

原 著

## ブメタニドはマウス新生仔期セボフルラン曝露による 認知機能障害を予防する

獨協医科大学医学部 麻酔科学

秦 要人

**要 旨** 小児期のセボフルラン曝露は長期認知機能障害の原因となる可能性が示唆されている。本研究では、セボフルラン曝露による認知機能障害のメカニズムに細胞内  $Cl^-$  濃度バランスが与える影響を明らかにする目的で、新生仔マウスに NKCC1 阻害薬であるブメタニドを投与し、セボフルラン曝露マウスの認知行動を観察した。

ICR マウス (生後 3~5 日, 11~13 日, 19~21 日) を 2.1% セボフルランに 4 時間曝露, 生後 49 日目に水迷路試験, オープンフィールド試験, プレパルス抑制試験を施行した。また新生仔マウス (生後 3~5 日) にブメタニドを腹腔内投与し, 注射直後にセボフルランに曝露させ, 行動試験を行い, 対照群と比較した。

生後 3~5 日目にセボフルランに曝露させたマウスでは, 対照マウスと比較して水迷路試験における遊泳距離の増加, オープンフィールド試験における移動距離と立ち上がり回数の増加, プレパルスによる驚愕反応抑制の低下を示した。一方, これらの変化は, ブメタニドにより抑制された。

新生仔期のセボフルラン誘発性認知機能障害に, 細胞内  $Cl^-$  濃度の増加によって起こる  $GABA_A$  受容体を介した脱分極が関与している可能性が示唆された。

**Key Words** : セボフルラン, 新生仔マウス, 認知機能障害, GABA, ブメタニド

### 緒 言

セボフルランなどの揮発性麻酔薬は, その導入の速さと使いやすさから, 今も世界中で臨床使用されている。しかし, これらの全身麻酔薬は臨床使用濃度で齧歯類の幼若脳で広範囲のアポトーシスを誘発することが報告されている<sup>1~3)</sup>。さらに小児期の全身麻酔薬の投与は, 発達後の認知行動の長期障害の原因となり<sup>4~6)</sup>, 小児医療における全身麻酔薬の臨床使用に懸念を生じさせている。

新生仔期の麻酔薬曝露後の認知機能障害は, 齧歯類を用いた行動実験で報告されている。この中には, Morris 水迷路試験によって明らかにされた学習・記憶機能<sup>3,7~9)</sup>, およびオープンフィールド試験によって明らかにされた情動行動<sup>10,11)</sup>, そしてプレパルス抑制試験に

よって明らかにされた感覚ゲーティングが含まれる<sup>12,13)</sup>。しかし, 新生仔期の全身麻酔によって生じる認知機能障害のメカニズムの大部分はいまだに不明である。

揮発性麻酔薬であるセボフルランの主な効果は, 成熟脳における  $GABA_A$  およびグリシン受容体の活性化による抑制性シナプス伝達の亢進である。生後発育の初期段階のニューロンは  $Cl^-$  の細胞内濃度が上昇しているため, 発達初期における脳では,  $GABA_A$  受容体の活性化によってニューロンの脱分極が起こるといわれている<sup>14,15)</sup>。そして新生仔期のセボフルラン曝露によって誘発された  $GABA_A$  受容体を介した脱分極は, ニューロンのアポトーシスおよび認知機能障害の原因となる可能性が示唆されている。

$Na-K-2Cl$  共輸送体である NKCC1 は, 早期新生仔発育段階 (生後 5~7 日) に多く発現し, 未成熟ニューロンの  $GABA_A$  受容体を介した脱分極を促進することが示されている<sup>16,17)</sup>。一般的に NKCC1 発現量は, 成長とともに次第に減少し, 生後 20 日目までに成体レベルにまで低下する。また, 未成熟ニューロンの  $GABA_A$  受容体

平成 28 年 10 月 31 日受付, 平成 28 年 11 月 24 日受理  
別刷請求先: 秦 要人

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880  
獨協医科大学医学部 麻酔科学

を介した脱分極は、NKCC1の特異的阻害剤であるブメタニドによって阻害されることが報告されている<sup>15)</sup>。したがって、ブメタニドが新生仔期のセボフルラン誘発性神経細胞アポトーシスを防止し、新生仔期に生じる認知機能障害を予防するという仮説を立て、新生仔マウスのセボフルラン曝露によって誘発される認知機能障害に対するブメタニドの影響を行動学的に明らかにし、GABA<sub>A</sub>受容体を介した脱分極が、新生仔期のセボフルラン曝露による認知機能障害の機序を解明することを研究の目的とした。

## 方 法

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

### 1. 対 象

雄性ICRマウスを使用した。温度制御された飼育室において、明暗周期を12時間とし、すべての実験は明期に行った。また餌、水分は自由に摂取できるようにした。

### 2. セボフルランの曝露

ICRマウスを無麻酔群(対照群)と4群の麻酔群(生後3~5日目(sevoP4)、生後11~13日目(sevoP12)、および生後19~21日目(sevoP20)に麻酔を行った)に無作為に割り付けた。麻酔導入は100%酸素(1.5l/min)下に5%セボフルランを用いて、立ち上がり反射が消失するまで行った。その後、100%酸素(1.5l/min)下に2.1%セボフルランを用いて4時間の麻酔維持を行った。4時間後、回復のために100%酸素を投与した。対照群の動物は、100%酸素が流れるチャンパー内に4時間留置した。(体重sevoP4:3.0~4.5g, sevoP12:5.3~7.8g, sevoP20:10.34~12.25g)

### 3. ブメタニドの前投与

SevoP4マウスにブメタニド(5 $\mu$ M/kg)(sevoP4+bume)または生理食塩水をセボフルラン曝露開始の15分前に腹腔内投与した<sup>15)</sup>。

### 4. Morris 水迷路試験

セボフルラン曝露後の学習、記憶機能を評価する目的で、Morris水迷路試験を行った<sup>3,7-9)</sup>。水迷路試験は、25~29℃に維持した水で満たされた直径1.2mのプールで行われ、プールの水面下1.0cmにプレキシガラスのプラットフォーム(直径10cm)を設置した。訓練のため、各群に4日間連続で1日2回のセッションを行い、

1セッションは3回の試行により構成された。各試行ではマウスにプラットフォーム探索を60秒以内で行わせ、プラットフォーム到達の20秒後にプールから取り出した。60秒以内にプラットフォームを見つけられなかったマウスはプールから取り出し、プラットフォーム上に20秒間留置した。尚、マウスのリリースポイントはランダムとし、出発点からプラットフォームまでの水泳距離は、画像追跡ソフトウェアであるImage Tracker PTV(デジモ, 大阪, 日本)を用いて測定した。最終試行終了後、プラットフォームを除去し、60秒間のプローブテストを行った。プローブテストは、プールを等サイズの4領域に分割し、プラットフォームの存在した領域内を泳いだ時間の割合を測定した。

### 5. オープンフィールド試験

セボフルラン曝露後の情動行動を評価する目的でオープンフィールド試験を行った<sup>10,11)</sup>。16の正方形(10×10cm)に分けたアリーナ(40×40×20cm)で行い、正方形は壁からの距離によって、border(12個)とcentral(4個)に分類した。試験開始時、マウスをアリーナ中央に置き、1回の試験でマウスに5分間、Image Tracker PTV(デジモ, 大阪, 日本)を用いてその行動を記録した。(1)立ち上がり回数、(2)移動距離、(3)中心に滞在していた時間について計測し、各試験セッションの合間に、オープンフィールド装置を40%エタノールで洗浄した。

### 6. プレパルス抑制試験

PPI試験は防音箱で行なった。マウスをプレキシガラスのシリンダ内に留置し、106dB、40msから成る音響刺激をマウス頭部前方6cmのスピーカーから与え、その驚愕反応を記録した。プレパルス(64, 68, 72, 76, 80dB:20ms)およびパルス(プレパルス発生後の100ms後)から構成される音響刺激を加え、シリンダに取り付けた<sup>12,13)</sup>、振動を電気信号に変換する圧電加速度計ユニットにより記録を行った。プレパルスによるパルスに対する驚愕反応の抑制の割合をプレパルス抑制(pre-pulse inhibition:PPI)と定義した。

### 7. 統 計

すべての結果は平均値 $\pm$ 標準誤差(SEM)で示し、統計解析は一元配置分散分析法(one-way analysis of variance:one-way ANOVA)および二元配置分散分析法(two-way analysis of variance:two-way ANOVA)を行った。また事後の多重比較検定としてDunnett検定またはFisherの最小有意差法を行い、統計学的有意

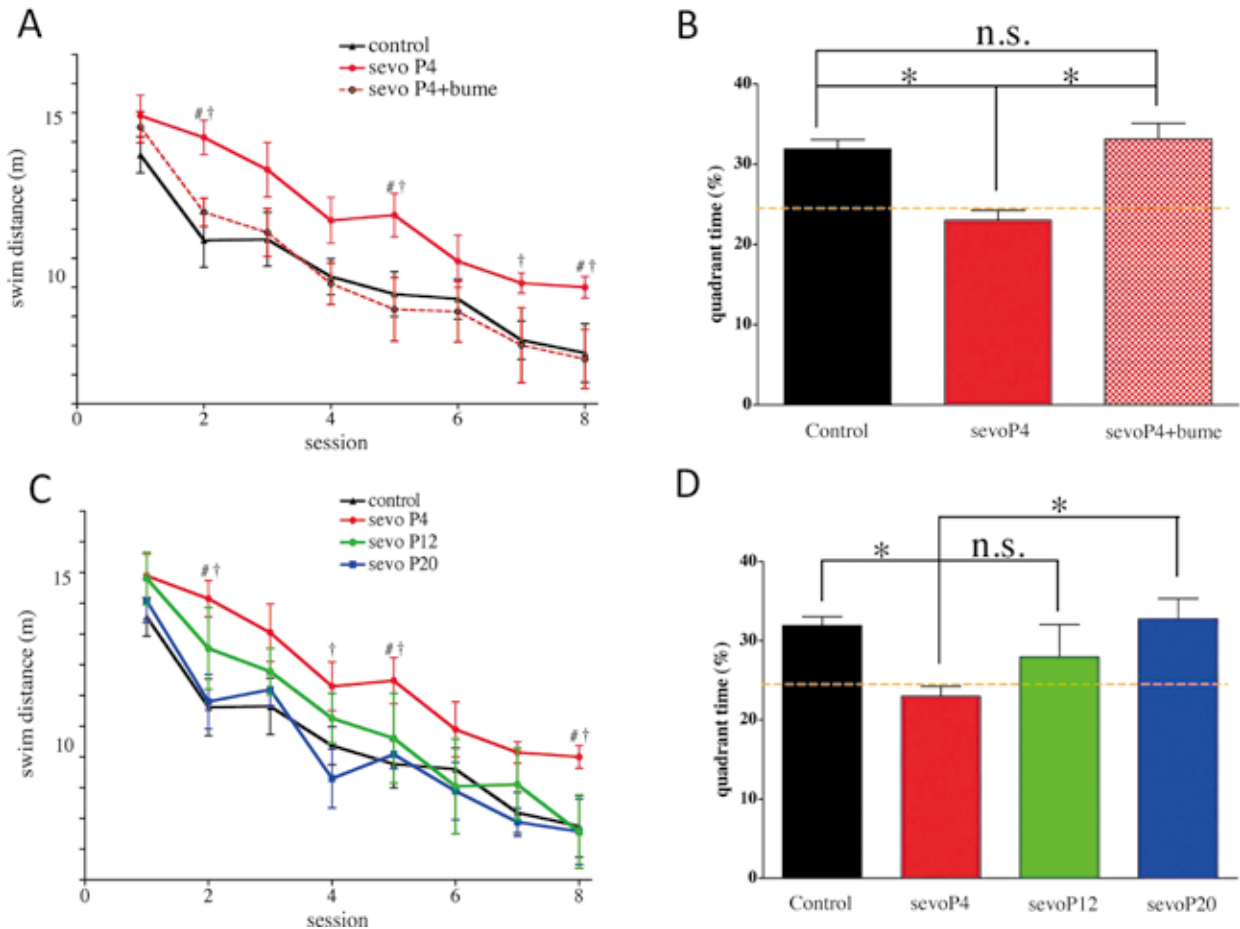


図1 新生仔期セボフルラン曝露が水迷路試験に及ぼす影響

(A) ブメタニド前投与がセボフルラン曝露後の水泳距離に及ぼす影響を示す。sevoP4の水泳距離は対照群と比べ有意に増加しており (# $P < 0.05$ )。sevoP4+bumeの水泳距離はsevoP4よりも有意に短く ( $\dagger P < 0.05$ )。対照マウスと有意差はなかった。(B) ブメタニドの前投与が新生仔期マウスのセボフルラン曝露後のプローブ試験に与える影響を示す。Quadrant timeはsevoP4では対照群に比べ有意に短くなっており ( $*P < 0.05$ )。その短縮はブメタニド前投与によって予防された ( $*P < 0.05$ )。(C) 成長過程におけるセボフルラン曝露後の水迷路試験への影響を示す。sevoP12およびsevoP20の水泳距離は対照マウスと同等であったが、sevoP4の水泳距離はセッション2, 5および8において、対照マウスより有意に長かった (# $P < 0.05$ )。さらにsevoP4の水泳距離は、セッション2, 4, 5および8でsevoP20より有意に長かった ( $\dagger P < 0.05$ )。(D) 成長過程におけるセボフルラン曝露後のプローブ試験への影響を示す。sevoP4では、quadrant timeが対照およびsevoP20よりも短くなっていった ( $*P < 0.05$ )。一方、sevoP12はsevoP4と有意差はなかった。

水準は  $P < 0.05$  とした。

## 結 果

### セボフルラン曝露が水迷路試験に及ぼす影響：ブメタニド前投与の効果

SevoP4 ( $n = 7$ ) は、セッション2, 5, 8において、対照群 ( $n = 9$ ) よりも有意に水泳距離が長かった ( $P < 0.001$ ) (図1A)。しかし、ブメタニドを前投与されたsevoP4マウス (sevoP4+bume) ( $n = 11$ ) の水泳距離は、セッション2, 5, 8においてsevoP4マウスよりも有意に短く ( $P < 0.001$ )。対照マウス群の距離と比べ、い

ずれのセッションにおいても有意差は認めなかった。プローブテストでは、sevoP4のtarget quadrantにおける滞在時間は対照マウス群と比べ有意に短く ( $P < 0.05$ )。sevoP4+bumeの滞在時間はsevoP4に比べ有意に長かった ( $P < 0.05$ ) (図1B)。SevoP4+bumeと対照群との比較では、有意差は認めなかった。

### セボフルラン曝露が水迷路試験へ及ぼす影響：成長過程における変化

水迷路試験において、対照群、sevoP4、sevoP12、sevoP20それぞれの水泳距離を比較したところ、

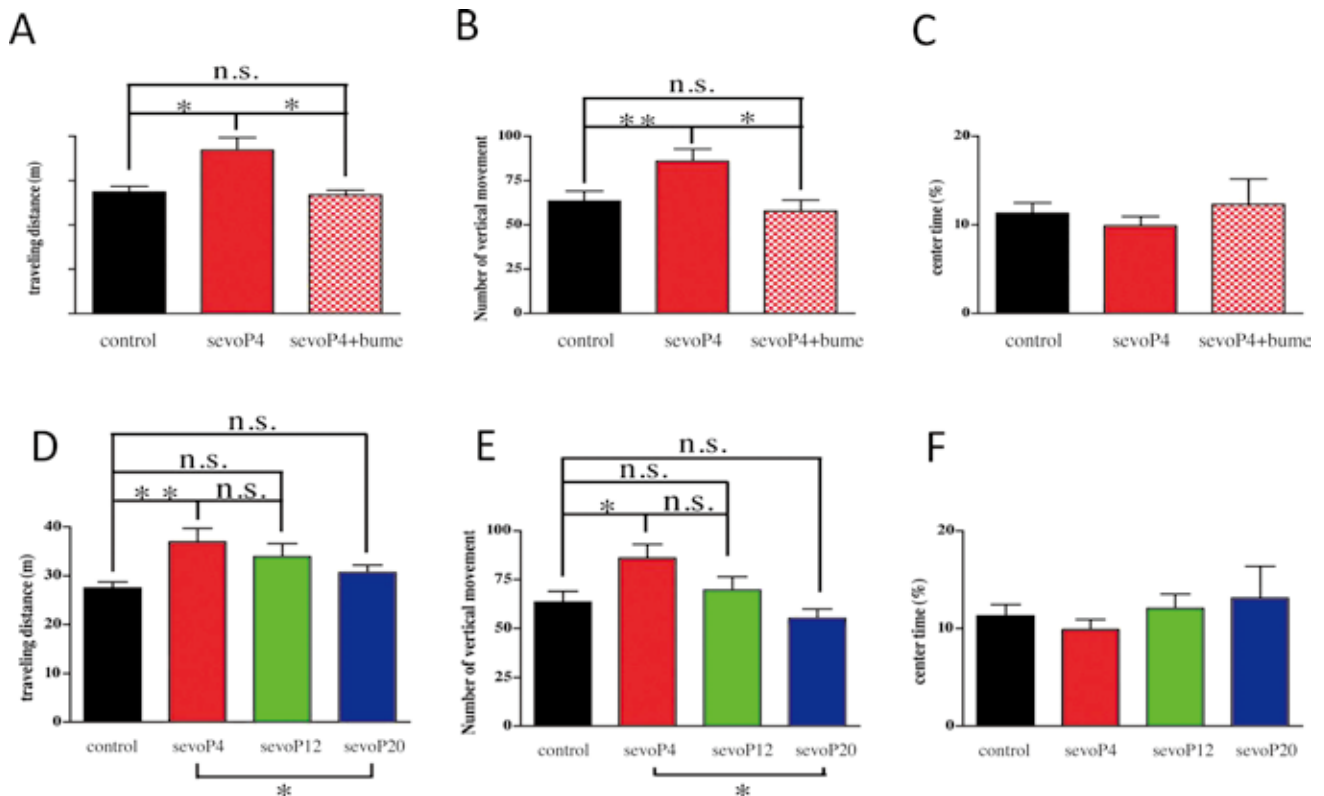


図2 セボフルラン曝露がオープンフィールド試験に及ぼす影響

(A-C) プメタニド前投与がセボフルラン曝露後のオープンフィールド試験に及ぼす影響を示す。(A) sevoP4のアリーナ内の移動距離は対照群に比べ有意に増加しており (\*  $P < 0.05$ ), sevoP4+bumeでは、これらの増加は改善された (\*  $P < 0.05$ )。 (B) 立ち上がり回数は、sevoP4において有意に増加しており (\*  $P < 0.05$ ), sevoP4+bumeではこれらの増加は改善された (\*  $P < 0.05$ )。 (C) Center timeは、すべての群間において有意差はなかった。(D-F) 成長過程におけるセボフルラン曝露後のオープンフィールド試験への影響を示す。(D) sevoP4のアリーナ内の移動距離は、対照群 (\*\* $P < 0.01$ ) および sevoP20 (\* $P < 0.05$ ) と比べ有意に大きかった。一方、sevoP12では、対照群と sevoP4 の中間の値を示し、これらの値は対照および sevoP4 と有意差がなかった。(E) 立ち上がり回数は、sevoP4 は対照群 (\*\* $P < 0.01$ ) および sevoP20 (\* $P < 0.05$ ) と比べ有意に増加していた。一方、sevoP12では、対照群と sevoP4 の中間の値を示したが、対照および sevoP4 と有意差がなかった。(F) Center timeは、すべての群間において有意差はなかった。

sevoP12 (n=9) および sevoP20 (n=7) は、対照群と比べ有意な差はなかったが、sevoP4の水泳距離は対照群に比べ、セッション2, 5, 8において有意に長かった ( $P < 0.001$ ) (図1C)。さらにsevoP4の水泳距離はsevoP20と比べるとセッション2, 4, 5, 8において有意に長かった ( $P < 0.0001$ )。プローブテストでは、sevoP4のtarget quadrant timeは、対照マウス群およびsevoP20のそれと比べ有意に短かった ( $P < 0.01$ ) (図1D)。

#### セボフルラン曝露がオープンフィールド試験に及ぼす影響：ブメタニド前投与の効果

アリーナにおける移動距離は、sevoP4 (n=11) では、対照マウス群 (n=9) と比べ有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。さらに、sevoP4で増加していた移動距離は

sevoP4+bume (n=12) では有意に短縮しており ( $P < 0.05$ )、対照群と変わらなかった (図2A)。同様に立ち上がり行動についても、sevoP4の立ち上がり回数は対照群と比べ有意に増加していた ( $P < 0.01$ )。さらにsevoP4+bumeでは、増加していた立ち上がり回数が有意に減少しており ( $P < 0.05$ )、対照群と同等であったことを示した (図2B)。中央の滞在時間は、すべての群間で有意差がなかった (図2C)。

#### セボフルラン曝露がオープンフィールド試験に及ぼす影響：成長過程における変化

SevoP4の移動距離は対照群に比べ有意に増加していた。さらにsevoP20 (n=7) と比べても有意に増加していた ( $P < 0.01$ ) (図2D)。一方、sevoP12 (n=9) との比較においては有意な差は認めなかった。またsevoP12

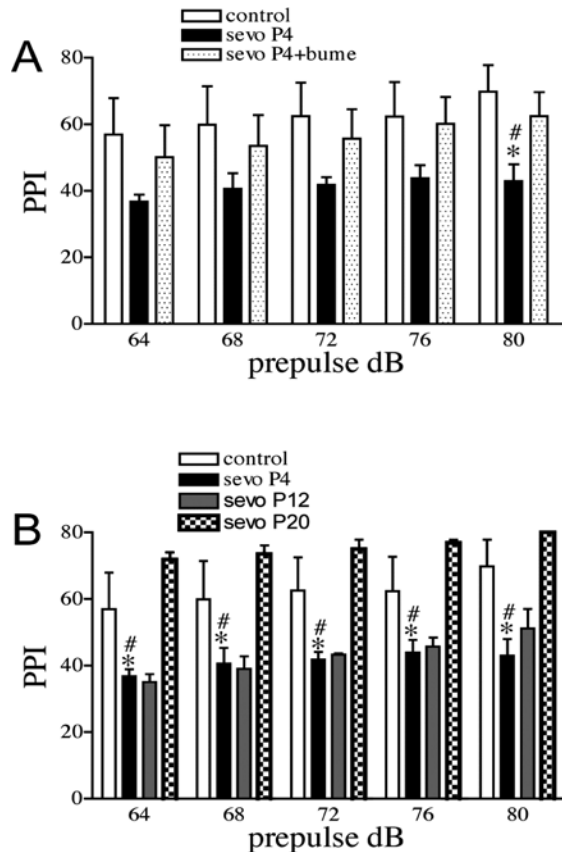


図3 セボフルラン曝露がプレパルス抑制 (PPI) 試験に及ぼす影響

(A) ブメタニド前投与がセボフルラン曝露後の PPI に及ぼす影響を示す。sevoP4 において 80 dB のプレパルス抑制 (PPI) は有意に減弱しており (\* $P < 0.05$ )、これらの減弱はブメタニド前投与により予防された (# $P < 0.05$ )。 (B) sevoP12 および sevoP20 の PPI は、いずれの刺激においても対照群と有意差はなかったが、sevoP4 は対照群と比べ、PPI が有意に減弱しており (\* $P < 0.05$ )、さらに sevoP20 と比べても有意に減弱していた (\* $P < 0.05$ )。

および sevoP20 は、対照群と差がなかった。立ち上がり行動についても同様に、sevoP4 の立ち上がり回数は、対照群および sevoP20 と比べ有意差に増加していたが ( $P < 0.05$ )、sevoP12 との差は認めなかった (図 2E)。中央の滞在時間は、全ての群間で有意差がなかった (図 2F)。

#### セボフルラン曝露がプレパルス抑制試験に及ぼす影響：ブメタニド前投与の効果

SevoP4 ( $n = 4$ ) におけるプレパルスによる驚愕反応の抑制 (PPI) は、80 dB の刺激において対照マウス ( $n = 4$ ) と比べ有意に減弱し ( $P < 0.001$ )、さらにこれらの減弱はブメタニドの前投与により改善した (図 3A)。

#### セボフルラン曝露がプレパルス抑制試験に及ぼす影響：成長過程における変化

SevoP4 および sevoP12 ( $n = 3$ ) の PPI は、すべてのプレパルス振幅において、対照マウスに比べ有意に減弱していた (sevoP4 :  $P < 0.05$ , sevoP12 :  $P < 0.05$ ) (図 3B)。また、P20 ( $n = 3$ ) と比較しても、sevoP4 および sevoP12 の PPI は有意に減弱していた ( $P < 0.05$ )。一方、sevoP20 の PPI については、対照群と有意な差はなく、減弱を認めなかった。

#### 考 察

新生仔期のセボフルラン曝露は、神経細胞のアポトーシスを引き起こすことが知られている<sup>1,2)</sup>。そしてセボフルラン誘発性神経細胞アポトーシスを予防することがセボフルラン誘発性認知機能障害を改善することも報告されている<sup>3,9)</sup>。本研究においても、生後 3~5 日にセボフルランを曝露させたマウスでは認知行動障害を呈した。

ループ利尿薬のブメタニドは NKCC1 を阻害することが知られており、過去の研究でもブメタニドの前投与がセボフルランに曝露した幼若ラット (生後 4 日目) の脳でアポトーシス関連システインプロテアーゼであるカスパーゼ-3 の活性化を減少させることが報告されている<sup>18)</sup>。そこで本研究では、ブメタニドが新生仔期セボフルラン誘発性神経細胞アポトーシスを防止することにより、長期的認知機能障害を予防するのではないかと仮説を立て、ブメタニドの前投与による行動学的評価を行ったところ、セボフルラン曝露前にブメタニドを腹腔内投与した生後 3~5 日のマウスでは認知行動障害の改善を認めており、各試験の成績はいずれも対照マウス群と同程度だった。未成熟ニューロンの GABA を介した脱分極はブメタニドによって阻害されることが示されている<sup>15)</sup>。未成熟ニューロンでは GABA を介した脱分極が興奮性に作用し、未成熟ニューロンに障害を与えられている<sup>19)</sup>。従って本研究結果は、セボフルラン誘発性 GABA<sub>A</sub> 受容体を介した脱分極が、新生仔期にセボフルラン曝露したマウスにおける神経細胞のアポトーシスと長期的認知機能障害をもたらすという理論を裏付けている。さらに本研究では、生後 19~21 日目にセボフルラン曝露したマウスでは認知行動障害を認めず、対照マウスとほぼ同程度であったこと、生後 11~13 日目にセボフルランを曝露させたマウスの各試験成績は、対照マウス群と生後 3~5 日目にセボフルラン曝露したマウスのほぼ中間に位置し、マウスの成長に従って認知行動障害は起こりにくくなることが解明された。GABA 作動性シナプス電位の極性はラット脳における NKCC1

と KCC2 の発現の生後発達変化と共に変化することが知られており<sup>15,20,21)</sup>、後期新生仔段階(生後 19 日目以降)では GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化は成体と同様に過分極となるが、早期新生仔段階(生後 3~5 日目)では GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化は脱分極になる。中間新生仔段階(生後 12~14 日目)では、GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化は生後 3~5 日目と生後 20 日目の中間の電位変化となるといわれている。またマウス脳における GABA 極性の発達変化はラット脳とほぼ同じと考えられ<sup>22,23)</sup>、本研究結果からもわかるように、セボフルラン曝露の影響による発達過程での変化は、GABA<sub>A</sub> 受容体を介したシナプス電位の発達による変化と連動していると考えられた。

本研究ではマウスを 2.1%セボフルランに 4 時間曝露させたが、最近の報告では、セボフルラン 2.0%を自発呼吸下に 6 時間曝露させたところ、吸入したマウスと対照マウスとの間に pH, PaO<sub>2</sub> および PaCO<sub>2</sub> について有意差は認められていない<sup>24)</sup>。また生後 4~17 日目のラットの自発呼吸下における 2.1%セボフルランの 6 時間曝露は、低酸素または低換気のいずれの証拠も示さなかった<sup>18)</sup>。従って本研究においても、自発呼吸下における 2.1%セボフルランの 4 時間曝露では、対照マウスとの間に呼吸状態の違いはあってもわずかであろうと判断した。さらに本研究において使用したブメタニドは、動脈血ガス分析に対し影響を与えないことが報告されている<sup>25)</sup>。従って、セボフルラン曝露下のマウスの呼吸状態あるいはブメタニドの前投与自体が本研究で測定された認知行動機能に影響を及ぼした可能性は極めて低い。

本研究では、同じ濃度のセボフルランを発達段階の異なるマウス群に使用したが、最小肺胞濃度 (minimum alveolar concentration : MAC) は発達と共に変化すると考えられているので、同濃度のセボフルランを使用した場合は、麻酔深度が発達段階によって異なる可能性がある。セボフルランの MAC の発達変化をラットで調べた研究では、生後 2 日目、9 日目、30 日目、および成体の MAC は、それぞれ 3.28, 3.74, 2.95 および 1.97 と報告していることから<sup>26)</sup> MAC の値は発達に伴って次第に減少して行くことが分かる。しかし生後 9 日目における MAC は、生後 2 日目と比較して 14.0%増加している。従って生後 9 日目マウスの 2.1%セボフルランによる麻酔深度は、生後 2 日目マウスの麻酔深度よりも約 14.0%低いことになる。以前行われた研究では、5-7 週のマウスにおける低用量のセボフルランは、むしろニューロン活性を興奮させることが報告されている<sup>27)</sup>。一方、生後 6~7 日目のマウスでは、1.1%~3.0%の濃度のセボフルランを吸入後、認知機能障害または神経細胞アポトーシスが誘発されることが報告されている<sup>9,28,29)</sup>。

この実験で使用した 2.1%のセボフルランよりも 52.3%低いセボフルラン濃度においてマウスの認知機能を有意に減弱させている。従って、本研究結果から、生後 3-5 日目同様、生後 9 日目前後においても 2.1%のセボフルラン曝露が認知機能障害を誘発するに十分な濃度であると考えられ、成長とともに影響は減少するものの、生後 20 日までの 2.1%セボフルラン曝露は認知機能を障害する可能性がある結論付けた。また、本研究はセボフルランを用いてマウスの認知機能障害を誘発させたが、デスフルランやイソフルランなどの揮発性麻酔薬の曝露によっても、同様の認知機能障害が惹起されることが報告されている<sup>28,30)</sup>。

## 結 論

本研究において、新生仔期マウスのセボフルラン曝露が認知機能障害に影響を及ぼすことを明らかにした。さらに生後 3~5 日目のマウスの認知機能障害は NKCC1 阻害薬であるブメタニドの前投与により予防された。ヒトにおける小児期のセボフルラン曝露による認知機能障害の原因はまだ定かではないが、マウスにおける認知機能障害に、細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度の増加によって起こる GABA<sub>A</sub> 受容体を介した脱分極が関与している可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Xie Z, Dong Y, Maeda U, et al : The common inhalation anesthetic isoflurane induces apoptosis and increases amyloid Protein levels. *Anesthesiology* **104** : 988-994, 2006.
- 2) Zhou X, Song FH, He W, et al : Neonatal exposure to sevoflurane causes apoptosis and reduces nNOS protein expression in rat hippocampus. *Molecular medicine reports* **6** : 543-546, 2012.
- 3) Wang WY, Jia LJ, Luo Y, et al : Location- and Subunit-specific NMDA receptors determine the developmental sevoflurane neurotoxicity through ERK1/2 signaling. *Mol Neurobiol* **53** : 216-230, 2016.
- 4) Wilder RT, Flick RP, Sprung JR, et al : Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort. *Anesthesiology* **110** : 796-804, 2009.
- 5) Ing C, DiMaggio C, Whitehouse A, et al : Long-term differences in language and cognitive function after childhood exposure to anesthesia. *Pediatrics* **130** : E476-E485, 2012.
- 6) Stratmann G, Lee J, Sall JW, et al : Effect of general

- anesthesia in infancy on long-term recognition memory in humans and rats. *Neuropharmacology* **39** : 2275-2287, 2014.
- 7) Shen X, Dong Y, Xu Z, et al : Selective anesthesia-induced neuroinflammation in developing mouse brain and cognitive impairment. *Anesthesiology* **118** : 502-515, 2013.
  - 8) Ramage TM, Chang FL, Shih J, et al : Distinct long-term neurocognitive outcomes after equipotent sevoflurane or isoflurane anesthesia in immature rats. *Br J Anaesth* **110** (SI) : 39-46, 2013.
  - 9) Ji MH, Qiu LL, Yang JJ, et al : Pre-administration of curcumin prevents neonatal sevoflurane exposure-induced neurobehavioral abnormalities in mice. *Neurotoxicology* **46** : 155-164, 2015.
  - 10) Zheng SQ, An LX, Cheng X, et al : Sevoflurane causes neuronal apoptosis and adaptability changes of neonatal rats. *Acta Anaesthesiol Scand* **57** : 1167-1174, 2013.
  - 11) Fujimoto S, Ishikawa M, Nagano M, et al : Influence of neonatal sevoflurane exposure on nerve development-related microRNAs and behavior of rats. *Biomed Res* **36** : 347-355, 2015.
  - 12) Cao W, Pavlinec C, Gravenstein N, et al : Roles of aldosterone and oxytocin in abnormalities caused by sevoflurane anesthesia in neonatal rats. *Anesthesiology* **117** : 791-800, 2012.
  - 13) Seubert CN, Zhu W, Pavlinec C, et al : Developmental effects of neonatal isoflurane and sevoflurane exposure in rats. *Anesthesiology* **119** : 358-364, 2013.
  - 14) Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, et al : Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **19** : 590-600, 2004.
  - 15) Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, et al : NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* **11** : 1205-1213, 2005.
  - 16) Delpire E : Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci* **15** : 309-312, 2000.
  - 17) He Q, Nomura T, Xu J, et al : The developmental switch in GABA polarity is delayed in fragile X mice. *J Neurosci* **34** : 446-450, 2014.
  - 18) Edwards DA, Shah HP, Cao W, et al : Bumetanide alleviates epileptogenic and neurotoxic effects of sevoflurane in neonatal rat brain. *Anesthesiology* **112** : 567-575, 2010.
  - 19) Zhao YL, Xiang Q, Shi QY, et al : GABAergic excitotoxicity injury of the immature hippocampal pyramidal neurons' exposure to isoflurane. *Anesth Analg* **113** : 1152-1160, 2011.
  - 20) Balakrishnan V, Becker M, Löhrike S, et al : Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem. *J Neurosci* **23** : 4134-4145, 2003.
  - 21) Mao S, Garzon-Muvdi T, Di Fulvio M, et al : Molecular and functional expression of cation-chloride cotransporters in dorsal root ganglion neurons during postnatal maturation. *J Neurophysiol* **108** : 834-852, 2012.
  - 22) Zhu L, Polley N, Mathews GC, et al : NKCC1 and KCC2 prevent hyperexcitability in the mouse hippocampus. *Epilepsy Res* **79** : 201-212, 2008.
  - 23) Liu Y, Chu H, Chen J, et al : Age-related change in the expression of NKCC1 in the cochlear lateral wall of C57BL/6J mice. *Acta Otolaryngol* **134** : 1047-1051, 2014.
  - 24) Yufune S, Satoh Y, Akai R, et al : Suppression of ERK phosphorylation through oxidative stress is involved in the mechanism underlying sevoflurane-induced toxicity in the developing brain. *Sci Rep* **6** : 21859, 2016.
  - 25) Duchin KL, Hutcheon DE : Comparison of bumetanide and hydrochlorothiazide on renal potassium and hydrogen ion excretion. *J Clin Pharmacol* **17** : 453-460, 1977.
  - 26) Orliaguet G, Vivien B, Langeron O, et al : Minimum alveolar concentration of volatile anesthetics in rats during postnatal maturation. *Anesthesiology* **95** : 734-739, 2001.
  - 27) Otsubo T, Maekawa M, Nagai T, et al : Facilitatory effects of subanesthetic sevoflurane on excitatory synaptic transmission and synaptic plasticity in the mouse hippocampal CA1 area. *Brain Res* **1197** : 32-39, 2008.
  - 28) Liang G, Ward C, Peng J, et al : Isoflurane causes greater neurodegeneration than an equivalent exposure of sevoflurane in the developing brain of neonatal mice. *Anesthesiology* **112** : 1325-1334, 2010.
  - 29) Zhang X, Xue Z, Sun A : Subclinical concentration of sevoflurane potentiates neuronal apoptosis in the developing C57BL/6 mouse brain. *Neurosci Lett*

- 447** : 109-114, 2008.
- 30) Zhang Y, Xu Z, Wang H, Dong Y, Shi HN, et al :  
Anesthetics isoflurane and desflurane differently  
affect mitochondrial function, learning, and memory.  
Ann Neurol **71** : 687-698, 2012.



**Bumetanide Prevents the Neonatal Sevoflurane-induced Cognitive Dysfunction in Mice**

Kanato Hata

*Department of Anesthesiology, Dokkyo Medical University, Tochigi, Japan*

Sevoflurane is well known as a volatile anesthetic that is now widely used in clinical anesthesia. This anesthetic induces GABA<sub>A</sub> receptor-mediated extra-synaptic tonic inhibition. Recent reports have suggested that exposure to sevoflurane at an early age lead to long-term cognitive dysfunction in human and animal models. However, the mechanisms underlying the sevoflurane involved to cognitive dysfunction remain unclear. We observed cognitive behaviors of adult mice after neonatal exposure to sevoflurane with bumetanide pre-injection to assess the effect of the neonatal Cl<sup>-</sup> balance on the effect of sevoflurane.

Neonatal mice (3-5days after birth) received an intraperitoneal bumetanide (5 μM/kg) or saline injection before the anesthesia. Just after the injection, the mice were

exposed to 2.1% sevoflurane in O<sub>2</sub> for 4hrs. Three different behavioral tests (water maze, open field and prepulse inhibition) were performed from 49 days after birth. The water maze performance, travelling distance, number of vertical movement in the open field arena and impaired inhibition of startle response by prepulse were impaired in the sevoflurane-exposed mice. The pre-injection of bumetanide improved these behavioral disorders. We conclude that neonatal sevoflurane-induced cognitive dysfunction depend on the higher intracellular Cl<sup>-</sup> concentration promoting GABA<sub>A</sub> receptor-mediated depolarization.

**Key words** : sevoflurane, neonatal mouse, cognitive dysfunction, bumetanide, behavioral tests