様式Ｃ－１９

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 1 日現在

機関番号：２２７０１
研究種目：基盤研究（Ｃ）
研究期間：2010～2012
課題番号：２２５９１７４４

研究課題名（和文） 疼痛が記憶学習に及ぼす影響の、行動学的及び中枢神経系での組織学・生理学的検討

研究課題名（英文）Impact of pain on the learning and memory - Behavioral assessment and histological and physiological study in the central nervous system -

研究代表者
小川 賢一（OGAWA KEN-ICHI）
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号：10233412

研究成果の概要（和文）：本研究では、疼痛及びその鎮痛が記憶・学習に与える影響を明らかにする目的で、ラット単純開腹モデルを用いて、一試行受動的回避学習試験(inhibitory avoidance test: IA)を用いた恐怖刺激記憶に術後急性疼痛が及ぼす影響を検討した。開腹術２時間後に IA 試験のコンディショニング、２４時間後にテストを施行したところ、予想に反して両群で恐怖刺激記憶の程度は変化していなかった。また、海馬における記憶学習に関与していることが知られている AMPA 受容体の GluA1 subunit の、術後 24 時間後のシナプトソームでの量を両群で比較したところ、差がないことが明らかになった。本研究の結果、術後早期の急性疼痛は、周術期の記憶学習障害に直接影響しない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify the impact of pain and its analgesia on memory and learning. We investigated the effects of acute postoperative pain on fear stimulus memories, one trial passive avoidance learning test was performed using a rat simple laparotomy model. We performed IA-conditioning to the rats 2 hours after the surgery and we conducted IA-test to 24 hours after surgery. Contrary to the expectations, latency to the entering black box had not changed in both groups. Furthermore, we compared the amount of GluA1 subunit of AMPA receptor, which is known to be involved in learning and memory in the hippocampus, in hippocampus synaptosome 24 hours after surgery and there was no difference between laparotomy group and control group. The results of this study suggested that postoperative acute pain may not directly affect the learning and memory disorders of perioperative period.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
２０１０年度	2,000,000	600,000	2,600,000
２０１１年度	800,000	240,000	1,040,000
２０１２年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総 計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 医歯薬学
科研費の分科・細目：麻酔科学
キーワード：術後疼痛・記憶学習・海馬

１．研究開始当初の背景
　臨床研究の結果から、慢性的な疼痛が人において学習機能を低下させることが明らかになっており、適切な術後鎮痛が術後譫妄を低減するのではないかといわれている。また、慢性疼痛を有する患者がそうでない患者と比べて記憶・学習能が低下しているという研究結果もある。慢性疼痛による記憶・学習能の低下については、疼痛によるストレスが視床下部-下垂体-副腎皮質経路を一定期間持続的に活性化し、副腎皮質ホルモンが海馬神経細胞に発現するステロイド受容体を活性化する結果、神経細胞のアポトーシスやシナプス伝達の低下を引き起こすといわれており、神経障害性疼痛がごく短期間の間に扁桃体におけるシナプス伝達を増強させるという報告が最近本邦からなされた。また、開腹手術による組織障害によって炎症性サイトカインの放出が起こり、その結果脳におけるグリア細胞が活性化し、認知障害が生じるという報告がある。しかし、疼痛モデル動物に対する学習能の研究は疼痛の分子メカニズムや、電気生理学的な神経回路の可塑性の検討に比べて意外なほど少ない。
　ヒトにおける臨床研究においても疼痛は高次脳機能に影響を及ぼすことが知られており、周術期患者管理の観点からも、疼痛を適切に制御することは術後高次機能低下を防ぎ早期退院に結びつく可能性がある点で重要視されている。また、術後痛が慢性疼痛へと移行していく症例も日常的に経験しており、術後痛の制御が患者の長期的なQOLを向上させると同時に社会的損失の抑制の観点からも重要である。今まで疼痛研究の中心は一次知覚神経である後根神経節(DRG)及びそれが最初に入力する脊髄後角に焦点を合わせた研究であり、痛みと中枢神経系の可塑的変化についての検討は世界的にも緒についたばかりである。また、疼痛と高次脳機能を行動学的に検討した動物実験、疼痛と中枢神経系におけるシナプス伝達の変化を検討した研究は今までにも散見されるが、本研究では記憶学習に関する行動実験と電気生理学とあわせて検討することで、行動学的変化と脳局所のシナプス特性の変化を結びつけることが出来、疼痛と高次脳機能の関係についてより説得力のある知見とすることが出来ることが期待される。

２．研究の目的
　本研究では、疼痛及びその鎮痛が記憶・学習に与える影響を明らかにする目的で、術後痛モデル(単純開腹モデル)ラット及び対照ラットに対して海馬・扁桃体依存性学習の一つである一試行受動的回避学習試験(inhibitory avoidance test: IA)の潜時における疼痛の影響を検討し、その際の海馬シナプトソームにおける AMPA 受容体の GluA1 サブユニットの発現量を比較する。

３．研究の方法
　実験はすべて約 5 週齢の雄性 SD ラット（120-140g）のラットを用いた。すべての実験期間を通じてラットは 12 時間の明暗サイクル(明期：7:00-19:00)、22℃の室温環境下で飼育された。

(1)単純開腹モデルラットの作成

　ラットは 2%イソフルラン吸入による全身麻酔下に、腹部の 70%アルコール消毒の後に剣状突起から正中に約 2cm の腹腔に至る切開を施され、指による擦過刺激を創縁に 2 回与えた後、4-0 絹糸にて 3〜4 針の縫合にて閉創した。手術に要する時間は約 10 分であり、対照群として、同じ時間だけ、同程度のイソフルラン麻酔を受けた群を用意した。

(2)単純開腹モデルラットの自発行動量の測定

対象となるラットを予め直径 40cm、高さ 70cm の透明なアクリルケージに馴化させ、手術前 24 時間、手術（麻酔）後 48 時間にわたってアクリルケージの上部に設置した受動型赤外線感知センサー（PSY-001, Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan）により行動量カウントを行った。計測された行動量はデジタルデータに変換され，パソコン上に記録した。ソフトウェアは CompACT AMS Ver.3 (Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。行動量の比較は、重複測定分散分析を用いて、手術前の行動量をコントロールとし、手術群及び対照群で比較した。

(3)足底刺激に対する逃避閾値への開腹手術による影響の検討

手術及び麻酔を行う前のラットに対し、auto von Frey装置（Ugo Basile社製Dynamic planter anesthesiometer）による機械的刺激に対する逃避閾値を測定し、開腹手術及び対照麻酔後2時間、24時間で同様に疼痛閾値を測定した。疼痛閾値の比較はKruskal-wallis testにより行った。

(4)一試行受動的回避学習（IA）試験

開腹モデル群および麻酔対照群に対し、手術もしくは麻酔の2時間後にIAのコンディショニングを行う。具体的にはIA用のシャトルボックスの白い方に対象となるラットを入れ、約10秒後に黒い箱との間の間仕切りを開放する。ラットは暗い場所を好むため、黒い箱に入るが、ラットが黒い箱に入った後に間仕切りを閉鎖し、3秒後に0.8mA、2秒間の電気ショックを、黒い箱の床面のグリッドから通電する。コンディショニングから24時間後に、ラットをシャトルボックスの白い箱に入れ、コンディショニングの時と同様に黒い箱との間の間仕切りを開放する。もしラットが「白い（明るい）箱から黒い（暗い）箱に入ると電気ショックが与えられる」ことを覚えている場合には、黒い箱には入らないが、そのことを覚えていない場合には元々の習性にしたがって黒い箱に入っていく。黒い箱に入るまでの潜時を測定し、2群間での比較を行った。潜時のカットオフ値は300秒とした。ラットの行動はビデオカメラで記録され、オフラインで潜時を測定した。同様の検討を、術後7日目に対しても行い、手術による疼痛および麻酔の影響がなくなったと考えられた時の記憶学習能も併せて検討した。

(5)海馬シナプトソームにおけるGluA1発現量に対する手術侵襲の影響の検討

IA試験のコンディショニングを行い、24時間が経過したラットをペントバルビタールによる深麻酔後に経心的に冷却ヘパリンかリン酸バッファーで灌流脱血を行った後、素早く大脳を摘出し、海馬を含んだ厚さ2mmの脳スライスを作成、海馬部分を摘出し、液体窒素を用いて急速冷凍した。サンプルが集まったところで可溶化バッファーを用いて海馬組織を可溶化し、ショ糖濃度勾配法を用いてシナプトソーム分画を回収する。シナプトソーム分画タンパクを12.5%SDSゲルを用いて電気泳動展開し、PVDF膜に転写後一次抗体として抗GluA1抗体および抗β-アクチン抗体を用いてWestern blottingを行った。

４．研究成果

(1)開腹モデルラットにおける自発行動の低下と足底刺激に対する感受性の変化の検討

IA試験は後肢への電気刺激による恐怖条件付けを行う行動試験であるので、疼痛を生じる処置であると同時に後肢への機械刺激過敏性を来さないモデルであることが必須であることから、我々はまず開腹モデルがどの程度の期間疼痛を感じているのか、また後肢への機械刺激に対する過敏性が生じるかを検討した。行動量の検討から、開腹術を受けたラットは、術後16時間程度は自発行動が抑制されており、過去の同様のモデルの自発行動量を検討した結果と比較すると、自発行動量が減少している期間は少なくとも疼痛を感じているであろうと推測できた(図1)。また、開腹術前後の足底への機械的刺激に対する逃避閾値を検討した結果、開腹術によって足底の機械刺激過敏性は惹起されないことが明らかになった（図2）。

図１.開腹モデルラットおよび対照ラットにおける自発行動量の経時的変化の比較

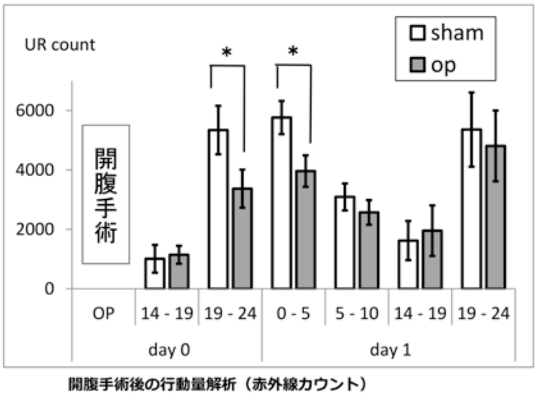
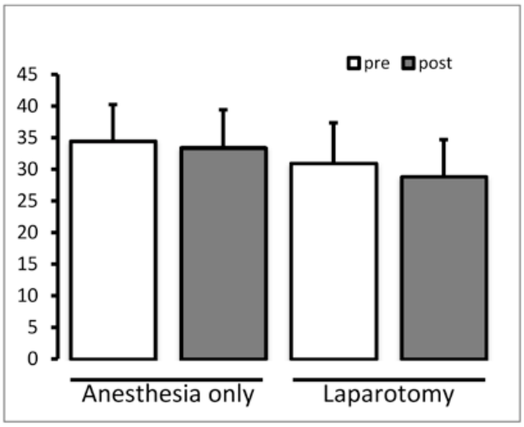


図 2.開腹モデルラットおよび対照ラットの後肢への機械刺激に対する逃避閾値の検討



(2)IA試験に対する開腹術の影響

神経因性疼痛モデル動物を用いた研究や、臨床研究の結果から、疼痛を有するモデル動物においては有痛期の記憶学習能が低下していると予想されたが、我々の予想に反して、術直後の恐怖刺激に対する記憶学習能は低下していなかった（図 3)。

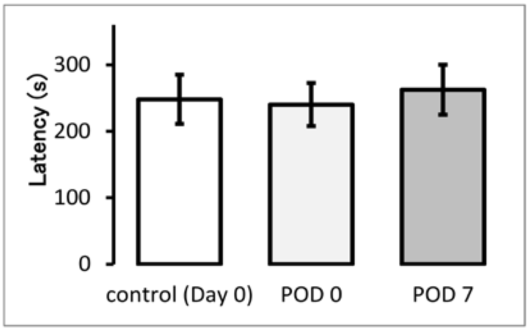
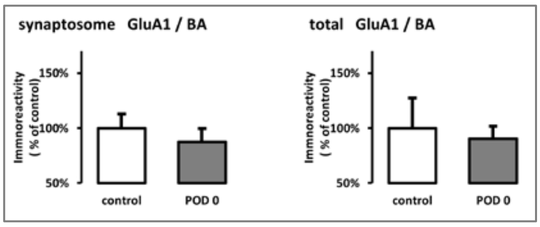


図 3. IA 試験の成績。

(3)海馬シナプトソーム分画における GluA1 タンパク発現量に対する開腹術の影響の検討

開腹術2時間後にIA試験のコンディショニングを受けたラットと麻酔だけを受けた後2時間でコンディショニングされたラットの海馬シナプトソーム中のGluA1発現量を比較したところ、両者に有意な差は認められず（図4）、行動学的な結果をサポートする結果となった。すなわち、急性の侵害性疼痛によって少なくとも海馬依存的な恐怖条件付け記憶は障害されず、記憶学習に重要な役割を果たすGluA1受容体の発現量にも開腹術による影響は見られなかった。

図4. 海馬シナプトソーム分画におけるGluA1受容体発現量に対する開腹術の影響



以上の結果から、当初の予想に反して、急性の術後痛そのものでは恐怖刺激に対する記憶学習は障害されないと考えられた。故に電気生理学的な検討は検討することを中止し、ここまでの結果で研究の中締めを行う予定としている。

これら研究成果の一部は、2013年5月に札幌で行われた日本麻酔科学会第60回総会で発表され、優秀賞に選定された。以上の研究成果はまとめて現在、英文専門誌に投稿準備中である。

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）

〔学会発表〕（計 2 件）

① Ayako Kobayashi, Yoshinori Kamiya, Toshiharu Tazawa, Takahiro Mihara, Yusuke Nakahashi, Hironobu Shinbori, Takahisa Goto : Pharmacological Analysis for the 5-HT Receptors in Electrical Spinal Cord Stimulation for Neuropathic Pain in Rat. 2013 Annual Meeting of the American Society of Aneshtesiologists, Oct 12-16, 2013, San Francisco, USA.

②内本一宏、宮崎智之、紙谷義孝、冨永陽介、松田洋子、後藤隆久. 麻酔薬曝露及び手術侵襲による認知記憶障害メカニズムの解明. 日本麻酔科学会第 60 回学術集会. 2013 年 5 月 23 日－25 日. ロイトン札幌他(北海道)

６．研究組織

(1)研究代表者
小川　賢一（OGAWA　KEN-ICHI）
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号：10233412

(2)研究分担者
新堀　博展（SHINBORI　HIRONOBU）
横浜市立大学・医学部・講師
研究者番号：60404993

紙谷　義孝（KAMIYA　YOSHINORI）
横浜市立大学・医学研究科・客員講師
研究者番号：90381491