

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10546

研究課題名(和文)術後譫妄と酸化ストレスとの関連解析

研究課題名(英文)postoperative delirium and oxidative stress

研究代表者

竹山 和秀 (TAKEYAMA, Kazuhide)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：80256148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では酸化ストレスモデルとしてDアミノ酸酸化酵素欠損マウスを用いて解析した。(1) Dアミノ酸酸化酵素欠損マウスは野生型マウスに比べて有意に血中の酸化程度が低いこと、(2)酸化ストレスとして頭頸部への放射線照射(x線：7Gy/fraction, 5日照射)した場合Dアミノ酸酸化酵素欠損マウスは野生型に比べて、組織障害ならびに唾液腺機能障害の程度が有意に低いこと、(3) Dアミノ酸酸化酵素欠損マウスは野生型マウスに比べてY字迷路のスコアが高いこと、などを明らかにした。本結果よりDアミノ酸酸化酵素欠損マウスは中枢(特に脳)での酸化ストレスモデルとして用いることが出来ることが期待された。

研究成果の概要(英文)：Decreased levels of oxidative stress, xerostomia after radiation detected in D-amino acids oxidase (DAO) deficient mice compared with wild ones. DAO deficient mice have high score of cognitive function compared with wild ones. These results indicate DAO deficient mice are useful for analysis of postoperative delirium and oxidative stress.

研究分野：麻酔科学

キーワード：せん妄 酸化ストレス NMDA Dアミノ酸 Dアミノ酸酸化酵素

### 1. 研究開始当初の背景

生体が内因性あるいは外因性に生じる活性酸素種 (ROS) などを十分に処理できず、活性酸素種の産生系 (酸化反応) と消去系 (抗酸化反応) のバランスが崩れた状態を酸化ストレス状態と呼ぶ。酸化ストレスは、老化をはじめとして動脈硬化、高血圧、腎臓病、脳血管障害など多くの疾患・病態にも影響を及ぼすことが知られている。ROS の生成を誘導する因子 (外因) として薬物がある。ROS を生じる薬物としてアセトアミノフェン、ドキシソルピシン、シスプラチンなどが知られている。一方、プロポフォールなどは中枢における抗酸化作用を有するといわれている (Murphy et al., Br J Anest. 1992)。また、手術自体が酸化ストレスをきたすことがよく知られている。

せん妄は急性発症、揺らぐ経過、不注意、支離滅裂な思考と意識レベルの変容で特徴づけられる。せん妄が周術期において患者の約半数に起こるとの報告がある。せん妄は手術のストレスに関係があると考えられているが、このメカニズムについては未だ明らかにされていない。最近の報告ではプロポフォール鎮静下の脊椎麻酔が、術後せん妄の発生頻度を低下させることが示された。アルツハイマー病患者にもせん妄が現れるが、このアルツハイマー病等の中枢神経障害の病態との関与が注目されているものに中枢の酸化ストレスがある。

アルツハイマー病におけるせん妄発症の要因が TRPM3 C 末端酵素 (ADP-ribose pyrophosphatase) 活性亢進を介したカルシウムホメオスタシス異常であることが報告された。TRPM ファミリーは細胞の代謝、分化、増殖、細胞死の調節に重要な役割を果たしており、酸化ストレス、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇、温度変化、pH の変化、機械刺激、浸透圧の変化等で活性化される。

以上の先行研究から、研究開始当初、活性酸素種消去能 (抗酸化能) が低下している状態において、TRPM3 C 末端酵素活性亢進を介した TRPM3 受容体の活性化を誘導し術中酸化ストレスが中枢神経障害・術後せん妄が生じるとの仮説に至った。

### 2. 研究の目的

近年、術後せん妄の機序として N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の機能変化による neurotoxin の関与が考えられている。すなわち、侵襲を伴う手術による脳内コルチゾールやサイトカイン濃度の上昇が tryptophan kynurenine 回路を活性化して quinolinic acid 分泌を促進し、NMDA 受容体を介し neurotoxin 分泌せん妄および認知障害をもたらすと考えられている (工藤ら, 日集中医誌, 2011)。

申請者らは、遊離型 D セリンが NMDA 受容体活性の調節因子として脳内疼痛シグナル伝達に関与することなどを明らかにし

た (Ito, Yoshikawa et al., J. Anesth, 2014; Ito, Yoshikawa et al, Eur. J. Pharmacol, 2008)。D セリンは、セリンラセマーゼ (Serine racemase: Srr) により L セリンから生成される。また、D セリンは D アミノ酸化酵素 (D-amino acid oxidase; DAO) によりケト酸に分解されるとともに過酸化水素を発生する。

本研究では、術後せん妄と酸化ストレスとの関連解析を行うにあたり、D アミノ酸化酵素欠損マウス (DAO 欠損マウス) が酸化ストレスモデルとしての有用性について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 酸化ストレス測定

生体は活性酸素種の産生系 (酸化反応) と消去系 (抗酸化反応) のバランスを保つことで恒常性を維持している。申請者は産生系の指標として血清中過酸化物を d-ROM (diacron reactive oxygen metabolites) test 法により、消去系の指標として BAP (biological anti-oxidant potential) test 法により解析した。すなわち、血清をアルキル置換芳香族アミン (N,N-dimethyl p-phenylenediamin) あるいは三価鉄チオンアン塩と室温下で混合し、有色の誘導体の発色強度ならびに変化率を測定した。

#### (2) 頭頸部への放射線照射

中枢 (脳) への酸化ストレスとして頭頸部への放射線照射を行った。すなわち、X 線 (150 kV, 20 mA) の雌性マウス (8 週齢) 頭頸部への局所照射を各々 5 日間行った (2-7 Gy/fraction)。

#### (3) 頭頸部への放射線照射による酸化ストレスの評価

頭頸部への放射線照射による酸化ストレスの評価として、頭頸部がんに対する放射線治療による有害作用である口腔粘膜炎ならびに唾液腺機能障害について検討した。

最終照射後 2~6 日目に、ピロカルピン (0.2 mg/kg) を筋注後に唾液量を測定し、組織 (舌・口唇・唾液腺) を摘出した。また、舌粘膜上皮細胞厚を計測して口腔粘膜上皮に対する放射線防護効果を評価した。また照射 30 日後の生存マウスについても同様の評価を実施した。最終照射より 6 日後に舌の潰瘍が 1% トルイジンブルー染色で明確に観察され、舌を摘出し、粘膜上皮厚を計測した。

#### (4) Y 字型迷路試験

認知的能力が必要な行動の中で注意機能の測定に Y 字型迷路による自発的交替行動課題を用いた。

3 本のアームをすべて同じ大きさにしてアーム間の角度を 120 度とした Y 字型に配置した arm 内を探索した際に認められる

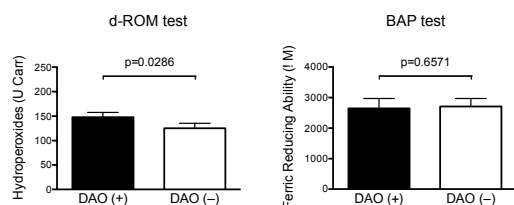
自発的交替行動を短期記憶として評価する。具体的には、マウスを Y 字迷路のいずれかのアームの先端に置き、5 分間にわたって迷路内を自由に探索させ進入したアームを記録する。動物が測定時間内に各アームに進入した回数（総アーム進入回数）および連続して異なる 3 本のアームに進入した組み合わせの数（交替行動数）を下式に代入し、自発的交替行動率（%）を算出する。自発的交替行動率を短期記憶能力のスコアと評価する。

自発的交替行動率（%）=（交替行動数）÷〔（総アーム進入回数）- 2〕× 100

#### 4. 研究成果

##### (1) D アミノ酸酸化酵素と酸化ストレス

ddY 系野生型マウス [DAO(+)] および ddY 系 DAO 欠損マウス [DAO(-)] より採取した血清を d-ROM test、BAP test により解析した。



その結果、DAO 欠損マウスにおいてヒドロキシペルオキシド値が野生型に比べて有意に低下していた。一方、還元能に関しては両者に有意な差は認められなかった(上図)。D アミノ酸酸化酵素は D セリンをはじめとする中性 D アミノ酸をケト酸に分解するとともに過酸化水素を発生する。すなわち、DAO 欠損マウス血中過酸化水素量が野生型に比べて少ないため、酸化ストレスが少ないものと考えられる。

##### (2) 頭頸部への放射線照射による酸化ストレスによる障害

ddY 系野生型 [DAO(+)] および ddY 系 DAO 欠損 [DAO(-)] マウス頭頸部への X 線照射により、舌粘膜上皮細胞の菲薄化が観察された。低線量照射 (X 線 3.5 Gy/fraction) では、舌粘膜上皮細胞は、むしろ肥厚傾向が観察された。DAO 欠損マウスにおいて舌粘膜上皮細胞の菲薄化の程度が野生型に比べて有意に減少していた。また、マウス頭頸部への X 線照射 (7 Gy/fraction) により、ピロカルピン刺激下の唾液分泌量低下が観察された。DAO 欠損マウスにおいて唾液分泌量は野生型に比べて有意に増加していた。これらの結果より、頭頸部領域への放射線照射後の口腔内正常組織障害の過程として、分割照射中に発症する唾液分泌の減少、引き続き起こる舌を含む口腔粘膜細胞の菲薄化・脱落に起因する潰瘍の発生が予測された。

##### (3) D アミノ酸酸化酵素と認知的能力

ddY 系野生型マウス [DAO(+)] および ddY 系 DAO 欠損マウス [DAO(-)] を Y 字型迷路による自発的交替行動課題を用い、自発的交替行動率 (%) により認知的能力を解析した。その結果、DAO 欠損マウスにおいて自発的交替行動率が野生型に比べて有意に高かった。

以上の本研究により、術後せん妄と酸化ストレスとの関連解析を行うにあたり、D アミノ酸酸化酵素欠損マウス (DAO 欠損マウス) が酸化ストレスモデルとしての有用性が示唆された。今後、DAO 欠損マウスおよび野生型マウスの手術によるストレス負荷後における酸化ストレスを d-ROM test、BAP test による解析、続いて各種麻酔薬による酸化ストレスの相違について検討する予定である。

#### < 引用文献 >

(1) Murphy P.G., et al., The antioxidant potential of propofol. Br.J.Anesth. 1992, 68(2), 613-618.

(2) Ito M, Yoshikawa M, Ito K, Matsuda M, Jin X.L., Takahashi S, Kobayashi H, Suzuki T. Antinociceptive effect of intracerebroventricular administration of d-serine on formalin-induced pain. J. Anesthesia 2014, 28(2), 228-234

(3) Ito K, Yoshikawa M, Maeda M, Jin XL, Takahashi S, Matsuda M, Tamaki R, Kobayashi H, Suzuki T, Hashimoto A. Midazolam attenuates the antinociception induced by D-serine or morphine at the supraspinal level in rats. Eur J Pharmacol 2008; 586(1-3): 139-144.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

(1) Yajima Y, Kawaguchi M, Yoshikawa M, Okubo M, Tsukagoshi E, Sato K, Katakura A. The effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) on the nephrotoxicity in the mouse during repeated cisplatin (CDDP) treatments. J Pharmacol Sci 2017; 134(2): 108-115. 査読有

(2) Matsuda M, Yoshikawa M, Kan T, Watanabe M, Ajimi J, Takahashi S, Miura M, Ito K, Kobayashi H, Suzuki T. Effect of peptidase inhibitors on dynorphin A (1-17) or (1-13)-induced antinociception and toxicity at spinal level. Pharmacol Pharmacy 2017, 8, 33-51. 査読有

(3) Matsuda M, Yoshikawa M, Kan T, Jin XL, Takahashi S, Kobayashi H, Nishiyama T.

Inhibition of AMPA receptors and activation of the glycine site or polyamine site of NMDA receptors at the supraspinal level induces antinociception. *Eur J Biomed Pharm Sci* 2017, 4(3), 77-83. 査読有

(4) Ogane M, Okubo M, Yoshikawa M, Shinomiya T, Tsukagoshi E, Kawaguchi M. Rebamipide, an anti-ulcerative drug, inhibits induction of salivary dysfunction by benzodiazepines. *Oral Disease* 2017, 23, 511-517. 査読有

(5) Takeyama K, Suzuki Y, Yoshikawa M, Suzuki T. Is the perfusion index useful in early detection of high spinal subarachnoid block during cesarean section? *Tokai J Exp Clin Med* 2016, 41 (4), 190-197. 査読有

(6) Irie M, Yoshikawa M, Ono R, Iwafune H, Furuse T, Yamada I, Wakana S, Yamashita Y, Abe T, Ishino F, Kaneko-Ishino T. Cognitive function related to the Sirh11/Zcchc16 gene acquired from an LTR retrotransposon in eutherians. *PLoS Genet.* 2015, 11(9): e1005521. 査読有

(7) Ajimi J, Yoshikawa M, Takahashi S, Miura M, Tsukamoto H, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Effect of three peptidase inhibitors on antinociceptive potential and toxicity with intracerebroventricular administration of dynorphin A (1-17) or (1-13) in rat. *J. Anesthesia* 2015, 29(1), 65-77. 査読有

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

竹山 和秀 (TAKEYAMA, Kazuhide)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：80256148

### (2)研究分担者

吉川 正信 (YOSHIKAWA, Masanobu)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：90276791