

筑波大学

博士（医学）学位論文

マウスにおける妊娠中の睡眠覚醒変化と
妊娠高血圧マウスにおける神経学的異常の検討

2017

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

小宮 春奈

目次	1
略語一覧	3
第1章 背景	4
1. 睡眠研究と遺伝子改変動物の利用	4
2. 妊娠と睡眠	5
3. 子癇前症とモデル動物	6
第2章 研究の目的	9
第3章 対象と方法	10
1. 使用動物	10
2. 脳波筋電図手術と測定	10
3. 脳波筋電図測定スケジュール	11
4. 脳波筋電図データの解析	12
5. 降圧剤の投与	13
6. 血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) の透過性評価	13
7. 統計	14
第4章 結果	15
1. 野生型 C57BL/6 マウスの妊娠に伴う睡眠覚醒変化	15
2. PAH マウスの妊娠に伴う EEG 変化	17
3. 降圧剤投与した PAH マウスの睡眠覚醒変化	20
4. つくば高血圧マウス (THM) の睡眠変化	20
第5章 考察	22
1. 周産期の睡眠覚醒	22
2. 子癇モデルとしての PAH マウス	23
3. レニン-アンジオテンシノーゲン系の影響	25
4. 本研究の限界	26

第 6 章 結論	28
第 7 章 図表	29
図 1. 野生型および PAH マウスの EEG/EMG とスペクトログラム	29
図 2. 野生型マウスにおける妊娠中の睡眠覚醒行動	30
図 3. 野生型マウスにおける妊娠中のスペクトラム解析	31
図 4. PAH マウスの妊娠後期における変化	32
図 5. PAH マウスにおける妊娠中の睡眠覚醒行動 (妊娠後期を除く)	33
図 6. PAH マウスにおける妊娠中のスペクトラム解析(妊娠後期を除く)	34
図 7. オルメサルタン投与による妊娠後期の PAH マウスの睡眠変化	35
図 8. THM における睡眠覚醒行動	36
引用文献	37
謝辞	48

略語一覽

ANOVA, analysis of variance

ACE, Angiotensin-converting enzyme

BBB, blood-brain barrier

EEG, electroencephalogram

EMG, electromyogram

NREM, nonrapid eye movement

NREMS, nonrapid eye movement sleep

PAH, pregnancy-associated hypertensive

REM, rapid eye movement

REMS, rapid eye movement sleep

SEM, standard error of the mean

THM, Tsukuba hypertensive mouse

第1章 背景

1. 睡眠研究と遺伝子改変動物の利用

睡眠は地球上の脳を持つ生物に広く保存されている行動であり、その機能は生命活動に必要不可欠である。睡眠不足が様々な身体的・精神的疾患に関わっていることは疫学的に示されているが¹⁻³、睡眠覚醒の神経学的な調節機構の全貌は未だ明らかになっていない。

ヒトの睡眠覚醒状態を正確に評価するためには、頭皮上の電極によって測定された脳波 (Electroencephalogram: EEG) が有用である。ヒトの睡眠は、NREM (Non-rapid eye movement) 睡眠とREM (Rapid eye movement) 睡眠に分類することができ、さらにNREM睡眠は深度によって3段階に分けられる。これらの脳波の判定には、特徴的な波の出現、有意な周波数、振幅などを指標とする。ヒト以外でも、ラット・マウスなど多くの哺乳類の睡眠覚醒行動は、ヒトと同様に脳波・筋電図に基づいて睡眠覚醒状態を判定することが出来る。ヒトの場合、日常生活を送りながら脳波測定を長期的に行うことは、社会的制約のために困難であるが、ラット・マウスなどの動物を用いると、脳波筋電図電極を強固に頭蓋上に接着させることで、大脳皮質表面からの脳波と頸部筋組織からの筋電図を長期間連続的に測定することが出来る。

睡眠研究に使用される実験動物として、2000年以前はラットが用いられることが多かったが、遺伝子改変マウスの普及とともに、マウスがモデル動物の主流となっている。多くの近交系マウス系統のなかでも、特にC57BL/6マウスは、全ゲノム解析が終了していることや、繁殖のしやすさなどから、睡眠を含むさまざまな生理学的・病態学的研究に広く用いられている^{4,5}。さらに、近年開発されたゲノム編集を含む遺伝子

工学技術⁶、光遺伝子工学や薬理遺伝学的手法にもC57BL/6マウスが用いられており、これらの手法により睡眠覚醒行動を制御する神経回路についての理解も進んできている⁷。

一方で、一般に神経科学の分野では多くの研究で雄マウスが使用されている。この偏りは、多くの場合が雌マウスの性周期（発情前期・発情期・発情後期、発情休止期）による実験結果のばらつきの可能性を考慮したためであるが、雌の性周期を考慮しても雄と比較してばらつきが大きいということはなかったという報告もある⁸。また、雄に偏った研究結果が性差バイアスとなる可能性もあり、神経科学分野における研究にはもっと雌マウスも含まれるべきであるという報告もある⁹。実際に、雌マウスを用いた睡眠覚醒についての報告は数例のみであり¹⁰⁻¹²、雌マウスを実験に用いること、雌マウスの特性を考慮した実験系を増やすことは、動物実験全体において今後の課題である。

2. 妊娠と睡眠

妊娠は、女性のみが経験する特有の現象である。妊娠中に睡眠状態が変化することは広く知られており、妊娠中に生じる様々な睡眠障害は、妊娠期間中の身体的、内分泌的变化を反映していると言われている¹³⁻¹⁷。妊娠中の睡眠覚醒変化を正確に知るためには、妊娠前後で睡眠状態を継続的に測定する必要があるが、おそらくは妊婦の身体的・精神的負担による理由から、継続的にポリソムノグラフィーを行った報告はほとんどない¹⁸⁻²⁰。

一方で、マウスでは、妊娠期間が約3週間と短いことから、妊娠中の睡眠覚醒状態を連続的に調べることは難しくない。子癩前症²¹や睡眠障害、ナルコレプシー²²など、

多くの遺伝子改変マウスがヒトの疾患モデルとして使用されていることから、動物モデル、特にマウスにおいて、妊娠が睡眠覚醒にどのような影響を及ぼすのかを知ることが有用である。しかしながら、これまで妊娠中の睡眠変化についての研究は、ラットでの報告が散見されるのみで²³⁻²⁶、マウスでの報告はほとんどない。近年の睡眠研究における動物実験の背景を考慮すると、C57BL/6系マウスでのデータは有用であると考えられる。

3. 子癇前症とモデル動物

妊娠中に発生する比較的頻度の高い合併症として、子癇前症 (Preeclampsia) があげられる。子癇前症は妊娠高血圧症候群としても知られ、妊娠 20 週以降に新たに発症する高血圧と蛋白尿を主徴とする²⁷⁻³¹。また、子癇 (Eclampsia) は子癇前症の重症例でしばしば発症する痙攣発作であり、子癇患者の画像検査上、多くの症例で脳血管浮腫の存在が指摘される。後頭葉や脳幹に広く浮腫を来すと中枢性神経障害を呈することもあり、子癇は産科重症救急疾患の一つである。WHO の多国籍調査によると、妊娠中の発症率は、子癇前症 2-3%、子癇 0.3%であり、母体死亡率のオッズ比はそれぞれ 3.7、42 であった³²。

子癇前症は多因子疾患といわれている。子癇前症の病態形成には、胎盤虚血による胎盤形成障害・胎盤機能障害³³と、それによる抗血管新生因子や炎症性メディエーターの放出が寄与しており、その結果肝臓や脳を含む様々な臓器障害^{34,35}が生じるとされる。しかしながら、その病因には、免疫系因子、遺伝的因子や酸化ストレス³⁶の関与など、さまざまな説が報告されており、その統括的な病態は未だ十分には解明されていない。治療法にはメチルドパやヒドララジン、ニフェジピンなどの降圧剤に

よる降圧が行われるが、コントロール不良の場合には、妊娠の中断が最終的な治療となり、病態に即した有効な治療法はない。

子癩前症モデル動物としては、自然発生型の境界型高血圧を示すBPH/5マウスや子宮胎盤への血流を遮断するラットモデル (reduced uterine perfusion pressure: RUPP) が代表的なものであるが、そのほかにも、L-NAME (nitro-L-arginine methyl) 投与による薬剤誘発性の妊娠高血圧モデル、IL-4,10欠損マウスやアデノウイルス投与による可溶性VEGF受容体-1 (soluble fms-like tyrosine kinase1: sFlt1) 過剰発現マウスなど、さまざまなモデルが報告されてきた³⁷⁻³⁸。

このうち、深水ら²¹によって報告された妊娠高血圧 (Pregnancy-Associated Hypertensive: PAH) マウスはレニンアンジオテンシン系の遺伝子改変マウスであり、レニン-アンジオテンシノーゲンの酵素-基質種特異的な反応性とヒトレニンの胎盤透過性を利用している^{39,40}。ヒトレニンを遺伝子導入した雄マウスに、ヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子を導入した雌マウスを交配させると、妊娠後期に胎盤で分泌された雄マウス由来のヒトレニンが母獣中のヒトアンジオテンシノーゲンと反応し、アンジオテンシンIへ変換、更にアンジオテンシン変換酵素 (ACE: Angiotensin converting enzyme) によりアンジオテンシンIIへと変換される。アンジオテンシンIIはヒトとマウスで共通であるため、増加したアンジオテンIIにより、アンジオテンシンII受容体であるAT1a受容体を介して血圧は急激に上昇し、非妊娠時および妊娠中期までは90-100 mmHgほどであった血圧は、150-160 mmHgに達する^{39,40}。この変化は、アンジオテンシン受容体遮断薬であるオルメサルタンを投与すると改善され、収縮期血圧は、120 mmHgほどに降圧される⁴¹。これまでの研究により、妊娠後期のPAHマウスは、著明な尿蛋白や心筋・胎盤組織の障害、胎児発育遅延など³⁹、多くの点でヒトと類似した症状を呈するが、PAHマウスにおける脳神経学的な変化については報告

されていない。急激な血圧上昇は、血液脳関門 (Blood Brain Barrier) を破綻させるという報告があるが⁴²、PAHマウスでのBBBの透過性について調べた研究はなく、PAHマウスにおける血圧上昇が睡眠覚醒や脳波へ及ぼす影響は未知である。

また、ヒトレニンとヒトアンジオテンシンを両方もつ遺伝子改変マウスはつくば高血圧マウス (THM: Tsukuba Hypertensive mouse) と呼ばれ、出生時より120-130 mmHgほどの慢性で中等度の高血圧を呈する⁴³。レニンアンジオテンシン系の亢進による高血圧という点では、PAHマウスと同じであるが、高血圧の発症起点が異なるモデルである。THMに関しては、飲水量の増加や尿量の増加が報告されているが⁴⁴、このマウスに関しても脳波や睡眠覚醒に関して調べた研究はなく、PAHマウスと比較することにより、中等度高血圧が睡眠覚醒に及ぼす影響を調べることにした。

第2章 研究の目的

C57BL/6 マウスと子癇モデルマウスである妊娠高血圧 (PAH) マウスにおいて、妊娠前後の睡眠覚醒状態を脳波筋電図の連続測定によって評価する。PAH マウスについては、血液脳関門の透過性評価およびアンジオテンシン II 受容体遮断薬投与も行い、妊娠後期の急激な血圧上昇が及ぼす神経学的な変化を明らかにする。

同時に、発症起点の異なる高血圧モデルとして、慢性高血圧モデルであるつくば高血圧マウス (THM) についても、睡眠覚醒状態を評価する。

第3章 対象と方法

1. 使用動物

未交配の C57BL/6 系雌マウス (CREA JAPAN より購入) 8 匹、PAH マウス 6 匹 (明らかな体調不良により、分娩後解析では 1 匹除外)、THM 雌 5 匹を用いた。PAH マウス、THM は C57BL/6 系で維持されている。(筑波大学動物実験委員会承認番号 17323)

マウスは 5 匹を上限として一つのケージで同居させ、室温湿度が一定に調整された 12 時間の明暗サイクル (9 時 21 時切り替え) 環境下で飼育された。餌と水分は自由に摂取できる状態とし、妊娠中の水分は摂取しやすいように水ゲル (Napa Nector, 8 oz, System Engineering Lab Group Inc.) を使用した。動物実験の取り扱いについては、筑波大学生命科学動物資源センターの規約に準じた。また、連続的脳波筋電図測定中は、頭部に脳波筋電図電極が装着されているため、非観血的な血圧測定が困難であり、マウスの血圧については深水らの報告を参考とした²¹。

2. 脳波筋電図手術と測定

8-12 週齢 (19-23 g) の野生型雌マウス、THM 雌マウス、ヒトアンジオテンシノーゲン発現雌マウスを対象とした。麻酔にはイソフルランを用い、導入は 3-4%、維持は 1.5-2%で行った。頭蓋骨を露出して小型電気ドリルで穴をあけ、定位固定器具 (KOPF) を用いて 4 本の脳波電極を硬膜下に、2 本の筋電図を頸部の筋肉へ挿入した。その後歯科用セメントでそれらを頭蓋骨へ固定した。脳波電極は前頭皮質と後頭皮質に設置した。(Anterior posterior : AP 0.5 mm, mediolateral : ML 1.3 mm,

dorsoventral : DV -1.3 mm, AP -4.5 mm, ML 1.3 mm, DV -1.3 mm) 麻酔からの回復後は術前のケージと同様のケージで個飼いとし、術後回復期間を最低4日とした。その後、電極の重さが最小となるようにバランスのとられたテザーケーブル (Instech laboratories) に繋いでケージを変更し、測定環境への慣らし期間として最低3日をおいた。

3. 脳波筋電図測定スケジュール

C57BL/6 マウスの性周期による睡眠変化を調べた研究では、暗期においては、発情間期の REM 睡眠 (REMS) 時間は発情前期より長い一方、NREM 睡眠 (NREMS) 時間と覚醒時間、NREM デルタ波密度には性周期による変化はなかったという報告がある¹⁰。これらの結果を考慮し、性周期による睡眠変化を平均化するため、妊娠前脳波筋電図測定期間は4日間とした。有線コードを接続して脳波筋電図を測定し、外界からの音による刺激を低減させるため、常時ホワイトノイズを流した。妊娠前脳波筋電図測定後、テザーケーブルを外し、雌マウスを雄マウスと同居させ交配させた。交配の組み合わせは、野生型雌マウスは同系統の野生型雄マウスと、ヒトアンジオテンシノーゲン発現雌マウスはヒトレニン発現雄マウスとした。膣プラグが確認された日を妊娠0日 (PD 0) とし、同日より脳波筋電図測定を再開、測定は分娩後まで続けた。マウスの妊娠期間は約19日であることを考慮し、妊娠初期を妊娠1-4日 (Pregnant day :PD 1-4)、妊娠中期を妊娠8-11日 (PD 8-11)、妊娠後期を妊娠15-18日 (PD 15-18) とした。分娩後の解析対象期間は出産後3-4日としたが、これは出産後の2日間は分娩時間や出生仔の数などにより睡眠覚醒状態の個体差が大きかったためである。測定途中で死亡したマウスや明らかに全身状態が悪くなったマウスは解析から除外した。

また、頭部に装着した脳波筋電図電極を保護するため、および連続的な計測を行うため、本研究では血圧測定と脳波筋電図測定は同時には行わなかった。

4. 脳波筋電図データの解析

睡眠覚醒のデータ解析は、過去に報告された方法に基づいて行った⁴⁵。脳波筋電図 (EEG/EMG) シグナルは bioamplifier (#AB-611J, Nihon Koden) で増幅、生体信号として必要な周波数帯を識別するため、EEG は 0.3-300 Hz、EMG は 30-300 Hz にフィルタリング処理した。EEG/EMG データは LabView (National Instruments) を改変したソフトウェアを用いて表示した。睡眠覚醒の判定時間単位を epoch と呼ぶが、本研究では 1 epoch 20 秒とした。EEG/EMG データは、MatLab (MathWorks) を基に作成された半自動解析ソフトによって覚醒/NREMS/REMS の 3 つのステージに分類されるが、分類後の半自動解析データはすべて目視で確認した。覚醒/NREMS/REMS のステージ判定は、各ステージに特徴的な脳波周波数帯の占有率と EMG の活動性から行った。覚醒期は高振幅で変動性の高い EMG、NREMS 期は高振幅な EEG かつ変動性の低い EMG 活動、REMS 期は θ 波 (6-9 Hz) 優位の EEG と変動性の低い EMG 活動を基準とした。覚醒、NRES、REMS の総時間は、各ステージの 20 秒毎の epoch 数を合計したもの、各ステージにおける平均エピソード持続時間は、各ステージの総時間を出現エピソード数で割ったものと定義した。アーチファクトを含んだ epoch は総時間のデータには含まれるが、周波数測定データでは除外した。EEG シグナルは MATLAB (Math Works) を基にした特注ソフトウェアを用い、1-30 Hz 帯を 1-Hz 周波数ビンで高速フーリエ変換 (FFT) した。各周波数ビンにおける EEG パワー密度は、全 EEG 周波数ビンの合計に対する、各睡眠覚醒状態の EEG 周波数ビンの割合とした。NREMS デルタパワ

一密度 (NREM delta density) は、NREMS epoch におけるすべての EEG パワー (1-30 Hz) に対するデルタパワー (1-4 Hz) の比、総デルタパワー密度 (Total delta density) は、総 EEG パワーにおけるデルタパワー (1-4 Hz) の比とした。EEG スペクトログラムの描出には、MATLAB の Chronux ツールボックス⁴⁶内のマルチテーパ法⁴⁷(時間半帯域幅 3、テーパ数 5、ウィンドウサイズ 30 秒、オーバーラップ 0.5) を用いた。

5. 降圧剤の投与

妊娠後期の血圧上昇を改善した場合の変化をみるため、妊娠後期の PAH マウス 5 匹に降圧剤投与を行った。降圧剤にはアンジオテンシン II 受容体阻害薬であるオルメサルタン (Funakoshi, Japan) を用いた。0.01% NaHCO_3 ・0.01% KHCO_3 を滅菌水に溶解し、15 mg/L として妊娠 13-19 日に飲用水として与えた。これはおおよそ 3 mg/kg に相当する。この方法により、PAH マウスの収縮期血圧はおおよそ 120 mmHg ほどに下降する⁴¹。投与量の一定しない自由飲水による経口投与としたのは、妊娠後期の PAH マウスは刺激に弱く、腹腔内投与することが難しいため、かつ妊娠子宮により腹圧が高い状態でゾンデ診による経口投与は誤嚥の危険性が高まるためである。

6. 血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) の透過性評価

PAH マウスの妊娠後期の BBB の状態を評価するため、エバンスブルー色素を尾静脈を行なった。エバンスブルー (WAKO, Japan) は 0.9%生理食塩水で 2% (wt/vol) に希釈し、0.45 μm PES シリンジフィルター (Starlab Scientific) を通した。妊娠後期の PAH マウスとコントロール群として妊娠後期の正常血圧群マウスに対し、1.5%のイ

ソフルラン麻酔下に、4 ml/kg のエバンスブルー溶解液を尾静注した。正常血圧群マウスは、ヒトアンジオテンシノーゲン発現雄マウスと交配させたヒトアンジオテンシノーゲン発現雌マウスとした。すべての手技は5分以内に完了し、色素静注後はすみやかに元のケージに戻した。1時間後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で経心的に還流して血管内の血液・色素を洗浄除去したのち、4%PFA を還流して組織を固定した。その後脳を取り出し、4%PFA に浸けて4°Cで一晩振盪し後固定して評価した。

7. 統計

野生型マウスと PAH マウスの、妊娠前後における睡眠覚醒総時間・エピソード持続時間・エピソード数・EEG パワー密度・デルタ密度の比較には、One-way repeated measure ANOVA ののち、Tukey's test を行なった。PAH マウスとオルメサルタン投与 PAH マウス、THM における全デルタ密度・REMS パラメーターの群間比較にも、One-way repeated measure ANOVA ののち、Tukey's test を行なった。THM と野生型マウスの睡眠覚醒総時間・エピソード持続時間・エピソード数の評価には、student's t-test を行なった。すべての解析は two-sided test で行い、統計学的有意水準は 0.05 とした。これらのデータ解析は、SPSS version 22 で行なった。

第4章 結果

1. 野生型 C57BL/6 マウスの妊娠に伴う睡眠覚醒変化

妊娠中および分娩後のマウスでは、覚醒期には中等度の振幅と速波を示す EEG と変動性のある EMG を、NREMS 期には高振幅徐波を示す EEG を、REMS 期にはシータ波(6-9 Hz)優位の EEG と筋弛緩を示し、これは妊娠前に観察された EEG/EMG 波形と同様であった (Figure 1, A)。妊娠マウスのスペクトログラムは、非妊娠時と同様、主に明期に多相性の睡眠パターンを示した。授乳期でもある分娩後は、暗期と明期の睡眠覚醒の違いはあまりはっきりしなかった (Figure 1, B)。

妊娠前の雌マウスの1日の覚醒時間は 868 ± 29.2 分であったが、これは雌マウスの覚醒時間は雄マウスより長いという過去の文献による結果と一致した⁴⁸。妊娠経過中、覚醒時間はより短くなっていき (710 ± 24.4 分)、妊娠後期には妊娠前および妊娠初期と比較して有意に短くなっていた ($F = 6.622, df = 4, P < 0.0001, \text{Figure 2, A}$)。この覚醒時間の変化を暗期・明期別に見ると、妊娠後期の暗期における覚醒時間は、妊娠前および妊娠初期と比較して有意に短かった一方 ($F = 5.949, df = 4, P = 0.001, \text{Figure 2, A}$)、明期では妊娠前、妊娠中と変化はなかった。分娩後は、1日の覚醒時間は妊娠前と同じレベルまで延長していたが、明期の覚醒時間は妊娠前よりも有意に長かった ($F = 3.271, df = 4, P = 0.025, \text{Figure 2, A}$)。

覚醒エピソード持続時間は、妊娠前と比較して妊娠中期および後期では有意に短かった ($F = 7.429, df = 4, P < 0.0001, \text{Figure 2, B}$)。明期・暗期毎に見ると、明期においては、妊娠後期に妊娠前や分娩後より短かく ($F = 4.270, df = 4, P = 0.008, \text{Figure 2, B}$)、暗期においては、妊娠中期と後期では、妊娠前と比較して有意に短かった ($F = 4.898,$

$df = 4, P = 0.004$, Figure 2, B)。妊娠後期の覚醒エピソード数は他のどの時期よりも多かった ($F = 10.408, df = 4, P < 0.0001$, Figure 2, C)。

妊娠後期の覚醒エピソード数は、明期 ($F = 6.540, df = 4$, Figure 2, C) 暗期 ($F = 10.806, df = 4, P < 0.0001$, Figure 2, C) いずれにおいても増加していた。

妊娠後期の覚醒時間の短縮と一致して、1日 NREMS 時間は、妊娠前・妊娠初期と比べ妊娠後期で長かった ($F = 8.620, df = 4, P = 0.001$, Figure 2, D)。明期・暗期別に見ると、明期の NREMS 時間は妊娠前、妊娠中、分娩後と同様であったが (Figure 2, D)、暗期の NREMS 時間は妊娠前および妊娠初期と比較して妊娠後期で有意に長かった ($F = 6.751, df = 4, P < 0.0001$, Figure 2, D)。

延長した妊娠後期の NREMS 時間と反対に (Figure 1, B)、NREMS エピソード持続時間は妊娠前および妊娠初期と比較し短くなっていた ($F = 5.168, df = 4, P = 0.003$, Figure 2, E)。明期・暗期別に見ると、明期では、妊娠後期は妊娠前と比べ短く ($F = 3.796, df = 4, P = 0.014$, Figure 2, E)、暗期では、妊娠後期は妊娠前・妊娠初期と比較して有意に短くなっていた ($F = 3.456, df = 4, P = 0.020$, Figure 2, E)。

妊娠後期の NREMS エピソード数は、明期においても ($F = 4.795, df = 4, P = 0.004$) 暗期においても ($F = 8.967, df = 4, P < 0.0001$, Figure 2, F)、どの期間よりも増加していた。これらの結果より、NREMS エピソード数の増加は、短縮したエピソード持続時間を凌いで NREMS 時間の増加に寄与していると考えられる。

REMS 時間は妊娠前、妊娠中、分娩後で有意な変化は認めなかった (Figure 2, G)。

REMS エピソード持続時間は、妊娠前と比較して妊娠中期・後期・分娩後において短縮していた ($F = 13.474, df = 4, P < 0.0001$, Figure 2, H)。明期暗期別に見ると、明期では、妊娠中期・後期・分娩後では、妊娠前と比較して短かった一方 ($F = 8.652, df = 4, P < 0.0001$, Figure 2, H)、暗期では変化はなかった (Figure 2, H)。

REMS エピソード数は 24 時間および明期ではどの時期でも差がなかった一方 (Figure 2, I)、暗期では妊娠前と比較して妊娠後期では多くなっていた ($F = 3.625$, $df = 4$, $P = 0.017$, Figure 2, I)。

覚醒期のスペクトラム解析では、妊娠後期において、妊娠前と比較して 4、5 Hz 帯のパワー密度が上昇していた ($F = 7.964$, $df = 4$, $P < 0.0001$, for 4 Hz, $F = 10.754$, $df = 4$, $P < 0.0001$, for 5 Hz)。一方、妊娠後期の 10,11 Hz 帯のパワー密度は妊娠前と比較して低下していた ($F = 12.378$, $df = 4$, $P < 0.0001$, for 10 Hz, $F = 12.418$, $df = 4$, $P < 0.0001$, for 11 Hz; Figure 3, A)。

NREMS 期のスペクトラム解析では、妊娠後期に、妊娠前・妊娠初期よりも 4 Hz 帯の密度の増加が見られた ($F = 13.384$, $df = 4$, $P < 0.00001$, Figure 3, B)。

REMS 期のスペクトラム解析では、妊娠後期の 4, 5 Hz 帯のパワー密度は妊娠前よりも高かった ($F = 4.865$, $df = 4$, $P = 0.004$ for 4 Hz, $F = 10.561$, $df = 4$, $P < 0.0001$ for 5Hz; Figure 3,C)。

睡眠深度の指標であるとされる NREMS デルタ密度⁴⁹は妊娠前、妊娠中、分娩前で有意な差はなかった (Figure 3, D)。

2. PAH マウスの妊娠に伴う EEG 変化

PAH マウスの血圧は妊娠 12 日目までは野生型マウスと同等であるが¹²、妊娠 13 日目より上昇し、分娩の直前にピークとなる。分娩後は血圧は速やかに低下し、3 日で分娩前のレベルに戻る^{9,25}。妊娠後期特異的な血圧上昇と一致して、PAH マウスは妊娠中期までは野生型マウスと同様の活動性を示した。しかしながら、妊娠後期には、覚醒時の EEG シグナル低下や EMG 変動性の低下、NREMS における低振幅な EEG

と持続的で変動性の低い EMG を認め、異常な EEG/EMG パターンを継続的に示した (Figure 1, C)。結果として、多くの epoch において、目視でも覚醒期か NREMS 期かの判別が困難であり、実際の観察上もマウスの活動性は著しく低下していた。妊娠後期の PAH マウスのスペクトログラムでは、高周波数域 (8 Hz) が減少し、暗期と明期の差は消失していた (Figure 1, D)。妊娠後期における PAH マウスの EEG の全般的な徐波化は、妊娠後期の総デルタ密度が妊娠中期よりも高いことから確認される (Figure 4, A)。

シータ波 (6-8 Hz) と筋弛緩によって判別される REMS は、妊娠後期でもはっきりと確認することが出来た (Figure 1 C)。1 日の REMS エピソード持続時間は 4.3 ± 1.0 分 (mean \pm S.E.M) と非常に短く、妊娠中期には 43.7 ± 7.7 分であったことと比較すると著明な減少であった。REMS エピソード持続時間は短縮 (0.44 ± 0.14 min) し、REMS エピソード数も減少 (5.5 ± 2.5 episodes per 24 h) したことにより、総 REMS 量は著明な減少を示した。

驚くべきことに、この異常な EEG 変化と概日スペクトログラム変化は、分娩後 2 日で速やかに正常に戻り (Figure 1, C and D)、明期暗期の活動性の差も再開した (Figure 4, A)。

実験に用いた PAH マウスの半数 (6 匹中 3 匹) で、妊娠後期に周期的に異常な EEG パターン、spike-and-discharge を示した (Figure 4, B, C, D)。この周期的な spike-and-discharge はほとんどの場合で NREMS 様状態中に起こり、明らかな体動と EMG 活動を伴った。このエピソードは 10-15 分持続して自然に消失し、24 時間で 4-6 回ほど出現した。

PAH マウスにおける急激な血圧上昇が BBB の透過性へ与える影響を調べるため、エバンスブルー色素を妊娠後期の PAH マウス 5 匹へ尾静注した。その結果、正常血

圧群の妊娠後期マウスではエバンスブルー色素は、脳実質には検出されなかった一方、妊娠後期の PAH マウスでは、すべてのマウスにおいて脳実質の複数箇所にも血管外への漏出が認められた (Figure 4, E)。漏出箇所の数は 4.5 ± 0.96 (mean \pm S.E.M) であり、漏出場所は個体によってさまざまであった。

妊娠後期の PAH マウスでは上記の理由より覚醒期と NREMS 期を正しく判別することが難しいため、妊娠後期は解析対象から除いて示した。

覚醒時間は妊娠前・妊娠初期・中期・分娩後で類似しており (Figure 5, A)、覚醒エピソード持続時間 (Figure 5, B)・エピソード数 (Figure 5, C) にも差は認めなかった。

同様に、NREMS 時間も妊娠前・妊娠初期・中期・分娩後で類似しており (Figure 5, D)、NREMS エピソード持続時間 (Figure 5, E)・エピソード数も差は認めなかった (Figure 5, F)。

REMS 時間に関しては、分娩後には妊娠初期・中期よりも延長していた ($F = 9.058$, $df = 3$, $P = 0.002$, Figure 5, G)。明期・暗期別に見ると、この REM 時間の延長は、明期には認めたが ($F = 11.141$, $df = 3$, $P = 0.0008$, Figure 5, G)、暗期には認めなかった REMS エピソード持続時間 (Figure 5, H)・REMS エピソード数 (Figure 5, I) に差は認めなかった。

スペクトラム解析においても上記理由により PAH マウスの妊娠後期は解析対象から除外した。PAH マウスのパワー密度は、覚醒期には、分娩後より妊娠中期において、3 Hz 帯の増加が見られ ($F = 5.783$, $df = 3$, $P = 0.011$)、6,7,9,12,13,14 Hz 帯では妊娠前とと比較して分娩後に高かった (Figure 6, A)。NREMS 期においては、有意な差を認めなかった (Figure 6, B)。REMS 期においては、妊娠中期の 6 Hz 帯 ($F = 10.101$, $df = 3$, $P = 0.001$) および 7 Hz 帯 ($F = 23.156$, $df = 3$, $P < 0.0001$) が低下しており、9 Hz 帯 ($F = 14.724$, $df = 3$, $P < 0.0001$)、および 10 Hz 帯 ($F = 9.019$, $df = 3$, $P = 0.002$) が増加し

ていた。NREMS デルタ密度は分娩後に低い傾向にあった (Figure 6, D)。

3. 降圧剤投与した PAH マウスの睡眠覚醒変化

アンジオテンシン受容体遮断薬であるオルメサルタンを投与した PAH マウスの血圧は 120 mmHg ほどであり、BBB の透過性には影響を与えない⁴²。オルメサルタンを投与した PAH マウスでは、野生型マウスと同様の活動性を示したことに加え、正常な睡眠覚醒パターンを示し、睡眠覚醒の明暗サイクルも認められた (Figure 7, A)。総デルタ密度はオルメサルタン投与群では妊娠前と同程度まで改善していた (Figure 7, B)。

PAH マウスでは妊娠後期の覚醒期・NREM 期を判定することが困難であるため、睡眠覚醒状態の指標としては、REMS 期のみを比較した。REMS 時間は妊娠後期の PAH マウスでは 4.3 ± 1.9 分 (mean ± S.E.M.) であったが、オルメサルタンを投与すると有意に増加した ($F=17.230$, $df=2$, $P<0.0001$, Figure 7, C)。REMS エピソード持続時間はオルメサルタン投与群と PAH マウスとでは同様であったが (Figure 7, D)、REMS エピソード数は増加しており ($F=25.613$, $df=2$, $P<0.0001$; Figure 7, E)、オルメサルタン投与 PAH マウスの REMS 時間の増加はエピソード数の増加によるものであった。

4. つくば高血圧マウス (THM) の睡眠変化

最後に、非妊娠時の THM の睡眠覚醒状態を調べた。

覚醒時間は非妊娠時の野生型マウスの非妊娠時と類似しており (Figure 8, A)、エピソード

ソード持続時間 (Figure 8, B) ・ エピソード数 (Figure 8, C) にも差は認めなかった。

同様に、NREMS 時間も、野生型マウスの非妊娠時と類似しており (Figure 8, D)、エピソード持続時間 (Figure 8, E) ・ エピソード数 (Figure 8, F) 共に差はなかった。

REMS 時間は野生型マウスの非妊娠時より短かかった (Figure 8, G)。 REMS 時間の短縮は、エピソード持続時間の減少と関連したが (Figure 8, H)、NREMS エピソード数には有意差はなかった (Figure 8, I)。 THM の総 REM 睡眠量とエピソード持続時間、エピソード数はオルメサルタンを投与した PAH マウスと類似していた (Figure 7, C, D, E)。

第5章 考察

1. 周産期の睡眠覚醒

本研究で観察された、妊娠に伴う覚醒時間の減少や、主に活動期での変化を反映した NREMS 時間の増加は、妊娠ラットを用いた過去の報告と一致する^{23,26}。睡眠の必要度は、脳波の低周波数成分 (デルタ密度) によって示される睡眠の深さ⁴⁹および睡眠時間の長さで示される。今回観察された妊娠の進行に伴う睡眠必要度の増加は、妊娠の進行によって増加する胎仔の重さや伸長した子宮によって増加する腹圧などにより母体の身体的負担が大きくなり、睡眠や休息がより必要になるためと考えられ、合目的的と考えられる。

また、妊娠後期には、覚醒および NREMS のエピソード持続時間の短縮・エピソード数の増加を認め、頻回な覚醒・NREMS の切り替えが確認された。このことは、ヒトやラットにおける過去の文献とも一致する²⁴。NREMS が断片化するのには、胎仔の動きや増大する子宮が周辺臓器へ及ぼす影響などのためと考えられる。

妊娠中の REMS は覚醒や NREMS とは異なる変化を示した。1 日 REMS 時間と REMS エピソード数は過去の文献通り、妊娠中の変化はなかったが²⁴⁻²⁶、REMS エピソード持続時間は、妊娠中期から分娩後にかけて短縮していた。スペクトラム解析では妊娠初期より、シータ波帯の変化を認めた。REMS の変化が NREMS の変化と異なることは、REMS 調節機構が NREMS のそれとは独立しているという考え方⁵⁰を支持するものである。

妊娠中の睡眠覚醒変化には、増大する子宮や胎仔による身体的な影響に加え、内分泌的变化も関与する。エストロゲンとプロゲステロンは妊娠が進行するにつれ増加し、

分娩後には急激に減少する⁵¹。プロゲステロンは大量投与により鎮静作用を持つことが古くから言われているが⁵²、一方で卵巣除去したマウスにエストロゲン単剤もしくはエストロゲンとプロゲステロンの両方を投与した実験では、エストロゲンとプロゲステロン投与は覚醒時間を増加させ、睡眠量を減少させるとされる^{12,16,53-55}。本研究では妊娠後期の総覚醒時間は妊娠前、妊娠初期と比較して減少していた。また、妊娠後期から分娩後にかけて増加するプロラクチンは、REM睡眠を増加させるといわれているが⁵⁶、本研究では過去の文献と一致して、REM睡眠量は分娩後大きな変化はなかった。また、分娩後は妊娠前とは大きく異なるホルモン状態であるにも関わらず、睡眠覚醒状態は妊娠前と近い状態に戻ることが示された。これらのことより、周産期の睡眠覚醒には、ホルモン変化による作用を上回るような調節機構の存在が示唆される。

2. 子癇モデルとしての PAH マウス

PAH マウスは妊娠後期に蛋白尿を伴う急激な高血圧を呈し、胎盤の梗塞性変化や胎児発育遅延などの症状を呈するが^{40,79}、これらは多くの点でヒトの子癇前症に類似している^{27,28}。しかしながら、薬理的・遺伝工学的手法を用いた子癇前症モデルマウスは複数報告されているものの⁵⁷⁻⁵⁹、PAH マウスを含め、これらのマウスについて、子癇などの脳への障害を調べた報告はほとんどない。

妊娠後期の PAH マウスでは、EEG の全般的な徐波化を認め、半数の PAH マウスでは spike-and-wave discharge が確認された。また EEG 上は覚醒と NREMS の判別も困難でありながら、刺激には反応することができ、また自発的な摂食・飲水は可能であった。これらのことより、妊娠後期の PAH マウスは全身状態が不良であるという

より、意識障害に近い状態であると考えられる。さらに、妊娠後期の異常な状態は降圧により改善することが確認され、PAH マウスのこれらの変化が、妊娠後期の急激な高血圧が主因であると推測された。分娩後は、EEG の全般的な徐波化は速やかに改善、出産 3 日後には正常な覚醒・NREMS 状態に戻り、これらの変化が可逆的であることが示された。しかしながら、PAH マウスの致死率は高く、本研究中でも分娩前後で 10 匹中 3 匹の PAH マウスが死亡している。ヒトの子癇で報告されている最も多い EEG 変化は、全般的もしくは部分的な EEG の徐波化であり⁶⁰⁻⁶²、高血圧がなくなれば異常な EEG は正常化する⁶²。本研究は、EEG の特徴的な変化やけいれん様の発作の出現と、それらの変化の可逆性、致死率の高さなどにより、PAH マウスがヒトの子癇と神経学的な類似点があることを明らかにし、PAH マウスの子癇モデルとしての可能性を示した。

また、妊娠後期のすべての PAH マウスで BBB の破綻を確認した。脳は平均収縮期血圧を 60-120 mmHg に維持し、安定した脳血流を保つための自己調整能を有する⁶³。80 mmHg ほどの急激な動脈圧の上昇はラットの BBB の完全性を破壊するという報告⁴²や、4 時間の腹腔内高血圧により脳へのエバンスブルーの漏出が見られた⁶⁴という報告などから、急激で重篤な血圧の上昇はそれのみで BBB の破綻を引き起こす可能性がある。子癇患者の神経学的画像研究では、急性の意識障害を伴う可逆性的大脑皮質後頭領域の血管性浮腫を病態とする可逆性白質脳症 (PRES: posterior reversible encephalopathy syndrome) が広く知られており^{61,65-67}、BBB の破綻の可能性が示唆されている。以上のことから、妊娠後期の PAH マウスはヒトの子癇と類似した病態的メカニズムを示しているといえる。

分娩後の PAH マウスは妊娠前と比較しても長い REMS を示したが、これは恒常性維持機構により、妊娠後期の著しく減少した REMS を代償していると考えられる。

PAH マウスは野生型雌マウスと異なり、仔マウスを育てることが出来ないことが多いが、このことが分娩後の睡眠覚醒状態に影響しているとは考えづらい。サイトカインや炎症はREMSを減少させることが知られており^{68,69}、妊娠後期のBBBの破綻は、サイトカインの増加を介して急激でREMSの減少を引き起こしている可能性がある。また、血管内皮障害がREMSの減少に関与している可能性も示唆されている⁷⁰。

3. レニン-アンジオテンシノーゲン系の影響

アンジオテンシン II はレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系による高血圧の主因であり⁵⁹、PAH マウスの高血圧にはアンジオテン II タイプ 1a (AT1a) 受容体が必要であることが報告されている⁶⁰。野生型マウスと比較して、PAH マウスおよびTHMでは血清中アンジオテンシン II は5-6倍上昇している^{21,41}。高血圧がBBBへ与える影響として、アンジオテンシンとアルドステロンが直接BBBの透過性と脳血管系に関与しているという可能性が挙げられる。高血圧ラットにおいては、ACE阻害薬投与によって脳動脈径の自動調節能が改善した方で、 β 遮断薬は同様もしくはそれ以上の動脈圧低下の効果があつたにも関わらず、同様の効果を示さなかったという報告があり⁷¹、同様に、低用量のアンジオテンシン II タイプ 1 受容体 (AT1) 遮断薬により、血圧とは無関係に脳血流の自己調整能を改善したという報告がある⁷²。これらの結果は、今回観察されたBBBの破綻の原因は、高血圧性の変化だけでなく、レニンアンジオテンシン系の亢進によるものである可能性を示唆する。

実際、ヒトレニン導入遺伝子は主に腎臓に発現しているが、脳にも軽度発現しており⁷³、ヒトアンジオテンシノーゲン導入遺伝子に関しても、主に肝臓で発現しているものの、脳にもごく軽度発現が確認されている⁷⁴。THMではACEおよびアンジオ

テンシン II 受容体が発現する脳においても、ヒト導入遺伝子に由来するアンジオテンシンの量が増加している可能性がある^{75,76}。本研究で観察された THM における REMS の減少は、慢性で中等度の血圧上昇でも REMS に影響を与えることを示しており、局所的なアンジオテンシンシステムが睡眠覚醒にどのように関与しているのかについての報告はないが、脳アンジオテンシンが THM の REMS を減少させている可能性はある。

4. 本研究の限界

PAH マウスを含む様々な子癇前症モデルマウスが報告されているが、どのモデルもヒトの子癇前症を病態や症状、薬理的介入に対する反応という観点からは完全に再現しているものではない。PAH マウスを子癇モデルマウスとする妥当性について検討するため、一般的に子癇患者に使用される抗けいれん薬、硫酸マグネシウム投与などの実験が有用であると考えられる。同様に、レニンアンジオテンシン系の増強が、血圧の上昇とは無関係に PAH マウスの意識状態の変化や spike-wave discharge を引き起こしているのかを検討するには、メチルドパなどのレニン-アンジオテンシンとは作用の異なる降圧薬を投与することで PAH マウスの神経学的異常が改善するか観察することが有用であろう。

次に、PAH マウスの EEG 変化には、液性因子が関連している可能性がある。ヒトの子癇前症での異常な胎盤形成²⁹と一致して、PAH マウスは異常な胎盤血管形成を示す^{60,77}。これらの変化は液性因子や活性酸素を増加させて BBB を破綻させる可能性がある⁷⁸。酸化ストレスからの防御機構である Keap1-Nrf2 経路の修飾により胎盤の血管新生が増強され、高血圧とは関係なく PAH マウスや仔マウスの生存率が改善

したとの報告もある⁷⁹。BBBの破綻と妊娠高血圧には、胎盤血管異常に関連した酸化ストレスや炎症性サイトカインが関与するとも考えられ、今後の研究課題の一つである。

最後に、使用マウスのサンプル数の少なさがある。野生型マウスにおける妊娠後期のNREMSの増加や、PAHマウスにおける妊娠後期の異常な意識状態などの本研究での結果は、個体差が少なく再現性が高いため、少ないサンプル数でも確実ではある。サンプル数を増やすことにより、軽微な影響をより確実に検出することができるかもしれない。加えて、本研究ではTHMを妊娠させることが出来ず、妊娠時のTHMとPAHマウスを比較することが出来なかった。慢性高血圧による妊孕性が原因かもしれないが、THMの妊娠時のデータがあれば、血圧の発症起点のことなる妊娠経過として有用であったかもしれない。

第 6 章 結論

野生型 C57BL/6 マウスでは、妊娠前後において睡眠深度の指標である NREM デルタ密度は変化しない一方、妊娠後期には有意に NREM 睡眠時間が増加し、妊娠に伴う睡眠需要の増加が示唆された。また、REMS には変化がなく、NREMS と REMS の異なる制御機構が考えられた。

PAH マウスでは、妊娠後期の急激な血圧上昇が起こる時期に一致して、BBB の破綻を伴う EEG の著明な全般的徐波化と spike-and discharge を認めたが、分娩後には速やかに改善し、可逆性の変化であることが示された。また、これらの変化はアンジオテンシン II 受容体遮断薬の投与により改善した。この病態はヒトにおける子癇前症や子癇発作における変化と類似しており、PAH マウスの子癇モデルマウスとしての有用性が示された。

第7章 図表

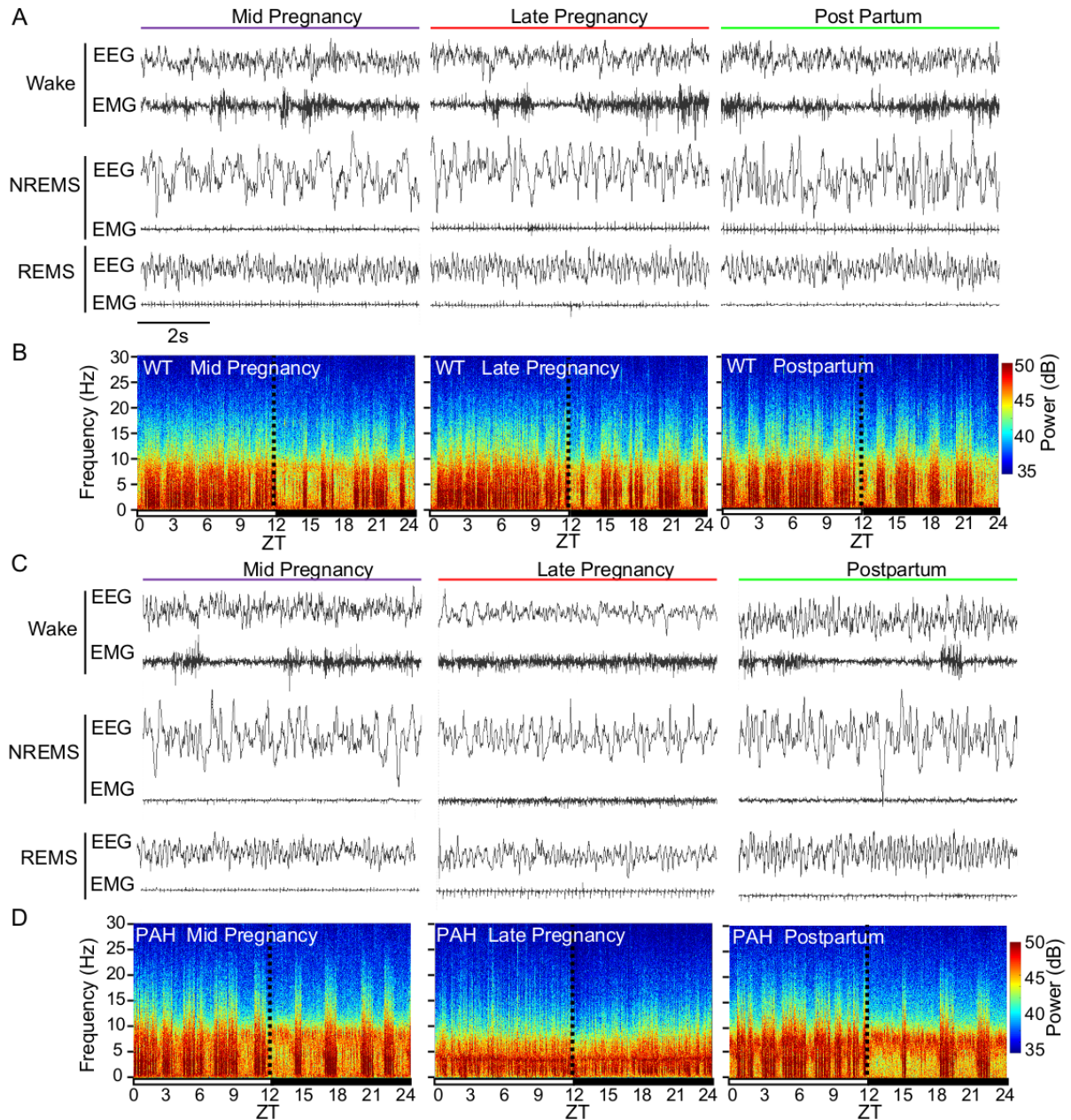


図 1. 野生型および PAH マウスの EEG/EMG とスペクトログラム

- A. 野生型マウスの妊娠中期、後期、分娩後における覚醒/NREMS/REMS の EEG/EMG
- B. 野生型マウスの妊娠中期、後期、分娩後における一日のスペクトログラム
- C. PAH マウスの妊娠中期、後期、分娩後における覚醒/NREMS/REMS の EEG/EMG
- D. PAH マウスの妊娠中期、後期、分娩後における一日のスペクトログラム

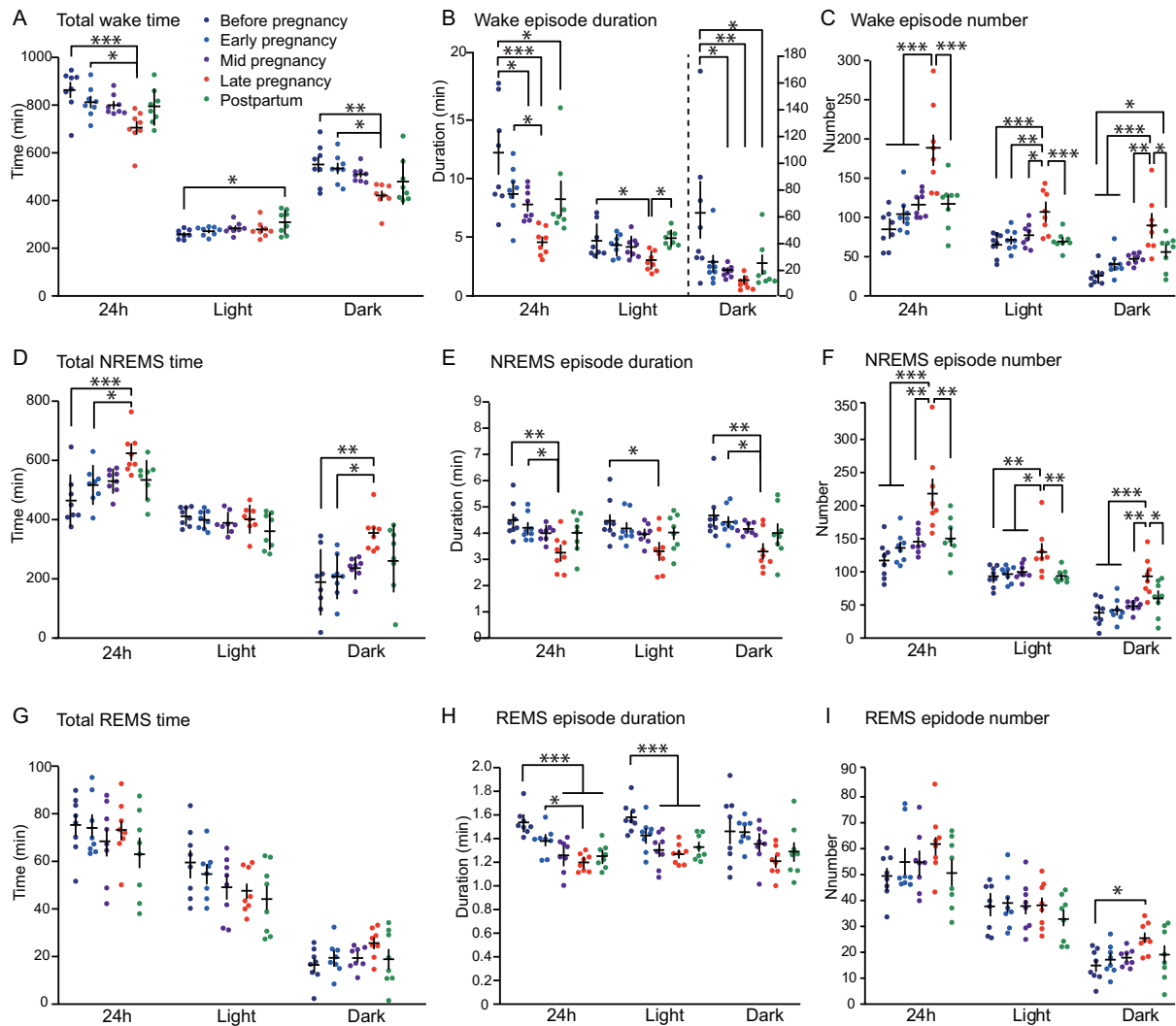


図 2. 野生型マウスにおける妊娠中の睡眠覚醒行動

- A. 総覚醒時間、B. 覚醒エピソード持続時間、C. 覚醒エピソード数
 D. 総 NREMS 時間、E. NREMS エピソード持続時間、F. NREMS エピソード数
 G. 総 REMS 時間、H. REMS エピソード持続時間、I. REMS エピソード数

n = 8. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. One-way repeated measures ANOVA followed by Tukey's test. The data from individual mice are presented as the mean ± S.E.M..

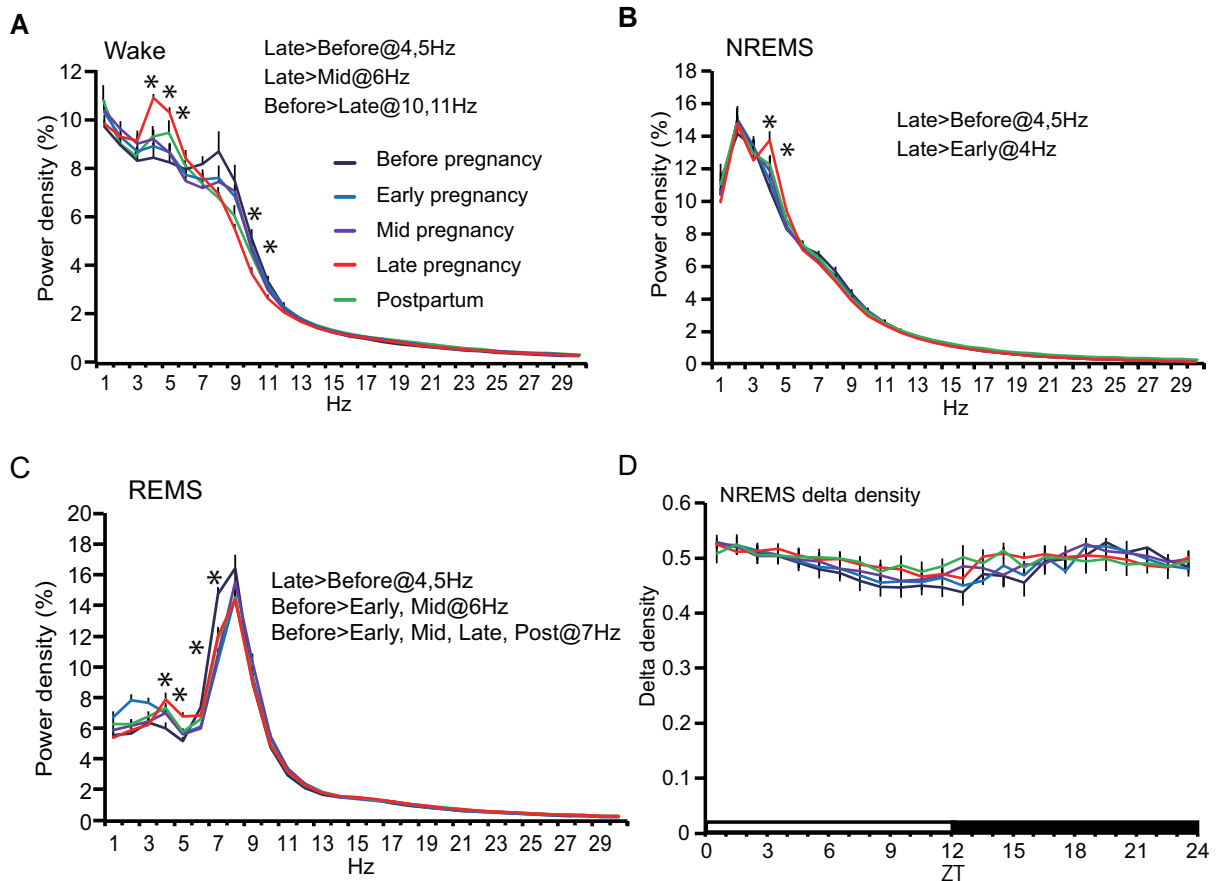


図 3. 野生型マウスにおける妊娠中のスペクトラム解析

- A. 妊娠前、妊娠初期・中期・後期、分娩後の覚醒期パワー密度
- B. 妊娠前、妊娠初期・中期・後期、分娩後の NREMS 期パワー密度
- C. 妊娠前、妊娠初期・中期・後期、分娩後の REMS 期パワー密度
- D. 24 時間の妊娠前、妊娠初期・中期・後期、分娩後の NREM デルタ密度

A-D: * $p < 0.05$, One-way repeated measures ANOVA followed by Tukey's test. $n = 8$. The data are presented as the mean \pm S.E.M..

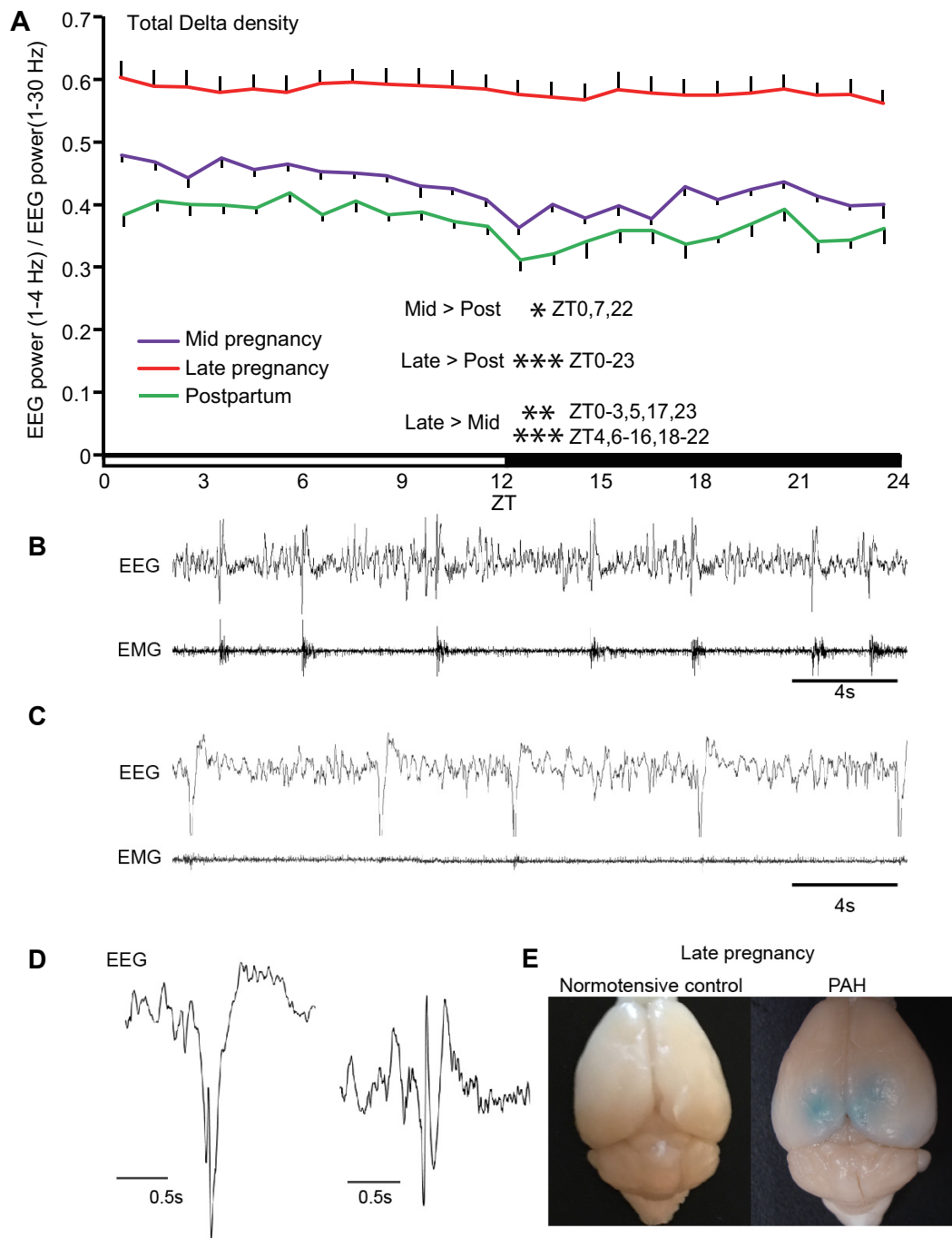


図 4. PAH マウスの妊娠後期における変化

A. 24 時間の総デルタ密度および NREM デルタ密度

B. 周期的な EEG/EMG 変化、C. Spike and discharge、D. B、C を拡大したもの

E. エバンスブルーを静注した妊娠後期の正常血圧マウスと PAH マウスの脳

A: n = 6. One-way repeated measures ANOVA, followed by Tukey's test. The data are presented as the mean \pm S.E.M..

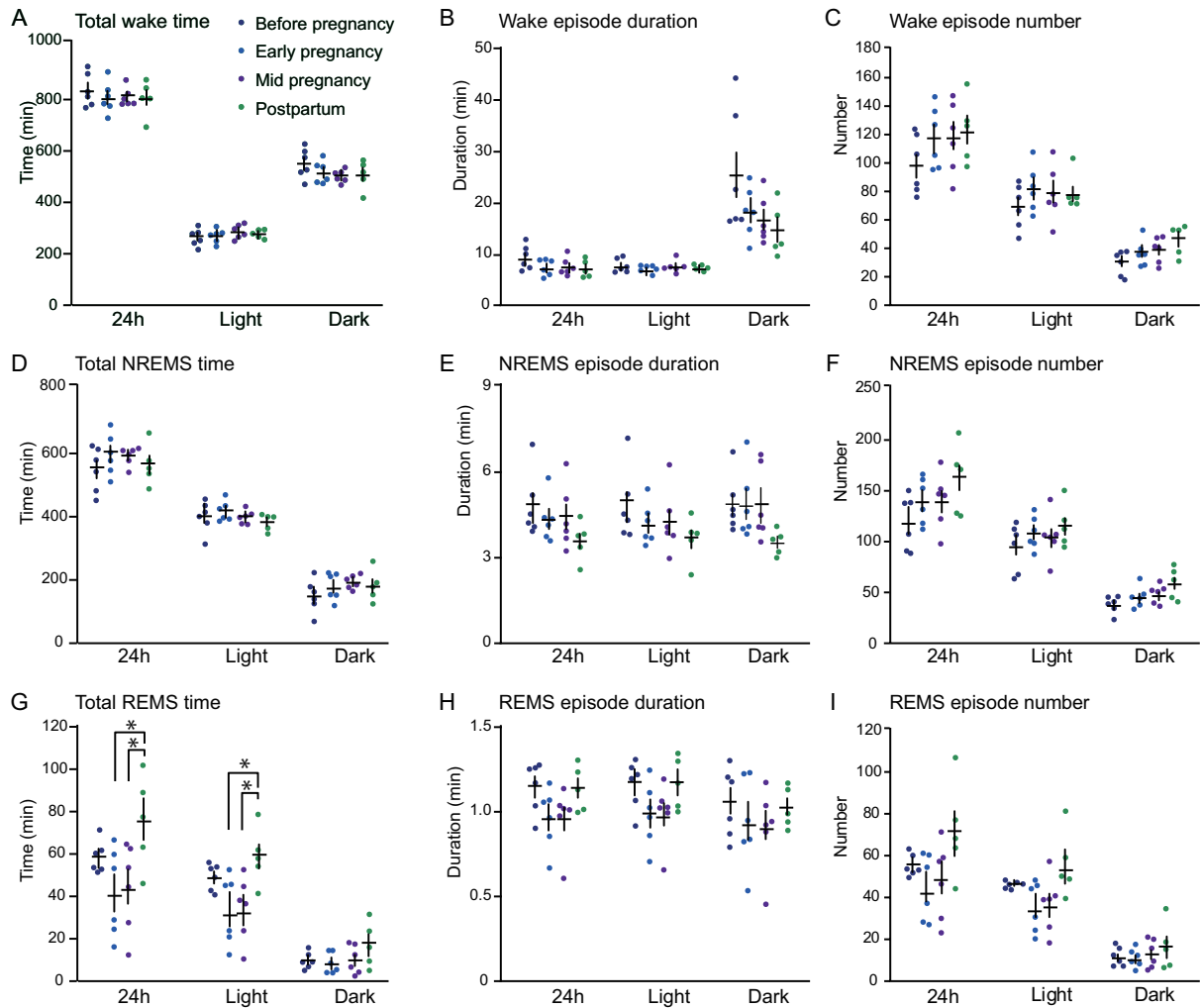


図 5. PAH マウスにおける妊娠中の睡眠覚醒行動（妊娠後期を除く）

- A. 総覚醒時間、B. 覚醒エピソード持続時間、C. 覚醒エピソード数
 D. 総 NREMS 時間、E. NREMS エピソード持続時間、F. NREMS エピソード数
 G. 総 REMS 時間、H. REMS エピソード持続時間、I. REMS エピソード数

n = 6. * $p < 0.05$. One-way repeated measures ANOVA followed by Tukey's test. The data from individual mice are presented with the group mean \pm S.E.M..

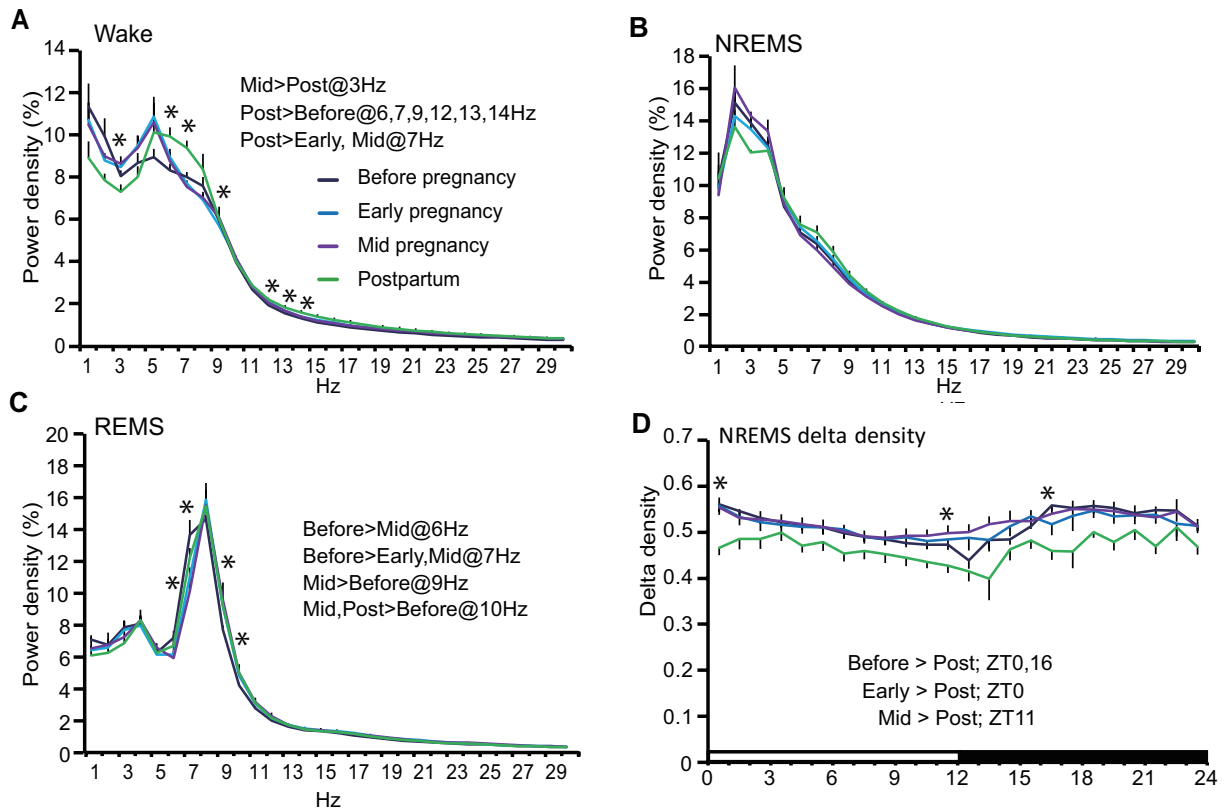


図6. PAH マウスにおける妊娠中のスペクトラム解析(妊娠後期を除く)

- A. 妊娠前、初期、中期、分娩後の覚醒期パワー密度
- B. 妊娠前、初期、中期、分娩後の NREMS 期パワー密度
- C. 妊娠前、初期、中期、分娩後の REMS 期パワー密度
- D. 24 時間における妊娠前、初期、中期、分娩後の NREM デルタ密度

A-D: n=6, *p < 0.05, One-way ANOVA followed by Tukey's test. The data are presented as the mean ± S.E.M..

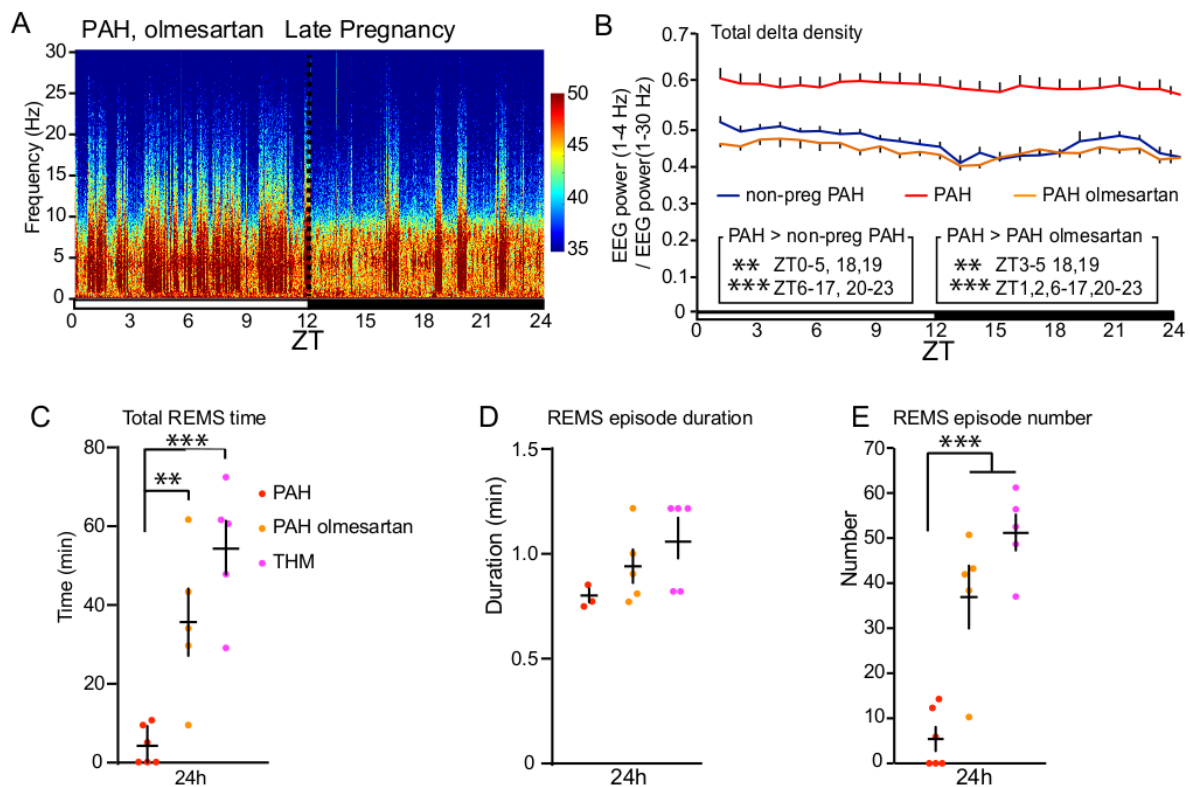


図 7. オルメサルタン投与による妊娠後期の PAH マウスの睡眠変化

- A. オルメサルタン投与した妊娠後期の PAH マウスのスペクトログラム
 B. 非妊娠時の PAH マウス、PAH マウス、オルメサルタン投与した PAH マウスにおける総デルタ密度の比較
 C-D. 24 時間における REMS の総時間、エピソード持続時間、エピソード数

B: Non-pregnant PAH mice (n=6), PAH mice in late pregnancy (n=6), olmesartan-administered PAH mice (n=5),

C-E: n = 5, * *p < 0.01, *** p < 0.001. One-way ANOVA followed by Tukey's test. The data are presented with the group mean ± S.E.M..

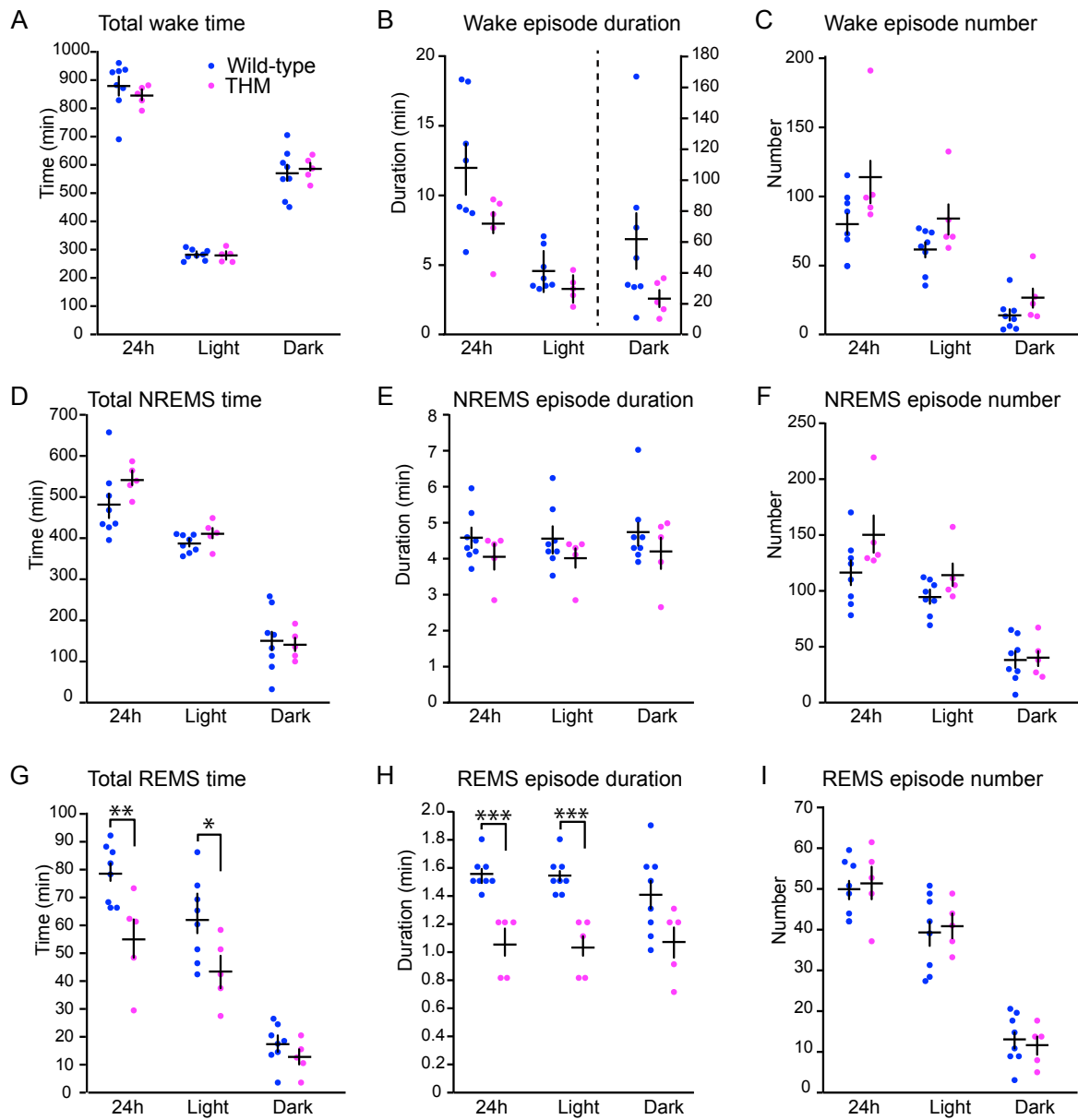


図 8. THM における睡眠覚醒行動

- A. 総覚醒時間、B. 覚醒エピソード持続時間、C. 覚醒エピソード数
 D. 総 NREMS 時間、E. NREMS エピソード持続時間、F. NREMS エピソード数
 G. 総 REMS 時間、H. REMS エピソード持続時間、I. REMS エピソード数

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Two-tailed t -test. The data from individual mice are presented with the group mean \pm S.E.M.. 5 THM and 8 wild-type mice.

引用文献

1. Gottlieb DJ, Punjabi NM, Newman AB, Resnick HE, Redline S, Baldwin CM, Nieto FJ. Association of sleep time with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Archives of Internal Medicine*, 2005;165(8), 863–867.
2. Gangwisch JE, Heymsfield SB, Boden-Albala B, Buijs RM, Kreier F, Pickering TG, Rundle AG, Zammit GK, Malaspina D. Short sleep duration as a risk factor for hypertension: Analyses of the first National Health and Nutrition Examination Survey. *Hypertension*, 2006.;47(5), 833–839.
3. Miyata S, Noda A, Ozaki N, Hara Y, Minoshima M, Iwamoto K, Takahashi M, Iidaka T, Koike Y. Insufficient sleep impairs driving performance and cognitive function. *Neuroscience Letters*, 2010;469(2), 229-233.
4. Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, de Jong PJ, Stewart AF, Bradley A. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*. 2011;474(7351):337-342.
5. Hrabě de Angelis M, Nicholson G, Selloum M, White J, Morgan H, Ramirez-Solis R, Sorg T, Wells S, fuchs H, Fray M, Adams DJ, Adams NC, Adler T, Aguilar-Pimentel A, Ali-Hadji D, Amann G, Andre P, Atkins S, Auburtin A, Ayadi A, Becker J, BeckerL, Bedu E, Bekeredjian R, Birling MC, Blake A, et al. Analysis of mammalian gene function through broad-based phenotypic screens across a consortium of mouse clinics. *Nature Genetics*. 2015;47(9):969-978.

6. Cirelli C. The genetic and molecular regulation of sleep: from fruit flies to humans. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10(8):549-560. doi:10.1038/nrn2683.
7. Weber F, Dan Y. Circuit-based interrogation of sleep control. *Nature*. 2016;538(7623):51-59.
8. Prendergasta BJ, Onishi KG, Zucker I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;40:1–5.
9. Clayton JA, Collins FS. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature*. 2014;509(7500):282-283.
10. Koehl M, Battle SE, Turek FW. Sleep in female mice: a strain comparison across the estrous cycle. *Sleep*. 2003;26(3):267-272.
11. Koehl M, Battle S, Meerlo P. Sex differences in sleep: the response to sleep deprivation and restraint stress in mice. *Sleep*. 2006;29(9):1224-1231.
12. Paul KN, Dugovic C, Turek FW, Laposky AD. Diurnal sex differences in the sleep-wake cycle of mice are dependent on gonadal function. *Sleep*. 2006;29(9):1211-1223.
13. Lee KA. Alterations in sleep during pregnancy and postpartum: a review of 30 years of research. *Sleep Medicine Reviews*. 1998;2(4):231-242.
14. O’Keeffe M, St-Onge MP. Sleep duration and disorders in pregnancy: implications for glucose metabolism and pregnancy outcomes. *International Journal of Obesity*. 2013;37(6):765-770.
15. Moline ML, Broch L, Zak R, Gross V. Sleep in women across the life cycle from adulthood through menopause. *Medical Clinics of North America*. 2004;88(3):705-736.

16. J. Mong, D. Cusmano. Sex differences in sleep: impact of biological sex and sex steroids. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2016;371(1688):20150110.
17. Parry BL, L.Fernando Martinez L, Maurer EL, Lopez AM, Sorenson D, Meliska CJ. Sleep, rhythms and women's mood. Part II. Menopause. *Sleep medicine reviews*. 2006;10(3):197-208.
18. Driver HS, Shapiro CM. A Longitudinal Study of Sleep Stages in Young Women During Pregnancy and Postpartum. *Sleep*. 1992;15(5):449-453.
19. Brunner DP, Munch M, Biedermann K, Huch R, Huch H, Borbely AA. Changes in sleep and sleep electroencephalogram during pregnancy. *Sleep*. 1994;17(7):576-582.
20. Lee KA, Zaffke ME, McEnany G. Parity and sleep patterns during and after pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*. 2000;95(1):14-18.
21. Takimoto E, Ishida J, Sugiyama F, Horiguchi H, Murakami K, Fukamizu A. Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science (New York, NY)*. 1996;274(5289):995-998.
22. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin Knockout Mice Molecular Genetics of Sleep Regulation. *Cell*. 1999;98(4):437-451.
23. Kimura M, Zhang SQ, Inoué S. Pregnancy-associated sleep changes in the rat. *The American Journal of Physiology*. 1996;271(4 Pt 2):R1063-9.
24. Nishina H, Honda K, Okai T, Kozuma S, Inoué S, Taketani Y. Characteristic changes in sleep patterns during pregnancy in rats. *Neuroscience Letters*. 1996;203(1):5-8.

25. Branchey M, Branchey L. Sleep and wakefulness in female rats during pregnancy. *Physiology & Behavior*. 1970;5(3):365-368.
26. Sivadas N, Radhakrishnan A, Aswathy BS, Kumar VM, Gulia KK. Dynamic changes in sleep pattern during post-partum in normal pregnancy in rat model. *Behavioural Brain Research*. 2016;320:264-274.
27. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertension*. 2014;4(2):97-104.
28. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *The Lancet*. 2010;376(9741):631-644.
29. Chaiworapongsa T, Chaemsaihong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nature Reviews Nephrology*. 2014;10(8):466-480.
30. Chaiworapongsa T, Chaemsaihong P, Korzeniewski SJ, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 2: prediction, prevention and management. *Nature Reviews Nephrology*. 2014;10(9):531-540.
31. Roccella EJ. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2000;183(1):S1-S22.
32. Abalos E, Cuesta C, Carroli G, Qurechi Z, Widmer M, Vogel JP, Souza JP. Pre-eclampsia, eclampsia and adverse maternal and perinatal outcomes: a secondary analysis of the World Health Organization Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health. *BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*.

- 2014;121 Suppl:14-24.
33. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ, Preeclampsia Is Associated with Failure of Human Cytotrophoblasts to Mimic a Vascular Adhesion Phenotype. *Journal of Clinical Investigation*. 1997; 99(9), 2152–2164.
 34. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1998;79(5), 1359–1375.
 35. Roberts JM, Hubel CA. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *The Lancet*. 1999;354(9181), 788–789.
 36. Haram K, Mortensen JH, Nagy B. Genetic aspects of preeclampsia and the HELLP syndrome. *Journal of Pregnancy*. 2014;910751(13).
 37. Sunderland N, Hennessy A, Makris A. Animal Models of Pre-eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2011;65(6), 533–541.
 38. McCarthy FP, Kingdom JC, Kenny LC, Walsh SK. Animal models of preeclampsia; Uses and limitations. *Placenta*. 2011;32(6), 413–419.
 39. Ishida J, Matsuoka T., Saito-Fujita, T., Inaba, S., Kunita, S., Sugiyama, F., ... Fukamizu, A. Pregnancy-associated homeostasis and dysregulation: Lessons from genetically modified animal models. *Journal of Biochemistry*, 2011;150(1), 5–14.
 40. Takimoto-Ohnishi E, Saito T, Ishida J, Ohnishi J, Sugiyama F, Yagami K, Fukamizu A. Differential roles of renin and angiotensinogen in the fetomaternal interface in the development of complications of pregnancy. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*. 2005;19(5), 1361–72.

41. Murata K, Baasanjav A, Kwon C, Hashimoto M, Ishida J, Fukamizu A. Angiotensin II accelerates mammary gland development independently of high blood pressure in pregnancy - associated hypertensive mice. *Physiological Reports*. 2015;3(9),
42. Mayhan WG, Faraci FM, Heistad DD. Disruption of the blood-brain barrier in cerebrum and brain stem during acute hypertension. *The American Journal of Physiology*. 1986;251(6 Pt 2):H1171-5.
43. Fukamizu A, Sugimura K, Takimoto E, Sugiyama F, Seo MS, Takahashi S, Hatae T, Kajiwara N, Yamagi K, Murakami K. Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(16), 11617–11621.
44. Kai T, Kino H, Ishikawa K. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy and renal glomerular sclerosis in transgenic hypertensive mice carrying both human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension Research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 1998;21(1):39-46.
45. Funato H, Sato M, Sinton CM, Gautron L, Williams SC, Skach A, Elmquist JK, Skoultschi AI, Yanagisawa M. Loss of Goosecoid-like and DiGeorge syndrome critical region 14 in interpeduncular nucleus results in altered regulation of rapid eye movement sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(42):18155-18160.
46. Mitra PP, Pesaran B. Analysis of dynamic brain imaging data. *Biophysical Journal*. 1999;76(2):691-708.
47. Bokil H, Andrews P, Kulkarni JE, Mehta S, mitra PP. A platform for analyzing neural

- signals. *Journal of Neuroscience Methods*. 2010;192(1):146-151.
48. Funato H, Miyoshi C, Fujiyama T, Kanda T, Sato M, Wang Z, Ma J, Nakane S, Tomita J, Ikkyu A, Kakizaki M, Hotta-Hitashima N, Kanno S, Komiya H, Asano F, Honda T, Kim SJ, Harano K, Muramoto H, Yonezawa T, Mizuno S, Miyazaki S, Connor L, Kumar V, Miura I, Suzuki T, Watanabe A, Abe M, Sugiyama F, Takahashi S, Sakimura K, Hayashi Y, Liu Q, Kume K, Wakana S, Takahashi JS, Yanagisawa M. Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice. *Nature*. 2016;539(7629):378-383.
49. Suzuki A, Sinton CM, Greene RW, Yanagisawa M. Behavioral and biochemical dissociation of arousal and homeostatic sleep need influenced by prior wakeful experience in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(25):10288-10293.
50. Luppi PH, Clément O, Fort P. Paradoxical (REM) sleep genesis by the brainstem is under hypothalamic control. *Current Opinion in Neurobiology*. 2013;23(5):786-792.
51. Barkley MS, Geschwind II, Bradford GE. The Gestational and Progesterone Pattern Secretion of Estradiol , in Selected Testosterone Strains of Mice. *Biology of Reproduction*. 1979;(20):733-738.
52. Heuser, G., Ling, G. M., Kluver, M. Sleep induction by progesterone in the pre-optic area in cats. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1967; 22(2), 122–7
53. Paul KN, Laposky AD, Turek FW. Reproductive hormone replacement alters sleep in mice. *Neuroscience Letters*. 2009;(463):239-243.
54. Cusmano DM, Hadjimarkou MM, Mong JA. Gonadal steroid modulation of sleep and wakefulness in male and female rats is sexually differentiated and neonatally organized

- by steroid exposure. *Endocrinology*. 2014;155(1):204-214.
55. Deurveilher S, Rusak B, Semba K. Estradiol and progesterone modulate spontaneous sleep patterns and recovery from sleep deprivation in ovariectomized rats. *Sleep*. 2009;32(7):865-877.
56. Obal F Jr, Opp M, Cady AB, Johannsen L, Krueger JM. Prolactin, vasoactive intestinal peptide, and peptide histidine methionine elicit selective increases in REM sleep in rabbits. *Brain Research*. 1989;490(2), 292–300.
57. Erlandsson L, Nääv Å, Hennessy A, Vaiman D, Gram M, Åkertostm B, Hansson SR. Inventory of Novel Animal Models Addressing Etiology of Preeclampsia in the Development of New Therapeutic/Intervention Opportunities. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2016;75(3):402-410.
58. McCarthy FP, Kingdom JC, Kenny LC, Walsh SK. Animal models of preeclampsia; Uses and limitations. *Placenta*. 2011;32(6):413-419.
59. Sunderland N, Hennessy A, Makris A. Animal models of pre-eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, NY : 1989)*. 2011;65(6):533-541.
60. Thomas S V. Neurological aspects of eclampsia. *Journal of the Neurological Sciences*. 1998;155(1):37-43.
61. Manfredi M, Beltramello A, Bongiovanni LG, Polo A, Pistoia L, Rizzuto N. Eclamptic encephalopathy: imaging and pathogenetic considerations. *Acta neurologica Scandinavica*. 1997;96(5):277-282.
62. Brussé IA, Peters NC, Steegers EA, Duvekot JJ, Visser GH. Electroencephalography during normotensive and hypertensive pregnancy: a systematic review. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2010;65(12):794-803.

63. Vaughan CJ, Delanty N. Hypertensive emergencies. *The Lancet (London, England)*. 2000;356(9227):411-417.
64. Youssef AM, Hamidian Jahromi A, Vijay CG, Granger DN, Alexander JS. Intra-abdominal hypertension causes reversible blood-brain barrier disruption. *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2012;72(1):183-188.
65. Mayama M, Uno K, Tano S, Yoshihara M, Ukai M, Kishigami Y, Ito Y, Iguchi H. Incidence of posterior reversible encephalopathy syndrome in eclamptic and patients with preeclampsia with neurologic symptoms. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2016;215(2):239.e1-239.e5.
66. Wagner SJ, Acquah LA, Lindell EP, Craici IM, Wingo MT, Rose CH, White WM, August P, Garovic VD. Posterior reversible encephalopathy syndrome and eclampsia: pressing the case for more aggressive blood pressure control. *Mayo Clinic Proceedings*. 2011;86(9):851-856.
67. Camara-Lemarroy CR, Escobedo-Zúñiga N, Villarreal-Garza E, Garcia-Valadez E, Gongora-Rivera F, Villarreal-Velazquez HJ. Posterior reversible leukoencephalopathy syndrome (PRES) associated with severe eclampsia: Clinical and biochemical features. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. 2017;(7):44-49.
68. Imeri L, Opp MR. How (and why) the immune system makes us sleep. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10(3):199-210.
69. Brambilla D, Barajon I, Bianchi S, Opp MR, Imeri L. Interleukin-1 inhibits putative cholinergic neurons in vitro and REM sleep when microinjected into the rat laterodorsal tegmental nucleus. *Sleep*. 2010;33(7):919-929.

70. Cooper DC, Ziegler MG, Milic MS, Ancoli-Israel S, Mills PJ, Loreda JS, Von Kanel R, Dimsdale JE. Endothelial function and sleep: Associations of flow-mediated dilation with perceived sleep quality and rapid eye movement (REM) sleep. *Journal of Sleep Research*. 2014;23(1):84-93.
71. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological Reviews*. 2000;52(3):415-472.
72. Saito T, Ishida J, Takimoto-Ohnishi E, Takamine S, Simizu T, Sugaya T, Kato H, Matsuoka T, Nangaku M, Kon Y, Sugiyama F, Yagami K, Fukamizu A. An essential role for angiotensin II type 1a receptor in pregnancy-associated hypertension with intrauterine growth retardation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(2):388-390.
73. Chillon JM, Baumbach GL. Effects of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a beta-blocker on cerebral arteriolar dilatation in hypertensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2001;37(6):1388-1393.
74. Kumai Y, Ooboshi H, Ago T, Ishikawa E, Takada J, Kamouchi M, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M. Protective effects of angiotensin II Type 1 receptor blocker on cerebral circulation independent of blood pressure. *Experimental Neurology*. 2008;210(2):441-448.
75. Fukamizu A, Seo MS, Hatae T, Yokoyama M, Nomura T, Katsuki M, Murakami K. Tissue-specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;165(2):826-832.
76. Takahashi S, Fukamizu A, Hasegawa T, Yokoyama M, Nomura T, Katsuki M,

- Mutakami K. Expression of the human angiotensinogen gene in transgenic mice and transfected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991;180(2):1103-1109.
77. McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FA, Chai SY. The brain renin-angiotensin system: Location and physiological roles. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2003;35(6):901-918.
78. Wright JW, Harding JW. The brain renin-angiotensin system: A diversity of functions and implications for CNS diseases. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 2013;465(1):133-151.
79. Furuya M, Ishida J, Inaba S, Kasuya Y, Kimura S, Nemori R, Fukamizu A. Impaired placental neovascularization in mice with pregnancy-associated hypertension. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 2008;88(4):416-429.
80. Freeman LR, Keller JN. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2012;1822(5):822-829.
81. Nezu M, Souma T, Yu L, Sekine H, Takahashi N, Wei AZ, Ito S, Fukamizu A, Zsengeller ZK, Nakamura T, Hozawa A, Karumanchi SA, Suzuki N, Yamamoto M. Nrf2 inactivation enhances placental angiogenesis in a preeclampsia mouse model and improves maternal and fetal outcomes. *Science Signaling*. 2017;10(479):eaam5711.

謝辞

本研究と論文作成にあたり、ご指導、ご高閲を賜りました船戸弘正教授 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究医学機構)、柳沢正史教授 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構) および柳沢船戸研究室、IIS の皆様に心から感謝いたします。また、実験の指導・助言を頂いた三好千香助教 (国際統合睡眠医科学研究機構)、マウス提供や実験についてのアドバイスを頂いた深水昭吉博士 (筑波大学生命科学研究科生物機能科学専攻/生命領域 学際研究センター(TARA)教授)、子癇発作についてのご意見を頂いた谷口豪先生 (東京大学精神科)、および実験補助をして頂いた堀田範子殿 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構テクニカルスタッフ)、一久綾殿 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構テクニカルスタッフ)、管野里美殿 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構テクニカルスタッフ)、助言をいただいた濱田洋実教授 (筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻婦人周産期医学)、佐藤豊実教授 (筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻婦人周産期医学) に深謝いたします。