

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09357

研究課題名(和文)術後せん妄と脳内神経伝達物質受容体発現に関する研究

研究課題名(英文)Studies on postoperative delirium and expression of neurotransmitter receptors in central nervous system.

研究代表者

村川 雅洋 (Murakawa, Masahiro)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：90182112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、各種麻酔薬が、術後せん妄に關与する可能性がある脳内ドパミンD2受容体やアセチルコリンM1受容体の発現に及ぼす影響を調べることである。雄性Wistarラットに、デクスメドミジン、プロポフォル、ミダゾラム、セボフルラン、亜酸化窒素をそれぞれ4時間投与し、大脳皮質、線条体、海馬、脳幹、小脳のDrd2(D2受容体遺伝子)、Chrm1(M1受容体遺伝子)の発現を、リアルタイムPCR法を用いて検討した。いずれの麻酔薬も、各部位におけるDrd2とChrm1の発現に有意の変化をきたさなかった。D2受容体とM1受容体におけるシナプス後の変化は、本研究で用いた各薬剤量では明らかではなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のプロトコルでは、現在臨床利用されている5種類の麻酔・鎮静薬、デクスメドミジン、プロポフォル、ミダゾラム、セボフルラン、亜酸化窒素は、ドパミンD2受容体とアセチルコリンM1受容体におけるシナプス後の変化を起こさないことが示唆された。術後せん妄(POD)/術後認知機能障害(POCD)の病態は完全に解明されておらずいくつかの説がある。本研究成果は、POD/POCDの病態が麻酔薬の神経伝達物質受容体に及ぼす影響のみでは説明できないことを支持するものであり、この分野のさらなる研究が必要であることを示した点で学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to investigate whether several anesthetics affect expression of dopamine D2 and acetylcholine M1 receptors in the rat brain. Thirty-six male rats were divided into six groups (n = 6); five groups for anesthetics and one for control. The five groups were anesthetized with either dexmedetomidine, propofol, midazolam, sevoflurane, or nitrous oxide for 4 hrs. Then, real-time polymerase chain reaction was performed to examine the expression of Drd2 (dopamine D2 receptor) and Chrm1 (acetylcholine M1 receptor) in the cerebral cortex, hippocampus, corpus striatum, brain stem, and cerebellum. There were no significant differences among the groups regarding Drd2 and Chrm1 mRNA expression of each region of the brain. Postsynaptic changes of dopamine D2 and acetylcholine M1 receptors due to administration of dexmedetomidine, propofol, midazolam, sevoflurane, and nitrous oxide are unlikely to occur at the doses of each anesthetic used in the present study.

研究分野：麻酔科学

キーワード：術後せん妄 ドパミン アセチルコリン mRNA 麻酔薬 鎮静薬

1. 研究開始当初の背景

術後せん妄(postoperative delirium: POD)、術後認知障害(postoperative cognitive dysfunction: POCD)は大手術後に意識混濁に加えて幻覚や錯覚がみられる状態で、人工呼吸用気管チューブや輸液用カテーテルの自己抜去などを引き起こし、手術患者の予後に重大な影響を与える合併症である¹⁾。POD と POCD はオーバーラップする概念であり、POCD は死亡率の上昇とも関連することが知られている。そのため、POD/POCD の病態の解明が望まれている。

いくつかの研究により、手術中に使用した麻酔薬が POD/POCD の発生に関連することが示されている。POCD の病態は不明な点が多いものの、この発生にはドパミンの過剰もしくはアセチルコリンの減少などが関連しているという説がある。実際に POD の治療には脳内ドパミン拮抗薬である向精神薬や脳内アセチルコリン代謝阻害薬(抗コリンエステラーゼ薬)がある程度の効果を有する。これは、脳内で相互作用を持つドパミン作動性ニューロンとコリン作動性ニューロンのバランス崩壊が、臨床症状発現の一因である可能性を示すものと考えられる²⁾。

一方、近年、手術時の麻酔や術後鎮静に用いられる薬物は、短時間作用性のものが多く、投与中止後は神経活動に及ぼす影響も速やかに消失するものと考えられる。これまで、研究代表者らは、セボフルラン吸入やプロポフォール、ミダゾラム、デクスメデトミジン静注によって、ラットの大脳皮質のアセチルコリン放出が減少することを報告してきたが、減少したアセチルコリン放出は、ミダゾラム以外の薬物投与中止後速やかに回復していた^{3,4)}。

ミダゾラムによる鎮静後は、せん妄をきたしやすいといわれているが、ミダゾラム投与後のアセチルコリン放出が投与中止後も減少し続けるという結果は、せん妄の発症に脳内アセチルコリン系が関与しているという仮説を裏付けるものである。しかし、せん妄は他の麻酔・鎮静薬投与後にも発症するものであり、神経伝達物質放出の増減、すなわち、シナプス前の変化が、麻酔や鎮静後速やかに元に戻っても、術後や鎮静からの覚醒後にせん妄が起こることを示している。

したがって、せん妄の原因となるような麻酔・鎮静の影響が残るとすれば、受容体発現などのシナプス後の変化が考えられる。そこで、手術時の麻酔や術後集中治療に用いられる麻酔薬や鎮静薬がこれらの神経伝達物質受容体の発現に影響を及ぼすか否かが、本研究の課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、術後せん妄に関する可能性のある上記の神経伝達物質、アセチルコリンおよびドパミンの受容体発現が、全身麻酔薬並びに鎮静薬によって変化するか否かを、ラットの脳におけるドパミン D2 受容体、アセチルコリン M1 受容体の発現を調べることで明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験に使用した動物

本研究の実験手順は、福島県立医科大学動物実験施設の承認を得た(承認番号:2019122)。本研究では、36匹のオスのWistarラット(体重 192 ± 42 g、5-9週齢)を用いた。実験は午前10時30分から正午までの時間に開始した。この36匹を6匹ずつ、5つの麻酔薬投与群(デクスメデトミジン、プロポフォール、ミダゾラム、セボフルラン、亜酸化窒素)と対照群に分けた。デクスメデトミジン、プロポフォール、ミダゾラムでは、セボフルラン5%で麻酔導入し、尾静脈に24G留置針を挿入し、それぞれデクスメデトミジン群では $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ を10分間ボラス投与後に

0.4 µg/kg/min、プロポフォール群では 4 mg/kg ボーラス投与後に 50 mg/kg/h、ミダゾラム群では 3 mg/kg ボーラス投与後に 25 mg/kg/h を静脈内投与した。セボフルラン群と亜酸化窒素群では、ラットを透明な筒に入れ、セボフルラン 3.3%もしくは亜酸化窒素 75%を 4 時間投与した。対照群では麻酔薬の投与は行わなかった。

脳の採取

プロポフォール群、ミダゾラム群、セボフルラン群では麻酔薬の投与開始から 4 時間後に断頭した。デクスメトミジン群、亜酸化窒素群、対照群では、セボフルラン 5%で麻酔下に断頭した。その後、氷上で大脳皮質、線条体、海馬、脳幹、小脳を 10 分以内に取り出し、-80 で凍結保存した。

リアルタイム PCR 法

凍結保存した脳を 3mm 四方にスライスし、RNeasy® mini kit (QIAGEN K.K., 東京)を用いて RNA を抽出し、10 ng/µL の濃度に希釈した。なお、抽出した RNA 濃度は Nano Drop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific K.K., 東京)を用いて測定した。

Drd2 (D2 受容体をコードする遺伝子)、*Chrm1* (M1 受容体をコードする遺伝子)の発現を調べるために、リアルタイム PCR 法を用いた。リアルタイム PCR は、One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Takara Bio Inc., 滋賀)を用い、製品プロトコルに則って操作を行った。リファレンス遺伝子として *Gapdh* を用い、表 1 の配列のプライマーを用いた。サーマルサイクラーは MyiQ™2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, アメリカ)を用い、反応プロトコルは製品プロトコルに従い 42・5 分間の後、95・10 秒間、95・5 秒間の後、60・30 秒間を 40 サイクル、95・15 秒間、60・30 秒間の後、95・15 秒間とした。解析は三重測定を行い、平均値を解析に用いて、脳の各部位における *Drd2* と *Chrm1* の発現量を iQ™5 Optical System Software (Bio-Rad Laboratories)を用いて 2-ΔΔCt 法で測定した。

表 1：プライマー配列

		Primer sequence (5' - 3')
<i>Drd2</i>	forward	CACTCAGATGCTTGCCATTGTTC
	reverse	GTGGGATGTTGCAATCACAGTGTA
<i>Chrm1</i>	forward	GCCTTCATCCTCACCTGGACA
	reverse	TCCCACAGGGTTTCAGGAACA
<i>Gapdh</i>	forward	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG
	reverse	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA

統計解析

すべての統計解析は、EZR⁵⁾(ver. 1.41, Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan)を用いて行った。データは、Kruskal-Wallis test を用いて解析し、有意差がみられた場合には Bonferroni の多重比較を行った。本研究では、p<0.05 を有意な差とし、すべての検定は両側検定を行った。

4. 研究成果

脳の各部位において、各群間における *Drd2* と *Chrm1* の mRNA 発現量に有意な差はなかった(表 2, 3)。

表 2 : 麻酔薬投与から 4 時間後の *Drd2* の mRNA 発現量

	対照群	デクスメドミジン	プロポフォール	ミダゾラム	セボフルラン	亜酸化窒素	p value*
皮質	0.04±0.02	0.04±0.01	0.06±0.04	0.06±0.03	0.03±0.01	0.09±0.11	0.62
海馬	0.02±0.02	0.03±0.02	0.03±0.02	0.03±0.04	0.02±0.01	0.06±0.07	0.55
線条体	2.31±0.44	2.29±0.37	2.50±1.38	2.70±0.32	2.11±0.35	3.18±1.41	0.24
脳幹	0.15±0.05	0.16±0.12	0.18±0.07	0.16±0.06	0.15±0.45	0.35±0.37	0.73
小脳	0.01±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.01±0.00	0.02±0.01	0.86

それぞれの値は、平均 ± 標準偏差を示す。p 値は Kruskal-Wallis test により算出した。

表 3 : 麻酔薬投与から 4 時間後の *Chrm1* の mRNA 発現量

	対照群	デクスメドミジン	プロポフォール	ミダゾラム	セボフルラン	亜酸化窒素	p value*
皮質	0.97±0.33	1.09±0.14	0.99±0.40	1.22±0.41	0.85±0.20	3.01±3.20	0.31
海馬	1.58±0.46	1.77±0.17	1.63±0.55	1.81±0.57	1.47±0.22	3.97±3.67	0.25
線条体	0.68±0.23	0.76±0.14	0.82±0.24	0.93±0.44	0.68±0.15	1.01±0.61	0.60
脳幹	0.02±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.00	0.06±0.07	0.054
小脳	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.05±0.10	0.60

それぞれの値は、平均 ± 標準偏差を示す。p 値は Kruskal-Wallis test により算出した。

本研究では、*Drd2* と *Chrm1* の mRNA の発現について、すべての脳の部位で投与した麻酔薬による有意差はなかった。この理由としていくつかの原因が考えられた。1 点目は、実験に用いたラットが比較的若いことである。手術侵襲に加えて 2-3%のセボフルランを 2 時間投与した 2 か月のラットにおいて、POCD モデルを作製した報告があるが⁶⁾、POCD は高齢であるほど発生しやすい⁷⁾。2 点目は、麻酔の深度である。今回使用した麻酔薬の投与量は、先行研究^{3,4)}とわれわれのパイロット研究に基づいて設定した。Nemoto ら³⁾は、われわれが今回使用した投与量とほぼ同じ量のデクスメドミジン、ミダゾラム、プロポフォールを投与し、対光反射消失を確認している。セボフルランの投与量については、2.5%・6 時間の暴露が POCD を引き起こすことが報告されており⁸⁾、本研究での使用量は POCD を引き起こすには十分であると思われる。POD/POCD と麻酔深度が関連するかについては議論が残るものの、われわれが今回使用した麻酔薬の量は神経伝達物質受容体に変化を及ぼすのに十分ではなかった可能性がある。3 点目は、いくつかの研究では麻酔薬に加えて手術侵襲が加わることが POCD の原因となることを示唆しているが、本研究では麻酔薬のみを投与しており、これが結果に影響した可能性がある。

本研究にはいくつかの制限がある。ラットにおける POCD に関する先行研究では、Morris water maze test による行動を評価しているものがあるが^{6,9)}、本研究ではこれは行っていない。さらに、ドパミンやアセチルコリン受容体にはいくつかのサブタイプがあるが、本研究では *Drd2* と *Chrm1* の mRNA の発現しか調べていない。そのほか、本研究では麻酔薬の暴露後に覚醒させていない点、受容体タンパクの発現量は調べていない点、サンプル数が少なくタイプ エラーをひき起こす可能性がある点などが制限である。また、すべてのラットは短時間ではあるもののセボフルランに暴露している。しかしながら極めて短時間であるため、これが結果に及ぼした影響は最小限であろう。

5-9 週齢のラットにおける *Drd2* と *Chrm1* の mRNA の発現量は、デクスメトミジン、プロポフォル、ミダゾラム、セボフルラン、亜酸化窒素、対照群の間で有意な差はみられなかった。本研究のプロトコルでは、デクスメトミジン、プロポフォル、ミダゾラム、セボフルラン、亜酸化窒素によるドパミン D2 受容体とアセチルコリン M1 受容体におけるシナプス後の変化は起きない可能性が高い。

< 引用文献 >

- 1) Hamilton GM, Wheeler K, Di Michele J, Lalu MM, McIsaac DI. A Systematic Review and Meta-analysis Examining the Impact of Incident Postoperative Delirium on Mortality. *Anesthesiology*. 2017;127:78-88.
- 2) Steiner LA. Postoperative delirium. Part 1: pathophysiology and risk factors. *Eur J Anaesthesiol*. 2011;28:628-636.
- 3) Nemoto C, Murakawa M, Hakozaki T, et al. Effects of dexmedetomidine, midazolam, and propofol on acetylcholine release in the rat cerebral cortex in vivo. *J Anesth*. 2013;27:771-774.
- 4) Shichino T, Murakawa M, Adachi T, et al. Effects of inhalation anaesthetics on the release of acetylcholine in the rat cerebral cortex in vivo. *Br J Anaesth*. 1998;80:365-370.
- 5) Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:452-458.
- 6) Feng X, Chen L, Zhou R, Bao X, Mou H, Ye L, Yang P. Blocking the mineralocorticoid receptor improves cognitive impairment after anesthesia/splenectomy in rats. *Int J Med Sci*. 2021;18:387-397.
- 7) Evered L, Scott DA, Silbert B, Maruf P. Postoperative cognitive dysfunction is independent of type of surgery and anesthetic. *Anesth Analg*. 2011;112:1179-1185.
- 8) Zhao Z, Ma L, Li Y, Zhang Q, Wang Y, Tai Y, Wang Q. MiR-124 protects against cognitive dysfunction induced by sevofurane anesthesia in vivo and in vitro through targeting calpain small subunit 1 via NF- κ B signaling pathway. *Adv Clin Exp Med*. 2021;30:701-709.
- 9) Oberman K, Hovens I, de Haan J, Falcao-Salles J, van Leeuwen B, Schoemaker R. Acute pre-operative ibuprofen improves cognition in a rat model for postoperative cognitive dysfunction. *J Neuroinflammation*. 2021;18:156.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Keisuke Yoshida, Masahiro Murakawa & Atsuyuki Hosono	4. 巻 36
2. 論文標題 Effects of anesthetics on expression of dopamine and acetylcholine receptors in the rat brain in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-022-03046-7	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	吉田 圭佑 (Yoshida Keisuke) (00769573)	福島県立医科大学・医学部・助手 (21601)	

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