

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02898

研究課題名(和文) 全身麻酔による脳内神経炎症機構の解明 -高齢者に最適な麻酔法の確立をめざして-

研究課題名(英文) Elucidation of neuroinflammatory mechanisms linking general anesthesia

研究代表者

河野 崇 (Kawano, Takashi)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：40380076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：術後せん妄(Postoperative delirium: POD)の病態について動物を用いた検討を行い、以下の点を明らかとした。(1)開腹手術と痕跡恐怖条件付けタスクを用いてPODの動物モデルを確立した。(2)PODの病態機序に急性脳内神経炎症が重要な役割を果たす。(3)術後急性脳内神経炎症の慢性化が術後認知予後悪化の原因である。(4)脳内神経炎症の慢性化には加齢が重要な要素となる。(5)加齢に伴う脳内神経炎症には特に海馬と前頭前野が脆弱である。これらの結果から、PODを含む術後認知異常の予防・治療戦略を考えるうえで脳内神経炎症を標的とした介入が有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

術後せん妄(Postoperative delirium: POD)は、高齢手術患者において頻度が高く、退院後のQOL低下や就労困難のみならず、死亡率増加にも関連する。PODの危険因子は、高齢であることが一貫して報告されているが、現時点において科学的根拠の高い予防・治療方法はない。本研究ではこれまでになかったPODの動物モデルを確立した。このモデルによりPODの病態機序の解明が前進すると考えられる。我々はこのモデルを用いてPODの病態に脳内神経炎症が重要な役割を果たすことを明らかとした。今後、脳内神経炎症を標的とした新規の予防・治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Animal research was conducted to elucidate the pathological mechanism of postoperative delirium (POD), and the following points were clarified. (1) An animal model of POD was established using laparotomy and trace fear conditioning tasks. (2) Acute neuroinflammation plays an important role in the pathological mechanism of POD. (3) Chronification of acute neuroinflammation is the cause of worsening postoperative cognitive outcome. (4) Aging is a key factor in the chronicity of neuroinflammation in the brain. (5) The hippocampus and prefrontal cortex are particularly vulnerable to age-related neuroinflammation. These findings imply that interventions targeting the neuroinflammation may be useful in considering preventive and therapeutic strategies for postoperative cognitive disorders, including POD.

研究分野：神経麻酔

キーワード：術後せん妄 脳内神経炎症

## 1. 研究開始当初の背景

術後せん妄 (Postoperative delirium: POD)は、注意、認知、および意識の障害を特徴とする急性の神経精神疾患であり、外科的ストレスに対する不適応反応の結果として発症する。PODは通常、手術後1-5日に生じ、一過性の可逆性疾患と見なされている。しかし、PODは、認知予後の悪化と強い関連があるため、高齢の外科患者における深刻な医療問題として認識されている。PODに関する最新の診療ガイドラインには、診断、予防、および症状管理に関する推奨事項がいくつか記載されている。ただし、いったんPODが発症すると、POD患者の管理は臨床的に困難であるのが現状である。したがって、PODの病態機序に基づく介入戦略および長期的な認知機能低下を防止方策の策定が喫緊の課題となっている。

PODおよびその後の認知機能障害の病態生理学的プロセスは、現時点においては、未解明である。しかし、脳内神経炎症と呼ばれる中枢神経系の炎症は、急性および慢性の両方の状況で認知障害に大きく寄与することを示した報告が増えている。たとえば、脳生検の死後分析では、神経炎症性脳の病態が臨床的せん妄状態に関連していることが示されている。我々は最近、高齢ラットの腹部手術モデルにおいて、外科的処置が術後長期の脳内神経炎症とそれに関連する認知機能低下を誘発したことを報告した。ただし、PODの発生と手術後の脳内神経炎症プロファイルとの関連に関する直接的な実験データは不足している。このような背景から、我々はPODが手術直後の急性脳内神経炎症によって引き起こされる可能性があり、その慢性化が認知予後を悪化させるという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

我々の仮説を検証するために、ラットの麻酔および開腹手術後の脳内神経炎症反応、すなわち炎症性サイトカイン産生の増加の経時的分析を実施することとした。特に、せん妄は全体的な脳機能障害であるため、炎症性サイトカインのレベルをいくつかの脳領域で測定した。さらに、せん妄の主症状は、記憶(認知)と注意の両方が測定可能である痕跡恐怖条件付けタスクによって評価した。加えて、若年と老齢の動物の反応を比較することにより、年齢依存性を調査した。

## 3. 研究の方法

開腹手術モデル: 外科手術の1週間前に、無作為に割り付けられたすべてのラットにオープンフィールド試験を実施した。ラットは、新規の環境である正方形のオープンフィールドに個別に配置され、その行動を10分間録画した。録画映像はその後、ソフトウェアを使用してデジタル分析した。手術当日、麻酔導入は、3%イソフルランと酸素で行い、術中は、イソフルラン1.5-2.0% (0.5L/min O<sub>2</sub>)で維持した。十分な麻酔深度の確認は、下肢引っ込み反射および眼瞼反射がないことによって決定した。手術部位の毛皮を剃り、皮膚をクローヘキシジンで消毒した。2cmの腹部正中切開を行った後、小腸を腹腔から体外に出し、指で3分間操作し、腹腔に戻した。次に腹壁を5-0 Vicryl 縫合糸で閉じ、皮膚を創傷接着剤で閉じた。手術時間は、10分間に規定した。体温は直腸プローブによって監視され、術中は加熱ランブによって36.5 ± 0.3 °Cに維持された。麻酔単独群のラットは、開腹手術ラットと同様な方法で、麻酔、毛刈り、術後鎮痛(ロピバカイン)のみを行った。対照動物には、同じ装置を介して100%酸素のみを与えた。術後痛は、顔の表情に基づいて、0(痛みなし)から2(激しい痛み)まで、Rat Grimace Scaleによって評価した。

痕跡恐怖条件付けタスクは過去の報告に基づいて実施した。ラットをコンディショニングチャンバーに入れ、2分間の慣れ期間を与えた。各動物は、痕跡恐怖条件付けの8回連続のトレーニングセッションを受けた。各痕跡恐怖条件付け試行は、10秒、4kHz、75dBのトーン条件付け刺激(CS)と、0.7秒、0.8mAのフットショック無条件刺激(US)で構成され、30秒のトレース間隔で区切った。30秒のトレース間隔中のフリーズ行動の合計秒数を各ラットについて計算し、トレース間隔の合計時間中のフリーズ時間のパーセンテージとして示した。すくみ行動は、呼吸によって引き起こされる動きを除いて、すべての動きがないことと定義した。フットショックのタイミングキューを避けるために、試行間の間隔の期間は、1-4分の範囲で疑似ランダムに設定した。トレーニングセッションの24時間後、痕跡および文脈記憶保持テストを実行した。痕跡記憶保持テストでは、ラットは内側から黒いアクリルプラットフォームで覆われた観察チャンバーで構成される新しいコンテキストに配置され、2分のベースライン期間を与えた後、CSトーンを与えた。文脈記憶保持テストでは、

ラットは、CS または US を受け取ることなく 4 分間、コンディショニングチャンバーに置かれた。痕跡と文脈記憶保持テストは 4 時間で区切られた。ラットの行動は、すべての実験セッションを通じてビデオに記録され、後に分析した。記憶保持テストでは、4 分間の観察期間中のフリーズ時間のパーセンテージとしてフリーズ動作を評価した。

組織および血清サンプルは、手術後 2 日または 7 日で行動テスト完了後に収集した。脳全体を迅速に採取し、顕微鏡を用いて氷上で解剖し、6 つの異なる脳領域、海馬、内側前頭前皮質 (mPFC)、扁桃体、視床下部、脳幹、および線条体を分離した。すべての脳領域は、1 mL の抽出バッファ-100mg 組織で抽出した。各サンプルは、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含有する緩衝液を用いてホモジナイズした。本研究では、IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  レベルを評価した。これらはどちらも、脳内神経炎症の主要な炎症性サイトカインとして確立されている。

#### 4 . 研究成果

実験群間で術前のオープンフィールド試験で測定されたパラメーターのいずれにも有意差はなかった。このことは、ベースラインの自発運動、不安レベル、および適応能力は各群で同等であったと考えられる。すべてのラットは実験介入を忍容でき、外科的処置から問題なく回復した。さらに、手術後 2 時間の Rat Grimace Scale は、麻酔単独群と手術群間で有意差はなかった。

術後 2 日目での評価: 手術後 1 日目、若年群、高齢群ともに、トレーニングセッション中のフリーズ反応に有意差はなかった。新しいチャンバーを用いて 24 時間後に記憶保持テストを実施した。すべての群において、CS オフセット後の 30 秒のトレース間隔中に、ベースラインと比較して強いフリーズ反応が観察された。群間比較において、コントロール群と麻酔単独群の間でフリーズ率に違いはなかったが、手術ラットは、コントロール群または麻酔単独群よりもフリーズ率が有意に弱かった。これらの結果は、開腹手術により、手術後 2 日での恐怖記憶保持が損なわれたことを示唆している。特に、高齢手術ラットは若年手術ラットよりもフリーズしにくいことが示された。文脈記憶保持テストでは、手術ラットは若年および高齢群の両方でコントロール群より強くフリーズ行動を示した。しかし、若年群と高齢群の間で、フリーズレベルに有意差は見られなかった。

術後 7 日目での評価: トレーニングセッション中、トレース恐怖条件付けの獲得に有意な群間差はなかった。若年群では、痕跡および文脈記憶保持テストにおいて有意な群間差で有意差はなかった。同様に、開腹手術は高齢ラットの痕跡記憶保持に影響を与えなかった。しかし、高齢ラットの文脈記憶保持能力は、コントロール群と比較して手術群で有意に抑制された。

痕跡恐怖条件付けタスクについて: 現時点において、動物におけるせん妄症状の表現型を評価するための確立された方法は存在しない。しかし、本研究では、痕跡恐怖条件付け後の痕跡および文脈記憶保持とラットのせん妄状態との関係について評価した。痕跡恐怖条件付けは、動物がトレース期間で区切られた CS-US 関連付けを行うことを必要とする学習課題である。特に、注意などの実行プロセスに関与する脳領域である mPFC のニューロン活動は、痕跡記憶の形成に不可欠であることが分かっている。したがって、痕跡記憶保持テストは、従来の遅延恐怖条件付けテストでは評価できない注意機能を検出できる。一方、文脈記憶は、海馬の認知機能に選択的に依存している記憶プロセスのエンコードと統合を反映する。認知障害および注意障害は、精神障害の診断および統計マニュアル (DSM)-V 基準におけるせん妄の診断の主要な臨床症状であるため、これらの行動パラダイムは、げっ歯類のせん妄の状態を評価するのに適していると考えられる。

手術 2 日後または 7 日後の行動テスト完了後、海馬、扁桃体、mPFC、視床下部、脳幹、および線条体の TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  レベルを測定した。手術後 2 日目および 7 日目のすべての脳領域における TNF- $\alpha$  の平均レベルは、コントロール群と麻酔単独群の間で同等だった。しかし、手術群の手術後 2 日目の平均 TNF- $\alpha$  レベルは、コントロール群よりも有意に高く、その程度は海馬および mPFC でより顕著であった。一方、手術によって誘発される TNF- $\alpha$  レベルの増加は若年群と高齢群で有意差はなかった。手術後 7 日目においては、若年ラットの脳 TNF- $\alpha$  レベルは手術に影響を受けなかった。一方、高齢ラットでは、mPFC、扁桃体、視床下部、脳幹、または線条体の TNF- $\alpha$  レベルに手術群と対照群で差はなかったが、手術群の海馬の TNF- $\alpha$  レベルは、対照群よりも高かった。TNF- $\alpha$  の血漿レベルは、すべての実験グループで検出可能なレベルを下回っていた。IL-1 $\beta$  レベルに関しては、若年群、高齢群とも TNF- $\alpha$  で観察されたものと同様の群間差があった。

我々のデータは、広範囲の脳領域における手術により誘発される急性脳内神経炎症が、ラットにおける POD 症状の発症に寄与することを示した。ヒト臨床における POD と同様に、脳内神経認知反応は、術後の急性期に顕著に出現する。さらに、術後脳内神経炎症は、年齢に依存して急性から慢性に移行する可能性があり、術後の長期認知予後不良につながる可能性がある。本研究結果により、術後の脳内神経炎症は POD の主要で治療可能な病態機序であることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koyama T, Kawano T, Iwata H, Aoyama B, Eguchi S, Nishigaki A, Yamanaka D, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, Locatelli FM, Yokoyama M	4. 巻 33
2. 論文標題 Acute postoperative pain exacerbates neuroinflammation and related delirium-like cognitive dysfunction in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Anesth	6. 最初と最後の頁 482-486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-019-02635-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishigaki A, Kawano T, Iwata H, Aoyama B, Yamanaka D, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, Eguchi S, Locatelli FM, Yokoyama M	4. 巻 33
2. 論文標題 Acute and Long-Term Effects of Haloperidol on Surgery-Induced Neuroinflammation and Cognitive Deficits in Aged Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Anesth	6. 最初と最後の頁 416-425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-019-02646-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoyama B, Kawano T, Iwata H, Nishigaki A, Yamanaka D, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, Eguchi S, Locatelli FM, Yokoyama M.	4. 巻 139
2. 論文標題 Role of neurosteroid allopregnanolone on age-related differences in exercise-induced hypoalgesia in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 77-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2018.11.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Locatelli FM, Kawano T, Iwata H, Aoyama B, Eguchi S, Nishigaki A, Yamanaka D, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, Yokoyama M.	4. 巻 137
2. 論文標題 Resveratrol-loaded nanoemulsion prevents cognitive decline after abdominal surgery in aged rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 395-402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2018.08.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野 崇
2. 発表標題 高齢者の認知機能
3. 学会等名 第 32 回日本老年麻酔学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山 毅、山中 大樹、青山 文、立岩 浩規、河野 崇、横山 正尚
2. 発表標題 急性脳内神経炎症およびせん妄様行動に及ぼす急性術後痛の関与 -ラット開腹手術モデルでの検討-
3. 学会等名 日本麻酔科学会 中国・四国支部第55回学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村田 和子  (Murata Yoriko)  (50325429)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師    (16401)	
研究分担者	高橋 章  (Takahashi Akira)  (90304047)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授    (16101)	
研究分担者	宮武 加苗  (Miyatake Kana)  (10380362)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教    (16401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	横山 正尚  (Yokoyama Masataka)  (20158380)	高知大学・医学部・名誉教授    (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関