

氏名 亀山 暁世
かめやま あきよ
学位の種類 博士 (医学)
学位記番号 富医薬博甲第 354 号
学位授与年月日 令和 2 年 9 月 30 日
学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当
教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目

Sevoflurane-induced retrograde amnesia is associated with inhibition of hippocampal cell ensemble activity after learning.

(吸入麻酔薬セボフルランによる逆行性健忘は学習後の海馬のセルアンサンブルの阻害と関連する)

論文審査委員

(主査) 教授 鈴木 道雄
(副査) 教授 西条 寿夫
(副査) 教授 森 寿
(副査) 教授 中辻 裕司
(指導教員) 教授 山崎 光章

論 文 要 旨

論 文 題 目

吸入麻酔薬セボフルランによる逆行性健忘は
学習後の海馬のセルアンサンブルの阻害と関連する
Sevoflurane-induced retrograde amnesia is associated with
inhibition of hippocampal cell ensemble activity after learning.

氏 名 亀山 暁世 _____

備考 ① 論文要旨は，2,000字程度とする。

② A4判とする。

〔目的〕

全身麻酔薬の作用機序については、未だ不明な点が多く、全身麻酔薬によって記憶が失われる「健忘」もその発生メカニズムについては解明されていない。一般的に健忘には海馬が重要な役割を担っていることが知られている。齧歯類の実験では、麻酔薬は海馬の神経活動を阻害し、その影響は麻酔中だけでなくその前後にも起こることがわかっている。しかしながら、どのように全身麻酔薬が海馬神経活動を変化させ、健忘を引き起こすのかは明らかとなっていない。

記憶は神経細胞集団として保存されるということがわかっている。神経細胞群（セルアンサンブル）は学習中にまず活性化し、学習後の睡眠中に再活性化する。この再活性化が記憶の固定化と想起に重要である。今回、学習後のセルアンサンブルの再活性化は記憶の固定化に必要な不可欠なため、全身麻酔薬による健忘は学習直後のセルアンサンブルの再活性化を阻害することによるものではないかという仮説を立てた。そこで、生体でのカルシウム(Ca^{2+})イメージングを使用してセルアンサンブルに着目して代表的な全身麻酔薬であるセボフルランを学習直後に施すと海馬神経活動にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

〔方法並びに結果〕

行動学的解析

オスの C57BL/6J マウス（10-12 週齢）を使用して行動学的解析を行った。セボフルランの海馬依存性記憶形成への影響を調べるため、文脈的恐怖条件付け学習の変法である context pre-exposure facilitation effect (CPFE)課題を用いた。マウスを1日目に新奇環境である箱（コンテキスト）に6分間曝露し、直後に麻酔群は2.5%セボフルラン麻酔を30分施した後にホームケージに戻し、コントロール群はすぐにホームケージに戻した。2日目、両群とも前日と同じコンテキストで即座に電撃を施行し、すぐにホームケージに戻した。3日目、両群ともこれまでと同じコンテキストに3分間曝露し、すくみ行動（フリージング）を計測した。このCPFE課題では、マウスがコンテキストという場所情報を記憶して電撃という恐怖記憶を結びつけることにより、すくみ行動を示す。両群とも初日のコンテキストでの行動に差はなかったが、3日目には麻酔群はコントロール群と比べて有意に少ないすくみ行動しか示さなかった。すなわち、学習直後のセボフルランは場所記憶と恐怖記憶との関連づけを阻害し、記憶の固定化に対する健忘と同様の機序で起きると考えられる。

イメージング解析

セボフルラン麻酔による記憶の固定化の阻害における神経細胞集団の動態について調べるため、海馬 CA1 領域の錐体細胞の Ca^{2+} 濃度変化を標識する GCaMP7 遺伝子改変マウスを使用し、超小型蛍光顕微鏡を外科的に留置した。顕微鏡を留置したマウスを学習課題として初日に新奇環境である箱（コンテキスト）に6分間曝露し、直後に麻酔群は2.5%セボフルラン麻酔を30分施した後にホームケージに戻し、コントロール群はすぐにホームケージに戻した。2日目、両群とも同じコンテキストに3分間曝露した。1日目と2日目のコンテキストにおける Ca^{2+} 活動は両群

とも差はなかったが、麻酔群のセボフルラン麻酔中における Ca^{2+} 活動は有意に低下していた。これにより、セボフルラン麻酔は海馬 CA1 の神経細胞活動を抑制することがわかった。1 日目と 2 日目のコンテキストにおける神経活動に対し非負値行列因子分解解析 (Non-negative matrix factorization: NMF) を行ったところ、類似した要素を含むセルアンサンブルが検出された。1 日目と 2 日目のコンテキストでのセルアンサンブルの類似性を定量するために、ドット積を計算した。麻酔群に比べコントロール群では 1 日目のコンテキストと 2 日目のコンテキストで類似性の高いセルアンサンブルが多数検出された。1 日目のコンテキストで検出されたセルアンサンブルが 2 日目のコンテキストでも再出現する確率であるマッチングスコアは、麻酔群に比べコントロール群では有意に高かった。これらにより、麻酔がセルアンサンブルの再活性化を抑制することにより健忘を引き起こすことが示唆された。コントロール群での再活性化を確認するため、1 日目のコンテキスト、ホームケージ、2 日目のコンテキストにおけるセルアンサンブルが類似性をドット積で計算した。ホームケージで再活性化されたセルアンサンブルは 2 日目のコンテキストでも再活性化される傾向にあった。これらの結果により、ホームケージでの休息中に再活性化されたセルアンサンブルは記憶の再活性化に重要である可能性が示唆された。

〔考察〕


セボフルラン麻酔は海馬依存性記憶である CPFE 課題において健忘を引き起こし、神経細胞による学習課題の表現に影響する。今回の結果は全身麻酔薬による健忘は海馬の神経活動を抑制することにより引き起こされることを示している。全身麻酔により神経活動が抑制されること自体はこれまでも報告されているが、学習後の期間が記憶の固定化に重要であるため、その期間に生じている神経活動を阻害することにより健忘が起きると考えられる。我々は以前に、セルアンサンブルの多くが学習後早期に再活性化され、さらにその後に再活性化されて記憶痕跡となること、学習後早期に再活性化されなかったセルアンサンブルはその後も再活性化されることが少ないことを報告した。これらにより、全身麻酔薬による学習後早期の再活性化の抑制は活性化されたセルアンサンブルの減少を引き起こし、記憶の阻害をもたらすことが示唆された。

今回セボフルランによる健忘を認めたが、健忘をもたらす麻酔薬の量や、種類、投与時間についてはさらなる検討が必要である。

〔総括〕

学習後の全身麻酔薬は海馬 CA1 領域の神経活動を阻害することにより、記憶の固定化をセルアンサンブルレベルで抑制した。この知見は、麻酔のメカニズムの解明や、潜在意識の情報伝達に対する解明の一助となる可能性がある。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	亀山 暁世
論文審査委員	職 名 (主査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授	氏 名 鈴木 道雄 西条 寿夫 森 寿 中辻 裕司	
指導 (紹介) 教員	教授	山崎 光章	
Sevoflurane-induced retrograde amnesia is associated with inhibition of hippocampal cell ensemble activity after learning (吸入麻酔薬セボフルランによる逆行性健忘は学習後の海馬のセルアンサンブルの阻害と関連する)			(判定) 合格
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>【目的】</p> <p>全身麻酔薬の作用機序については未だ不明な点が多く、全身麻酔薬による健忘の発生機序も解明されていない。齧歯類では、全身麻酔薬は海馬の神経活動を阻害し、その影響は麻酔中だけでなくその前後にも及ぶことが知られているが、全身麻酔薬がどのように海馬神経活動を変化させ、健忘を引き起こすのかは不明である。記憶は神経細胞集団（セルアンサンブル）として保存される。セルアンサンブルは学習中にまず活性化し、学習後の睡眠中に再活性化するが、この再活性化が記憶の固定化と想起に重要であることが明らかとなっている。</p> <p>本研究で、亀山暁世氏は、全身麻酔薬は記憶の固定化に必須である学習後のセルアンサンブルの再活性化を阻害することによって健忘を生じるという仮説の下で、カルシウム (Ca²⁺) イメージングを使用して、代表的な全身麻酔薬であるセボフルランを学習直後に投与し、海馬のセルアンサンブル活動にどのような影響を及ぼすのかを検討した。</p> <p>【方法および結果】</p> <p>1. 行動学的解析</p> <p>C57BL/6J雄性マウス (10-12週齢) を用い、文脈的恐怖条件付け学習の変法である context pre-exposure facilitation effect (CPFE) 課題を行った。1日目にマウスを新奇環境である箱 (コンテキスト) に6分間曝露し、直後に麻酔群は2.5%セボフルラン麻酔を30分施した後にホームケージに戻し、コントロール群はすぐにホームケージに戻した。2日目に両群とも前日と同じコンテキストにて電気ショックを与え、すぐにホームケージに戻した。3日目に両群とも同じコンテキストにて3分間のすくみ行動 (フリージング) を計測した。</p> <p>麻酔群はコントロール群と比べて有意に少ないすくみ行動を示した。すなわち、学習直後のセボフルラン麻酔は、コンテキストの場所記憶と電気ショックの恐怖記憶との連合を阻害した。</p>			

2. Ca²⁺イメージング解析

海馬CA1領域の錐体細胞のCa²⁺濃度変化を標識するGCaMP7遺伝子改変マウスを使用し、外科的に留置した超小型蛍光顕微鏡によりCa²⁺活動を計測した。1日目にマウスを新奇環境である箱（コンテキスト）に6分間曝露し、直後に麻酔群は2.5%セボフルラン麻酔を30分施した後にホームケージに戻し、コントロール群はすぐにホームケージに戻した。2日目に両群とも同じコンテキストに3分間曝露した。

1日目と2日目のコンテキストにおけるCa²⁺活動には、両群とも差はなかったが、麻酔群のセボフルラン麻酔中のCa²⁺活動は有意に低下していた。すなわち、セボフルラン麻酔は海馬CA1の神経細胞活動を抑制した。

1日目と2日目のコンテキストにおける神経活動に対して非負値行列因子分解解析（Non-negative matrix factorization: NMF）を行ったところ、類似した要素を含むセルアンサンプルが検出された。1日目と2日目のコンテキストで活動したセルアンサンプルの類似性を定量するためにドット積を計算した。コントロール群では、麻酔群に比べて、1日目のコンテキストと2日目のコンテキストで類似性の高いセルアンサンプルが多数検出された。1日目のコンテキストで検出されたセルアンサンプルが2日目のコンテキストでも再出現する確率であるマッチングスコアは、コントロール群では麻酔群に比べて有意に高かった。すなわち、セボフルラン麻酔はセルアンサンプルの再活性化を抑制した。

コントロール群での再活性化を確認するため、1日目のコンテキスト、ホームケージ、2日目のコンテキストにおけるセルアンサンプルの類似性をドット積で計算した。ホームケージで再活性化されたセルアンサンプルは2日目のコンテキストでも再活性化される傾向にあった。

【総括】

本研究で、亀山暁世氏は、全身麻酔薬セボフルランの海馬依存性記憶形成に対する影響を、マウスを用いた行動実験およびCa²⁺イメージングによるセルアンサンプル活動の計測によって検討した。その結果、コンテキスト学習の直後にセボフルラン麻酔を行うと、コンテキストの場所記憶と麻酔後に与えた電気ショックの恐怖記憶との連合が阻害されること、麻酔中の海馬CA1の神経細胞活動が抑制されること、および麻酔前後で同じコンテキストに曝露した時に活動するセルアンサンプルの類似性が低下することから、セボフルラン麻酔はセルアンサンプルの再活性化を抑制することにより記憶の固定化を阻害することを示唆した。

本研究は、全身麻酔薬によって健忘が生じる機序として、海馬CA1領域のセルアンサンプルの再活性化の阻害が関与することを初めて示した点で新規性が高い。また、麻酔の作用機序や麻酔による副作用の病態解明、さらには潜在意識における記憶情報の伝達の解明などにつながる可能性があり、医学における学術的重要性および臨床的発展性を有する。以上より本審査委員会は、本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。