

平成21年 4月14日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591694

研究課題名（和文） 脊髄の虚血再灌流障害に対するポストコンディショニングの効果

研究課題名（英文） The effect of postconditioning on re-perfusion injury in the spine

研究代表者

坪川 恒久（Tsubokawa Tsunehisa）

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：80283109

研究成果の概要：

ラットに12分の脊髄虚血を負荷するモデルを用いて痙性麻痺に対してポストコンディショニングが有用であるか否かを検討した。虚血解除後に30秒間の虚血・30秒間の再灌流を3サイクル加えるポストコンディショニングをおこなったところ、コントロール群に比較して虚血解除後の5日間の運動機能は有意に改善した。脊髄標本を作製し、組織学的に検討したところ運動細胞が温存されていることが確認された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	420,000	3,920,000

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：ポストコンディショニング，脊髄虚血，再灌流障害，対麻痺

1. 研究開始当初の背景

胸腹部大動脈瘤に対する人工血管置換術など、胸部で大動脈遮断が必要な手術における重篤な合併症の一つに脊髄虚血による対麻痺があり、その発生率は6.6～8.3%とされている。その対策として脊髄冷却、脳脊髄液ドレナージ、選択的灌流など様々な対策がとられているが、有効な予防・治療方法は確立

されていない。

2003年にZhaoらは、心筋細胞において、虚血再灌流の直後に短時間の虚血と再灌流を繰り返すことにより心筋細胞の壊死が減少することを発見し、ポストコンディショニングと名付けた。プレコンディショニング効果は心筋細胞で発見された後、中枢神経や他

の臓器の虚血再灌流障害に対する予防方法として、確立され臨床的にも広く応用されるにいたっている。そこでわれわれはポストコンディショニングについても、同様に他の臓器、細胞でも効果があると考え、中枢神経、特に虚血により機能障害が明確な脊髄運動細胞を対象として、その効果を確認する研究を計画するにいたった。

2. 研究の目的

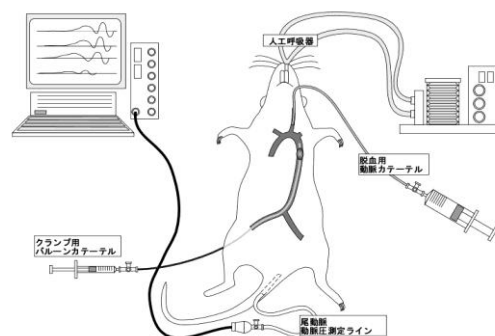
心筋虚血に対するポストコンディショニングの主要な作用は、心筋細胞内ミトコンドリアにおける **mitochondrial permeability transition pore** の開孔抑制を介して発現することが示唆されている。中枢神経細胞におけるアポトーシス、ネクローシスでも心筋と同様にミトコンドリア内の **Ca** イオンの細胞質への放出が起こっていることから、中枢神経細胞でもポストコンディショニングが有用である可能性は高い。

臨床的に下行大動脈手術中に **Adamkiewicz** 動脈が閉塞されておこる脊髄虚血および再灌流による対麻痺の発生を予防する方法は確立されていない。これまで中枢神経系に対するポストコンディショニングの効果についての報告は少なく、特に脊髄虚血に対する効果を調べた報告は無い。以上より、本研究の目的は脊髄の虚血再灌流障害に対してポストコンディショニングが有効であるかを否かを検証することである。

3. 研究の方法

体重 340~410g の **Wistar** 系雄性ラットを、ペントバルビタール 40mg/kg の腹腔内投与により麻酔し、気管挿管後、人工呼吸管理とした。左の大腿動脈より **2Fr** のフォガティカテーテルを 11cm の深さまで挿入した。この位置は左鎖骨下動脈分岐の直下であることを予備実験により確認してある。また尾動

脈にカテーテルを留置した。このカテーテルによりバルーンの拡張が大動脈を閉塞（大動脈遮断）することを確認した。右の大腿動脈は温存し、運動機能は右下肢で評価した。更に、左総頸動脈に **20G** の脱血用のカテーテルを留置し、回路内を生理食塩水で満たした脱血装置に接続した。大動脈遮断の際にカテーテルを脱血装置に開放することで、上半身の平均血圧は **40mmHg** に自動的に調節される。血圧を低下させることにより、上半身の異常高血圧を予防し、脊髄への側副血行路による灌流を遮断することができる。ここまでの手技は、ラットの脊髄虚血実験で確立された方法を踏襲した。



全ての外科的処置が終了した後 10 分間の静置期間をとった。ラットを無作為にコントロール群とポストコンディショニング群の 2 群に分けた。静置期間後、循環動態が安定していることを確認し、虚血負荷を開始した。両群ともに **Fogarty** カテーテルに生理食塩水 **0.05ml** を注入してバルーンを拡張し、大動脈遮断を実施した。同時に左総頸動脈に留置したカテーテルを脱血装置に開放した。12 分間の大動脈遮断後に、**Fogarty** カテーテルから生理食塩水を吸引して大動脈遮断を解除した。コントロール群では、脱血装置側に流出した血液を 1 分以内に返血し、観察を開始した。ポストコンディショニング群では、20 秒間の虚血と 20 秒間の再灌流を 3 サイクル繰り返し、その後返血した。これらの処置が終了

した後、各カテーテルを抜去し、創を縫合により閉鎖した。自発呼吸の回復を待ち、気管チューブを抜去し、12時間は30%酸素ケージに収容し、その後、通常のケージに移して運動機能の観察をおこなった。

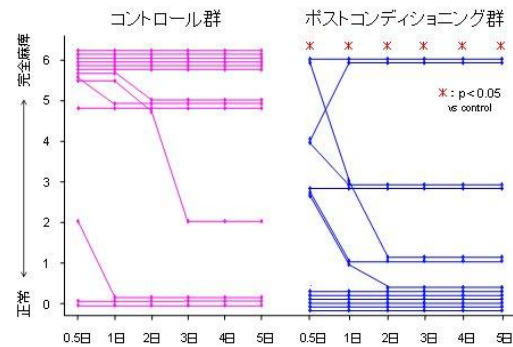
大動脈遮断解除後、0.5、1、2、3、4、5日の時点で、下肢の運動機能の評価を行った。評価にはMotor Deficit Index (0から6点の7段階。0:完全麻痺, 6:正常)を用いた。組織学的評価を行うために、コントロール群、ポストコンディショニング群のラットを新たに3匹ずつ作成し、脊髄虚血、再灌流から1時間後に麻酔から覚醒させずに安楽死させホルマリン固定した。腰椎レベルでの脊髄標本作製し、HE染色、ニッスル染色にて細胞を観察した。

統計解析にはSPSS ver14.0を用いた。Motor Deficit Indexの群内比較には、Kruskal-Wallis testを用いた。群間の比較にはMany-Whitney U testを用い、適宜Bonferroni法により補正した。P値が0.05未満をもって統計学的有意差があると判断した。

4. 研究成果

各群15匹ずつの実験をおこなったが、両群とも2匹ずつが観察期間中に死亡した。これらのラットのデータは解析から除外し、各群13匹で検討をおこなった。大動脈遮断後の全ラットのMotor Deficit Indexの推移を下図に示す。

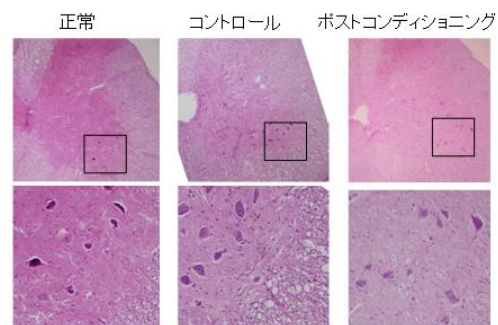
ポストコンディショニング群では、コントロール群に比較して、いずれの時点においてもmotor deficit indexが低値を示す、すなわち麻痺の程度が軽かった。コントロール群は、大動脈遮断時間が12分であるのに対して、ポストコンディショニング群ではこの遮断時間にさらにポストコンディショニングの

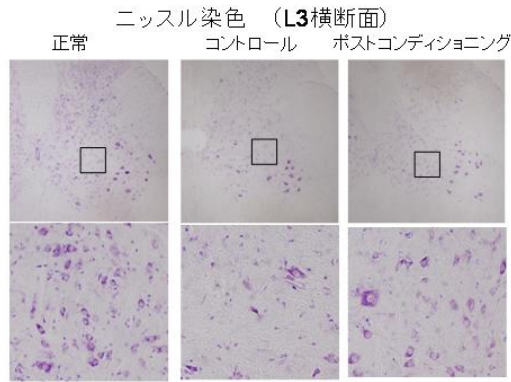


ための遮断を20秒×3サイクル追加しているため、総遮断時間はポストコンディショニング群の方が長くなる。にもかかわらず、ポストコンディショニング群で麻痺の程度が軽く、運動機能が正常化した個体数もおおかったことは、脊髄虚血および再灌流による運動機能障害に対して障害を減らす方向に働いていることが明らかとなった。この結果に関しては、日本麻酔科学会第55回学術集会(2008.6.14 横浜)にて発表し、優秀演題に選出された。

組織学的評価を行うために、各群のラットを新たに3匹ずつ作成し、脊髄虚血、再灌流から1時間後に麻酔から覚醒させずに安楽死させ脊髄摘出標本作成した。脊髄のHE染色では、コントロール群では白質の空胞化が目立ち、ニッスル染色でも細胞の死滅が目立った。一方ポストコンディショニング群では、これらの変化が少なかった。

HE染色 (L3横断面)





下行大動脈，とくに胸腹部大動脈手術における対麻痺は発生率が高く，重篤な合併症である．これまで，脳脊髄液ドレナージや，硬膜外冷却法，各種薬剤のプレコンディショニング的な投与方法が臨床的に用いられているが，対麻痺の発生を完全に予防することはできない．一方モニターとしては，運動誘発電位の有用性が多く報告されているが，運動誘発電位が正常であっても，麻痺が発症した例も報告されており，こちらも確実なモニターであるとするには，さらなる検証が必要である．

ポストコンディショニングが臨床的に用いられる場合の利点としては，1) 予防的な方法とは異なりイベント後に実施できること（つまり運動誘発電位に異常がでた症例にだけ実施することが可能である），2) 手術中なら大動脈のクランプと解除を短時間繰り返すだけであり，特に特殊な器具，薬剤を必要としないことがあげられる．一方，短所としては虚血による障害がおこっているときにさらに虚血を追加することになり，安全性が確立されるまで十分な基礎研究が必要であることが，あげられる．

今後の課題としては，まず最適なポストコンディショニング条件の確立が必要である．今回は心臓のポストコンディショニングを参考に虚血時間・再灌流時間を設定したが，

心筋細胞と中枢神経細胞では虚血，再灌流に対する耐性，予備能が異なっており，この点を明らかにする必要がある，すなわち，虚血時間，再灌流時間，サイクル数を変化させてそれらがポストコンディショニング効果に与える影響を調べる必要がある．さらに，このポストコンディショニングの機序を調べるには，細胞レベルあるいは遺伝子レベルでコントロール群とポストコンディショニング群の違いを明らかにする必要がある．

結論として，ポストコンディショニングは，脊髄虚血・再灌流傷害による運動機能障害を軽減した．手技的には簡便であり，臨床的には特に器具や薬剤を用いることなく実施可能である．今後，動物実験により安全性を確認し，臨床応用に向けて研究を推進していきたい．

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1件)

山田清恵，坪川恒久，山本 健，脊髄虚血による対麻痺に対するポストコンディショニングの効果，日本麻酔科学会第55回学術集会，2008.6.14，横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪川 恒久 (Tsubokawa Tsunehisa)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：80283109

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし