

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2016～2019
 課題番号：16K20101
 研究課題名(和文)四肢虚血リモートプレコンディショニングと酸化ストレス、フリーラジカルの関与

研究課題名(英文) Are oxidative stress and free radicals involved in the mechanism of neuroprotection by remote limb ischemic conditioning?

研究代表者
 山下 理 (YAMASHITA, Satoshi)
 山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20610885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：急性の四肢虚血リモートプレコンディショニングは脳でも保護効果を認めるが、心臓などと比較してそれほど強くない点が判明した。また酸化ストレス・フリーラジカルがトリガーになると推測し、プレコンディショニング中にそれらを除去しようと考えたが、理想的なスカベンジャーの同定に至らなかった。フリーラジカルそのものは測定が困難で、酸化代謝物質の変動等も短時間の四肢虚血では、有意な変化を示すことが出来なかった。しかし臨床応用の可能性のある一つの有効な方法であり、他の同様の機序が示唆されている介入と組み合わせたり、別の角度からのアプローチによってその有効性や機序の解明を進めることが出来ると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

四肢虚血リモートプレコンディショニングにおける機序の全容解明までには至らなかったが、その一部について明らかにした。脳における虚血・再灌流後の酸化ストレス・フリーラジカルがその後の脳虚血などの神経障害を増悪することは明らかになっており、障害を与えない程度のストレスをトリガーとして直接脳などの臓器を虚血にすることなく、内因性の保護機構を活性化させる考えは非常に魅力的である。また四肢は虚血に強く、臨床でも無血野を得るためにターニケットを使用して手術をおこなっており、臨床応用も可能である。今後さらに検討を進めていく必要があると考える。

研究成果の概要(英文)： Remote limb ischemic preconditioning in Early phase was found to have a protective effect in the brain, but it was not as strong as in the heart and other organs. I also suspected that oxidative stress and free radicals were the preconditioning trigger, and tried to remove them during preconditioning. So I tried to prove it first but could not identify the ideal scavenger. Free radicals themselves were difficult to measure, and changes in oxidative metabolites, etc. could not show significant changes in short-term limb ischemia. However, remote limb ischemic preconditioning is considered to be one effective method with potential clinical applications, so it can be combined with other interventions that suggest similar mechanisms or approached from different views. I think we can advance the elucidation of its effectiveness and mechanism.

研究分野：神経麻酔

キーワード：プレコンディショニング リモートプレコンディショニング 神経保護 四肢虚血 酸化ストレス
 フリーラジカル early phase フリーラジカルスカベンジャー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プレコンディショニングは臓器虚血等の有害刺激の前に短時間の同様の刺激を与えておくことで、その後の有害事象に対して抵抗性・保護効果を発揮する生体の内因性保護機構である。様々な臓器で検討されているが、現在でも脳虚血後の神経障害・後遺症に関して有効な治療がないことから、脳・神経細胞における保護効果、臨床的な応用についての期待は高い。これまでの研究では直接短時間の脳虚血を行うことで、確かに神経保護効果を認めるが、これを実際に臨床応用することは難しい。虚血の代わりにその他の有害刺激を用いて行う場合、虚血時ほど保護効果は強くないようである。またプレコンディショニングには数時間の early phase と数日から1週間後の delayed phase があり、後者の方が保護効果は強いとされるが、条件付けや適応が難しいことが考えられる。四肢虚血リモートプレコンディショニング (RLIP: remote limb ischemic preconditioning) は、一過性に四肢虚血を繰り返すことで離れた臓器の保護効果を発揮するもので、心臓や他の臓器ではいくつか報告があるが、脳虚血の early phase での報告は少ない。

2. 研究の目的

四肢虚血リモートプレコンディショニングによる early phase の神経保護効果をラットによる中大脳動脈閉塞モデル (MCAO: middle cerebral artery occlusion) を用いて検討する。機序は未だ解明されていないが、本研究ではその機序として四肢虚血・再灌流に伴う酸化物質、フリーラジカルが大きく関与しているのではないかと考え、短時間のプレコンディショニング刺激時にフリーラジカルスカベンジャーを使用してトリガーを消去した場合におけるその保護効果の修飾を示すことからその関与を示唆することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 四肢虚血リモートプレコンディショニングの条件付けについて、これまでの研究結果からターニケットをラットの右大腿に装着し、カフ圧迫による虚血を10分間×5分間の再灌流を3サイクル行う条件とした(若手研究(B) 247911596)。虚血は一般的に該当血管を露出させ、直接クランプして行うことが多いが、侵襲度を考慮して我々はターニケット法を採用した。

(2) 四肢虚血リモートプレコンディショニング1時間後に2hrのナイロン糸によるMCAOを施行した。このモデルではナイロン糸の挿入により中大脳動脈領域を虚血とするもので、術後の生存率も高く、詳細な神経学的評価も行いやすい一方で比較的虚血の程度のばらつきが大きいことでも知られている。そのため脳血流ドップラー計を前頭～頭頂部に装着し、ナイロン糸挿入によって血流が50%以上低下したものを有意な血流低下とした。

(3) 使用した吸入麻酔薬そのものにも神経保護作用が報告されているため、イソフルランを用いた全身麻酔導入・気管挿管後、頸部を開創して血管を露出、ナイロン糸を挿入して閉創した後、いったん覚醒させて、その影響を出来るだけ少なくしたうえで虚血を行った。2hr後再度麻酔を導入してナイロン糸を抜去し手技を終了した。

(4) 術後1, 3, 7日後に神経学的所見の評価と体重の推移を評価し、術後7日目に脳を灌流固定して脳梗塞体積を算出した。

4. 研究成果

(1) 最初にフリーラジカルスカベンジャーとしてDimethylthiourea (DMTU)を投与した。当研究室において家兔脊髄虚血モデルでも使用経験があり、またこれまでDMTUを使用した研究がいくつかあることから、それに基づいて投与した。単独投与による安全性を確認した後、RLIP前に投与して神経保護効果の修飾を神経学的所見と脳梗塞体積で評価したが、RLIPの神経保護効果を打ち消すといった有意な影響は認めなかった(図1, 図2)。

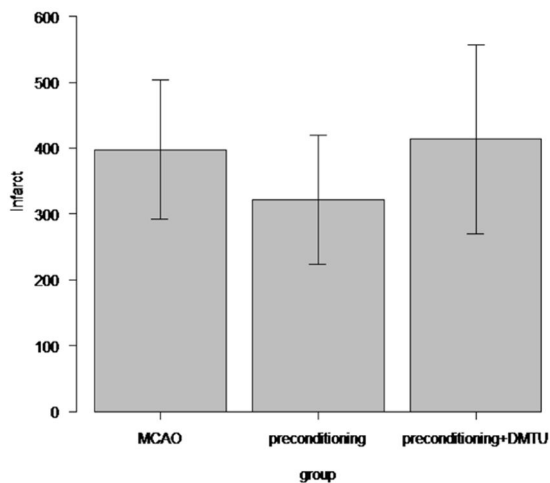


図1 MCAO群, RLIP群, RLIP+DMTU群間の脳梗塞体積

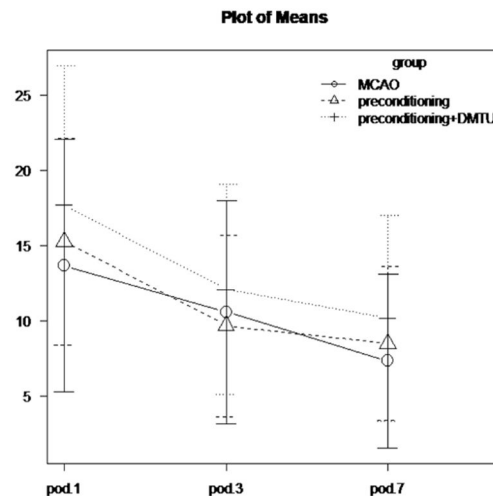


図2 MCAO群, RLIP群, RLIP+DMTU群間の1, 3, 7日後の神経スコアの推移

(2) 次に内因性のフリーラジカルスカベンジャーとしてケトン体の一つの ヒドロキシ酪酸 (BHB: hydroxybutyric acid)をその候補物質とした。ケトン体はBHB, アセト酢酸, アセトンの総称であるが, BHB がその中で主な物質である。しかし安全性確認において BHB 投与自体で MCAO による脳梗塞体積が増加したことが判明したため, フリーラジカルスカベンジャーとしての投与はできなかった (図3)。

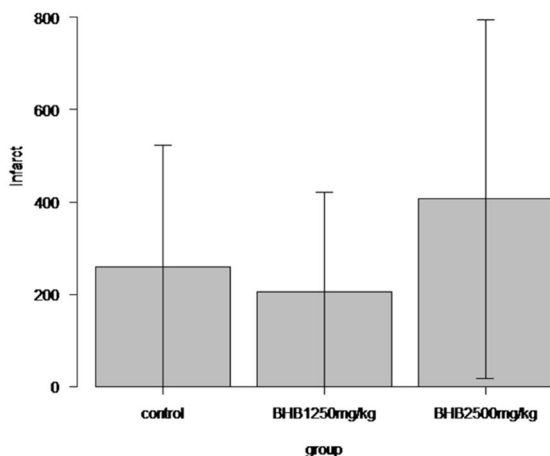


図3 BHB投与による脳梗塞体積への影響

BHB はヒトにおける臨床的な血中濃度になるように投与量を決定したが, これまでの報告と比較してかなり大量となり, また血中濃度は 思いのほか上がりにくいことが判明した。現在ケトン体による細胞・臓器保護効果がある報告されているが, 今回はケトン体投与によって神経保護効果よりむしろ脳梗塞の増悪を認めたことは本研究の目的からは少し離れるが, 一つの発見であった。

(3) フリーラジカルスカベンジャー自体は脳梗塞等の病態においては, 保護的に作用するため, あまり作用時間の長い物質ではそれ自体の影響も無視できなくなる。一時的な繰り返しの四肢虚血時に生じるフリーラジカル, 酸化ストレスのみを抑え, その後の今回の実験系である MCAO によって生じる脳梗塞自体には影響を与えないものが理想的だが, 今回の研究ではそれをうまく同定するのが困難であった。

(4) early phase の RLIP は脳でも保護効果は認めるが, 心臓などと比較してそれほど強くはない点が判明した。また酸化ストレス・フリーラジカルがトリガーになっていると推測し, プレコンディショニング中にそれらを除去することで, まずは証明しようと考えたが, 理想的なスカベンジャーの同定に至らなかった。フリーラジカルそのものは測定が困難で, 酸化代謝物質の変動等も短時間の四肢虚血では, 有意な変化を示すことが出来なかった。しかし四肢虚血リモー

トプレコンディショニングは臨床応用の可能性のある、一つの有効な方法であると考えられるので、他の同様の機序が示唆されている介入と組み合わせる方法や、別の角度からのアプローチによってその有効性や機序の解明を進めることが出来ると考える。

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 山下 理
2. 発表標題 The examination of neuroprotective effect by ketone body in transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) of rat
3. 学会等名 第6回アジア神経麻酔集中治療学会（国際学会）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----