

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

1-1：がん治療の合併症としての認知機能障害  
D) 認知機能障害の分子メカニズム解明

担当責任者

住谷 昌彦	東京大学医学部附属病院 緩和ケア診療部 准教授（部長）
下條 信威	筑波大学 医学医療系臨床医学域 救急・集中治療部 講師
齋藤 繁	群馬大学大学院医学系研究科 麻酔神経科学 教授
緒方 徹	国立障害者リハビリテーションセンター研究所 障害者健康増進・スポーツ科学支援センター センター長
齋藤 洋一	大阪大学 大学院医学系研究科 脳神経機能再生学 特任教授
下川 敏雄	山梨大学 大学院医学工学総合研究部 准教授
研究協力者	
細見 晃一	大阪大学 大学院医学系研究科 脳神経機能再生学 特任助教
清水 豪士	大阪大学医学部附属病院 医員

**研究要旨**

神経障害性疼痛の発症には様々な分子生物学的機序が報告されている。これらの分子生物学的機序には発症に直接的に関わる要因だけでなく、疼痛下行性抑制系と呼ばれる内因性の疼痛制御機構の破綻による要因の2種類がある。いずれも疼痛、しびれの発症には重要な働きを示しており、これらの機序解明から神経障害性疼痛の発症における鍵となる分子を探索しヒト神経障害性疼痛患者の遺伝子多型の調査候補とすることに加えて、それに基づく治療法ならびに予防法の開発の基盤とする。

**A. 研究目的**

集中治療室（ICU）入室中の患者の多くに、せん妄や意識レベルの低下、認知機能の変化が観察されている。原因として、感染や手術などの影響から発生したサイトカイン、活性酸素、コルチゾールの物質の発現が関係している（Girard et al. Crit Care. 2008, MacLillich et al. J Psychocom Res. 2008）。この状況を反映する動物実験モデルとして高炎症モデルがある。我々は、同モデルにおいて、脳内の炎症マーカーの上昇を確認している（13th Endothelin Conference 2013, Tokyo）。さらに、高炎症モデルラットが騒音に暴露された場合、活性酸素、コルチゾール、炎症性サイトカインにより、海馬における脳細胞障害を引き起こし、その結果作業記憶障害に繋がる可能性がある。つまり、より ICUに近い環境を想定し、より臨床的なモデルを作成する。こ

のような高炎症モデルラットの騒音の影響を検討した研究はなく、本研究において、高炎症、騒音が海馬に与える影響を観察し、同時に、高次機能を測定し、高次機能障害を確認し、せん妄モデルとして確立を目指す。さらに、本研究の大きなテーマである抗癌剤投与モデルを用いて、同様の検査に騒音の要素を加え、高炎症モデルラットとの比較検討を行う。また、その成果を踏まえて、介入による効果も検討し、抗癌剤によるせん妄の詳細なメカニズムの解明を目指す。

**B. 研究方法**

**動物**

本研究では8週例の雄 Wistar ラットを使用する。動物管理手順は、筑波大学動物資源センターの倫理委員会によって承認されたガイドラインに沿って行う。実験前に全てのラットは

ケージ内で飼育し、温度は  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照度は 200lux (5:00~19:00) に保持し、食物および水は自由に与える。全てのラットは4グループに分け、1グループの数は10匹とした。1グループはcontrolラットとして通常のホームケージ内で飼育する。2グループは騒音のみに暴露。3グループはLPSを投与した高炎症モデルラットを使用。そして、4グループは高炎症モデルラットを騒音に暴露する。これらの4つのグループを観察する。

### 騒音

音量、音の発生の間隔は事前研究をもとに作成予定。騒音の種類は Tone Generator ソフトから作成したホワイトノイズを使用し、Sound Engine Free ソフトで Hz を 1000~44100Hz に設定する。実験は筑波大学動物実験センターの一室を使用し、音以外の環境変化は実験開始以前と変化がでないように最低限に保ち、騒音を外部に漏らさないために、ラットのゲージが収容できる 70×50×40cm 防音箱内で騒音を発生させる。作成した音源をアンプ（種類は現在、検討中）を使用し音量を増幅し、スピーカー（SC-A7L2）をラットゲージの両端におき white noise を発生させる。音量はラットに暴露させる前に騒音計（SMART SENSOR®）を使用して測定する。対象ラットはLPSを投与直後から騒音に暴露させ、暴露時間は、事前実験でLPS投与後のラットが Y-maze の測定が可能になる 48 時間とする。

### LPS

高炎症モデルラットは Alexander によるモデルを使用する(17)。Wistar rats 250 - 300 g に LPS10mg/kg（大腸菌 055 : B5 を生理的食塩水にて溶解）を腹腔内への投与し 24 時間に観察する。一方で、control 群、騒音のみの群には

同様量の滅菌生理的食塩水 10mg/ kg を腹腔内に投与する。

### 外科処置、検体採取

全てのラットは Y-maze 試験後にペントバルビタールナトリウム (50mg/kg) によって麻酔をした後に解剖し、血液サンプルは腹部切開後に下大静脈より採取する。またコルチコステロンの発現に日内変動があるため、採血は 9~10 時の間に採取し、採血後に脳を取り出す。全てのラットから取り出した脳を 4%パラフィン溶液で固定したのちにメタノールにて脱水し、保存しておく。

### Y-maze、高次機能評価

全てのラットは騒音暴露後に Y-maze テストを実施し、自発交替行動率を測定する。使用した Y-maze は走路長 60cm、走路幅 10cm、高さ 20cm のサイズのものを使用する。3 つあるアームのうちの 1 つの先端にラット置き、8 分間にわたって迷路内を自由に探索させる。ラットが移動したアームを順番はビデオにて記録する。各アームへの移動回数（総アーム選択数）と、連続して異なる 3 本のアームを選択した数（交替行動数）を測定する。交替行動数÷総アーム選択数 $\times 100$ =交替行動率 (%)とし、これを作業記憶の指標とする。各試験は試験実施前に Y-maze の通路はアルコールで洗浄し、紙タオルで拭いた後に実施する。

### 測定物質

4%パラフィン液で固定した脳は  $3 \mu\text{ml}$  の厚さに切片をスライスし、S100B、TUNEL、MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 の免疫組織染色を行う。血液サンプルはエチレンジアミン四酢酸入りの採血管を使用し血漿を採取した。血漿からはコルチコステロンを測定する。

(倫理面への配慮)

本研究は、筑波大学動物資源センターの倫理委員会によって承認されたガイドラインに沿って行う。実験前に全てのラットはケージ内で飼育し、温度は  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照度は 200lux (5:00~19:00) に保持し、食物および水は自由に与える。また、全ての処置は、麻酔下で行い、その方法、投与量も適切な量を設定している。

### C. 研究結果

今のところ、具体的なデータは得られていない。

### D. 考察

同様に、現段階では、考察は出来ない。

### E. 結論

同様に、現段階では、結論は出せない

### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他