

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08967

研究課題名(和文)術後せん妄の病態生理および睡眠障害との因果関係の解明

研究課題名(英文)Clarification of the pathophysiology of postoperative delirium and of its causal relationship with the sleep disorders

研究代表者

森 厚詞 (Mori, Atsushi)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：80771980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、イソフルラン全身麻酔下で開腹手術(「麻酔+開腹手術」)処置したマウスを利用し、非臨床レベルから術後せん妄(POD)の病態生理の解明を試みること、せん妄促進因子として挙げられる睡眠障害とPODの関連性についてレム断眠ストレス負荷モデルを利用して検討することを目的とした。「麻酔+開腹手術」処置4時間後のマウスは、セロトニン代謝物濃度の増加に伴う神経伝達変化が引き起こされ、この現象がPODの病態生理に関与することが示唆された。レム断眠ストレス負荷はそれ自体ではセロトニン神経伝達に影響を及ぼすことはなく、本研究で睡眠障害とせん妄の関連性を明らかにすることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外科治療を受ける高齢患者に好発する術後せん妄(POD)は、術後急性に発症する精神症状および意識障害を呈する一般的な術後合併症である。POD発症患者には在院日数の延長と死亡率の上昇が報告されているほか、その後の認知症の発症にも関与するなど、予後に悪影響を及ぼすことが示唆されている。現状、POD予防・治療のための薬物療法は十分ではない状況にある。本研究では、セロトニン神経伝達変化が術後せん妄の病態生理に関与することが示唆された。今後のさらなる解明研究により、POD発症予防法・治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to elucidate the pathophysiology of postoperative delirium (POD) non-clinically using mice treated with laparotomy under isoflurane anesthesia (Iso/Ope). In addition, we examined the relationship between sleep disorders, which are cited as delirium-promoting factors, and POD using Iso/Ope treatment and REM sleep deprivation model mice.

Four hours after the Iso/Ope treatment, changes in serotonin neurotransmission were induced in mice due to an increase in the concentration of serotonin metabolites, suggesting that this phenomenon is involved in the pathophysiology of POD. REM sleep deprivation alone does not affect serotonin neurotransmission, and we were unable to clarify the relationship between sleep disorders and delirium in this study.

研究分野：医歯薬学、外科系臨床医学、麻酔科学

キーワード：術後せん妄 疾患モデルマウス 神経伝達変化 睡眠障害 REM断眠ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外科治療を受ける高齢患者に好発する術後せん妄(POD)は、術後急性に発症する注意力の障害、認知機能の低下、幻覚・妄想・興奮などの精神症状および見当識障害を伴う軽度から中等度の意識障害を呈する一般的な術後合併症である。POD 発症患者には在院日数の延長と死亡率の上昇が報告されているほか¹⁾、その後の認知症の発症にも関与するなど、予後に悪影響を及ぼすことが示唆されている²⁾。しかしながら、POD 予防・治療のための薬物療法は十分ではない状況にある。

POD の病因には、「神経炎症」、「神経老化」、「酸化ストレス」、「神経伝達異常」、「神経内分泌異常」、「概日リズム調節異常」、「ネットワーク接続異常」などの仮説がある³⁾。実際は、これら全てが連結して POD の病態を形成するという考えが一般的である。例えば、集中治療室において高齢患者に高頻度に観察される睡眠障害は、せん妄と共通の臨床的特徴、危険因子、神経化学的な異常を示す。睡眠障害がせん妄を誘発する可能性が高いことは広く認知されているが、せん妄と睡眠障害の因果関係は未だ明らかにされていない。

一方、POD の病態生理として脳内アセチルコリンの減少とドパミンの増加、血清中コリンエステラーゼ活性の低下、全身性のサイトカイン類上昇が報告されているものの⁴⁻⁶⁾、POD の正確な病態生理は完全には定義されていない。現在、周辺症状の関与も含め、POD の病態生理を明らかにし、予防・治療法を開発することはきわめて重要な研究課題となっている。

我々はこれまでに、イソフルラン全身麻酔下で開腹手術(「麻酔+開腹手術」)処置した若齢マウスが手術 4 時間後に、新奇物体認識試験で認知機能異常様行動変化を示すこと⁷⁾と水探索試験で注意障害様の行動変化を示すこと⁸⁾など、せん妄様の行動変化を示すことを見出した。また同様に他のグループにおいても「麻酔+開腹手術」を行った若齢マウスが、処置 6-9 時間後に Y 迷路試験で認知機能異常様の行動変化を引き起こすことを観察している⁹⁾。このことから、「麻酔+開腹手術」処置 4 時間後のマウスは、「POD モデル動物」になりうると考えた。

2. 研究の目的

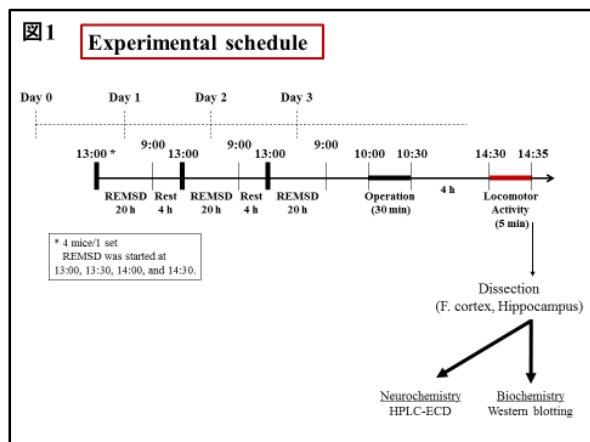
本研究の主目的は、POD の病態生理解明である。現在、せん妄関連の創薬研究は順調に進んでいるとは言いがたい状況にある。その要因の一つとして、POD 研究の前進に寄与するようなモデル動物が欠如していることが考えられる。これまでの実験動物を利用したせん妄研究の多くが、マウスやラットにリポポリサッカライド(LPS)を投与する、薬剤誘発性の全身性炎症反応モデルを用いるものであり、行動薬理学的評価としては認知機能異常様の行動変化を観察するものであった。本研究では、「麻酔+開腹手術」処置 4 時間後のマウスのより詳細な特徴づけを行い、POD モデル動物としての妥当性評価と共に病態生理の解明を試みる。さらに、せん妄促進因子として挙げられる睡眠障害を誘発する Rapid eye movement 断眠ストレス(REMSD)を負荷する群を設け、せん妄に対する睡眠障害の関連性を探る。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と群構成

実験には 8 週齢の雄性 C57BL/6N マウス(ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社)を購入し、9-11 週齢で使用した。マウスは、通常 1 ケージに 8 匹飼いとし、実験開始日からは個別飼育にした。これらを制御された環境下(室温 23 ± 2°C、点灯 7:00 の 12 時間明暗サイクル)に置き、市販の飼料および水を自由に与えた。

マウスは試験開始時に無処置群(Intact)、REM 断眠ストレス負荷群(REMSD)、REMSD+イソフルラン全身麻酔群(REMSD+Iso)、REMSD+イソフルラン麻酔+開腹手術群(REMSD+Iso/Ope)に無作為に割り当て、試験スケジュール(図 1)に沿って実施した。



(2) REMSD、麻酔+開腹手術処置

マウスへの REMSD 負荷は、プラットフォーム法¹⁰⁾により行った。プラスチック製ケージ (32 × 22 × 13 cm) の中心付近にプラットフォーム (直径 3 cm、高さ 5 cm の円柱状) を固定し、ケージ内に深さ 4 cm になるように水を入れた。マウスをプラットフォーム上に置き、20 時間放置した。その間、食物と水は自由に与えた。20 時間後、マウスをホームケージに戻し、4 時間休息させた。これらの手順を 3 日間繰り返した。

全身麻酔は、透明なアクリルチャンバー内で 2.5-3% のイソフルランで 5 分間麻酔導入した後、マウスをチャンバーの外に移動し、麻酔マスクを装着して 1.4-1.6% イソフルランで 25 分間麻酔維持した。開腹手術は、25 分間の麻酔維持中にマウス下腹部を 1.5 cm 程度正中切開し、取り出した小腸を指先で 1 分間軽く擦って元に戻した。閉腹の際、腹筋縫合後には、EMLA クリーム (2.5% リドカインおよび 2.5% プリロカイン) を切開創に塗布し、その後皮膚を縫合した。手術後のマウスは麻酔維持時間終了後にホームケージに戻した。

(3) 自発運動量測定

自発運動量は、灰色のポリプロピレン製のボックス (40 × 40 × 45 cm) 内にマウスを置き、5 分間自由に探索させた。マウスの軌跡はビデオ行動解析システム EthoVision (Noldus) に取り込み、5 分間の総移動距離を計測した他、ボックス底面を中心エリアと側壁沿いエリアに分け、それぞれのエリアで滞在した時間を計測した。

(4) 脳内神経伝達物質濃度測定

行動評価後のマウスを二酸化炭素で安楽死させた後、速やかにマイクロ波に曝露した。頭蓋骨から脳全体を取り出した後、前頭皮質と海馬を採取した。採取した脳組織の重量を測定し、アッセイまで -80°C で保存した。

各組織サンプルを、氷冷下、超音波破砕機 (VP-050N, TAITEC) を使用して、アセチルコリン (Ach) 測定用内部標準物質であるエチルホモコリンとモノアミン測定用内部標準物質のイソプロテレノールを含む 0.1 N 過塩素酸溶液中でモノジナイズした。ホモジネート後の組織を氷冷下で 30 分放置し、その後 4°C、18,000 × g で 15 分間遠心分離して上清を分取した。上清中の Ach 含量、モノアミン (ノルエピネフリン: NE, ドパミン: DA, セロトニン: 5-HT) およびそれらの代謝物含量 (NE: MHPG, DA: DOPAC と HVA, 5-HT: 5-HIAA) は、電気化学検出器を備えた HPLC システム (HPLC-ECD、EICOM) で測定した。

HPLC-ECD は、データプロセッサおよび自動インジェクタ (EICOM M-510) を装備した EICOM HTEC-500 を使用した。Ach 測定の分離カラムには、EICOMPAK AC-GEL (4.6 × 150 mm、EICOM) を使用し、カラム温度 33 °C、12% メタノール、400 mg/l 1-デカンスルホン酸ナトリウムおよび 50 mg/l EDTA-2Na を含む 50 mM 炭酸水素カリウム溶液からなる移動相を流速 0.45 ml/min で流して分離した。電気化学検出器には白金作用電極を用い、印加電位は Ag/AgCl 参照電極上で +450 mV とした。モノアミン測定の分離カラムには、EICOMPAK SC-5ODS (3.0 × 150 mm、EICOM) を使用し、カラム温度 25 °C、16% メタノール、190 mg/l 1-オクタンスルホン酸ナトリウムおよび 5 mg/l EDTA-2Na を含む 0.1 M 酢酸-クエン酸緩衝液 (pH 3.5) からなる移動相を流速 0.45 ml/min で流して分離した。電気化学検出器には炭素作用電極を用い、印加電位は Ag/AgCl 参照電極上で +750 mV とした。各含有量は、組織湿重量 1 グラムあたりのナノグラムとして計算し、モノアミンについては代謝物との比率から代謝回転率の算出も行った。

(5) ウェスタンブロットティング

行動評価後のマウスを二酸化炭素で安楽死させた後、氷冷下で速やかに前頭皮質と海馬を採取した。組織にプロテアーゼ阻害剤を含む HEPES 緩衝スクロース溶液を添加し、ホモジナイズした後、4°C、500 × g で 5 分間遠心分離して上清を分取した。上清の蛋白質濃度は、BCA キット (PIERCE) を使用して測定し、Laemmli サンプルバッファーで可溶化した。各調製サンプルからのタンパク質 10 µg を電気泳動により 10% SDS-PAGE ゲル上で分離した。分離したタンパク質を、セミドライブロットティングシステムを使用して、ポリニフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Millipore) に転写した。PVDF 膜を、0.1% Tween 20 (TBST) および 5% スキムミルクを含有するトリス緩衝生理食塩水とともに室温で 1 時間インキュベートし、続いて目的の抗体とともに 4°C で一晩インキュベートした。A 型モノアミン酸化酵素 (MAO-A、ab126751、Abcam)、B 型モノアミン酸化酵素 (MAO-B、sc-515354、Santa Cruz Biotechnology)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH、#2118、Cell Signaling Technology) の抗体をそれぞれ抗体希釈液 (Can Get Signal solution 1、TOYOBO) を用いて希釈した (すべての一次抗体について 1:1000)。膜を洗浄後、3% スキムミルクを含む TBST で二次抗体とともに 1 時間インキュベートした。目的の蛋白質バンドを化学発光オートラジオグラフィ (ECL キット、Cytiva) で検出し、Amersham Imager 600 (Cytiva) でデジタル画像を取得した後、免疫反応性バンドの密度を画像解析ソフトウェア (Image J) で解析した。目的タンパク質の発現レベルは、同一膜上のハウスキーピングタンパク質 GAPDH の発現量との比率として計算した。

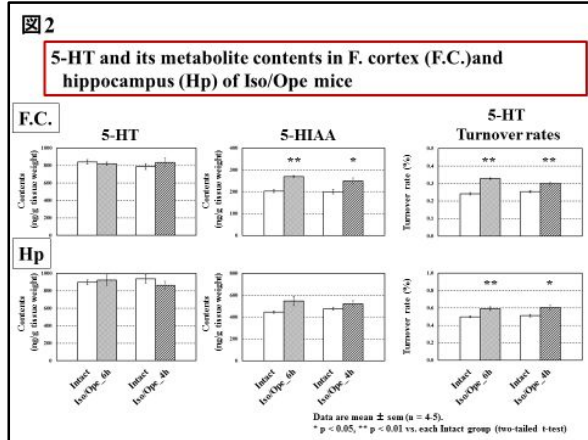
(6) 統計解析

データは全て平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析はすべて SPSS ソフトウェア (IBM) を用い、両側 t 検定により解析した。P 値が 0.05 より小さい場合に統計学的に有意とした。

4. 研究成果

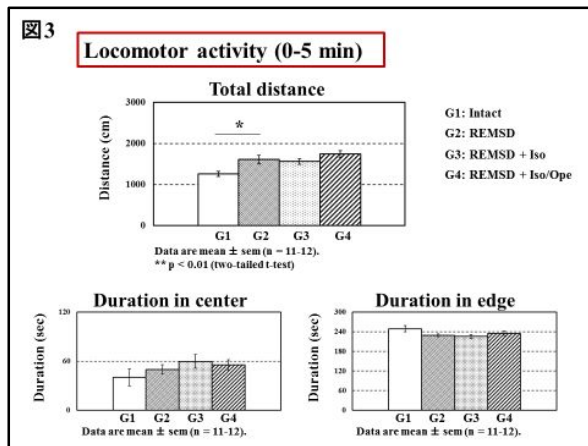
(1) ノーマル C57BL/6N マウスへの Iso/Ope 処置

REMSD 負荷マウスでの検討の前に、ノーマル C57BL/6N マウスに Iso/Ope 処置を行い、処置 4 時間および 6 時間後の前頭皮質と海馬における神経伝達変化の有無について検討した。その結果、処置 4 時間後と 6 時間後の両方のポイント、両方の解析部位において、Ach、NE、DA は有意な変化が認められなかった。5-HT 伝達については、両部位共に 5-HIAA 含量の増加に伴う 5-HT 代謝回転率の有意な上昇が観察され、4 時間後と 6 時間後の代謝回転率の上昇は同程度であった。(図 2)



(2) 自発運動量

REMSD 負荷後のマウスは、Intact 群に比べ、自発運動量の有意な増加を示した。REMSD 負荷した 3 群間に有意な差はなく、自発運動量において Iso/Ope 処置による影響はないものと考えられた。また、ボックス内の滞在エリアの解析では、REMSD 負荷群で中心エリアの増加傾向と側壁沿いエリアの減少傾向が観察されたが、群間に統計学的有意差は無かった。(図 3)

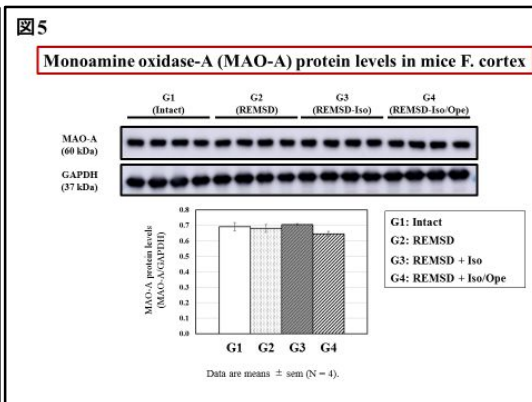
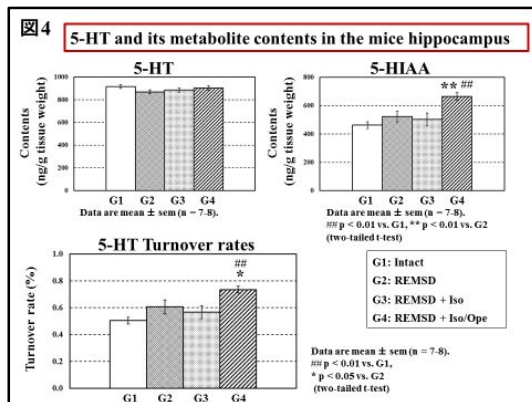


(3) 神経化学的解析

HPLC-ECD による Ach 濃度測定では、前頭皮質と海馬の両部位で、REMSD 負荷による有意な濃度変化、REMSD 負荷群間での麻酔曝露や開腹手術処置に伴う有意な濃度変化は観察されなかった。また、前頭皮質および海馬のモノアミン濃度測定では、REMSD 負荷により NE、DA、5-HT 濃度には変化が無かったが、それらの代謝物濃度には増加傾向が見られた(海馬 MHPG のみ有意に増加)。また、それぞれの代謝回転率は有意な増加を示さなかった。REMSD 負荷群間の比較では、Iso/Ope 処置による海馬 5-HIAA 濃度の有意な増加と 5-HT 代謝回転率の有意な増加が見られた(図 4)。その他、Iso/Ope 処置による前頭皮質と海馬の MHPG 含量の有意な減少が見られたが、代謝回転率の有意な変化はなかった。

(4) 生化学的解析

前頭皮質と海馬組織から調製したサンプルを用いて、モノアミン代謝に関与する MAO-A と MAO-B のウェスタンブロッティングによる発現量解析を行った。両部位において、REMSD 負荷による代謝酵素の有意な発現変化は認められなかった。両部位共に、Iso/Ope 処置により、NE や 5-HT の代謝酵素である MAO-A の発現量が減少する傾向は見られたが、有意差は無かった(図 5)。一方、DA 代謝酵素である MAO-B の発現量変化は認められなかった。



(4) 研究結果の考察および今後の検討課題

本研究において、REMSD 負荷動物に特徴的な自発運動量の増加¹⁰⁾は観察されていることから、REMSD モデル作製は問題ないと考えられた。また、滞在エリアの解析からは REASD による不安惹起も認められず、REMSD 負荷による神経化学的、生化学的な変化もなかったため、REMSD は神経伝達に影響を及ぼすようなストレス負荷ではないことが考えられた。一方、REMSD + Iso/Ope では、5-HT 代謝物 5-HIAA 含量増加に伴う 5-HT 代謝回転率の増加を示した。また、有意差はなかったものの、MAO-A 蛋白レベルの減少が見られた。図 2 に示すノーマルマウスへの Iso/Ope 処置 4 時間においても 5-HT 神経伝達変化が見られたが、MAO-A 蛋白発言量には変化がなかった（データ提示なし）。ここで見られた MAO-A 発現量低下傾向について、REMSD の影響かどうかについてはさらなる検討が必要である。早期の加齢で学習・記憶障害を示す P8 系統の老化促進モデルマウス老化促進モデルマウス（Senescence-Accelerated Mouse (SAM)-P8）への Iso/Ope 処置 6 時間後には、同様の 5-HT 神経伝達変化と共に MAO-A 蛋白発言量増加とその活性低下が観察されている¹¹⁾。本研究結果およびこれまでの研究データから、Iso/Ope 処置により 5-HT 神経伝達変化を引き起こされ、この現象が POD 病態生理の一端を担う可能性が示唆される。今後継続して POD 病態生理を明らかにしていくためには、今回試験に組み込まれていない学習・記憶に関する行動評価系やストレス負荷のないマウスへの Iso/Ope 処置群を含めての再検討、また他とのデータ比較する場合には使用動物種、負荷するストレス種、解析タイミングの違いを見直しての試験デザイン再構築が必要と考えている。

<参考文献>

- 1) Ganai S, et al. Arch Surg. 2007; 142: 1072-78.
- 2) Koster S, et al. Ann Thorac Surg. 2009; 87: 1469-74.
- 3) Maldonado JR. Am J Geriatr Psychiatry. 2013; 21: 1190-222.
- 4) Trzepacz PT. Dement Geriatr Cogn Disord. 1999; 10: 330-4.
- 5) Cerejeira J, et al. Age Ageing. 2011; 40: 621-6.
- 6) van Munster BC, et al. Brain Cogn. 2010; 74: 18-23.
- 7) 青山正、科研費報告書（研究課題/領域番号 26861228）
- 8) 森厚詞 ANESTHESIOLOGY® 2018 学会発表データ
- 9) Peng M, et al. Sci Rep. 2016; 6: 29874.
- 10) Niiijima F, et al. Biogenic Amines. 2009; 20: 99-111
- 11) 三澤知子、科研費報告書（研究課題/領域番号 20K0940）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ran WANG, Atsushi MORI, Kimitoshi NISHIWAKI
2. 発表標題 Establishment of Novel Postoperative Delirium (POD) Mouse Model
3. 学会等名 ANESTHESIOLOGY 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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	光本 泰秀 (Mitsumoto Yasuhide) (60166064)	北陸大学・薬学部・教授 (33304)	

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
---------	---------