

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592308

研究課題名(和文)全身麻酔後の記憶学習能変化とAMPA型グルタミン酸受容体の関与に関する研究

研究課題名(英文)General anesthesia impairs learning via the saturation of synaptic plasticity.

研究代表者

伊奈川 岳 (INAGAWA, GAKU)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：60336584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、成体ラットに対する2時間の臨床用量のイソフルラン曝露によって、その遠隔期(麻酔薬曝露の数日後以降)に、空間認知を含む文脈依存的な記憶学習が障害され、海馬長期増強が抑制されることが示された。さらに海馬GluA1の再取り込み後のユビキチン結合が阻害される一方で、シナプスGluA1が過剰発現しており、シナプスの飽和現象が生じてAMPA受容体のtraffickingが抑制されている可能性が示唆された。またプロポフォル投与ではこれらの海馬の機能障害を認めなかったことから、術後認知記憶障害のリスク因子としては、吸入麻酔薬曝露が大きな要因を占めている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：General anesthesia induces long-lasting cognitive and learning deficits. However, the underlying mechanism remains unknown. The GluA1 subunit of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) is a key molecule for learning and synaptic plasticity, which requires trafficking of GluA1-containing AMPARs into the synapse. Seven days after exposure to 1.8% isoflurane for 2 h (Iso1.8), the inhibitory avoidance learning ($P = 0.002$) and long-term potentiation ($P < 0.001$) were impaired, however, propofol-administered model was not impaired ($P = 0.14$). Iso1.8 also temporarily increased GluA1 in the synaptoneuroosomes ($P = 0.012$) and reduced the GluA1 ubiquitination, a main degradation pathway of GluA1 ($P = 0.014$). Isoflurane impairs hippocampal learning and modulates synaptic plasticity in the postanesthetic period, in contrast to propofol administration. Increased GluA1 may reduce synaptic capacity for additional GluA1-containing AMPARs trafficking.

研究分野：生体制御・麻酔科学

キーワード：吸入麻酔薬 記憶学習 海馬 受動回避 神経可塑性 長期増強 AMPA型グルタミン酸受容体 静脈麻酔薬

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔下手術後に生じる学習障害を含む術後認知障害は、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おり、近年強く問題視されており、周術期ストレスなどに加えて、全身麻酔薬の投与自体が発生要因の候補の一つとされている。幼若期また高齢期においては、一過性の認知障害のみならず記憶学習を含む高次脳機能の中長期的な障害を生じることが報告されているが、成年期（思春期～中年期）の術後患者においてははまだ十分な報告がなされていない。

麻酔後記憶機能障害の機序が明らかになれば、これに対する薬物治療を考える出発点となる。現在日本で年間 200 万件以上の全身麻酔が行われ、その数割で長期的認知機能障害がおきていることを考えると、社会的必要性は極めて大きいと考えられる。

我々の先行研究において、8～10 週齢の若年成体ラットをイソフルランで 2 時間麻酔した後覚醒させ、その後の学習能の変化を抑制性回避試験（IA 試験）で調べると、麻酔覚醒 24 時間後には IA 試験の成績が向上するが、7 日後には低下し、一ヶ月かけて部分的に回復することを発見した。（2011 年、日本麻酔科学会発表）これは、科学研究費補助金基盤 C（代表者 伊奈川岳、平成 20 年～22 年）による研究の成果であり、特に中長期的な学習能低下は新規性の高い知見である。

IA 学習課題は、海馬依存性の文脈依存的な学習であり、海馬シナプスの可塑性にかかわる機序としてシナプス後膜集合電位の海馬における長期増強（Long Term Potentiation: LTP）を基盤とすることが知られている。また海馬における LTP の発現には、AMPA 型グルタミン酸受容体の海馬シナプスへの挿入が必要であることが示されている。（Whitlock JR, et al, Science. 2006）その分子基盤として 4 量体である AMPA 受容体の GluA1 サブユニットのリン酸化が必要なことが知られ

ている。また、IA 試験での学習により AMPA 型グルタミン酸受容体の海馬シナプスへの挿入が起こること、この AMPA 受容体の挿入をブロックすると IA 試験における学習が阻害されること、また AMPA 受容体の挿入が起こったシナプスの数が学習成績と正の相関を示すことを、我々の研究分担者のグループが報告している。（Mitsushima et al, PNAS. 2011）

我々が見出した、イソフルラン麻酔後の IA 試験成績の変化、特に 7 日後の成績低下が、他の麻酔薬でも起こることが証明されれば、このモデルが全身麻酔後認知機能障害の動物モデルとして確立できることに可能性がある。また、全身麻酔後の認知機能障害の原因は明らかになっていない。

また、AMPA 型グルタミン酸受容体は、中枢神経の覚醒、認知、記憶などにかかわる領域のシナプスでは、興奮性に働き、吸入麻酔薬によって抑制されることが知られている。本研究では、吸入麻酔薬の作用点としてはあまり注目されてこなかった AMPA 受容体、特に GluR1 含有受容体の関与を明らかにしようとしている。

2. 研究の目的

本研究の麻酔薬曝露の条件で 8～10 週齢の若年成体ラットを吸入麻酔薬イソフルランで 2 時間麻酔した後、制性回避試験（IA 試験）の成績が 7 日後には低下することは、既に確認済みである。本研究は、引き続き若年成体ラットを用いて、イソフルランの神経毒性の機序を明らかにすることと、ヒト臨床で頻用されている同種の吸入麻酔薬であるセボフルランや静脈麻酔薬であるプロポフォールによる神経毒性の可能性を検証する目的で、次の研究を計画した。

（1）様々な濃度や投与量のイソフルラン、セボフルランとプロポフォールを投与した若年成体ラットの記憶学習能を、IA 学習課題

を用いて検証した。学習能に変化が出る濃度（投与量）や麻酔後の時間を同定した。

（2）全身麻酔の一定期間後の IA 学習課題での成績が、海馬の長期増強と関連するかを、海馬におけるシナプス活動（フィールドポテンシャル）を測定することによって電気生理学的に検証した。

（3）全身麻酔の一定期間後の IA 学習課題の成績変化が、GluR1 含有 AMPA 受容体蛋白の海馬シナプスへの挿入と関連しているかどうかを検証するため、海馬シナプトソームの AMPA 受容体、特に GluR1 を含む受容体蛋白の量、機能、およびそのリン酸化を定量的に測定した。また qRT-PCR 法を用いた mRNA の定量と、免疫沈降法による抽出 GluA1 のコピキチン結合レベルの定量を行った。

3. 研究の方法

（1）麻酔薬曝露モデル作成し、麻酔中の呼吸循環動態の検証した。体重 200-250g 前後（6-8 週齢）の雄性 Wistar-Imamichi ラット及び Sprague-Dawley ラットを用いた。自作プラスチック製麻酔チャンバーを用いた半閉鎖式麻酔・酸素回路・気化器を用いた。0.5 - 1.3MAC 相当のイソフルラン 0.6 - 1.8%を 2 時間投与し、吸入麻酔薬曝露モデルを作成した。また、イソフルランの短時間麻酔下で腹腔内にプロポフォル (150mg/kg, 300mg/kg) を注入し、静脈麻酔薬曝露モデルを作成した。小動物用酸素飽和度測定装置等を用いて、麻酔中の心拍数・呼吸数・酸素飽和度を経時的に測定し、カブノグラムで、排気中の酸素濃度、二酸化炭素濃度、吸入麻酔薬濃度を測定した。麻酔中のチャンバーは恒温槽に設置し、直腸用温度センサーで体温をモニターし、一定環境を保った。

（2）制性回避学習課題（Inhibitory Avoidance test）隣接する明箱と暗箱からなる専用ケージを用いた。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、探索後に暗箱に入ったら、電気ショックをラットの足に与えた。トレーニングの 24 時間後にリテンション（想起）テストを行った。再び試験用ケージの明箱に入れて扉を開け、暗箱に入っていきまでの潜時を測定して、学習効果の指標とした。

（3）海馬における細胞外シナプス電位の測定した。イソフルラン麻酔の後に断頭し、海馬を含む脳スライス（厚さ 300 μ m）を作成した。多点皿電極測定装置（MED64 system）を用い、皿電極にスライスをなじませた後、海馬 CA1 領域で、最も良好な fEPSP が得られる刺激電極を探索し記録を開始した。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。

（4）AMPA 受容体の生化学的検討。イソフルラン麻酔の後に断頭し、迅速に海馬検体を採取した。採取した海馬について、全分画またはシナプトソーム分画を抽出後、Western blotting 法を用いて、蛋白量を測定した。AMPA 受容体 GluA1 サブユニットを定量した。

4. 研究成果

2 時間のイソフルラン曝露モデルでは、7 日後に海馬認知記憶能が障害されるという知見が得られた。

（1）麻酔及び血行動態評価。2 時間の 1.8% イソフルラン麻酔中の血圧、脈拍数と、ABG で測定した pH, PaO₂, PaCO₂, SaO₂ の変化は通常の生理的範囲であった。

（2）行動学的評価。2 時間の 1.8% イソフルラン曝露は、その 7 日後に空間認知・文脈的記憶学習の障害を生じ、それは可逆的であった。また、7 日後の記憶学習障害は、1.8% イ

ソフルラン群で顕著であり、濃度依存性を示した 2 時間の 1.8% イソフルラン曝露の 1, 3, 7, 28 日目のいずれかに、IA test を行ったところ、latency は 7 日目に有意に減少した (コントロール $294 \pm 34s$; 7 日目 $138 \pm 28s$; $P = 0.002$)。さらに 2 時間の 0.6%, 1.2%, 1.8% のいずれかの濃度のイソフルランに曝露させた 7 日後では、latency は 1.8% 群で有意に減少した (コントロール $294 \pm 34s$; 1.8% イソフルラン $138 \pm 28s$; $P = 0.003$)。

(3) 電気生理学的検討。2 時間の 1.8% イソフルラン曝露の 7 日後の海馬急性スライスでは、長期増強 (LTP) の抑制と、長期抑圧 (LTD) の増強が生じていた。高頻度刺激に誘発される LTP は抑制された (コントロール $125.7 \pm 2.5\%$; イソフルラン $105.70 \pm 1.35\%$; $P < 0.001$)。さらに低頻度刺激に誘発される LTD は増強された (コントロール $98.60 \pm 1.7\%$; イソフルラン $78.3 \pm 4.8\%$; $P = 0.003$)。

(4) 生化学的検討。2 時間の 1.8% イソフルラン曝露の 7 日後に、シナプトソーム分画の GluA1 が一時的に増加し、そのユビキチン結合レベルが減少していた。1 日目、7 日目、28 日目のシナプトソーム分画の GluA1 を測定したところ、7 日目に一時的な増加を認めた (コントロール $100 \pm 9.7\%$; イソフルラン $138.9 \pm 8.9\%$; $P = 0.012$)、そして全分画では、統計学的に有意な変化を認めなかった。次に 7 日目の GluA1 の mRNA 量も測定したが変化していなかった (コントロール $100 \pm 13.5\%$; イソフルラン $99.6 \pm 17.9\%$; $P = 0.97$)。さらに 7 日目の GluA1 のユビキチン結合レベルを測定したところ有意に減少していた (コントロール $100 \pm 8.7\%$; イソフルラン $71.1 \pm 6.1\%$; $P = 0.014$)。

(5) プロポフォール 150mg/kg および、300mg/kg (150+75+75 30 分毎に分割投与) の 7 日後では、Iso 曝露群と異なり、IA の成績に有意な低下は生じなかった。(コントロール $224 \pm 34s$; 150mg/kg $208 \pm 33 s$; 300mg/kg

$173 \pm 35s$; $P = 0.602$)。

(6) プロポフォール 150mg/kg および、300mg/kg (150+75+75 30 分毎に分割投与) の 7 日後では、全分画 (コントロール $100 \pm 10.5\%$; 150mg/kg $97.8 \pm 7.4\%$; 300mg/kg $113 \pm 23.1\%$; $P = 0.757$) およびシナプス分画 (コントロール $100 \pm 9.9\%$; 150mg/kg $116 \pm 6.3\%$; 300mg/kg $88 \pm 20.6\%$; $P = 0.381$) の GluA1 発現量は変化していなかった。

本研究では、成体ラットに対する 2 時間の臨床用量のイソフルラン曝露によって、その遠隔期 (麻酔薬曝露の数日後以降) に、空間認知を含む文脈依存的な記憶学習が障害され、海馬長期増強が抑制されることが示された。シナプスにおける GluA1 が過剰発現しており、シナプスの飽和現象が生じて GluA1 の trafficking が抑制されている可能性が示唆された。さらに海馬 GluA1 の再取り込み後のユビキチン結合が何らかの機序で阻害されていることが、GluA1 の過剰発現の原因の一つである可能性が示唆された。

またプロポフォール投与ではこれらの海馬の機能障害を認めなかったことから、術後認知記憶障害のリスク因子としては、吸入麻酔薬暴露が大きな要因を占めている可能性が示唆されると考えられた。

吸入麻酔薬の成体動物の中枢神経系に対する吸入麻酔薬の作用はいまだ未解明な部分が多く、吸入麻酔薬の臨床的必要を鑑みても、今後の更なる研究が望まれる。また、げっ歯類における記憶学習の障害はヒトにおける術後認知障害と関連すると考えられる。吸入麻酔薬の安全な使用のために、吸入麻酔薬の投与濃度などの使用方法と遠隔期の認知記憶能の変化についての臨床研究につなげていく必要があると考える。

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 1 件)

Kazuhiro Uchimoto, Tomoyuki Miyazaki, Gaku Inagawa, Takuya Takahashi, Takahisa Goto et al, “ Isoflurane Impairs Learning and Hippocampal LTP via the Saturation of Synaptic Plasticity”, Anesthesiology. (2014 Aug; 121(2):302-10.) (査読あり)
DOI: 10.1097/ALN.000000000000269.

〔学会発表〕(計 8 件)

Kazuhiro Uchimoto, Tomoyuki Miyazaki, Takahisa Goto et al, “ Very short exposure of volatile anesthetics induces long-term learning deficit in young adult male rats. ” ; ESA2014, Jun 2. 2014, Stockholm, Sweden.

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)

Kazuhiro Uchimoto, Tomoyuki Miyazaki, Takahisa Goto et al, “ Propofol Did Not Affect Contextual Learning After Intraperitoneal Administration in Adult Rats. ” , ASA 2013, Oct 15. 2013, San Francisco, USA.

Kazuhiro Uchimoto, Tomoyuki Miyazaki, Takahisa Goto et al, “ Comparison of post-anesthetic learning deficit due to isoflurane exposure or propofol infusion. ” , ESA 2013. Jun 2. 2013, Barcelona, Spain.

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)

Kazuhiro Uchimoto, Tomoyuki Miyazaki, Takahisa Goto et al, “ Isoflurane causes postanesthesia learning disturbances in adult rats by interfering with trafficking of GluA1-containing AMPA receptors in the hippocampus. ” , ASA 2012, Oct 15. 2012, Washington D.C., USA.

Kazuhiro Uchimoto, Tomoyuki Miyazaki, Takahisa Goto et al,, “ Isoflurane causes postanesthesia learning disturbances in adult rats by interfering with trafficking of GluA1-containing AMPA receptors in the hippocampus. ” , Neuroscience 2012, Sep 19. 2012, Nagoya Congress Center (Nagoya, Aichi).

内本一宏, 西澤絢子, 菊地龍明, 後藤隆久: イソフルラン暴露 24 時間後のラットの行動学的記憶学習に対する概日リズムの影響, 日本麻酔科学会第 58 回学術集会, 2011.5.20, 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

伊奈川 岳 (INAGAWA, Gaku)

横浜市立大学・医学(系)・研究科(研究院)・

客員研究員

研究者番号: 60336584

(2) 研究分担者

後藤 隆久 (GOTO, Takahisa)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・

教授

研究者番号：00256075

内本 一宏 (UCHIMOTO, Kazuhiro)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・

共同研究員

研究者番号：50710951

高橋 琢哉 (TAKAHASHI, Takuya)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・

教授

研究者番号：20423824

宮崎 智之 (MIYAZAKI, Tomoyuki)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30580724

(3)連携研究者

(4)研究協力者

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)