

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592273

研究課題名(和文) マイクログリアに焦点をあてた術後の高次機能障害の発症機序の解明とその予防法の検討

研究課題名(英文) Postoperative impairment of cognitive function in rats: A possible role of preoperative restraint stress induced microglial activation

研究代表者

山下 創一郎 (YAMASHITA, SOICHIRO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10455933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：術前の拘禁ストレスが、手術侵襲にともなう海馬のマイクログリアの活性化と炎症性サイトカインの発現、および術後の学習・記憶障害にどのような影響を及ぼすかについて調べたところ、6-8か月の成年ラットでは、ストレスに曝されているところに手術侵襲が加わると術後に空間作業記憶(spatial working memory)の障害が発生した。18-20か月の老年ラットでは、手術侵襲が加わると術後に空間作業記憶の障害が発生するが、術前にストレスに曝されているとその障害が長期に渡る可能性が示唆された。これらは海馬のマイクログリアの活性化と神経細胞におけるIL-1の発現が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to evaluate the effect of preoperative 2 hrs restraint stress on microglial activation, an expression of interleukin-1beta in hippocampus and spatial working memory after surgery in adult and aged rats. Spatial working memory was affected after surgery in a 6-8 months adult rat undergoing preoperative 2 hrs restraint stress. In a 18-20 months aged rat, surgery itself induced postoperative impairment of spatial working memory. However, the impairment continued even on the 14 postoperative days in an aged rat undergoing preoperative 2 hrs restraint stress. Those were associated with microglial activation and an increased expression of interleukin-1beta on neuron in hippocampus.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔蘇生学

キーワード：高次機能障害 拘禁ストレス 手術 spatial working memory マイクログリア IL-1

1. 研究開始当初の背景

我が国は現在、人口の高齢化という問題を抱えており、高齢者の手術は増加の一途をたどっている。しかし、様々な合併症を有し予備能が低下している高齢患者は、周術期に高い確率で合併症を起こす。術後の高次機能障害（Postoperative cognitive dysfunction：POCD）は高齢患者に特有の周術期合併症の一つであるが、ひとたびそれが起これば、例えば手術が成功したとしても患者の生活の質を落とし、入院中や退院後のケアに多くの費用と時間を費やすことになる。よって、高齢者のPOCD対策は、安全な医療の提供という観点からだけでなく、医療経済という観点からみても極めて重要である。

POCDの発症の原因としては、加齢や手術侵襲、麻酔などの様々な因子が報告されてきたが、これらの因子があったとしても必ずしも発症するわけではなく、POCDの発症の機序は依然として不明なままである。

近年、lipopolysaccharide（LPS）の投与前に、ストレスによりマイクログリアを活性化しておくこと、脳内の炎症反応が惹起されやすくなることが明らかにされた。また、加齢にともなうマイクログリアの活性化が、手術後の脳内の炎症反応の惹起と高次機能障害の発症に関わっていることも報告された。ゆえに、POCDは手術侵襲や麻酔などの単独の因子が原因で発症するのではなく、術前のストレスや加齢などによるマイクログリアの活性化が、手術侵襲によって惹起される脳内の炎症反応をさらに促進することで発症する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、術前の拘禁ストレスが、手術侵襲にともなう脳内の炎症性サイトカインの発現と術後の空間作業記憶にどのような影響を及ぼすかについて調べ、POCDの発症機序を解明する。さらに、加齢マウスと成年マウスで比較し、POCD発症における加齢の影響を明らかにする。

(2) 抗うつ薬であるフルオキセチンが、手術侵襲にともなう術後の空間作業記憶障害にどのような影響を及ぼすかについて調べ、POCDの薬剤による予防効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 拘禁ストレスがその後の手術にともなう海馬領域のマイクログリアの活性化と炎症性サイトカインの発現および空間作業記憶に及ぼす影響

Fisher344 ラットを用い、6-8ヶ月の成年ラットと18-20ヶ月の老年ラットにおいて、拘禁ストレスの有無がその後の手術にともなう海馬領域のマイクログリアの活性化と炎症性サイトカインの発現および術後の空間作業記憶にどのような影響を及ぼすかについての検討を行った。ストレス+手術群、手術のみ群、ストレスのみ群、コントロール群に分け、ストレスのみ群は円筒チューブに2時間の拘禁を、手術のみ群はイソフルラン麻酔下で開腹手術を、ストレス+手術群は2時間の拘禁ストレスの24時間後にイソフルラン麻酔下で開腹手術を施した。手術は、鎮痛のために創部に0.2%ロピバカインを0.5cc皮下注射した後、腹部正中を3cm切開し、親指と人差し指を用いて1分間の腸管のmanipulationを行い、絹糸で閉腹した。手術（またはストレス）の24時間後、4日後、14日後にY-mazeでspontaneous alterationを測定し空間作業記憶を調べた。行動試験後に安楽死させ、脳を採取し、海馬領域のIL-1の蛍光免疫染色を行い、その発現の強さを観察するとともに、NeuN、CD11b、GFAPとの二重染色でその発現部位を観察した。

(2) フルオキセチンが手術にともなう術後の空間作業記憶障害に及ぼす効果

Fisher344 ラットを用い、18-20ヶ月の老年ラットにおいて、手術直前に経静脈的に投与した抗うつ薬であるフルオキセチンが、手術にともなう術後の空間作業記憶障害にどのような効果を及ぼすかについての検討を行った。フルオキセチン10mg/kg投与群、フルオキセチン5mg/kg投与群、生食投与群、コントロール群に分け、手術直前にフルオキセチン10mg/kg、5mg/kg、生食をそれぞれ1cc投与した。手術は前述と同様にイソフルラン麻酔下で開腹を行った。手術の24時間後、4日後にY-mazeでspontaneous alterationを測定し空間作業記憶を調べた。

4. 研究成果

(1) 拘禁ストレスがその後の手術にともなう海馬領域のマイクログリアの活性化と炎症性サイトカインの発現および空間作業記憶に及ぼす影響

6-8ヶ月の成年ラットの体重の変化は（図1）ストレスのみ群では4日後には増加に転じていたが、手術のみ群とストレス+手術群では4日後では依然減少を続け、14日後に増加に転じていた。

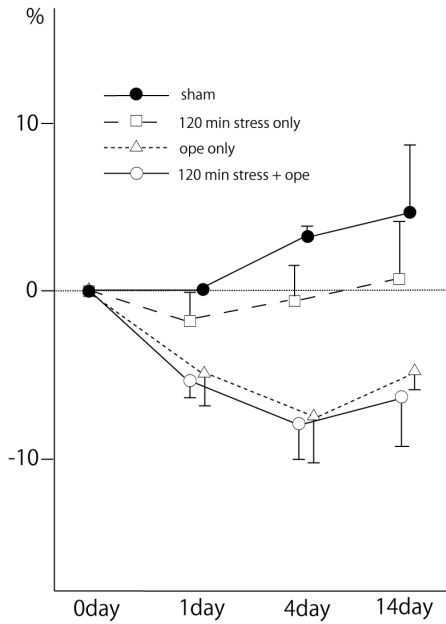


図1 成年ラットの体重の変化

Y-maze における spontaneous alteration は (図2) ストレス+手術群では24時間後から14日後までの観察期間を通じて50%程度の低値を示し、ストレスのみ群やコントロール群に比べて有意に低かった。手術のみ群は4日後には低下傾向を示したが、14日後にはストレスのみ群やコントロール群と同程度に回復した。ストレスのみ群は14日後までコントロール群と同程度であった。

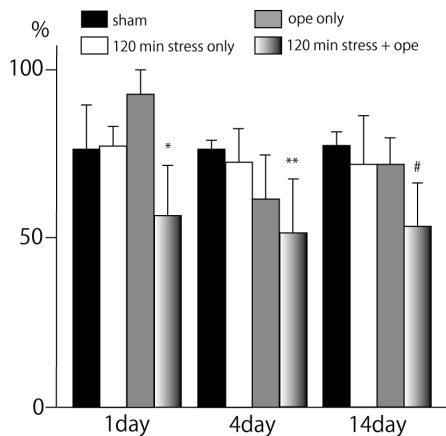


図2 成年ラットの Y-maze における spontaneous alteration

* $P < 0.01$ vs コントロール群、手術のみ群、 $P < 0.05$ vs ストレスのみ群、** $P < 0.05$ vs コントロール群、ストレスのみ群、# $P < 0.01$ vs コントロール群、手術のみ群、 $P < 0.05$ vs ストレスのみ群

成年ラットにおける手術24時間後の海馬領域のIL-1の発現は(図3) ストレス+手術群において特に強く認められた。

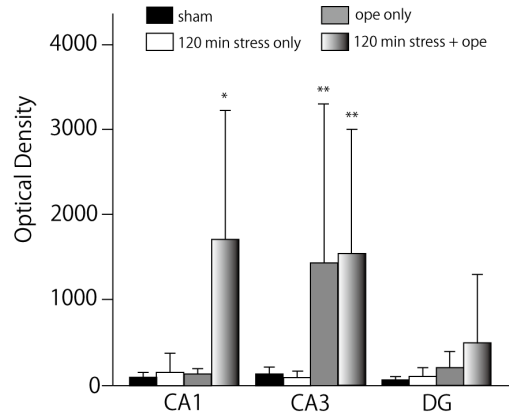
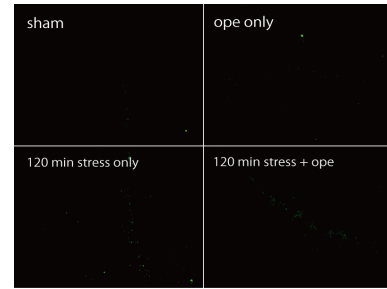


図3 成年ラットにおける24時間後の海馬領域のIL-1の発現

* $P < 0.05$ vs コントロール群、ストレスのみ群、手術のみ群、** $P < 0.05$ vs コントロール群、ストレスのみ群

さらに、IL-1の局在を免疫組織学的に検討したところ(図4)、神経細胞のマーカーであるNeuNと同一局在を示した。

以上のことから、成年ラットでは、ストレスに曝されているところに手術侵襲が加わると、術後に空間作業記憶障害が発生するが、これは海馬の神経細胞におけるIL-1の発現が関与していることが示唆された。

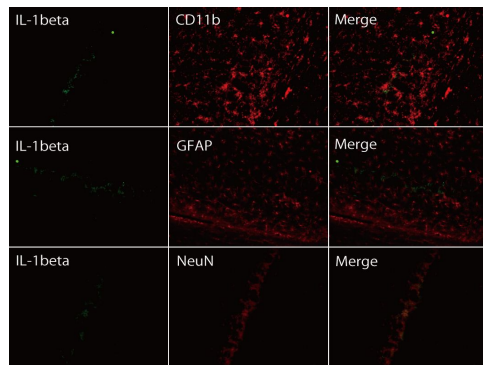


図4 成年ラットにおける24時間後の海馬CA1領域のIL-1の局在

ストレス+手術群における海馬CA1領域のIL-1とCD11b、GFAP、NeuNの二重染色像

一方、18-20 ヶ月の老年ラットの体重の変化は(図5) ストレスのみ群では4日後には増加に転じていたが、手術のみ群とストレス+手術群では4日後では依然減少し、ストレス+手術群ではさらに14日後も減少していた。

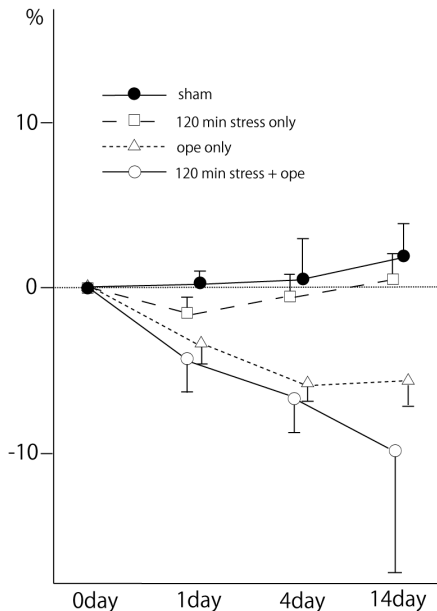


図5 老年ラットの体重の変化

Y-maze における spontaneous alteration は(図6) ストレス+手術群、手術のみ群では24時間後から14日後までの観察期間を通じて50%程度の低値を示し、ストレスのみ群やコントロール群に比べて有意に低かった。また、14日後はストレス+手術群が手術のみ群に比べて有意に低かった。ストレスのみ群は24時間後にコントロール群に比べて有意に低下したが、4日後以降はコントロール群と同程度となった。

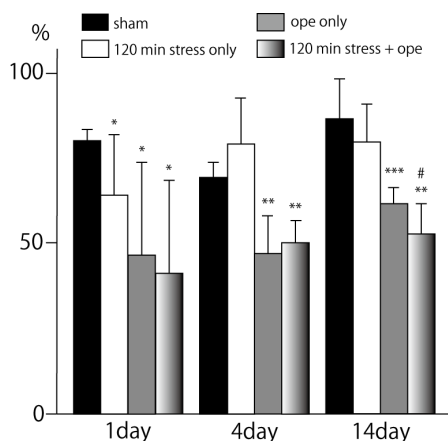


図6 老年ラットの Y-maze における spontaneous alteration

* $P < 0.05$ vs コントロール群、** $P < 0.01$

vs コントロール群、ストレスのみ群、*** $P < 0.05$ vs コントロール群、ストレスのみ群、# $P < 0.05$ vs 手術のみ群

老年ラットにおける手術の24時間後の海馬領域の IL-1 の発現は(図7) ストレス+手術群、手術のみ群において強く認められた。さらに、IL-1 の局在を免疫組織学的に検討すると(図8)、神経細胞のマーカーである NeuN と同一局在を示した。

また、CD11b をマーカーとするマイクログリアの活性化を検討したところ(図9) CA1、CA3 領域でストレス+手術群がコントロール群に比べて有意に高かった。

以上のことから、老年ラットにおいては、手術侵襲が加わると術後に空間作業記憶障害が発生するが、これは海馬の神経細胞における IL-1 の発現が関与していることが示唆された。また、術前にストレスに曝されていると、その障害が長期に渡る可能性があり、マイクログリアがその障害に関与している可能性が示唆された。

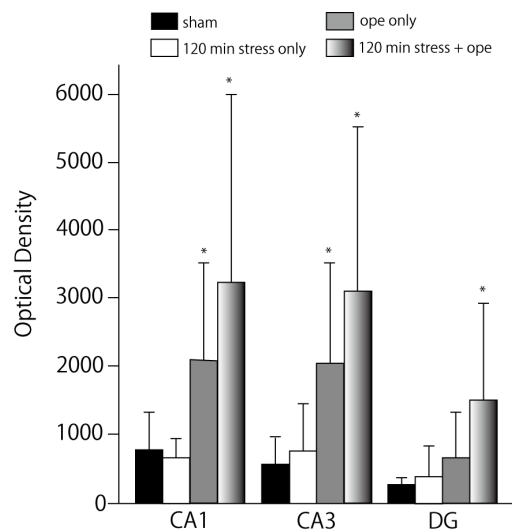
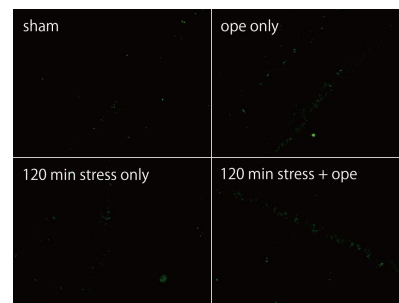


図7 老年ラットにおける24時間後の海馬領域の IL-1 の発現

* $P < 0.05$ vs コントロール群、ストレスのみ群

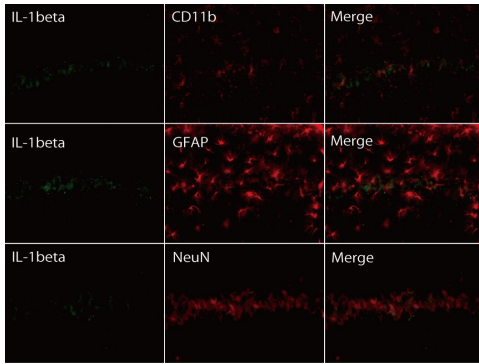


図 8 老年ラットにおける 24 時間後の海馬 CA1 領域の IL-1β の局在
 ストレス+手術群における海馬 CA1 領域の IL-1β と CD11b、GFAP、NeuN の二重染色像

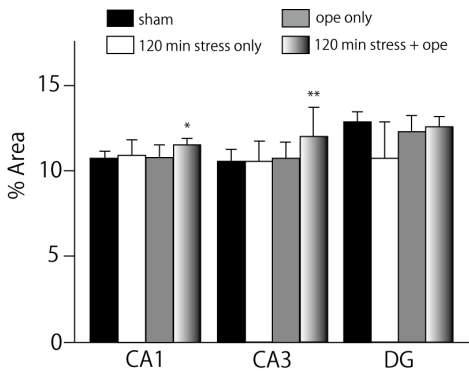


図 9 老年ラットにおける 24 時間後の海馬領域の CD11b の活性化
 * $P < 0.05$ vs コントロール群、** $P < 0.05$ vs コントロール群、ストレスのみ群

(2)フルオキシセチンが手術にともなう術後の空間作業記憶障害に及ぼす効果

18-20 ヶ月の老年ラットの体重の変化は(図 10)手術のみ群、フルオキシセチン投与群で 4 日後まで減少した。

Y-maze における spontaneous alteration は(図 11)手術を行ったすべての群で 24 時間後に低下したが、4 日目ではフルオキシセチン 10 mg/kg 投与群でコントロール群と同程度まで回復が認められた。

以上のことから、18-20 ヶ月の老年ラットにおいて、手術直前に経静脈的にフルオキシセチンと投与すると、術後の空間作業記憶障害を防ぐ可能性が示唆された。しかし、体重減少が顕著に認められることから、投与方法を含めさらなる検討が必要と考えられる。

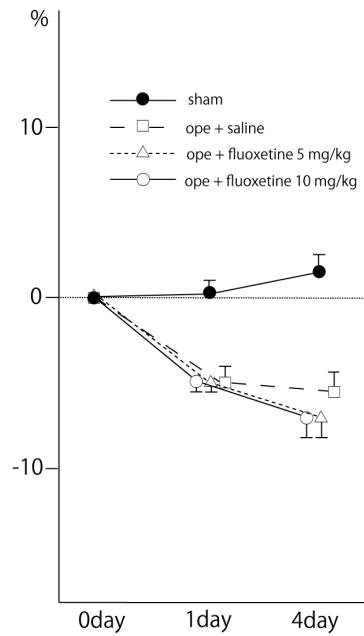


図 10 老年ラットの体重の変化

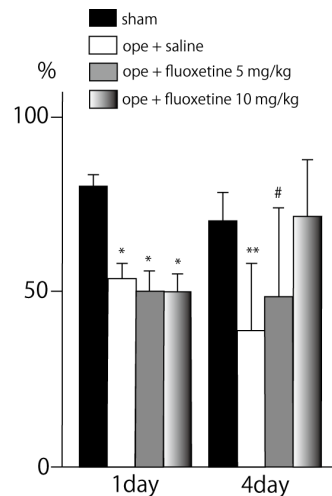


図 11 Y-maze における spontaneous alteration

* $P < 0.05$ vs コントロール群、** $P < 0.01$ vs コントロール群、フルオキシセチン 10 mg/kg 投与群、# $P < 0.05$ vs コントロール群、フルオキシセチン 10 mg/kg 投与群

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 創一郎 (YAMASHITA, SOICHIRO)
 筑波大学・医学医療系・講師
 研究者番号：10455933