

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462409

研究課題名(和文) 成体ラット開腹手術モデルを用いた急性侵害性疼痛による記憶学習能への影響の検討

研究課題名(英文) acute pain and insult of simple laparotomy affects postoperative cognition and learning in young adult male rats.

研究代表者

小川 賢一 (OGAWA, Kenichi)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員准教授

研究者番号：10233412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：吸入麻酔薬を用いた全身麻酔手術後に生じる術後認知障害は、手術後の生存率と生活の質に悪影響を及ぼすことが知られている。本研究では下腹部開腹による術後疼痛モデルを作成し、遠隔期の文脈的記憶学習障害について検証を行ったところ、開腹術のみの侵襲では障害を生じない可能性が示唆された。また、5分間の吸入麻酔によって遠隔期に海馬AMPA受容体のシナプス発現量に変化を生じるが、開腹手術による侵害の影響は生じていない可能性が示唆された。これらは、臨床上的吸入麻酔薬の安全な使用法を開発していくうえで重要な知見であり、今後は遠隔期の認知記憶能の変化について、更なるデータの蓄積が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：General surgery using volatile anesthetics may induce post operative cognitive dysfunction. We made an acute postoperative pain and insult model using young adult rats for comprehensive elucidation of postoperative cognitive dysfunction (POCD). Our simple laparotomy model shows that acute postoperative pain may not affect hippocampus and learning, although volatiles anesthesia during only 5 minutes for laparotomy may affect hippocampus dependent learning and modulation of hippocampal GluA1 subunit of AMPAR.

研究分野：麻酔科学

キーワード：全身麻酔 吸入麻酔薬 術後疼痛 長期増強 AMPA受容体 神経可塑性 認知記憶障害 海馬

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは平成 22-24 年度科学研究補助金(基盤 C)において、足底切開による術後疼痛モデルにおける文脈的記憶学習への影響を検証してきた。また、本教室では、共同研究者である後藤隆久教授の指導する研究チームが「成体ラットにおいて、吸入麻酔後の遠隔期に AMPA 受容体のシナプスへの移行障害を通じて、学習・記憶機能が低下すること」を明らかにするなど、麻酔薬の中枢神経系、とりわけ認知機能に対する影響をテーマに研究をすすめてきた。吸入麻酔薬の有害かつ遷延する中枢神経作用は、従来成体動物ではあまり報告がなかったが、近年は麻酔後の術後認知障害(postoperative cognitive dysfunction: POCD)を引き起こす因子として注目されている。POCD 発症の原因としては、麻酔薬の曝露の他、手術侵襲による炎症や侵害性疼痛、術後安静による社会的活動低下、概日リズムの乱れ、などが検討されているが、詳細なメカニズムと予防法は未解明であり、またおそらく年齢によって異なる。ヒトにおける臨床研究においても、麻酔や疼痛は高次脳機能に影響を及ぼすことが知られているが、これらは幼若者や高齢者を対象にしたものが多く、成人における術後認知記憶障害はあまり知られていない。しかし我々は上記の知見から、成人における認知記憶障害が術後数日~数か月という遠隔期に発症している可能性があり、そもそも見過ごされてきただけであって退院後の社会生活および QOL に影響を与えている可能性があると考えている。また、これまでの臨床研究および動物研究からは、慢性疼痛は自発的行動量と学習機能が低下させることが明らかになっている(Kilanowicz et al., Neurotoxicology, 2012)が、急性侵害性疼痛(術後疼痛モデル)においては、自発的行動量と学習機能への影響は未解明である。

今回、新たに下腹部開腹による術後疼痛モデル(成体ラット)を作成して(Tong et al., Anesthesia ad analgesia, 2006)、海馬依存性の文脈的記憶学習試験(Inhibitory Avoidance test)を用いて予備実験をおこなったところ、麻酔曝露モデルと比較して術後の学習・記憶機能があまり低下しない傾向を見出した。これは、成体動物の POCD 発症に対する術後疼痛の関与を否定するもので、今までの報告とは矛盾する結果であった。このことは成体動物の POCD の主原因を全身麻酔薬曝露に絞る可能性を示唆しており、詳しく解明する必要があると考えられた

2. 研究の目的

我々の予備的研究結果は、急性侵害性疼痛が成体動物の POCD 発症に関与しないことを示唆していた。これまでは、神経障害性疼

痛や慢性の炎症性疼痛を有する動物で記憶学習障害が生じることなどから、手術後の急性侵害性疼痛は POCD の増悪因子であると考えられてきたが、我々は、この現象の詳細を解明することで、成体動物の POCD の主原因を吸入麻酔薬曝露に絞りこめるのではないかと考えた。本研究に先立って、開腹術後疼痛モデルを作成し、手術当日および翌日の自発的行動量の低下傾向を確認していた。また、手術当日および翌日では、海馬依存性の文脈的記憶学習に影響は無さそうであるという傾向を確認していた。これらの結果を踏まえて次の実験を計画した。

(1) 成体ラットを用いて開腹術後疼痛モデルを作成し、急性侵害性疼痛によって、神経生理学的な影響が生じていることを、自発的行動量を定量して検証した。

(2) 比較対象となる麻酔薬曝露モデルでは術後中長期に文脈的記憶学習が低下するので、開腹術後疼痛モデルにおける、術後直後~中長期の経時的変化を検証した。

(3) 文脈的記憶学習の神経電気生理学的な基盤として知られている海馬 CA1/Schaffer collateral(SC)経路のシナプス可塑性の変化を経時的に検証した。

(4) 海馬 CA1/SC 経路におけるシナプス可塑性の分子生物学的基盤として知られている AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットである GluA1 の発現レベルの変化を経時的に検証した。

3. 研究の方法

(1) 開腹術後疼痛モデルの作成。体重 100-150g(4-5 週齢)の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。2.0%イソフルラン麻酔下、下腹部正中に約 3cm の切創を開腹に到るまで加えた後、速やかに 3-0 絹糸で縫合した。手術時間は 4 分程度、麻酔時間は 6 分間とし、午前 11-12 時の間に行った。対照群は、麻酔のみ行った。

(2) 自発的行動量測定。手術後、行動測定用ケージにラットを移し、1 週間の行動観察及び運動量の測定を行った。ラットの行動はビデオ録画し行動量、探索行動で移動した距離などを測定した。また赤外線モニターを用いて運動量を測定した。

(3) 抑制性回避学習課題(Inhibitory Avoidance test)。手術の 2 時間後、1 日後、3 日後、7 日後に専用の試験用ケージを用いて行う。ケージは隣接する明箱と暗箱からなっており、ギロチン式の扉で仕切られている。まずトレーニングとして、扉を閉めた状態でラットを明箱に入れ、10 秒間探索させた後、扉を開ける。ラットは暗い場所を好む為、す

みやかに扉から暗箱に入ってゆく。暗箱に入ったら扉を閉め、0.2mA、2秒の電気ショックを床よりラットの足に与える。ショック後15秒間静置したのち、ラットをケージから出して休息させる。トレーニングの24時間にリテンション(想起)テスト、ふたたび試験用ケージの明箱にいれて扉をあけ、暗箱に入っていくまでの潜時を測定して、学習効果の指標とした。

(4) 多点皿電極(MED64 system)を用いた海馬における細胞外シナプス電位の測定。手術の2時間後、1日後、3日後、7日後のラットをイソフルラン麻酔の後に断頭し、海馬または扁桃体を含む脳スライス(厚さ300 μ m)を作成した。スライスの作成は現在行っている方法に則って行った。スライスを倒立顕微鏡にセッティングしたMEDコネクター(Alpha MED Science, Osaka, Japan)上の電極(MED515A)に静置し、人工脊髄液を灌流した。20分程度スライスをなじませた後、海馬ではCA1領域で、もっとも刺激が得られる場所を探索し、興奮性シナプス集合電位(fEPSP)の入力-出力特性を記録した上で、刺激強度は得られる最大シナプス電位の約50%になるように調節した。40分以上paired pulse刺激によるfEPSPが安定していることを確認し、100Hzで0.1ms、900回のテタヌス刺激を与え、シナプス電位の長期増強(LTP)を誘発し、fEPSPのamplitudeとslopeを40分にわたり記録した。

(5) AMPA受容体の生化学的検討。麻酔暴露モデルラットについて、Inhibitory Avoidance testの実施無し、トレーニングの30分後、記憶想起(リテンション)の30分後、のタイミングで各々イソフルラン麻酔下に断頭し、迅速に海馬検体を採取する。採取した海馬について、シナプトソーム分画を抽出後、Western blottingを行い、蛋白量を半定量測定した。また、トータルホモジネートでも同様に行った。

4. 研究成果

開腹モデルラットを用いて、一試行抑制性回避学習試験(Inhibitory avoidance test: IA)を実施し、海馬検体に対してWB法を用いて生化学的検討を行った。生後4週齢目のSDラットを用い、2.0%イソフルラン麻酔下に剣状突起下腹部正中を1.5 - 2cmの長さに切開し、開腹した。開腹後、直ちに3-0絹糸を用いて閉創した。コントロール群として、イソフルラン麻酔を1.8%イソフルラン麻酔に手術時間とほぼ同じ5分間暴露したものを用意した。

疼痛行動の評価は、直接創部を疼痛測定器具で刺激することはせず、ビデオモニターおよび行動量測定装置を用いて行動量が減弱したことをもって確認した。また、疼痛閾値

の検証のため、開腹術前と開腹術を行った後3時間後に、測定刺激(von Frey test)を行って評価し、有意な差がないことを確認した。モデル確認を行った後、開腹術の3時間後、3日後、7日後に、IA testのコンディショニングを行い、さらに24時間後にどれだけ足底への電気刺激を忌避刺激として記憶しているか(テストチャンバーに入らないか)を、テストチャンバーにラットが入るまでの時間で検討した。カットオフ値は300秒とした。その結果、3日目にはやや増加傾向がみられたが、有意な変化は認められなかった。イソフルレン1.8%を2時間にわたり吸入させると、1週間後に有意にテストチャンバーにラットが入るまでの潜時が短縮する(=記憶障害が生じている)ことが、すでに共同研究者らが見出しており、本結果から開腹術のみの侵襲では記憶学習障害を生じない可能性が示唆された。

続いて、海馬組織を用いたグルタミン酸受容体に対する生化学的検討(WB法)を進めた。海馬検体をホモジネートし、WB法を用いてAMPA受容体サブユニットであるGluA1のシナプス発現量について生化学的検討を行ったところ、3日目にやや低下し、7日目に増加していた。開腹モデルと5分間麻酔モデルの間には、統計学的に有意な変化をみとめなかった。これらの知見を総合すると、4-5週齢のラットでは5分間の吸入麻酔によって、遠隔期に海馬AMPA受容体のシナプス発現量に変化がみられるが、開腹手術による侵害の影響は生じていない可能性が示唆された。

第61回日本麻酔科学会総会のシンポジウムにて、これまでに得られた知見を総合して発表を行なった他、本研究内容に関する演題発表も行なった。また、欧州麻酔科会議2014年度総会にて演題発表を行なった。さらに本研究で得られた知見について、英文査読誌に投稿すべく準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Hung Tae Kim, Kazuhiro Uchimoto, Tyler Duellman, Hay Yang, "Automated assessment of pain in rats using a voluntarily accessed static weight-bearing test", *Physiology & Behavior*. (2015 Jul 21; 151: 139-146.), doi: 10.1016/j.physbeh.2015.06.035. 査読有

Kazuhiro Uchimoto, Tomoyuki Miyazaki, Yoshinori Kamiya, Takahiro Mihara, Yukihide Koyama, Masataka Taguri, Gaku Inagawa, Takuya Takahashi, Takahisa Goto, "Isoflurane Impairs Learning and Hippocampal

LTP via the Saturation of Synaptic Plasticity”, *Anesthesiology*. (2014 Aug; 121(2):302-10.),doi:10.1097/ALN.000000000000269. 査読有

Kazuhiro Uchimoto, Hiroko Fujimoto, Kumiko Yonezaki, Tomoyuki Miyazaki, Tomio Ando, Takahisa Goto, “Very short exposure of volatile anesthetics induces long-term learning deficit in young adult male rats”, *European Journal of Anaesthesiology* (2014 Jun; 31:121.), 査読有

Yusuke Nakahashi, Yoshinori Kamiya, Kengo Funakoshi, Tomoyuki Miyazaki, Kazuhiro Uchimoto, Kentaro Tojo, Kenichi Ogawa, Tetsuo Fukuoka, Takahisa Goto, “Role of nerve growth factor-tyrosine kinase receptor A signaling in paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats.”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2014 Feb 14;444(3): 415-9.),doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.082. 査読有

Kazuhiro Uchimoto, Tomoyuki Miyazaki, Yoshinori Kamiya, Yusuke Tominaga, Takahisa Goto, “Comparison of postoperative learning deficit due to isoflurane exposure or propofol infusion”, *European Journal of Anaesthesiology* (2013 Jun; 30:109-110.), 査読有

Tatsuaki Kikuchi, Hongying Tan, Takahiro Mihara, Kazuhiro Uchimoto, Dai Mitsushima, Kenkichi Takase, Satoshi Morita, Takahisa Goto, Tomio Ando, Yoshinori Kamiya, “Effects of volatile anesthetics on the circadian rhythms of rat hippocampal acetylcholine release and locomotor activity.”, *Neuroscience*. (2013 May 1; 237: 151-60.), 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

村瀬頼子, 内本一宏, 後藤隆久, 柚崎通介: 若年マウスに対するイソフルラン曝露後に遷延する空間学習能力低下は、集団飼育下の全自動行動解析装置による解析においても存在する。日本麻酔科学会第 62 回合同学術集会, 2015.5.29, 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
朝倉彩子, 内本一宏, 伊奈川岳, 後藤隆久: デスフルラン曝露が海馬記憶学習に与える影響。日本麻酔科学会第 62 回合同学術集会, 2015.5.29, 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

Kazuhiro Uchimoto, Hiroko Fujimoto, Kumiko Yonezaki, Tomoyuki Miyazaki, Takahisa Goto, “Very short exposure of volatile anesthetics induces long-term

learning deficit in young adult male rats.” ; ESA2014, Jun 2. 2014, Stockholm, Sweden. Poster presentation.

内本一宏, 後藤隆久: 全身麻酔薬が認知記憶に及ぼす影響～成体ラットモデルを中心に。日本麻酔科学会第 61 回学術集会, シンポジウム, 2014.5.16, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

内本一宏, 紙谷義孝, 藤本寛子, 宮崎智之, 安藤富男, 後藤隆久: 単純開腹疼痛が海馬認知記憶能に与える影響。日本麻酔科学会第 61 回学術集会, 2014.5.16, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

内本一宏: 単純開腹モデルにおける急性侵害疼痛は、若年雄性ラットの認知学習能に影響を与えるか? 第 7 回「麻酔科痛みのメカニズムを語る会」, 2014.3.5, 芝パークホテル(東京都港区)

Kazuhiro Uchimoto, Yosuke Tominaga, Youko Matuda, Tomoyuki Miyazaki, Takahisa Goto, “Propofol Did Not Affect Contextual Learning After Intraperitoneal Administration in Adult Rats.”, ASA 2013, Oct 15. 2013, San Francisco, USA. Poster presentation.

Kazuhiro Uchimoto, Yosuke Tominaga, Youko Matuda, Tomoyuki Miyazaki, Takahisa Goto, “Propofol Did Not Affect Contextual Learning After Intraperitoneal Administration in Adult Rats.”, ASA 2013, Oct 15. 2013, San Francisco, USA. Poster presentation.

内本一宏, 宮崎智之, 後藤隆久: 術後認知記憶障害のメカニズムの解明。日本麻酔科学会第 60 回学術集会, 2013.5.24, ロイトン札幌(北海道札幌市), 優秀賞

〔図書〕(計 1 件)

『ラットの行動解析ハンドブック』 / Ian Q. Whishaw, Bryan Kolb 編 ; 高瀬堅吉, 柳井修一, 山口哲生監訳 / 16 章 翻訳 内本一宏 - 西村書店, 125-134, 2015.10

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 賢一(OGAWA, Kenichi)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授
研究者番号: 10233412

(2)研究分担者

内本 一宏 (UCHIMOTO, Kazuhiro)
横浜市立大学・医学研究科・客員講師
研究者番号：50710951

後藤 隆久 (GOTO, Takahisa)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：00256075

紙谷 義孝 (KAMIYA, Yoshinori)
新潟大学・医歯薬総合病院・教授
研究者番号：90381491

(3)連携研究者

(4)研究協力者

宮崎 智之 (MIYAZAKI, Tomoyuki)
水原 敬洋 (MIHARA, Takahiro)
富永 洋介 (TOMINAGA, Yosuke)
朝倉 彩子 (ASAKURA, Ayako)
弓場 由紀 (YUBA, Yuki)
米崎 久美子 (YONEZAKI, Kumiko)
足立 明子 (ADACHI, Akiko)