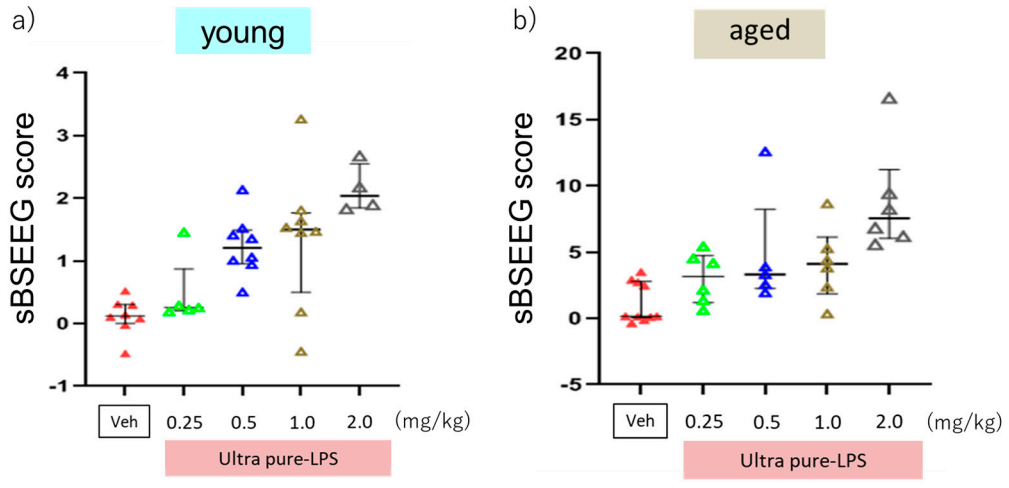
160　BSEEGスコアを用いたせん妄モデル動物の評価系の確立	山梨　豪彦

【目的】せん妄は身体因や薬剤を原因として、一過性に認知機能障害、睡眠障害、興奮、幻覚妄想などの症状を呈する症候群である。せん妄の治療法は十分に確立されておらず、せん妄の病態解明および治療法の探索が急務である。そのためにはせん妄モデル動物を用いた研究が必要不可欠であるが、モデル動物のせん妄状態を適切に捉える評価法も同時に必須である。これまでのせん妄モデル動物を用いた研究において認知機能に関連した行動試験が用いられてきたが、行動試験は施設や実施者による不一致が起こりやすく、行動試験の結果をヒトの症状にそのまま適応することの妥当性も問われうるため、客観的でヒトへの適応に妥当な検査法が求められる。我々はヒトを対象として小型脳波デバイスで前頭部から得られた脳波を、独自のアルゴリズムにより徐波化の指標を数値化するバイスペクトル脳波（BSEEG）法を用いて、それにより得られる BSEEG スコアがせん妄患者の検出や重症度の定量化に有用であることを報告した。さらに我々は、マウスから得られる脳波データを同様のアルゴリズムで BSEEG スコアに変換することが、げっ歯類においてもせん妄状態を検出するために有用である可能性を示した。本研究では BSEEG スコアを評価系としてより確固たるものとして確立することを目的とした。
【方法】若齢（2〜3 ヵ月）および老齢（18〜19 ヵ月）の野生型 C57Bl/6 マウスを用いた。脳波ヘッドマウント設置手術、脳波記録、Ultrapure-LPS 投与実験の全実験スケジュールを下図に示す。脳波ヘッドマウントはプロトコールに沿ってマウスの頭蓋骨上に設置された。ヘッドマウント装着手術から 2 週間の回復期間の後、脳波記録を行った。脳波測定から 1〜2 日目でベースラインの測定を行い、3 日目に Ultrapure-LPS を腹腔内投与した。収集した脳波データを、以前、我々らが報告したウェブベースの BSEEG スコア計算機を用いて BSEEG スコアに変換した。群間比較のために、Ultrapure-LPS 投与後の半日の BSEEG スコアの平均値と、脳波測定開始 1 日目 daytime の BSEEG スコアの平均値の差を標準化 BSEEG スコア（sBSEEG スコア）として算出した。
【結果】若齢マウスにおいて、BSEEG スコアは daytime に高い数値で安定し、夜間には低い数値で不安定になる日内変動を示した。生理食塩水の投与による BSEEG スコアの変化は通常みられないが、Ultrapure-LPS 投与により BSEEG スコアは上昇した。一方で老齢マウスにおいては、若齢マウスと同様の日内変動を示すもの、日内変動を示すが昼夜の BSEEG スコアの動きが逆転しているもの、生理食塩水の投与による BSEEG スコアの上昇がみられるもの、とさまざまであった。若齢マウスと老齢マウスに対する Ultrapure-LPS を様々な量で投与し、投与後の sBSEEG スコアの比較を行ったところ、若齢マウスでは、Ultrapure-LPS の用量依存性に sBSEEG スコアが上昇する傾向が確認された。高齢マウスにおいても Ultrapure- LPS の用量依存性に sBSEEG スコアが上昇する傾向が確認された。さらに sBSEEG スコアの上昇は若齢マウスと比較して大きいことが確認された。

Ultra-pure LPS 投与後の sBSEEG スコア



160. BSEEG スコアを用いたせん妄モデル動物の評価系の確立

山梨　豪彦

鳥取大学 医学部附属病院 精神科

Key words：せん妄，脳波，脳内炎症，モデル動物，BSEEG

緒　言

せん妄は身体因や薬剤を原因として、一過性に認知機能障害、睡眠障害、興奮、幻覚妄想などの症状を呈する症候群である。せん妄により入院中の危険行動や事故のリスクが上昇するのみでなく、入院日数の増加、長期死亡リスクの増加、医療費の増加、といった望ましくない結果につながる［1］。しかしせん妄の治療法は十分に確立されておらず、その一因としてせん妄の病態理解が不十分なことが挙げられる。そのため新たなせん妄の予防法、治療法の開発やせん妄の病態解明が急務である。

せん妄の病態解明および治療法の探索のためにはせん妄モデル動物を用いた研究が必要不可欠である。そのためにはせん妄モデル動物の確立と、そのせん妄状態を適切に捉える評価法が必須である。これまでのせん妄モデル動物を用いた研究において、せん妄状態の評価のために Y-maze test や Morris water maze test などの認知機能に関連した行動試験が用いられてきた［2］。しかし、行動試験は施設や実施者による不一致が起こりやすい。また、行動試験の結果をヒトの症状にそのまま適応することの妥当性も問われうるため、客観的でヒトへの適応に妥当な検査法が求められる。

臨床現場において、脳波検査でせん妄の特徴であるびまん性徐波を捉えることはせん妄の客観的指標として診断に有用である。Shinozaki らは小型脳波デバイスで前頭部から得られた脳波を、スペクトルパワー密度分析を用いて処理し、独自のアルゴリズムにより徐波化の指標を数値化するバイスペクトル脳波（BSEEG）法を開発した［3］。また、我々は BSEEG 法により得られる BSEEG スコアがせん妄患者の検出や重症度の定量化に有用であり、さらには BSEEG スコアが在院日数や長期死亡率といったアウトカムにも関連することを報告した［4］。さらに我々は、マウスから得られる脳波データを同様のアルゴリズムで BSEEG スコアに変換したところ、BSEEG スコアが平常状態では昼に高く夜間に低い日内変動を示すこと、せん妄モデルの作製に有用とされる Lipopolysaccharide（LPS）の投与により BSEEG スコアが上昇すること、LPS の投与による BSEEG スコアの上昇が老齢マウスでは若年マウスよりも大きいことを報告した［5］。これはマウスにおいても BSEEG スコアの上昇が徐波化の指標として有用であること、BSEEG スコアがせん妄モデル動物のせん妄状態を検出するために、従来用いられる行動試験よりも客観的かつ効率的な評価系となることを示唆している。本研究では BSEEG スコアを評価系としてより確固たるものとして確立することを目的とした。

方　法

1. 動物と飼育

若齢（2～3 ヵ月）および老齢（18～19 ヵ月）の野生型 C57Bl/6 マウスを Jackson Laboratory から購入した。すべてのマウスは餌と水は自由に摂取でき、12：12 時間の明暗サイクル下で生育された。

2. 薬剤と試薬

Ultrapure-LPS（Sigma、大腸菌由来）を入手し、注射用生理食塩水に溶解した。投与の際には Ultrapure-LPS

をマウスに腹腔内注射した。脳波ヘッドマウント、脳波測定装置は Pinnacle 社のものを用いた。

3. 実験デザイン

脳波ヘッドマウント設置手術、脳波記録、Ultrapure-LPS 投与実験の全実験スケジュールを図 1 に示す。脳波ヘッドマウントはプロトコールに沿ってマウスの頭蓋骨上に設置された。ヘッドマウント装着手術から 2 週間の回復期間の後、脳波記録を Sirenia EEG system を用いて開始した。脳波測定開始からのスケジュールは以下の通りとした。1〜2 日目にベースライン測定し、3 日目に Ultrapure-LPS を投与した。若齢マウス、老齢マウスとも、0、0.25、0.5、1.0、2.0（mg/kg）の Ultra-pure LPS を腹腔内投与した（図 1）。

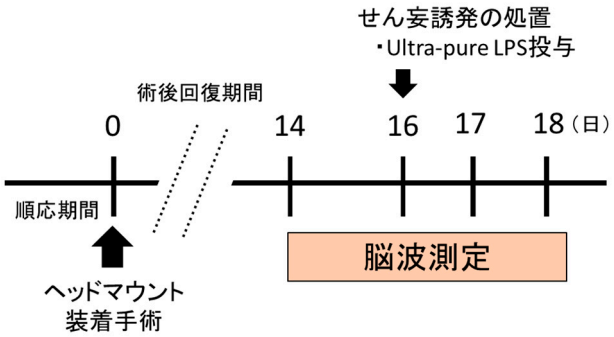


図 1. ヘッドマウント装着手術、脳波測定、Ultrapure-LPS 投与のスケジュール
ヘッドマウントの装着手術、脳波測定、Ultra-pure LPS の投与スケジュールを示した。

4. BSEEG スコアの算出

収集した脳波データを、以前我々らが報告したウェブベースの BSEEG スコア計算機を用いて BSEEG スコアに変換した（https://shinozakilab.shinyapps.io/bseegcalculator/）[5]。この変換は、ヒトの研究で使用したものと同様のアルゴリズムを用いており、生の脳波記録をパワースペクトル密度にデジタル変換し、3 Hz のパワーと 10 Hz のパワーの比を計算することで導き出される［5］。

群間比較のために、Ultrapure-LPS 投与後の半日の BSEEG スコアの平均値と、脳波測定開始 1 日目 daytime の BSEEG スコアの平均値の差を標準化 BSEEG（sBSEEG）として算出した。

結果および考察

1. 若齢マウスと老齢マウスにおける BSEEG スコアの変化

若齢マウスにおいて、BSEEG スコアは daytime に高い数値で安定し、夜間には低い数値で不安定になる日内変動を示した。生理食塩水の投与による BSEEG スコアの変化は通常みられないが、Ultrapure-LPS 投与により BSEEG スコアは上昇した（図 2）。過去に我々が報告したものと同様の結果を再現することができた［5］。

一方で老齢マウスにおいては、若齢マウスと同様の日内変動を示すもの、日内変動を示すが昼夜の BSEEG スコアの動きが逆転しているもの、生理食塩水の投与による BSEEG スコアの上昇がみられるもの、とさまざまであった（図 3）。これは高齢者において睡眠覚醒リズムが乱れたり、軽微な刺激でせん妄が惹起されたりするといった特徴を反映しているものと解釈できると考えた。

2. Ultra-pure LPS 投与による BSEEG スコアの変化

若齢マウスと老齢マウスに対する Ultrapure-LPS を様々な量で投与し、投与後の sBSEEG スコアの比較を行った。sBSEEG スコアは Ultra-pure LPS を与した同日の daytime のものを使用した。若齢マウスでは、Ultrapure-LPS の用量依存性に sBSEEG スコアが上昇する傾向が確認された（図 4a）。高齢マウスにおいても

Ultrapure- LPS の用量依存性に sBSEEG スコアが上昇する傾向が確認された。さらに sBSEEG スコアの上昇は若齢マウスと比較して大きいことが確認された（図 4b）。ヒトにおいては BSEEG スコアの高値がせん妄状態を示唆することが確認されており、マウスにおける Ultrapure-LPS の投与による用量依存性、かつ高齢マウスでより鋭敏な BSEEG スコアの上昇は、せん妄状態を捉えていると考えられる。今後、BSEEG と行動や脳内の炎症性マーカーとの関連を検証していく。

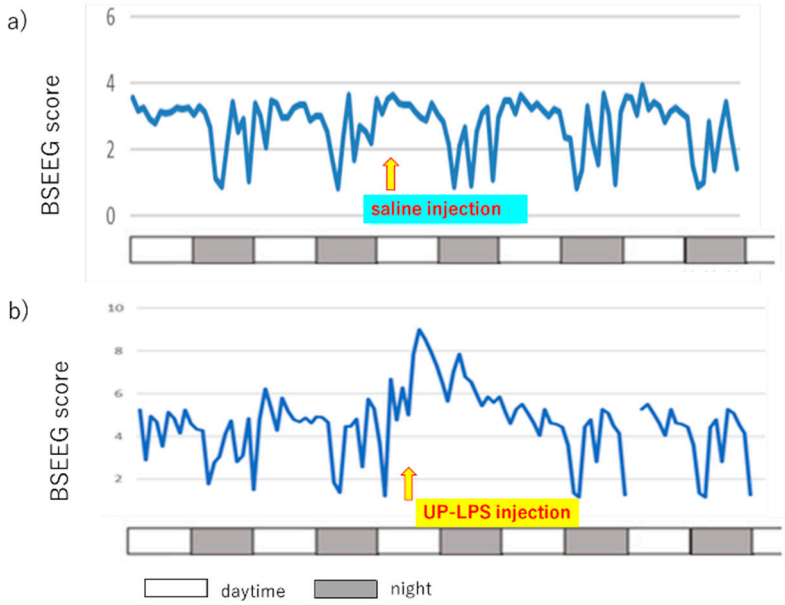


図 2. 若齢マウスにおける BSEEG スコア変化の典型例

a) 若齢マウスに対する BSEEG スコア変化の典型例。BSEEG スコアは daytime に高い数値で安定し、夜間には低い数値で不安定になる日内変動を示す。生理食塩水の投与による BSEEG スコアの変化はみられない。

b) 若齢マウスに対する Ultrapure-LPS 投与による sBSEEG スコアの変化。Ultrapure-LPS の投与により sBSEEG スコアは上昇する。

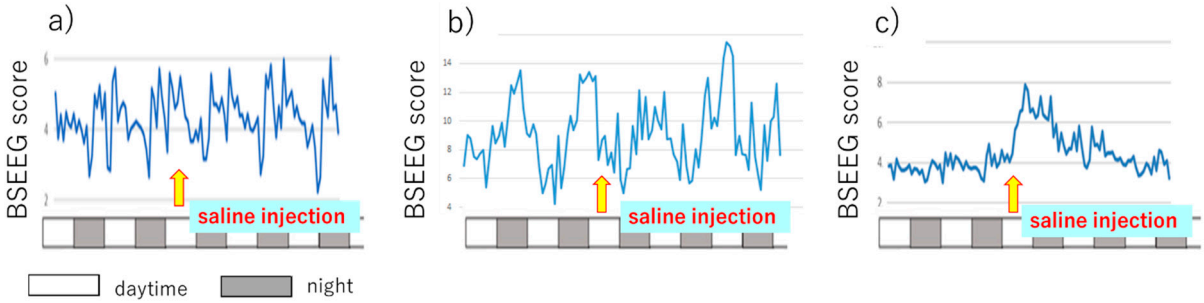


図 3. 高齢マウスにおける BSEEG スコア変化の例

a) 若齢マウスと同様のBSEEGの日内変動を示す高齢マウスの一例。

b) 日内変動を示すが昼夜のBSEEGスコアの動きが逆転している高齢マウスの一例。

c) 生理食塩水の投与によりBSEEGスコアの上昇がみられる高齢マウスの一例。

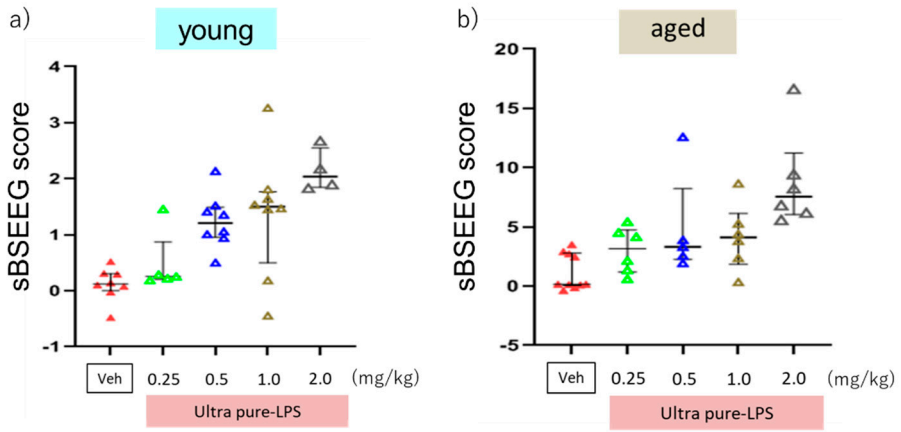


図 4. Ultra-pure LPS 投与後の sBSEEG スコア

a) 若齢マウスに対する Ultra-pure LPS 投与後の sBSEEG スコアの比較。sBSEEG スコアは Ultrapure-LPS を与した同日の daytime のものを使用。Ultrapure-LPS の用量依存性に sBSEEG スコアが上昇する傾向が確認された。

b) 高齢マウスに対する Ultra-pure LPS 投与後の sBSEEG スコアの比較。sBSEEG スコアは Ultrapure-LPS を与した同日の daytime のものを使用。Ultrapure-LPS の用量依存性に sBSEEG スコアが上昇する傾向が確認された。さらに sBSEEG スコアの上昇は若齢マウスと比較して大きいことが確認された。

共同研究者・謝辞

本研究は、スタンフォード大学医学部精神科の篠崎元との共同研究である。

文　献

1) Inouye SK, Westendorp RG and Saczynski JS. Delirium in elderly people. Lancet. 2014; 383(9920):911-922. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60688-1. Epub 2013 Aug 28. PMID: 23992774

2) Hoogland IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA and van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. J Neuroinflammation. 2015; 12:114. doi: 10.1186/s12974-015-0332-6. PMID: 26048578

3) Shinozaki G, Chan AC, Sparr NA, Zarei K, Gaul LN, Heinzman JT, Robles J, Yuki K, Chronis TJ, Ando T, Wong T, Sabbagh S, Weckmann MT, et al. Delirium detection by a novel bispectral electroencephalography device in general hospital. Psychiatry Clin Neurosci. 2018; 72(12):856-863. doi: 10.1111/pcn.12783. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30246448

4) Yamanashi T, Crutchley KJ, Wahba NE, Sullivan EJ, Comp KR, Kajitani M, Tran T, Modukuri MV, Marra PS, Herrmann FM, Chang G, Anderson ZM, Iwata M, et al. Evaluation of point-of-care thumb-size bispectral electroencephalography device to quantify delirium severity and predict mortality. Br J Psychiatry. 2021:1-8. doi: 10.1192/bjp.2021.101. PMID: 35049468

5) Yamanashi T, Malicoat JR, Steffen KT, Zarei K, Li R, Purnell BS, Najafi A, Saito K, Singh U, Toth BA, Lee S, Dailey ME, Cui H, et al. Bispectral EEG (BSEEG) quantifying neuro-inflammation in mice induced by systemic inflammation: A potential mouse model of delirium. J Psychiatr Res. 2021; 133:205-211. doi: 10.1016/j.jpsychires.2020.12.036. Epub 2020 Dec 15. PMID: 33360427