短かった(Figure 5f, Context, Day/Night:  $F = 0.2557$ ,  $P = 0.6146$ ; Sevoflurane:  $F = 15.7$ ,  $P = 0.0002$ ; 交互作用:  $F = 0.002062$ ,  $P = 0.9639$ ; Figure 5g, Cued, Day/Night:  $F = 3.114$ ,  $P = 0.0818$ ; Sevoflurane:  $F = 23.8$ ,  $P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 0.9017$ ,  $P = 0.3455$ )。

#### 第 4 節 考察

第 2 章において、発達期のマウスに対する全身麻酔薬曝露で生じる脳のアポトーシスが、昼より夜の曝露で有意に増加することが判明したが、本章では、このアポトーシスの違いが表現型にどう反映されるかを各種行動学的実験により検証した。

オープンフィールドテストおよび高架式十字迷路テストの結果から、P6 マウスに対する夜のセボフルラン曝露は成長後の不安様行動を有意に亢進させた。不安様行動と扁桃体の関連について、過去に多くの報告がみられる(35, 36)。本研究で、昼と比べ夜の全身麻酔薬曝露で扁桃体におけるアポトーシスの有意な増加を認めており (Figure 4f)、不安様行動の亢進につながっている可能性が考えられる。

一方で、Y 迷路テストと恐怖条件付けテストの結果から、セボフルラン曝露の昼夜の違いは、短期作業記憶および長期記憶には影響を与えないことが明らかになった。これは従来の研究結果と一致している(37)。

成獣マウスの pERK の発現を昼に抑制すると、マウスの学習、記憶障害を来すという報告がある(32)。これに対して、我々はセボフルラン曝露で pERK 発現量が減少した際の短期空間作業記憶および長期記憶形成に、昼夜の曝露による違いを認めなかった。発達期マウスと成獣マウスの海馬、扁桃体のシナプス形成の成熟度の違いで、pERK 発現量の減少が記憶へ与える影響が異なるのかもしれない。

## 第4章 発達期マウスに対する MEK 阻害薬投与による脳の細胞毒性の昼夜の違いに関する検討

### 第1節 目的

過去の報告で、発達期マウスに対して MEK 阻害薬を投与することで、全身麻酔薬曝露と類似した脳のアポトーシスが増加することが明らかになっている(21)。しかし、MEK 阻害薬投与の昼夜の投与時間帯の違いがアポトーシスに与える影響については不明である。

そこで本章では、P6 マウスに対して昼夜の異なる時間帯に MEK 阻害薬を投与することで、脳のアポトーシスに異なる影響がみられるか検討した。

### 第2節 方法

#### 1. 倫理

第1章と同様である。

#### 2. 使用動物

第1章と同様である。

### 3. 使用薬物

MEK (MAPK/ERK kinase)阻害薬である SL327( $\alpha$ -[amino[(4-aminophenyl)thio]methylene]-2-(trifluoromethyl)benzeneacetonitrile)(ENZO Life Science, Farmingdale, NY, USA)を使用した。SL327 は血液脳関門を通過して MEK を阻害し、ERK1/2 のリン酸化を抑制する。SL327 をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した。

### 4. 薬物投与方法

SL327 溶液の投与量による大脳のアポトーシスおよび pERK 発現量を比較するため、SL327 10 mg/kg、30 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg を P6 マウスに腹腔内投与した。対照群(SL327 0 mg/kg)のマウスには Vehicle として同容量の DMSO を腹腔内投与した。

昼の投与群は ZT5 に、夜の投与群は ZT17 に SL327 を投与後、第 2 章と同環境のチャンバー内で、酸素濃度 30%のキャリアーガスに 6 時間曝露した。

### 5. 脳組織検体の摘出

酸素濃度 30%のキャリアーガスを 6 時間曝露した直後に、第 1 章と同様の手法で全脳組織検体を摘出した。

## 6. ウェスタンブロット法

第 1 章と同様である。

## 7. 免疫染色法

第 2 章と同様である。

## 8. 統計解析

解析には、Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software Inc)を使用した。SL327 各投与量の、cleaved PARP、pERK1/2 および ERK1/2 の昼夜における発現量の比較では、Student's test を用いた。なお、p-value <0.05 を統計学的有意と判定した。

昼夜での SL327 50mg/kg 投与群と対照群における cleaved PARP、pERK1/2 および ERK1/2 の発現量の比較には、two-way ANOVA 検定及び Bonferroni's multiple comparison test を用い、p-value < 0.05 を統計学的有意と判定した。

## 第 3 節 結果

### 1. ウェスタンブロット法

P6 マウスに、昼または夜に SL327 を腹腔内投与し、酸素濃度 30%のキャリアーガスを 6 時間曝露した直後に脳組織(大脳)を摘出し、SL327 をそれぞれ 0、10、30、50、100 mg/kg 投与した際の cleaved PARP、pERK1/2 および ERK1/2 の発現量を比較した結果を Figure 6a に、この結果を解析し、定量化したものを Figure 6b-h に示す。なお、Figure 6b-h では、昼に Vehicle として DMSO を腹腔内投与した対照群の発現量を基準(1)としてその他の値を示している。

Figure 6b の結果から、アポトーシスの指標である cleaved PARP の発現量は昼夜共に、SL327 投与量依存性に増加した。また、50 mg/kg 以上の SL327 投与で、昼と比べ夜で有意に高値を示した(Figure 6b, PARP/GAPDH, Vehicle:  $t = 1.952$ ,  $P = 0.0651$ ; SL327 10 mg/kg:  $t = 1.296$ ,  $P = 0.2098$ ; 30 mg/kg:  $t = 1.515$ ,  $P = 0.1440$ ; 50 mg/kg:  $t = 3.052$ ,  $P = 0.0081$ ; 100 mg/kg:  $t = 2.242$ ,  $P = 0.0405$ )。

pERK1/2 の発現量は、内部標準(GAPDHもしくは ERK1/2)によらず昼夜共に、SL327 投与量依存性に低下した。また、第 1 章で得られた結果に一致して、pERK1/2 の発現量は夜と比較して昼の対照群において有意に高値を示していたが、SL327 10-30 mg/kg 以上の投与で、その有意差は消失した。なお、ERK1/2 の総発現量は、昼夜や SL327 の投与量によらず有意差を認めなかった(Figure 6c, pERK1/GAPDH, Vehicle:  $t = 3.921$ ,  $P = 0.0008$ ; SL327 10 mg/kg:  $t = 1.203$ ,  $P = 0.2431$ ; 30 mg/kg:  $t = 1.032$ ,  $P = 0.3132$ ; 50 mg/kg:  $t = 2.116$ ,  $P = 0.0515$ ; 100 mg/kg:  $t = 0.5908$ ,  $P = 0.5635$ ;

Figure 6d, pERK2/GAPDH, Vehicle:  $t = 3.597$ ,  $P = 0.0018$ ; SL327 10 mg/kg:  $t = 1.962$ ,  $P = 0.0638$ ; 30 mg/kg:  $t = 1.338$ ,  $P = 0.1945$ ; 50 mg/kg:  $t = 2.095$ ,  $P = 0.0536$ ; 100 mg/kg:  $t = 0.1752$ ,  $P = 0.8633$ ; Figure 6e, pERK1/ERK1, Vehicle:  $t = 6.596$ ,  $P < 0.0001$ ; SL327 10 mg/kg:  $t = 2.414$ ,  $P = 0.0255$ ; 30 mg/kg:  $t = 1.627$ ,  $P = 0.1180$ ; 50 mg/kg:  $t = 2.059$ ,  $P = 0.0573$ ; 100 mg/kg:  $t = 1.091$ ,  $P = 0.2923$ ; Figure 6f, pERK2/ERK2, Vehicle:  $t = 3.95$ ,  $P = 0.0008$ ; SL327 10 mg/kg:  $t = 1.833$ ,  $P = 0.0817$ ; 30 mg/kg:  $t = 1.948$ ,  $P = 0.0643$ ; 50 mg/kg:  $t = 2.066$ ,  $P = 0.0566$ ; 100 mg/kg:  $t = 0.433$ ,  $P = 0.6712$ ; Figure 6g, ERK1/GAPDH, Vehicle:  $t = 1.431$ ,  $P = 0.1678$ ; SL327 10 mg/kg:  $t = 1.801$ ,  $P = 0.0867$ ; 30 mg/kg:  $t = 2.065$ ,  $P = 0.509$ ; 50 mg/kg:  $t = 0.1709$ ,  $P = 0.8666$ ; 100 mg/kg:  $t = 0.7922$ ,  $P = 0.4398$ ; Figure 6h, ERK2/GAPDH, Vehicle:  $t = 0.8233$ ,  $P = 0.4200$ ; SL327 10 mg/kg:  $t = 0.03106$ ,  $P = 0.9755$ ; 30 mg/kg:  $t = 2.051$ ,  $P = 0.0524$ ; 50 mg/kg:  $t = 0.2408$ ,  $P = 0.8130$ ; 100 mg/kg:  $t = 0.1884$ ,  $P = 0.8531$ ).

P6 マウスに対して、昼または夜に SL327 50 mg/kg もしくは Vehicle として DMSO を腹腔内投与し、酸素濃度 30%のキャリアーガスを 6 時間曝露した直後に脳組織(大脳)を摘出して、cleaved PARP、pERK1/2 および ERK1/2 の発現量を比較した結果を Figure 6i に、この結果を解析し、定量化したものを Figure 6j-p に示す。なお、Figure 6j-p では、昼に Vehicle として DMSO を腹腔内投与した対照群の発現量を基準(1)としてその他の値を示している。



Figure 6j の結果から、アポトーシスの指標である cleaved PARP 発現量について、two-way ANOVA 検定により、投与時期の主効果と、SL327 投与の主効果を共に認め、交互作用も有意差を認めた。Post hoc テストにより、cleaved PARP 発現量は、昼夜共に SL327 50mg/kg の腹腔内投与により増加すること、また、昼の SL327 の腹腔内投与と比べ夜の投与で有意に増加することが判明した(Figure 6j, Day/Night:  $F = 15.14, P = 0.0004$ ; SL327:  $F = 68.63, P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 6.011, P = 0.0194$ )。

Figure 6k-n の結果から、pERK1/2 の発現量について、two-way ANOVA 検定により、投与時期の主効果と、SL327 投与の主効果を共に認めた。交互作用については、pERK1/ERK1 発現量のみ有意差を認め、その他の pERK1/2 の発現量では有意差を認めなかった。Post hoc テストにより、pERK1/2 の発現量は昼夜共に、SL327 の投与で有意に低下すること、また対照群で認められた昼夜における pERK1/2 の発現量の有意差は、SL327 50mg/kg の投与で消失することが判明した(Figure 6k, pERK1/GAPDH, Day/Night:  $F = 17.45, P = 0.0002$ ; SL327:  $F = 331.1, P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 3.266, P = 0.0793$ ; Figure 6l, pERK2/GAPDH, Day/Night:  $F = 14.62, P = 0.0005$ ; SL327:  $F = 218, P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 3.974, P = 0.0541$ ; Figure 6m, pERK1/ERK1, Day/Night:  $F = 36.62, P < 0.0001$ ; SL327:  $F = 344.8, P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 10.68, P = 0.0024$ ; Figure 6n, pERK2/ERK2, Day/Night:  $F = 17.48, P = 0.0002$ ; SL327:  $F = 190.5, P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 3.047, P = 0.0897$ )。

Figure 6o-p の結果から、ERK1/2 の発現量について、two-way ANOVA 検定により、投与時期の主効果と、SL327 投与の主効果を共に認めず、交互作用も有意差を認めなかった(Figure 6o, ERK1/GAPDH, Day/Night:  $F = 0.8832$ ,  $P = 0.3538$ ; SL327:  $F = 0.2876$ ,  $P = 0.5951$ ; 交互作用:  $F = 1.333$ ,  $P = 0.2562$ ; Figure 6p, ERK2/GAPDH, Day/Night:  $F = 0.5544$ ,  $P = 0.4615$ ; SL327:  $F = 0.711$ ,  $P = 0.4048$ ; 交互作用:  $F = 0.1762$ ,  $P = 0.6722$ )。

## 2. 免疫染色法

昼または夜に SL327 50 mg/kg もしくは DMSO を腹腔内投与し、酸素濃度 30% のキャリアーガスを 6 時間曝露した直後に全脳組織を摘出し、P6 マウスの頭頂葉皮質第II層(Cortex layerII)、扁桃体(Amygdala)、視床(Thalamus)、海馬台(Subiculum)における AC-3 の発現を対照群と比較した結果を Figure 7a-d に示す。各部位の強拡大像において、茶色に染色された細胞が、アポトーシスの指標である AC-3 陽性細胞である。

脳組織の各部位ごとに、昼夜の SL327 投与群とそれぞれの対照群の計 4 群で AC-3 陽性細胞数を定量化した結果を Figure 7e-n に示す。Figure 7f-g, i, l の結果から、扁桃体、視床、CA1 領域、尾状核、被核(Caudate/putamen)における AC3 陽性細胞数の発現量について、two-way ANOVA 検定により、投与時期の主効果と SL327

投与の主効果を認め、交互作用については、視床と CA1 領域で有意差を認めず、扁桃核、尾状核、被核でそれぞれ有意差を認めた。Post hoc テストにより、扁桃核、視床、尾状核、被核における AC-3 陽性細胞数は、対照群に対して夜の SL327 投与群での有意な増加を認め、昼の SL327 投与と比べ夜の投与で有意に増加することが判明した。また、CA1 領域における AC-3 陽性細胞数は、対照群に対して夜の SL327 投与群で有意な増加を認めた(Figure 7f, Amygdala, Day/Night:  $F = 8.46$ ,  $P = 0.0131$ ; SL327:  $F = 24.41$ ,  $P = 0.0003$ ; 交互作用:  $F = 11.55$ ,  $P = 0.0053$ ; Figure 7g, Thalamus, Day/Night:  $F = 10.06$ ,  $P = 0.0081$ ; SL327:  $F = 17.8$ ,  $P = 0.0012$ ; 交互作用:  $F = 2.878$ ,  $P = 0.1156$ ; Figure 7i, CA1, Day/Night:  $F = 6.661$ ,  $P = 0.0241$ ; SL327:  $F = 17.83$ ,  $P = 0.0012$ ; 交互作用:  $F = 2.697$ ,  $P = 0.1264$ ; Figure 7l, Caudate/putamen, Day/Night:  $F = 6.348$ ,  $P = 0.0269$ ; SL327:  $F = 12.44$ ,  $P = 0.0042$ ; 交互作用:  $F = 7.527$ ,  $P = 0.0178$ )。

Figure 7e, h, j-k, m-n の結果から、頭頂葉皮質第 II 層(Cortex layer II)、海馬台、CA3 領域、歯状回(Dentate gyrus)、脳梁膨大部皮質(Retrosplenial cortex)、頭頂葉皮質第 V 層(Cortex layer V)における AC3 陽性細胞数の発現量について、two-way ANOVA 検定により、投与時期の主効果を認めず、SL327 投与の主効果を認めた。交互作用については、頭頂葉皮質第 II 層で有意差を認め、海馬台、CA3 領域、歯状回、脳梁膨大部皮質、頭頂葉皮質第 V 層でそれぞれ有意差を認めなかった。Post hoc テストにより、頭頂葉皮質第 II 層、海馬台、歯状回、脳梁膨大部皮質、頭頂葉皮

質第V層における AC-3 陽性細胞数は、対照群に対して夜の SL327 投与群での有意な増加を認めた。頭頂葉皮質第V層では、AC-3 陽性細胞数が、対照群に対して昼の SL327 群でも有意な増加を認めた。なお、CA3 領域では、SL327 投与の有無や昼夜の曝露時間帯によらず、AC-3 陽性細胞数に有意差を認めなかった(Figure 7e, Cortex layer II, Day/Night:  $F = 0.761$ ,  $P = 0.4001$ ; S327:  $F = 52.08$ ,  $P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 8.61$ ,  $P = 0.0125$ ; Figure 7h, Subiculum, Day/Night:  $F = 0.5359$ ,  $P = 0.4782$ ; SL327:  $F = 20.32$ ,  $P = 0.0007$ ; 交互作用:  $F = 1.617$ ,  $P = 0.2277$ ; Figure 7j, CA3, Day/Night:  $F = 1.385$ ,  $P = 0.2621$ ; SL327:  $F = 5.538$ ,  $P = 0.0365$ ; 交互作用:  $F = 0.6154$ ,  $P = 0.4480$ ; Figure 7k, Dentate gyrus, Day/Night:  $F = 1.862$ ,  $P = 0.1974$ ; SL327:  $F = 7.448$ ,  $P = 0.0183$ ; 交互作用:  $F = 3.31$ ,  $P = 0.0939$ ; Figure 7m, Retrosplenial cortex, Day/Night:  $F = 1.862$ ,  $P = 0.1974$ ; SL327:  $F = 7.448$ ,  $P = 0.0183$ ; 交互作用:  $F = 0.9703$ ,  $P = 0.3440$ ; Figure 7n, Cortex layer V, Day/Night:  $F = 0.5079$ ,  $P = 0.4897$ ; SL327:  $F = 34.57$ ,  $P < 0.0001$ ; 交互作用:  $F = 0.7937$ ,  $P = 0.3905$ )。

#### 第4節 考察

過去の研究で、発達期のマウスに対する全身麻酔薬曝露で脳のアポトーシスが増加すると共に pERK 発現量が減少すること、また逆に MEK 阻害薬の投与で pERK

発現量を抑制すると、全身麻酔薬曝露の際と同様に、脳のアポトーシスが増加することが報告されている(21)。本研究から、第2章で見られた全身麻酔薬曝露の場合と同様に、MEK阻害薬の投与で生じる脳のアポトーシスは、昼より夜の投与で多いことが判明した。

## 第5章 発達期マウスに対する全身麻酔薬曝露による脳の c-Fos 発現量の昼夜の違いに関する検討

### 第1節 目的

第2章より、発達期の全身麻酔薬曝露による脳のアポトーシスは昼より夜の曝露で多いこと、また全身麻酔薬曝露により pERK 発現量が昼夜同程度まで抑制されることが判明した。しかしながら、全身麻酔薬曝露による脳のアポトーシスの昼夜の違いに ERK 経路がどう関連しているか、詳細は不明である。

そこで本章では、この全身麻酔薬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 の発現量を検証した。

### 第2節 方法

#### 1. 倫理

第1章と同様である。

#### 2. 使用動物

第 1 章と同様である。

### 3. 使用麻酔薬

第 2 章と同様である。

### 4. 麻酔薬曝露方法

第 2 章と同様である。

### 5. 脳組織検体の摘出

第 2 章の免疫染色法の処置と同様である。

### 6. 免疫染色法

第 1 章と同様である。ただし、ヘマトキシリンによる対比染色は行わず、一次抗体は mouse monoclonal anti-c-Fos 抗体(Santa Cruz Biotechnology)を antibody diluent (Dako)で 1:100 に希釈したものを使用した。

### 第3節 結果

P6 マウスにセボフルランまたは酸素濃度 30%のキャリアーガスを 6 時間曝露した直後に全脳組織を摘出し、頭頂葉皮質第II層(Cortex layer II)における c-Fos の発現を比較した結果を Figure 8 に示す。各部位の強拡大像において茶色に染色された細胞が、c-Fos 陽性細胞である。頭頂葉皮質第 II 層の c-Fos 陽性細胞数は、セボフルランの有無や昼夜の曝露時間帯によらず、有意差を認めなかった。

### 第4節 考察

本研究で、発達期のマウスの脳における c-Fos 発現は、全身麻酔薬曝露の有無や昼夜の曝露時間帯によらず変化しないことが判明した。

第2章では、全身麻酔薬曝露後の脳のアポトーシスが昼と比べ夜で有意に増加することが判明した。その理由として、ERK 経路の下流にある転写因子が神経回路形成の阻害や脳のアポトーシスの増加と関連している可能性が考えられるが、本研究結果から、c-Fos との関連性は低いと考えられた。



## 第6章 総括

今回の研究では、発達期マウスに対する全身麻酔薬曝露による脳のアポトーシスが昼より夜の曝露で多いこと、また ERK 活性化阻害による脳のアポトーシスは全身麻酔薬曝露と同様に昼より夜の投与で多いことが判明した。これらの結果は、全身麻酔薬曝露後の脳の細胞毒性の昼夜の違いに ERK が関与している可能性を示唆する。

発達期における全身麻酔薬により脳の細胞毒性が増悪する現象が、全身麻酔薬の直接的作用によりもたらされる現象か否かについて断定することは困難である。しかし本研究の結果や過去の報告から、全身麻酔薬の直接作用ではなく、全身麻酔薬等がもたらす脳の細胞の機能変化によるものである可能性が高いと推察される。第一に、本研究で使用した MEK 阻害薬である SL327 も全身麻酔薬ではないが、脳におけるアポトーシスの増加を認めている。第二の理由として、発達期における全身麻酔薬以外の薬物による脳の細胞毒性も報告されているからである。例えば、発達期における N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体阻害薬の投与により、脳の広範な部分でアポトーシスの増加を認めることがわかっている(1)。

過去の研究で、ERK が神経回路形成に重要な役割を果たしていることが報告されており(34, 38, 39)、今回の研究でも、発達期マウスの脳に pERK 発現量の日内変動が存在することが判明した。このため、全身麻酔薬曝露後の脳の細胞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や細胞質タンパク質の活性化の阻害が、神経回路形成を阻害し、脳のアポトーシスを増加させているのかもしれない。なお、本研究から ERK 経路の下流にあたる転写因子の c-Fos は、この機序に関与していないことが示唆された。

全身麻酔薬曝露後の脳の細胞毒性の昼夜の違いに ERK の関与が示唆される一方で、第 2 章、第 4 章において、全身麻酔薬や MEK 阻害薬の投与により、リン酸化 ERK 発現量が昼夜同程度まで抑制されたにも関わらず昼より夜で脳のアポトーシスが増加していることから、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ことが推察される。例えば、様々な細胞応答を媒介する代表的なセカンドメッセンジャーの一つである cyclic adenosine monophosphate (cAMP) は、成獣マウスの海馬において、昼で高く夜で低い日内変動を有し、この変動を阻害することで記憶障害が出現することが報告されており(32)、全身麻酔曝露による脳の細胞毒性の昼夜の違いにも関与している可能性がある。また、時計中枢が存在する視交叉上核からの情報で松果体から分泌されるメラトニンの血中濃度の概日リズムは、全身麻酔薬の一つであるプロポフォール投与で乱れを来すことや(30)、発達期における全身麻酔薬による脳のアポトーシスの増加がメラトニンの投与で軽減することが報告されており(40)、全身麻酔薬曝露後の脳の細胞毒性の昼夜の違いにメラトニンが関与している可能性も考えられる。しかし、いずれの関与を証明するためにも、さらなる検証が必要である。

今回の研究により、発達期マウスに対する全身麻酔薬曝露は、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、そして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。これらの結果は、発達期における全身麻酔薬の昼夜の曝露時間帯の違いが、脳の高次機能に異なる影響を与えることを示唆する。

本研究の限界として、全身麻酔薬としてセボフルランのみを用いて各実験を行っていることが挙げられる。全身麻酔薬が概日リズムに与える影響は、麻酔薬の種類により異なることが示唆されている(41)。本研究では、最も広く臨床で用いられている吸入麻酔薬の一つであるセボフルランを用いたが、イソフルランなどの他の吸入麻酔薬やプロポフォールなどの静脈麻酔薬の時間薬理学的影響についても検証する必要がある。

本研究ではげっ歯類のマウスを用いており、アカゲザルなどの霊長類やヒトにおいて、全身麻酔薬曝露による脳の細胞毒性への時間薬理学的影響が存在するか不明である。例えばマウスは、ヒトと異なり夜行性である。したがって、本研究の結果をただちにヒトに外挿することはできないが、小児においても、全身麻酔薬曝露による成長後の精神神経発達への影響が昼夜の曝露で異なる可能性があり、今後は霊長類を用いたさらなる検証が必要である。

## 第7章 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。

## 謝辞

論文の作成にあたり、防衛医科大学校薬理学講座教授石塚俊晶先生には指導教官として、研究全般にわたり多大なるご指導を賜りました。防衛医科大学校生化学講座教授佐藤泰司先生には研究に関わる構想から、実験指導、結果評価、研究方向性の決定に至るまで、直接的なご指導を賜りました。防衛医科大学校麻酔学講座教授池田健彦先生には、臨床の立場から研究内容に関するご指導を賜り、また研究環境面での配慮もいただきました。防衛医科大学校生化学講座実験補助の高宮希代子様には実験動物の管理や実験手技のご指導を賜りました。また、防衛医科大学校薬理学講座、生化学講座、麻酔学講座の方々には研究環境面での配慮をいただきました。厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の実施に全面的に理解を示し支えてくれた家族に、深く感謝いたします。

## 附記

本研究の一部を、以下の学術集会で発表した。

### 1. 第 90 回日本薬理学会年会

平成 29 年 3 月 15 日(水) 長崎ブリックホール 長崎新聞文化ホール

一般演題 《Effects of early anesthetic exposure on quantitative Autistic trait of Japanese male children》

### 2. 第 136 回日本薬理学会関東部会

平成 29 年 7 月 8 日(土) 東京医科歯科大学

一般演題 《幼少期の全身麻酔薬曝露と自閉症スペクトラム障害の関連》

## 引用文献

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 (New York, NY)*. 1999;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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(3):876-82.
3. Vutskits L, Xie Z. Lasting impact of general anaesthesia on the brain: mechanisms and relevance. *Nature reviews Neuroscience*. 2016;17(11):705-17.
4. 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;110(3):628-37.
5. Takaenoki Y, Satoh Y, Araki Y, Kodama M, Yonamine R, Yufune S, et al. Neonatal exposure to sevoflurane in mice causes deficits in maternal behavior later in adulthood. *Anesthesiology*. 2014;120(2):403-15.

6. Brambrink AM, Back SA, Riddle A, Gong X, Moravec MD, Dissen GA, et al. Isoflurane-induced apoptosis of oligodendrocytes in the neonatal primate brain. *Annals of neurology*. 2012;72(4):525-35.
7. Coleman K, Robertson ND, Dissen GA, Neuringer MD, Martin LD, Cuzon Carlson VC, et al. Isoflurane anesthesia has long-term consequences on motor and behavioral development in infant rhesus macaques. *Anesthesiology*. 2017;126(1):74-84.
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. 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;110(4):796-804.
10. Glatz P, Sandin RH, Pedersen NL, Bonamy AK, Eriksson LI, Granath F. Association of anesthesia and surgery during childhood with long-term academic performance. *JAMA pediatrics*. 2017;171(1):e163470.
11. Hu D, Flick RP, Zaccariello MJ, Colligan RC, Katusic SK, Schroeder DR, et al. Association between exposure of young children to procedures requiring general



anesthesia and learning and behavioral outcomes in a population-based birth cohort.

Anesthesiology. 2017;127(2):227-40.

12. Warner DO, Zaccariello MJ, Katusic SK, Schroeder DR, Hanson AC, Schulte PJ, et al. Neuropsychological and behavioral outcomes after exposure of young children to procedures requiring general anesthesia: The Mayo Anesthesia Safety in Kids (MASK) Study. Anesthesiology. 2018;129(1):89-105.

13. McCann ME, de Graaff JC, Dorris L, Disma N, Withington D, Bell G, et al. Neurodevelopmental outcome at 5 years of age after general anaesthesia or awake-regional anaesthesia in infancy (GAS): an international, multicentre, randomised, controlled equivalence trial. Lancet (London, England). 2019;393(10172):664-77.

14. O'Leary JD, Janus M, Duku E, Wijeyesundera DN, To T, Li P, et al. Influence of surgical procedures and general anesthesia on child development before primary school entry among matched sibling pairs. JAMA pediatrics. 2019;173(1):29-36.

15. Sun LS, Li G, Miller TL, Salorio C, Byrne MW, Bellinger DC, et al. Association between a single general anesthesia exposure before age 36 months and neurocognitive outcomes in later childhood. Jama. 2016;315(21):2312-20.

16. Psaty BM, Platt R, Altman RB. Neurotoxicity of generic anesthesia agents in infants and children: an orphan research question in search of a sponsor. *Jama*. 2015;313(15):1515-6.
17. Rappaport BA, Suresh S, Hertz S, Evers AS, Orser BA. Anesthetic neurotoxicity--clinical implications of animal models. *The New England journal of medicine*. 2015;372(9):796-7.
18. Andropoulos DB, Greene MF. Anesthesia and developing brains - Implications of the FDA warning. *The New England journal of medicine*. 2017;376(10):905-7.
19. Sanchez V, Feinstein SD, Lunardi N, Joksovic PM, Boscolo A, Todorovic SM, et al. General anesthesia causes long-term impairment of mitochondrial morphogenesis and synaptic transmission in developing rat brain. *Anesthesiology*. 2011;115(5):992-1002.
20. Zhao Y, Liang G, Chen Q, Joseph DJ, Meng Q, Eckenhoff RG, et al. Anesthetic-induced neurodegeneration mediated via inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;333(1):14-22.
21. Yufune S, Satoh Y, Akai R, Yoshinaga Y, Kobayashi Y, Endo S, et al. Suppression of ERK phosphorylation through oxidative stress is involved in the

mechanism underlying sevoflurane-induced toxicity in the developing brain. *Scientific reports*. 2016;6:21859.

22. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68(9):2112-6.

23. Hamilton EE, Kay SA. SnapShot: circadian clock proteins. *Cell*. 2008;135(2):368-.e1.

24. Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, et al. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science (New York, NY)*. 1994;264(5159):719-25.

25. Guzzetti S, Dassi S, Pecis M, Casati R, Masu AM, Longoni P, et al. Altered pattern of circadian neural control of heart period in mild hypertension. *Journal of hypertension*. 1991;9(9):831-8.

26. Nakano Y, Oshima T, Ozono R, Higashi Y, Sasaki S, Matsumoto T, et al. Non-dipper phenomenon in essential hypertension is related to blunted nocturnal rise and fall of sympatho-vagal nervous activity and progress in retinopathy. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*. 2001;88(3):181-6.

27. Brugger P, Marktl W, Herold M. Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. *Lancet (London, England)*. 1995;345(8962):1408.
28. Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 2010;466(7306):627-31.
29. Rasmussen LS, O'Brien JT, Silverstein JH, Johnson TW, Siersma VD, Canet J, et al. Is peri-operative cortisol secretion related to post-operative cognitive dysfunction? *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 2005;49(9):1225-31.
30. Dispersyn G, Pain L, Touitou Y. Propofol anesthesia significantly alters plasma blood levels of melatonin in rats. *Anesthesiology*. 2010;112(2):333-7.
31. Dispersyn G, Pain L, Touitou Y. Circadian disruption of body core temperature and rest-activity rhythms after general (propofol) anesthesia in rats. *Anesthesiology*. 2009;110(6):1305-15.
32. Eckel-Mahan KL, Phan T, Han S, Wang H, Chan GC, Scheiner ZS, et al. Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications for memory persistence. *Nature neuroscience*. 2008;11(9):1074-82.

33. 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;371(6495):346-7.
34. Satoh Y, Endo S, Ikeda T, Yamada K, Ito M, Kuroki M, et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) knockdown mice show deficits in long-term memory; ERK2 has a specific function in learning and memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(40):10765-76.
35. Ciocchi S, Herry C, Grenier F, Wolff SB, Letzkus JJ, Vlachos I, et al. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature*. 2010;468(7321):277-82.
36. Haubensak W, Kunwar PS, Cai H, Ciocchi S, Wall NR, Ponnusamy R, et al. Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature*. 2010;468(7321):270-6.
37. Yonamine R, Satoh Y, Kodama M, Araki Y, Kazama T. 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*. 2013;118(1):105-13.

38. Satoh Y, Endo S, Nakata T, Kobayashi Y, Yamada K, Ikeda T, et al. ERK2 contributes to the control of social behaviors in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(33):11953-67.
39. Satoh Y, Kobayashi Y, Takeuchi A, Pages G, Pouyssegur J, Kazama T. Deletion of ERK1 and ERK2 in the CNS causes cortical abnormalities and neonatal lethality: Erk1 deficiency enhances the impairment of neurogenesis in Erk2-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(3):1149-55.
40. Yon JH, Carter LB, Reiter RJ, Jevtovic-Todorovic V. Melatonin reduces the severity of anesthesia-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neurobiology of disease*. 2006;21(3):522-30.
41. Dispersyn G, Pain L, Challet E, Touitou Y. General anesthetics effects on circadian temporal structure: an update. *Chronobiology international*. 2008;25(6):835-50.

Figure 1

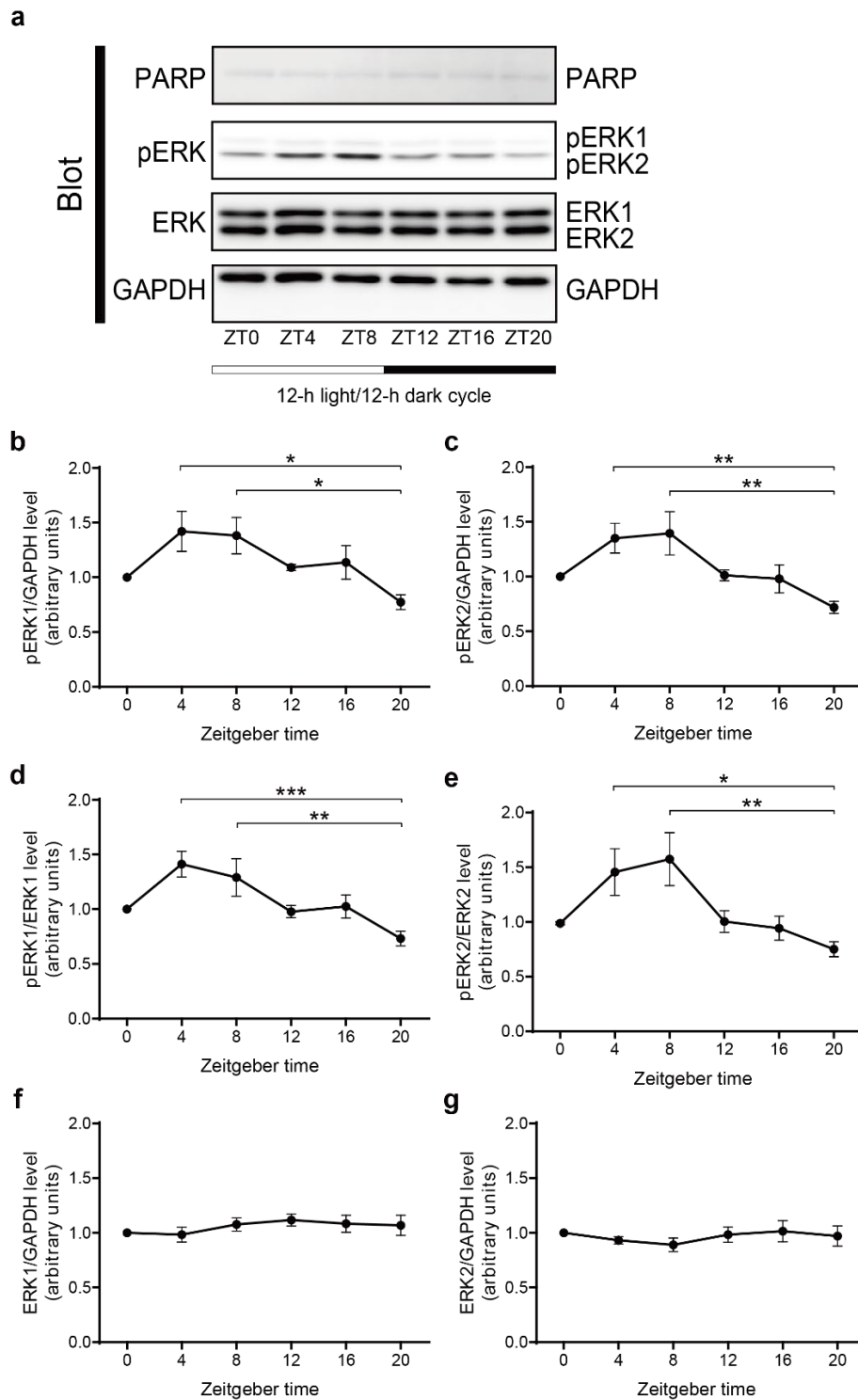
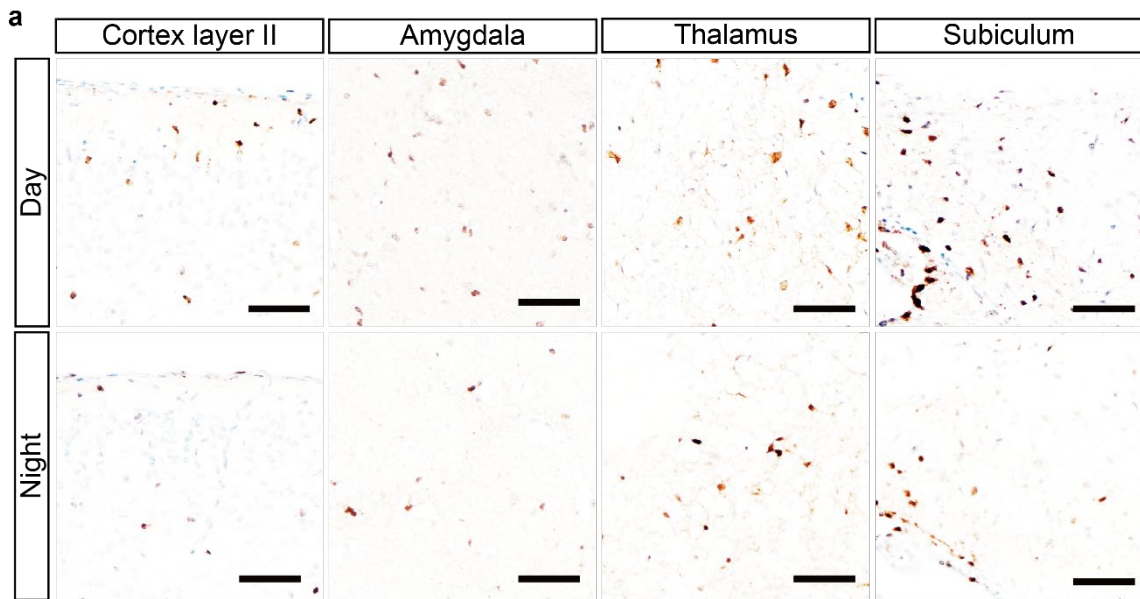


Figure 1 P6 マウス的大脑における pERK 発現量の検討

(a)ウェスタンブロット法による、P6 マウス脳組織(大腦)の pERK 発現量の ZT0、ZT4、ZT8、ZT12、ZT16 および ZT20 の各時刻における比較。アポトーシスの指標である cleaved PARP の発現は、確認した全ての時間でほぼ認めない(各群 n = 6)。 (b) pERK1 の発現量は、ZT4 が最大、ZT20 で最小となる日内変動を有する。 (c) pERK2 の発現量は、ZT8 が最大、ZT20 で最小となる日内変動を有する。 (d) pERK1 の発現量は、ZT4 が最大、ZT20 で最小となる日内変動を有する。 (e) pERK2 の発現量は、ZT8 が最大、ZT20 で最小となる日内変動を有する。 (f) ERK1 の総発現量に、pERK1 で認める日内変動は見られない。 (g) ERK2 の総発現量に、pERK2 で認める日内変動は見られない。 (b)-(c)、および(f)-(g)では内部標準として GAPDH を用いた。また、(d)では ERK1 を、(e)では ERK2 を、それぞれ内部標準として用いた。データの表記は、mean ± SEM。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  (各群 n = 6)。



Figure 2



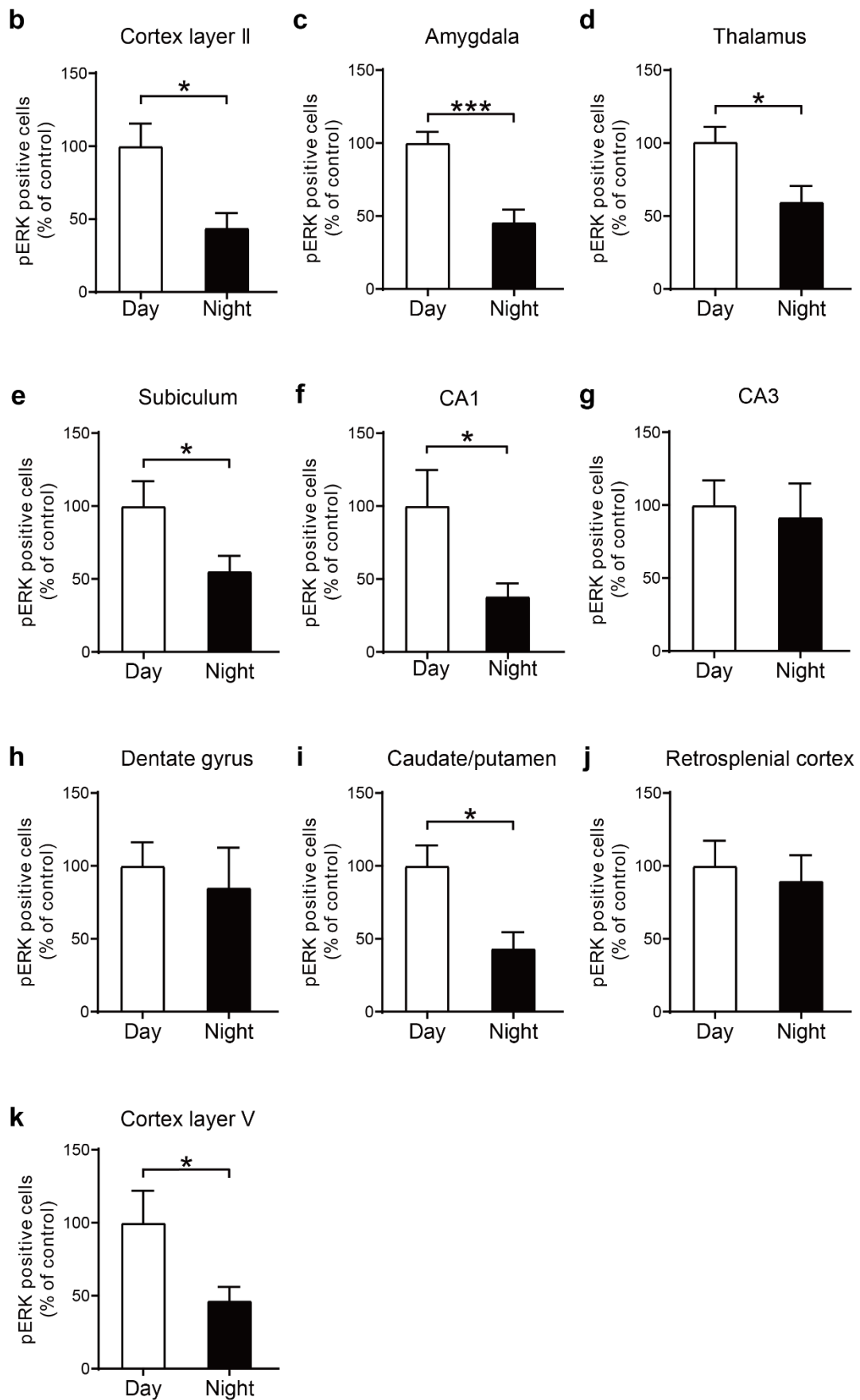


Figure 2 P6 マウスの脳の各部位における pERK 染色像と pERK 陽性細胞数の昼夜での比較

(a)P6 マウスの頭頂葉皮質第 II 層(Cortex layer II)、扁桃体(Amygdala)、視床(Thalamus)、海馬台(Subiculum)における、昼夜の pERK 染色像の比較。茶色の点が pERK 陽性細胞。マウスは 4%PFA により灌流固定、Scale bars: 50  $\mu$ m。 (b)-(k)各部位での pERK 陽性細胞数。(b)頭頂葉皮質第 II 層、(c)扁桃体、(d)視床、(e)海馬台、(f)海馬 CA1 領域、(g)海馬 CA3 領域、(h) Dentate gyrus = 齒状回、(i) Caudate/putamen = 尾状核、被核(線条体)、(j) Retrosplenial cortex = 脳梁膨大部皮質、(k) Cortex layer V = 頭頂葉皮質 V 層。データの表記は、mean  $\pm$  SEM。\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.001$ (各群 n = 6)。

Figure 3

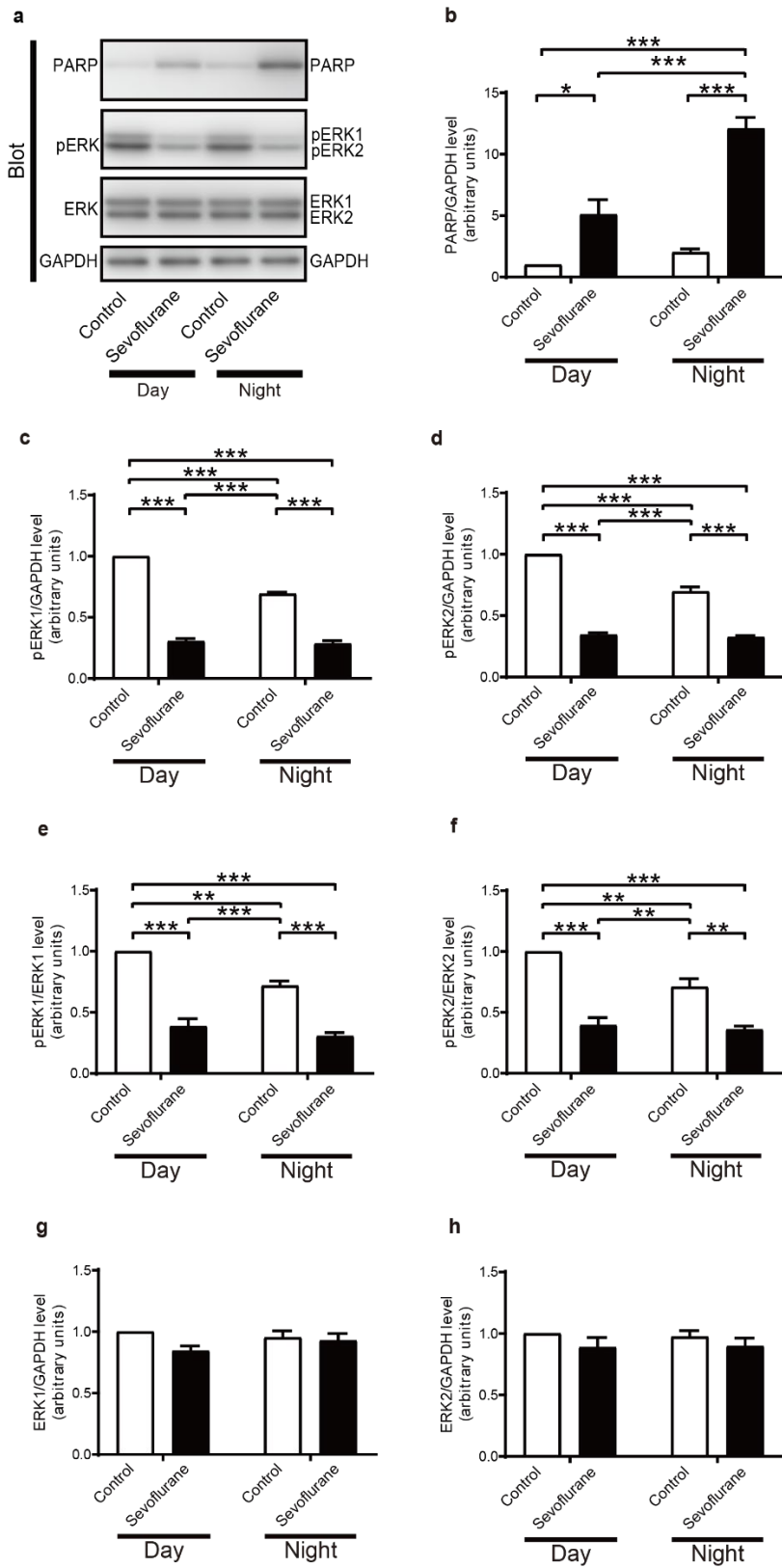


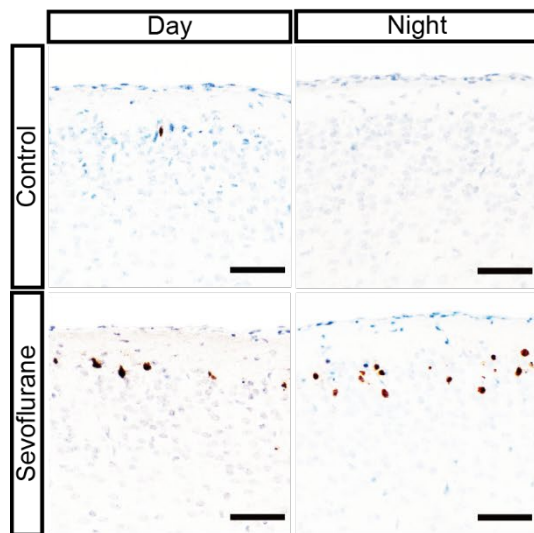
Figure 3 昼または夜のセボフルラン曝露による P6 マウス大脳におけるアポトーシスお

よび pERK 発現量の比較

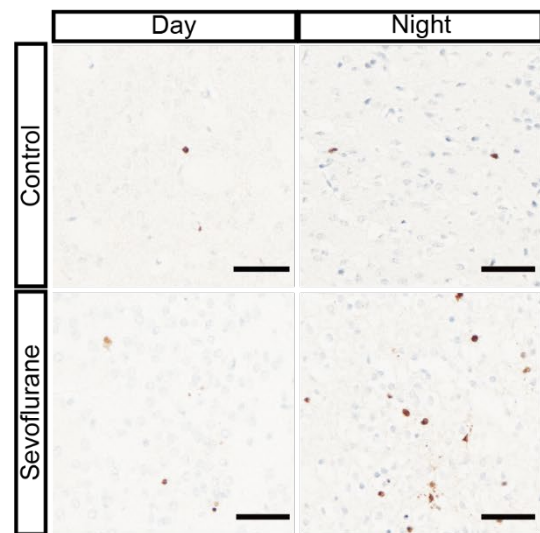
(a)ウェスタンブロット法により、セボフルラン曝露後の P6 マウス大脳における cleaved PARP、pERK および ERK 発現量を、昼夜で対照群と比較した(各群 n = 4)。(b)セボフルラン曝露によって生じる cleaved PARP 発現量は、昼夜ともに対照群と比べ増加した。また、cleaved PARP 発現量は昼より夜の曝露で有意に増加していた。(c)-(f)対照群では、夜より昼で pERK1/2 発現量の有意な増加を認めた。一方、セボフルラン曝露によって pERK1/2 の発現量は同程度にまで抑制された。(g)-(h) ERK1/2 の総発現量は、昼夜やセボフルラン曝露の有無によらず一定であった。(b)-(d)、および(g)-(h)では内部標準として、GAPDH を用いた。また、(e)では ERK1 を、(f)では ERK2 を、それぞれ内部標準として用いた。データの表記は、mean ± SEM。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$  (各群 n = 4)。

Figure 4

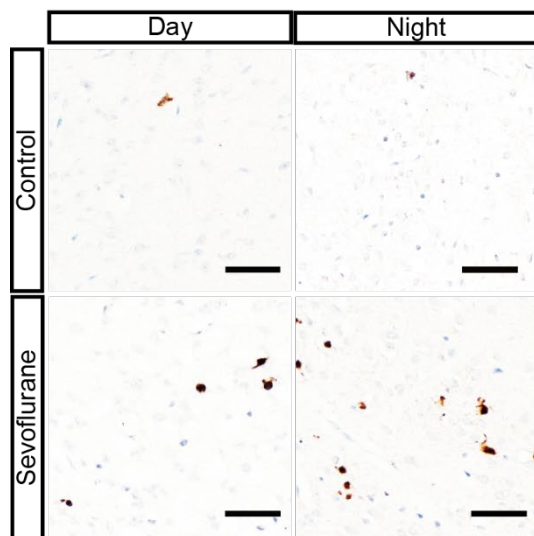
**a** Cortex layer II



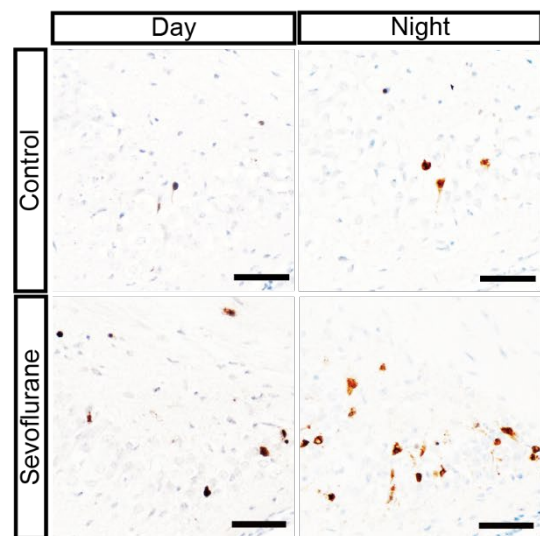
**b** Amygdala



**c** Thalamus



**d** Subiculum



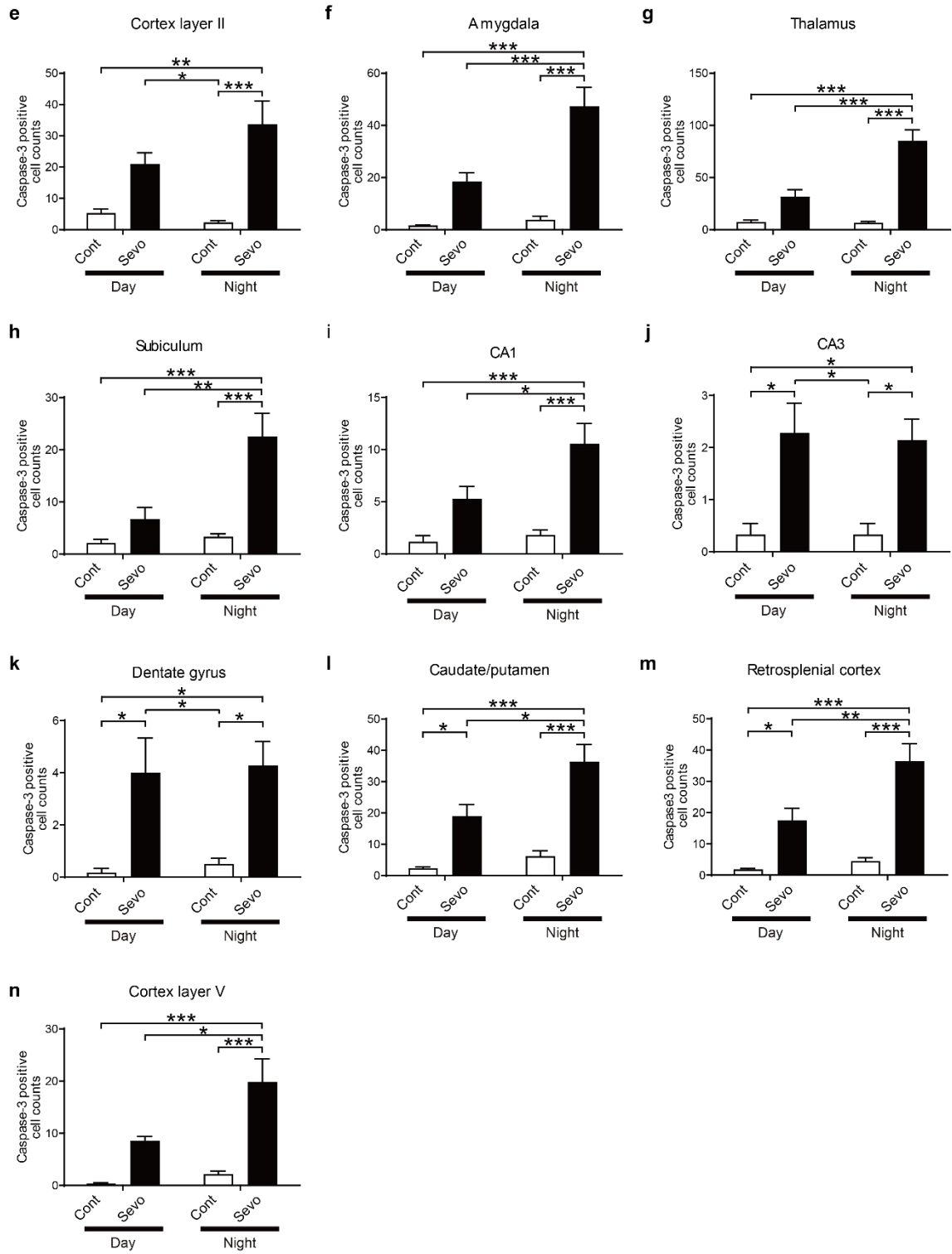


Figure 4 昼または夜のセボフルランの曝露による P6 マウス脳各部位における

activated caspase-3 (AC-3)染色像および AC-3 陽性細胞数の比較

(a)-(d)P6 マウスの頭頂葉皮質第 II 層(Cortex layer II)、扁桃体(Amygdala)、視床(Thalamus)、海馬台(Subiculum)の各部位における、昼または夜のセボフルラン曝露ごとのアポトーシスの比較。茶色の点のアポトーシスの指標となる AC-3 陽性細胞。マウスは 4%PFA により灌流固定、Scale bars: 50  $\mu$ m。 (e)-(n)各部位での activated caspase-3 陽性細胞数。(e)頭頂葉皮質第 II 層、(f)扁桃体、(g)視床、(h)海馬台、(i)海馬 CA1 領域、(j)海馬 CA3 領域、(k) Dentate gyrus = 歯状回、(l) Caudate/putamen = 尾状核、被核、(m) Retrosplenial cortex = 脳梁膨大部皮質、(n) Cortex layer V = 頭頂葉皮質 V 層。データの表記は、mean  $\pm$  SEM。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$  (各群 n = 6-7)。



Figure 5

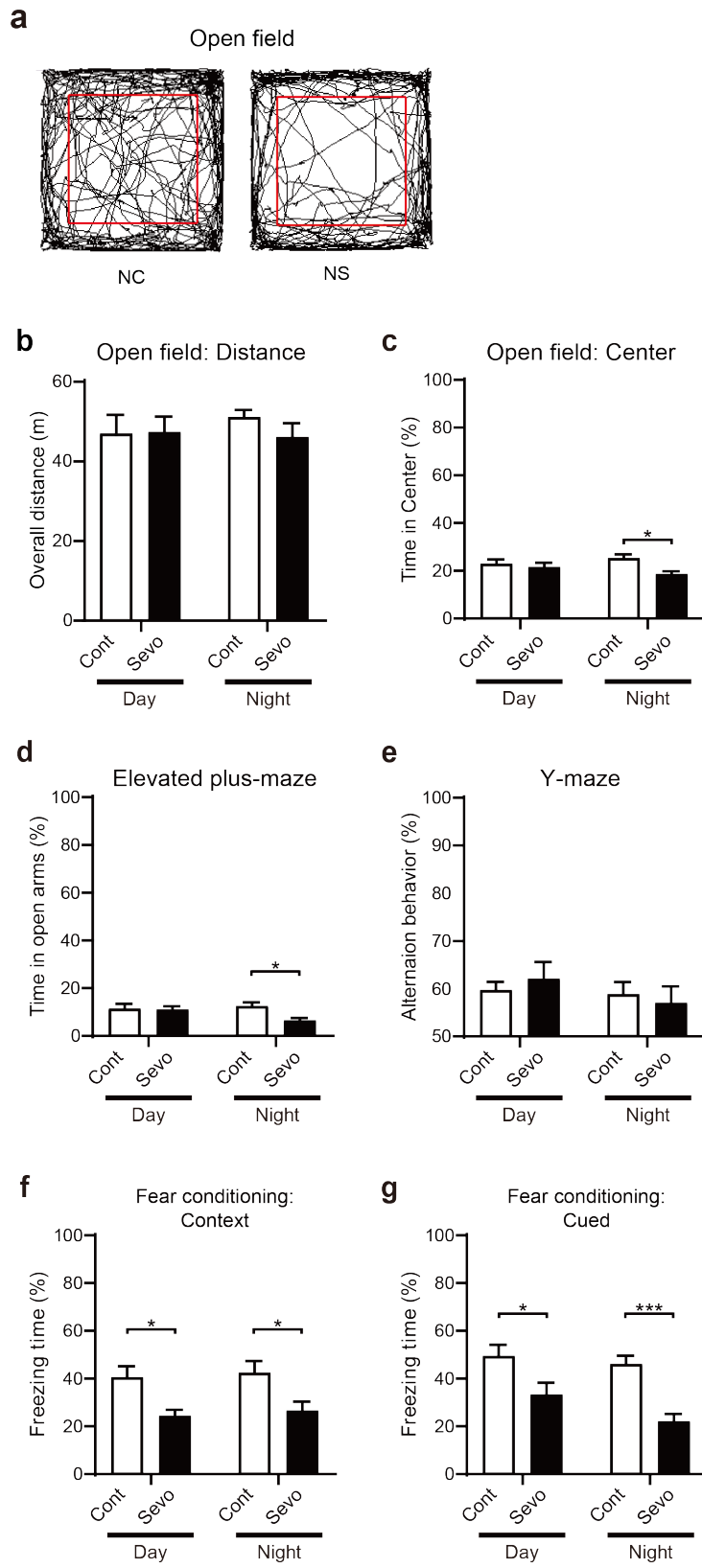
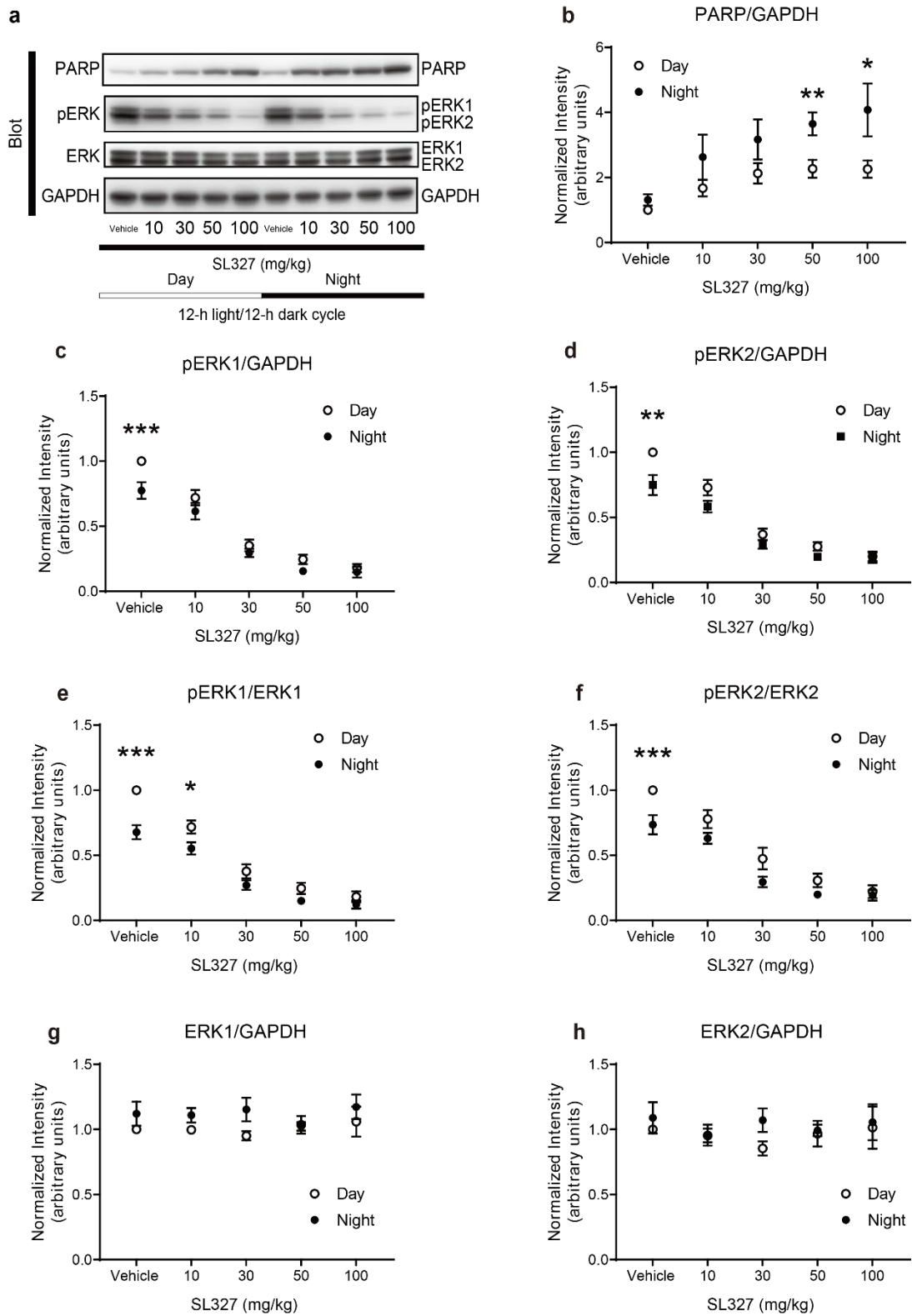


Figure 5 P6 マウスに対する昼または夜のセボフルラン曝露が、マウスの成長後の精神行動に与える影響

(a)オープンフィールドテストにおいてマウスが移動した軌跡の例。赤枠は、オープンフィールドの面積の 50%にあたる範囲(中央部)。NC = Night control 群: P6 マウスに対して夜に酸素濃度 30%のキャリアーガスを曝露した群。NS = Night sevoflurane 群: P6 マウスに対して夜に 2%セボフルランを曝露した群。(b)オープンフィールドテストにおけるマウスの総移動距離(Open field test: distance)。昼夜およびセボフルラン曝露の有無によらず、新奇空間の総探索距離に有意差を認めない(各群 n = 13)。(c)オープンフィールドテストにおけるマウスの中央部滞在時間(Open field test: center)。夜にセボフルランを曝露した群のみ、対照群と比較して有意に新奇空間の中央部滞在時間が短縮する(各群 n = 13)。(d)高架式十字迷路テスト(Elevated plus-maze test)。夜にセボフルランを曝露した群のみ、対照群と比較して有意にオープンアーム滞在時間は短縮した(各群 n = 13)。(e) Y 迷路テスト(Y-maze test)。昼夜やセボフルラン曝露の有無によらず、自発的交替行動率に有意差は認めなかった(各群 n = 19-20)。(f)恐怖条件付けテスト(恐怖文脈条件)(Fear conditioning: context testing)。対照群と比較してセボフルラン群ですくみ反応時間は有意に短縮するが、昼夜による有意差は認めなかった(各群 n = 19-20)。(g)恐怖条件付けテスト(恐怖音条件)(Fear conditioning: cued testing)。対照群と比較してセボフルラン群ですくみ反応時間は有意に短縮するが、昼

夜による有意差は認めなかった(各群 n=19-20)。データの表記は、mean ± SEM。\* $P$   
< 0.05、\*\*\* $P$  < 0.001。

Figure 6



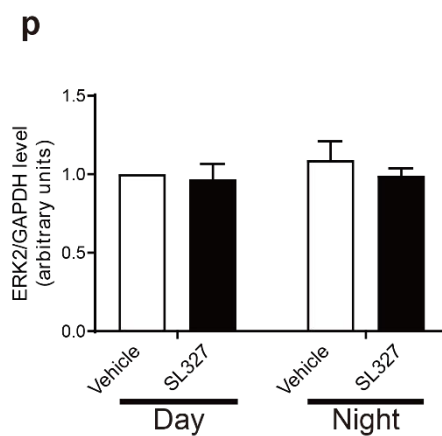
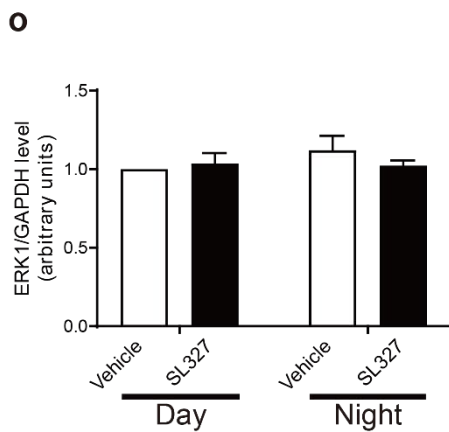
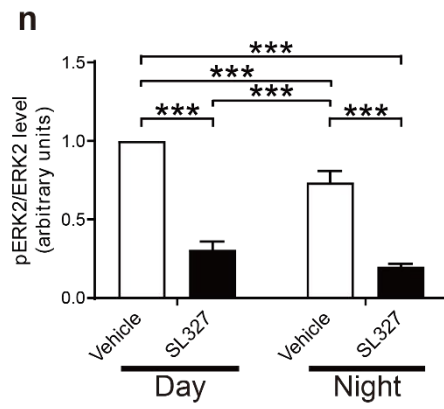
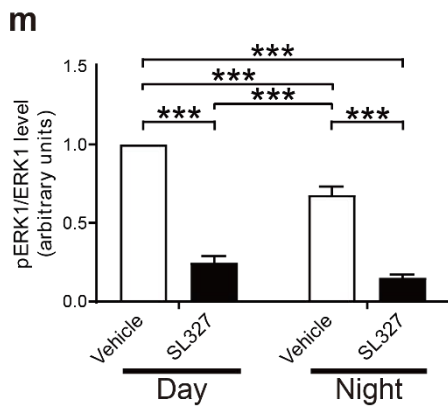
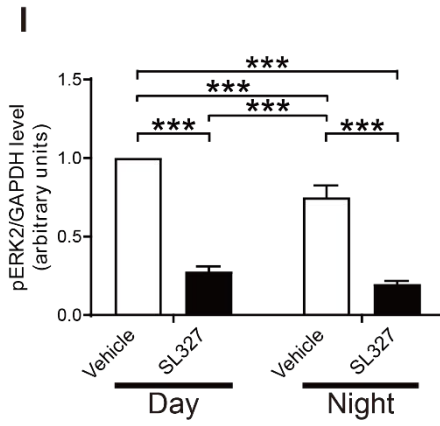
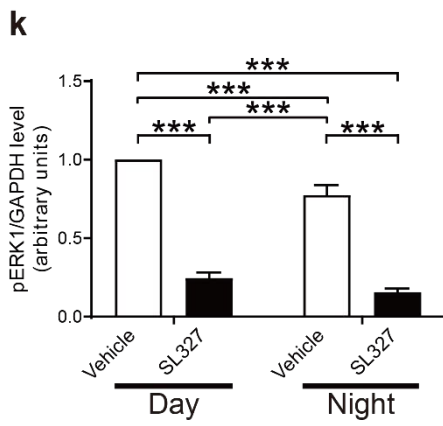
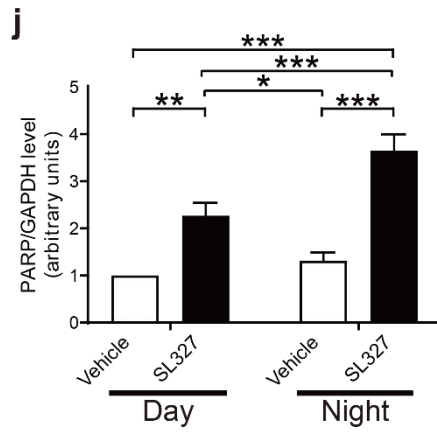
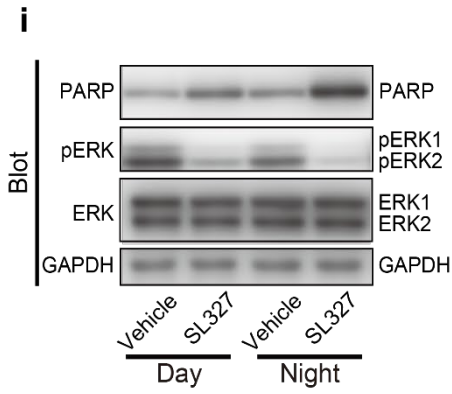


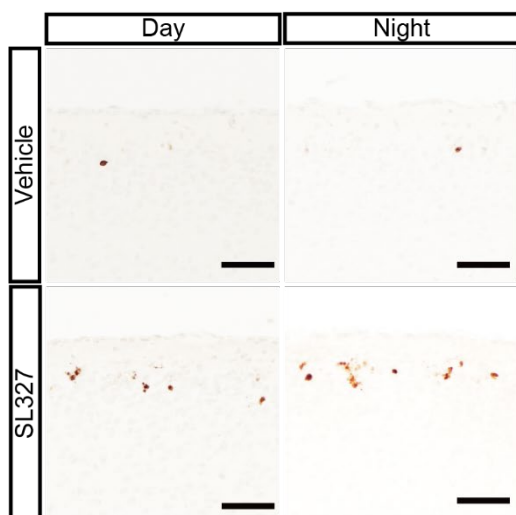
Figure 6 昼または夜の SL327 の投与量が P6 マウス大脳のアポトーシス、pERK および ERK 発現量に及ぼす影響

(a)昼または夜に SL327 をそれぞれ 0、10、30、50、100 mg/kg 投与した際の、P6 マウス大脳における cleaved PARP、pERK1/2 および ERK1/2 の発現量をウェスタンブロット法により比較した。(b) cleaved PARP の発現量は昼夜共に、SL327 投与量増加に伴って増加した。また、50 mg/kg 以上の SL327 投与で、昼と比べ夜で有意に高値を示した。(各群 n = 8-12)。(c)-(f) pERK1/2 の発現量は、夜 Vehicle を投与した対照群より昼の対照群で有意に高値を示すが、pERK1 で SL327 10-30 mg/kg 以上、pERK2 で SL327 10 mg/kg 以上を腹腔内投与すると、昼夜の発現量の有意差は消失した(各群 n = 8-12)。(g)-(h) ERK1/2 の総発現量は、昼夜や SL327 の投与の有無によらず一定であった(各群 n = 8-12)。(i)昼または夜に、P6 マウスに対して SL327 50 mg/kg または Vehicle を投与した際の、大脳 cleaved PARP、pERK1/2 および ERK1/2 の発現量をウェスタンブロット法により比較した。(j)昼夜における SL327 の投与は、Vehicle 群と比較して有意に cleaved PARP 発現量を増加した。また、SL327 の投与による cleaved PARP 発現量は、昼と比べて夜で有意に増加した(各群 n = 8-12)。(k)-(n) pERK1/2 の発現量は、昼夜共に、SL327 の投与で有意に低下した。また、Vehicle 群で認められた昼夜における pERK1/2 の発現量の有意差は、SL327 の投与で消失した(各群 n = 8-12)。(o)-(p) ERK1/2 の総発現量は、昼夜や SL327 の投与の有無によ

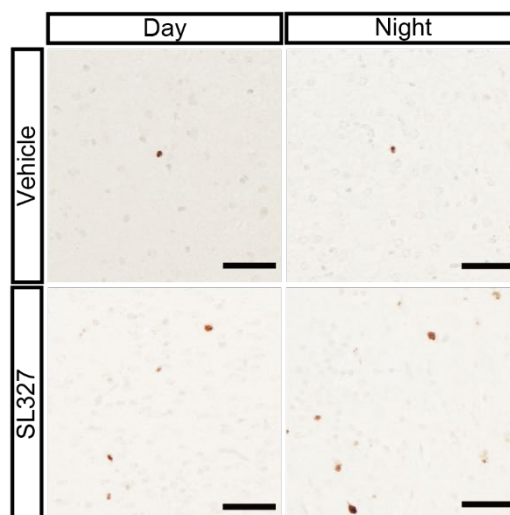
らず一定であった(各群  $n = 8-12$ )。 (b)-(d)、 (g)-(h)、 (j)-(l)、 (o)-(p)では内部標準として、 GAPDH を用いた。 また、 (e)(m)では ERK1 を、 (f)(n)では ERK2 を、 それぞれ内部標準として用いた。 データの表記は、  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 。 (b)-(h)、 (j)-(p)  $*P < 0.05$ 、  $**P < 0.01$ 、  $***P < 0.001$ 。

Figure 7

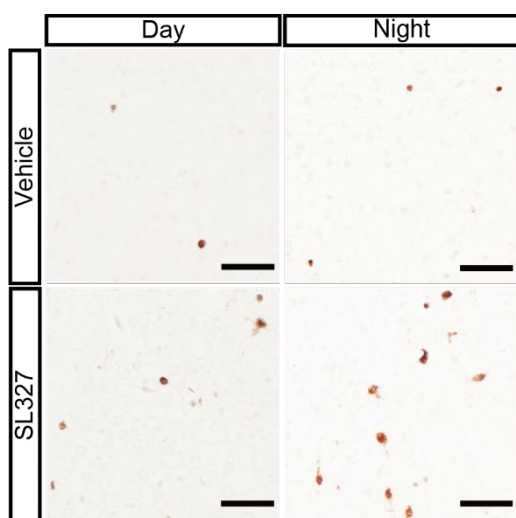
**a** Cortex layer II



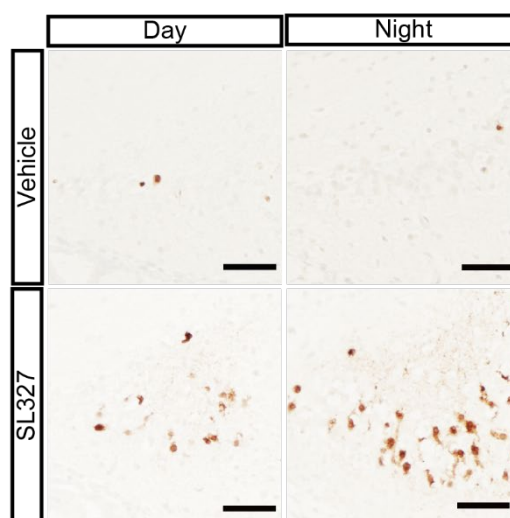
**b** Amygdala



**c** Thalamus



**d** Subiculum





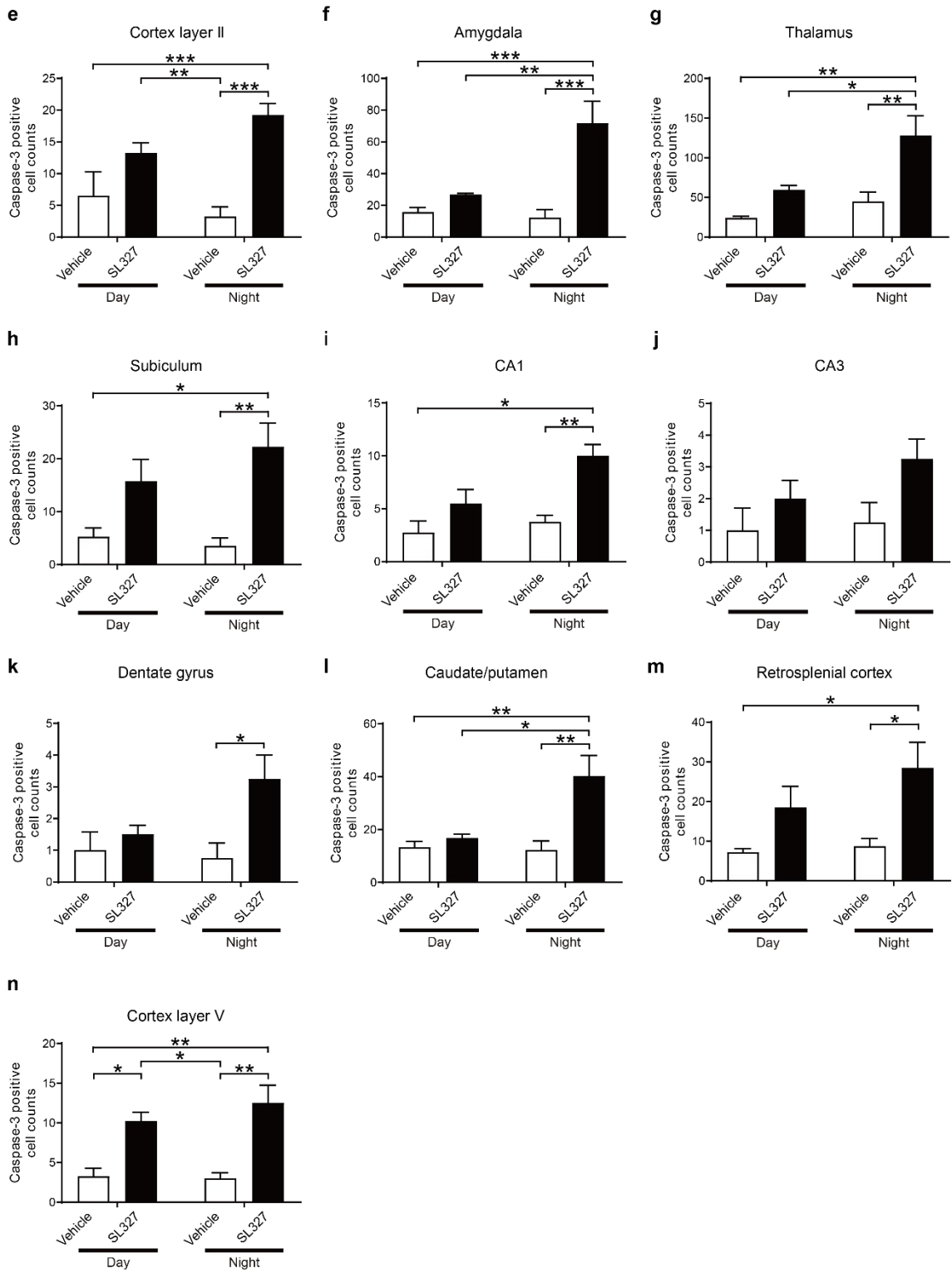


Figure 7 昼または夜の SL327 の投与による P6 マウス脳各部位における AC-3 染色像および AC-3 陽性細胞数の比較

色像および AC-3 陽性細胞数の比較

(a)-(d)P6 マウスの頭頂葉皮質第 II 層(Cortex layer II)、扁桃体(Amygdala)、視床(Thalamus)、海馬台(Subiculum)の各部位における、昼または夜の SL327 の投与ごとの AC-3 染色像の比較。茶色の点がアポトーシスの指標となる AC-3 陽性細胞。マウスは 4%PFA により灌流固定、Scale bars: 50  $\mu$ m。 (e)-(n)各部位での、昼または夜の SL327 の投与ごとの AC-3 陽性細胞数の比較。(e)頭頂葉皮質第 II 層、(f)扁桃体、(g)視床、(h)海馬台、(i)海馬 CA1 領域、(j)海馬 CA 3 領域、(k) Dentate gyrus = 歯状回、(l) Caudate/putamen = 尾状核、被核、(m) Retrosplenial cortex = 脳梁膨大部皮質、(n) Cortex layer V = 頭頂葉皮質 V 層。データの表記は、mean  $\pm$  SEM。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$  (各群 n = 4)。

Figure 8

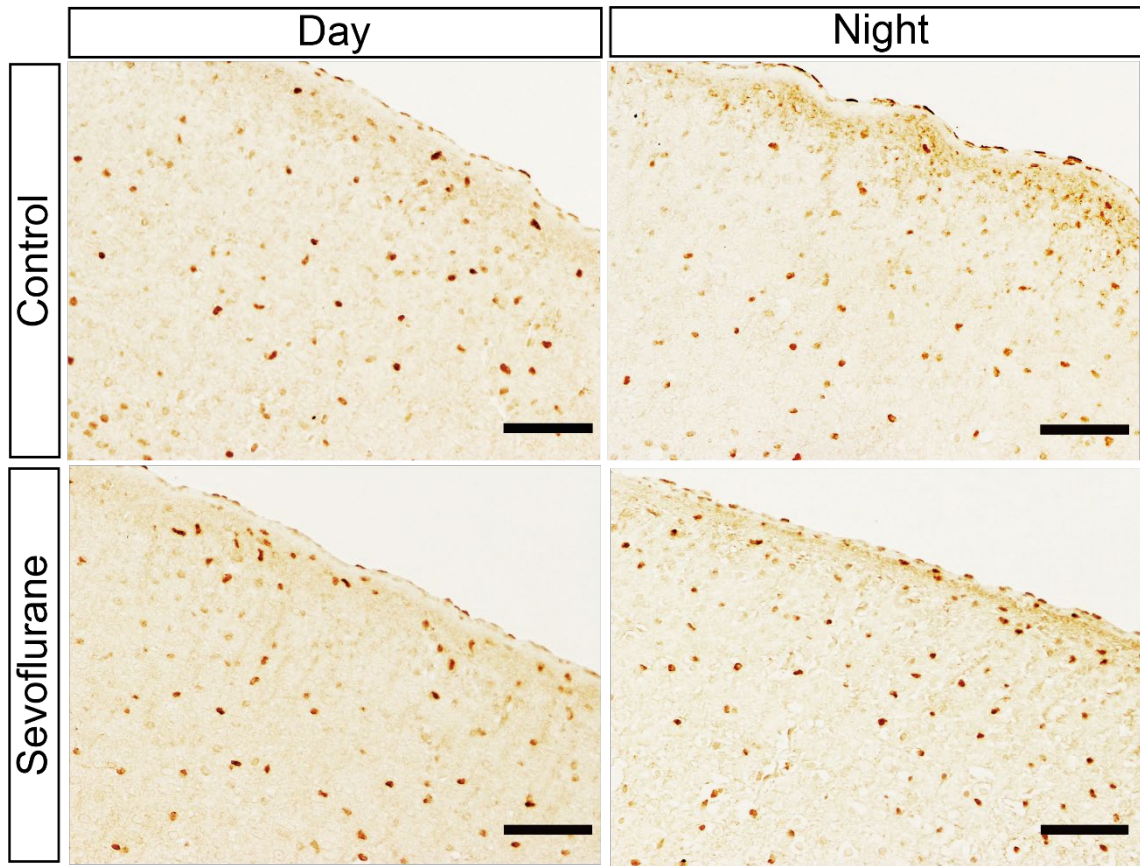


Figure 8 昼または夜のセボフルラン曝露による P6 マウスの脳における c-Fos 染色像  
の比較

P6 マウスの頭頂葉皮質第 II 層(Cortex layer II)における、昼または夜のセボフルラン曝露ごとの c-Fos 発現量の比較。茶色の点が c-Fos 陽性細胞。マウスは 4% PFA により灌流固定、Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ 。