

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：33920

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659703

研究課題名(和文)長期記憶形成におけるアストロサイト代謝の役割と麻酔薬作用の分子科学的機序の解明

研究課題名(英文)Role of astrocyte metabolism in the constitution of long-term memory and the molecular pharmacological effect of anesthetics

研究代表者

木下 浩之(Kinoshita, Hiroyuki)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70291490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、若年成体マウスへのセボフルラン暴露が恐怖記憶を惹起するか、さらに海馬でのF-アクチンの構成が恐怖記憶形成と関連するかを明らかにすることを目的とした。マウスは生後2週でほぼ脳が完成するので、生後4週の雄若年成体マウスで実験を行った。さらに脳を摘出し、海馬の記憶の構成を示唆するF-アクチンの免疫染色を行った。若年成体マウスへの臨床使用濃度内のセボフルラン吸入は、恐怖記憶定着に加え海馬でのF-アクチン構成を増強した。本研究結果は、本研究で検討したマウス週齢に相当するヒト個体で、セボフルラン吸入が、恐怖記憶構築、すなわち、心的外傷後ストレス障害を引き起こす可能性を示唆するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Whether sevoflurane inhalation modulates the fear memory in young adult mice, have not been studied although neonatal exposure to this volatile anesthetic induces neurodegeneration resulting in deficits related to social behavior and/or learning disabilities. Since mice brain completes the growth during the first two weeks after birth, the current study was designed to examine whether sevoflurane exposure to four-weeks old young adult mice modifies the long-term fear memory learning ability, and if it is the case, whether F-actin constitution in the hippocampus relates to the consolidation of fear memory. Sevoflurane exposure to young adult mice accelerated the long-term horror learning ability with increased F-actin constitution in the hippocampus. These results suggest that sevoflurane amnesia may enhance fear memory consolidation resulting in psychological stress like posttraumatic stress disorder in young adults of humans.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：揮発性麻酔薬 脳 驚愕反応

1. 研究開始当初の背景

揮発性あるいは静脈麻酔薬への数時間暴露は生後間もないシナプス形成期個体の海馬で神経変性を引き起こすことが、齧歯類での研究を中心に、近年、指摘されるようになった。しかし、その分子科学的機序は依然として不明である。発達中の脳への麻酔薬暴露による記憶障害はヒトでも起こりうる現象か否か、また、仮に起こりうる場合、その長期記憶に及ぼす影響はどの程度なのか、についても明らかでない。これら麻酔薬暴露と長期記憶障害に関する臨床研究は、最近ようやく始まる機運を見せてはいるものの、その結論が得られるのは少なくとも今後 10 数年の年月を要す。しかし、多くの小児麻酔を抱える現況では、時間を費やす、これらの臨床研究結果を踏まえ臨床業務の方向性を決めるゆとりはなく、現在、麻酔科医は小児麻酔での麻酔法や麻酔薬の選択に関し大きなジレンマの中にいることは明らかである。

申請者らは、マウスモデルで機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI) を用い、各種神経刺激に伴う脳血流変化を可視化することに成功した (Neurosci Lett 2008 他)。また、脳スライス中の各種細胞内シグナルのライブセルイメージングを可能にした (基盤研究 B, 2007-2010 年度)。これらの成果により、申請者らは脳機能をつぶさに検証する方法論をえることができた。さらに、脳血流制御 (萌芽研究, 2004-2005 年度)、脳内液性因子放出 (基盤研究 C, 2005-2006 年度) および脳内細胞・細胞間相互作用 (基盤研究 C, 2007-2008 年度) において、アストロサイトの存在が重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。しかし、アストロサイト機能が脳機能に及ぼす役割は依然として不明であり、記憶形成についても例外でない。また、アストロサイトによるグリコーゲン分解がニューロンのエネルギー源となることが、最近の研究で明らかにされた。

2. 研究の目的

以上の学術的背景をふまえ、本研究は、1) シナプス形成期の幼弱マウスへの麻酔薬の数時間暴露は成体に至るまでの長期記憶形成に影響を及ぼすか、またこれに麻酔薬間で相違があるか否か、2) 長期記憶障害個体では海馬領域の血流が低下すると同時に同部位の発達が抑制され、そこでのシナプス可塑性が現弱しているか否か、3) 記憶障害個体での海馬アストロサイトで糖代謝と共にエネルギートランスポートの発現が低下しているか否か、4) 記憶障害個体の脳室へのエネルギートランスporter-cDNA 導入は長期記憶障害を回復するか否かについて検討し、麻酔薬が長期記憶に及ぼす作用とその分子科学的機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験開始 1 時間前にマウスを実験室へ移動し環境に慣れさせる (室温は 24℃、保育器内は 37℃ に保つ)。生理的条件を一定にするため実験時間は固定した 9-12 時の 3 時間以内ですべての個体についての実験を終了した。本試験は、動物が一度経験した電気刺激 (嫌悪刺激として利用) に対する回避行動を長期記憶の指標とするもので、すでにその有用性は示されている。今回申請の SMART ビデオ行動解析システム、明室と暗室が扉でつながったパッシブアボイダンスケージなど一式を用いた。

生後 4 週の雄若年成体マウスに 2.5% セボフルランを空気 (2 L/min) をキャリアにし自発呼吸下に 3 時間吸入させた (セボフルラン群)。コントロール群では 2 L/min 空気のみ吸入させた。これらマウスに対し、生後 8 週で驚愕反応検査を行った。すなわち、仕切られた明室-暗室付属の装置で、1 日目に馴化させ、2 日目に暗室侵入までの時間 (獲得時間) 測定と暗室侵入直後の電気刺激を施行した。ついで、3 日目に暗室侵入までの時間 (保続時間) を測定した。上記検査終了後、頸椎損傷でマウスを安楽死させた。灌流固定後に脳を摘出し、海馬を用いて F-アクチンの免疫染色

を行った。

以上の研究は、当初、近年、齧歯類を中心として指摘されるようになった、シナプス形成期個体への麻酔薬暴露が引き起こす海馬での神経変性の機序の詳細を明らかにするために計画された。特に、ラットやマウスの寿命を考慮した場合、少なくとも麻酔薬暴露後 8 か月の経過を追わなければ、成人（ヒトで 20 歳頃）に至るまでの脳神経学的予後を検証することはできない。その点で、本研究結果は、小児麻酔の臨床に一定の見解を与えるに違いないと考えていた。

しかし、研究を開始したところで、これらの結果について、予想と反し、セボフルラン吸入で恐怖記憶の定着が促進される結果が得られてため、その確証を得るために、追加実験を繰り返している。使用しているマウスの週齢がちょうど思春期にあたるため、その時期の個体に対する麻酔の PTSD（心的外傷後ストレス障害）作用に一定の結論を出すべく現在、鋭意、検討中である。ここ最近のデータでは、個体差が大きいことが示唆されており、最終的な結論を出すまで、空間認知機能の評価など、行動薬理実験を徹底する計画としている。そのため、当初予定していた fMRI 検査などは施行できていない。

4 . 研究成果

獲得時間に両群の差はなかった（対照 [n=27] : 11.1 ± 5.2 秒、セボフルラン [n=31] : 11.1 ± 5.8 秒）が、保続時間はセボフルラン投与群（134.8 ± 93.7 秒）で対照群（62.2 ± 33.9 秒）に比し有意に延長した（ $P < 0.05$ ）。

海馬での F-アクチン輝度はセボフルラン群で有意に高値を示した（約 1.5 倍、 $P < 0.05$ ）。

若年成体マウスへの臨床使用濃度内のセボフルラン吸入は、恐怖記憶定着に加え海馬での F-アクチン構成を増強する。本研究結果は、本研究で検討したマウス週齢に相当するヒト個体で、セボフルラン吸入が、恐怖記憶構築、すなわち、心的外傷後ストレス障害を引き起こす可能性を示唆するものと考えら

れる。現在追加実験を行っているが、個体差による影響が否定できないため、最終的な結論を出すまでは、しばらく時間がかかると推察される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 中村絵美、橋本篤、八口トド美佐子、棕田崇、藤原祥裕、木下浩之：若年成体マウスへのセボフルラン暴露は恐怖記憶定着を促進する。日本麻酔科学会第 62 回学術集会、兵庫県神戸市、2015.5.28-30

2. Kinoshita H, Nakamura E, Feng G-G, MD, Li J, Jiang J, Sakakibara K, Fujiwara Y: Sevoflurane inhalation accelerates the long-term horror learning ability in young adult mice. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, New Orleans, LA, USA, October 11-15, 2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：特になし

6．研究組織

(1)研究代表者

木下 浩之 (Kinoshita Hiroyuki)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70291490

(2)研究分担者

成田 年 (Narita Minoru)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40318613

畠山 登 (Hatakeyama Noboru)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70251907

中畑 克俊 (Nakahata Katsutoshi)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70332971