

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16458

研究課題名（和文）虚血性脊髄障害に対する水素吸入の治療効果 - 脊髄マイクロダイアライシスによる検討 -

研究課題名（英文）Protective Effects of Hydrogen Gas against Spinal Cord Ischemia&amp;#8211; Reperfusion Injury: A Microdialysis Study of the Spinal Ventral Horn

研究代表者

末廣 浩一（Suehiro, Koichi）

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10735806

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：下行大動脈遮断（12分間）を行い、脊髄虚血モデルラットを作成した。脊髄前角にてマイクロダイアライシスを行い、同時に下肢の運動誘発電位を測定し、脊髄虚血性障害の評価を行った。脊髄虚血前から水素吸入（1, 2, 3%）を行うことにより、脊髄前角でのグルタミン酸濃度の上昇、運動誘発電位の低下は濃度依存性に抑制された。この脊髄虚血予防効果はグルタミン酸トランスポーター-1（GLT-1）拮抗薬投与により有意に抑制された。また蛍光免疫染色によって脊髄虚血後は脊髄前角でのGLT-1発現量が有意に低下し、水素吸入により回復する事から、水素の脊髄保護効果にGLT-1が関与する事を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では脊髄虚血モデルラットを用いて、水素ガス吸入による脊髄障害予防効果に対する検討を行った。水素ガス吸入は脊髄前角でのグルタミン酸の上昇を抑制し、脊髄虚血後の運動機能の回復を促進させることを示した。また水素の保護効果の機序としてグルタミン酸トランスポーターが重要な役割を果たすことを示した。今後臨床でのさらなる研究が必要であるが、水素吸入は比較的容易に行うことができるため、心臓血管外科手術における脊髄保護の手法として非常に有効性が高いと考える。

研究成果の概要（英文）：This experimental study aimed to assess the efficacy of hydrogen gas inhalation against spinal cord ischemia-reperfusion injury and reveal its mechanism by measuring glutamate concentration in the ventral horn using an in vivo microdialysis method. The increase in extracellular glutamate induced by spinal ischemia was significantly suppressed by 3% hydrogen gas inhalation. Conversely, the pre-administration of glutamate transporter-1 inhibitor diminished the suppression of spinal ischemia-induced glutamate increase observed during the inhalation of 3% hydrogen gas. Immunofluorescence indicated the expression of glutamate transporter-1 were significantly decreased after spinal cord ischemia, which were attenuated by 3% hydrogen gas inhalation. Our study demonstrated hydrogen gas inhalation exhibits a protective and concentration-dependent effect against spinal ischemic injury, and glutamate transporter-1 has an important role in the protective effects against spinal cord injury.

研究分野：麻酔

キーワード：水素 脊髄虚血 マイクロダイアライシス グルタミン酸

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における生活習慣の欧米化を基盤に、肥満、糖尿病、高脂血症が増加している。そして元来高頻度の高血圧も含めて、これら危険因子の集積より成るメタボリックシンドロームが増加しており、これらを危険因子とする動脈硬化による心疾患や脳血管疾患に代表される血管病が増加し、がんに次いで日本人の死因の2位になっている。動脈硬化病変に合併することが多い動脈瘤の罹患率も増加しており、動脈瘤全体の25%を占める胸部大動脈瘤も急増している。左鎖骨下動脈より遠位に発生した胸腹部大動脈瘤は外科的手術もしくはステントを用いた血管内治療が施行されるが、いずれの場合も脊髄保護が重要となる。

(2) 脊髄への血流は、肋間あるいは腰動脈から分岐する前根動脈が重要であるとされている。前根動脈の中でも、下部胸椎あるいは上部腰椎の高さにある前根動脈は大前根動脈(Adamkiewicz動脈)と呼ばれ、脊髄の血流維持に最も重要な動脈であり、途絶すると対麻痺を生じるとされている。胸部大動脈手術では、大前根動脈を分枝する肋間あるいは腰動脈の血流低下による脊髄虚血から術後に対麻痺を生じる危険性があり、その頻度は胸腹部大動脈瘤手術で5~15%程度、胸部下行大動脈手術では5%程度とされている。対麻痺は術後の患者の生活の質(Quality of life)を著しく低下させるだけでなく、その後の治療・介護などに貴重な医療費などを投じることとなる。胸腹部大動脈手術で、対麻痺発生率を低下させるための対策として、大動脈遠位の体外循環による灌流や脳脊髄液ドレナージ、硬膜外冷却法、肋間動脈再建、低体温循環停止法、術前脊髄動脈造影、周術期血圧管理、脊髄モニタリングなどが考案されてきた。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、脊髄虚血モデルラットを用いて水素ガス吸入による脊髄障害予防効果を検討する事である。水素ガス吸入は虚血再灌流障害を抑制する事により、脳梗塞や心筋梗塞モデル動物において梗塞巣を減少させる事が報告されている。脊髄虚血モデルウサギにおいても脊髄虚血再灌流時の水素ガス吸入により、下肢運動障害の有意な改善や酸化ストレス反応軽減を認めた事が報告されている。しかし過去の報告では脊髄虚血再灌流後6時間毎の酸化ストレス反応や24時間毎の下肢運動機能を検討しているのみであり、虚血再灌流直後からの水素ガス吸入による脊髄障害予防効果や経時的な変化を検討している報告はない。

(2) 本研究では脊髄マイクロダイアライシス法による脊髄前角でのグルタミン酸濃度を測定する事により脊髄虚血再灌流障害の評価を行う。脊髄虚血モデルラットにおいて髄液中のグルタミン酸濃度が上昇し、対麻痺症状と髄液中グルタミン酸上昇に有意な関連性があり、また薬物投与を行うことで髄液中グルタミン酸上昇が有意に抑制できたと報告されている。しかしながら、過去の研究におけるグルタミン酸濃度計測は髄液中の濃度変化を計測するという間接的なものにすぎない。本研究では、周術期下肢運動障害の責任部位とされる脊髄前角でのマイクロダイアライシス法により、直接的また連続的にグルタミン酸濃度を測定し、脊髄虚血再灌流直後からの脊髄障害の程度を評価する。髄液中グルタミン酸濃度計測と比較して、マイクロダイアライシスによる直接的なグルタミン酸濃度測定は、脊髄虚血再灌流障害の経時的な変化をより正確にとらえることが可能である。過去の研究では水素ガス吸入による脊髄保護効果機序は解明されておらず、本研究で脊髄マイクロダイアライシス法を用いて経時的な変化を正確に計測する事で、脊髄保護作用の機序解明に寄与することが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 脊髄マイクロダイアライシス法と下肢運動誘発電位による脊髄虚血評価

10 - 12 週齢、体重 400 - 500g のラットにセボフルラン 5%を吸入、ペントバルビタール 40mg/kg を腹腔内投与することで全身麻酔導入を行った。右内頸動静脈、左大腿動脈にカテーテルを挿入後、気切チューブの挿入を行った。ラットを以下の 6 群に分類 (n=6) し、それぞれ前処置を行った。

- ① Sham 群 (脊髄虚血なし/水素投与なし)
- ② 脊髄虚血群 (脊髄虚血/水素投与なし)
- ③ 1%水素群 (脊髄虚血/1%水素投与)
- ④ 2%水素群 (脊髄虚血/2%水素投与)
- ⑤ 3%水素群 (脊髄虚血/3%水素投与)
- ⑥ DHK 群 (脊髄虚血/3%水素投与/ジヒドロコイニン酸[DHK: 選択的グルタミン酸トランスポーター1 拮抗薬]投与)

水素投与 3 群には虚血 10 分前から 130 分後までそれぞれ 1%、2%、3%の水素を吸入投与した。DHK 群には虚血 20 分前に DHK (0.1mg/kg) をクモ膜下投与し、他群と同様に 3%の水素を吸入投与した。脊髄虚血は左開胸し、直視下にて下行大動脈を 12 分間遮断することによって行った。遮断中は内頸動脈の平均動脈圧を 40mmHg に維持するように、適宜瀉血を行った。脊髄虚血導入後、脊髄マイクロダイアライシスによるグルタミン酸濃度、下肢の運動誘発電位 (MEP) 振幅を測定した。脊髄マイクロダイアライシスは第 10 胸椎レベルの脊髄前角にプローブ留置を行った。MEP は Bregma から 4mm 外側、5mm 尾側に刺激電極を留置し、左下肢に測定電極を留置した。いずれも脊髄虚血開始前に基礎値を測定し、虚血開始後 130 分間の変化を測定した。

#### (2) 下肢運動機能評価と組織学的評価

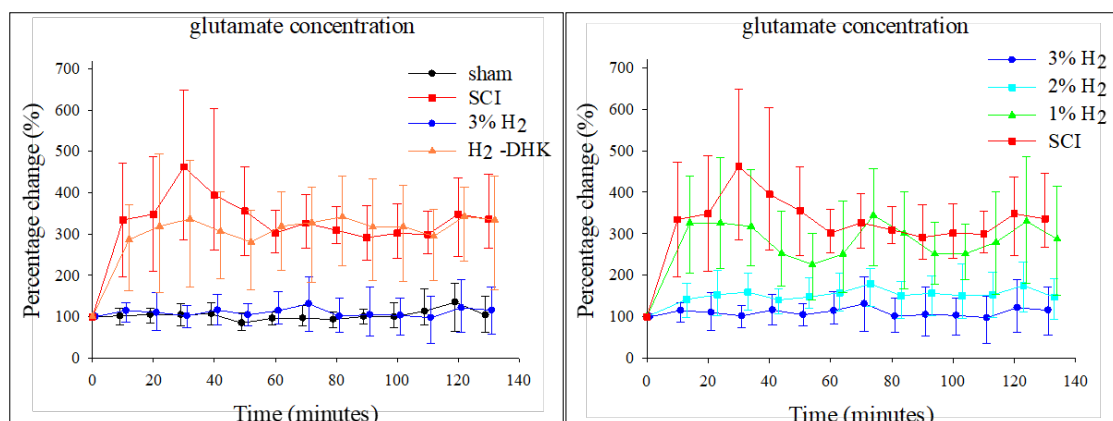
上記 (1) と同様の手順で脊髄虚血モデルを作成し、脊髄虚血 48 時間後の下肢運動機能評価、組織学的評価を行った。Motor Deficit Index (MDI) を用いて下肢運動機能の評価した。運動機能評価後、第 10 胸椎レベルで脊髄を取り出し 10%ホルマリン液で固定した。パラフィンブロックを作成し、Nissl 染色と HE 染色を行い、灰白質の正常神経細胞数を観察した。

また脊髄保護効果におけるグルタミン酸トランスポーター1 (GLT-1) の関与を検討するために、蛍光免疫染色法を用いて Sham 群、脊髄虚血群、3%水素群の脊髄前角における GLT-1 発現量を測定した。

### 4. 研究成果

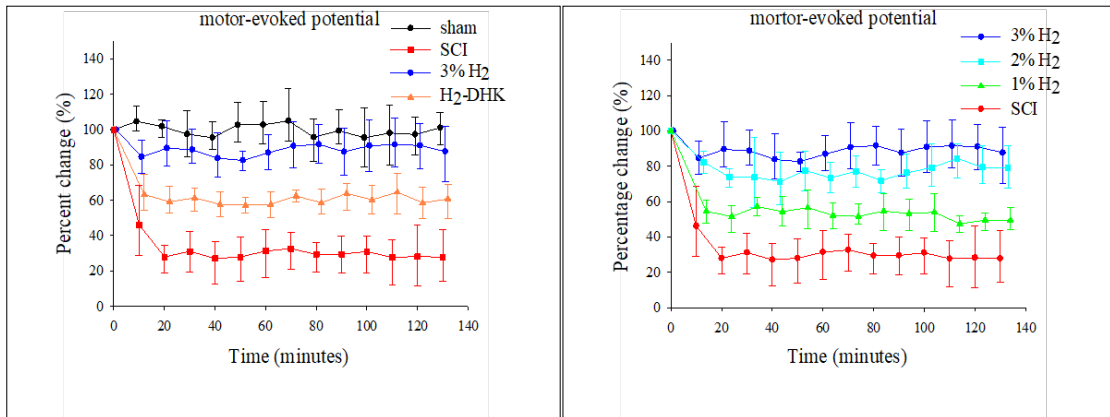
#### (1) 脊髄マイクロダイアライシス

脊髄虚血群でグルタミン酸濃度の有意な上昇がみられたが、2%、3%水素群ではこの上昇は有意に抑制され、その効果は濃度依存性であった。DHK 群では、3%水素群と比較して有意なグルタミン酸濃度の上昇がみられ、DHK の前投与により水素の脊髄虚血予防効果は消失した。



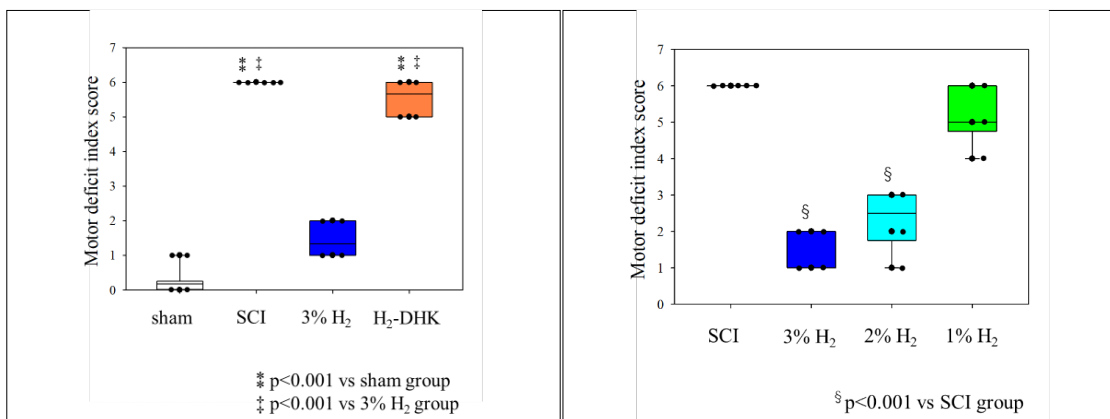
## (2) 下肢運動誘発電位

脊髄虚血群で有意な MEP 振幅の低下がみられたが、2%、3%水素群ではこの低下は有意に抑制され、その効果は濃度依存性であった。DHK 群では、3%水素群と比較して有意な MEP 振幅の低下がみられ、DHK の前投与により水素の脊髄虚血予防効果は消失した。



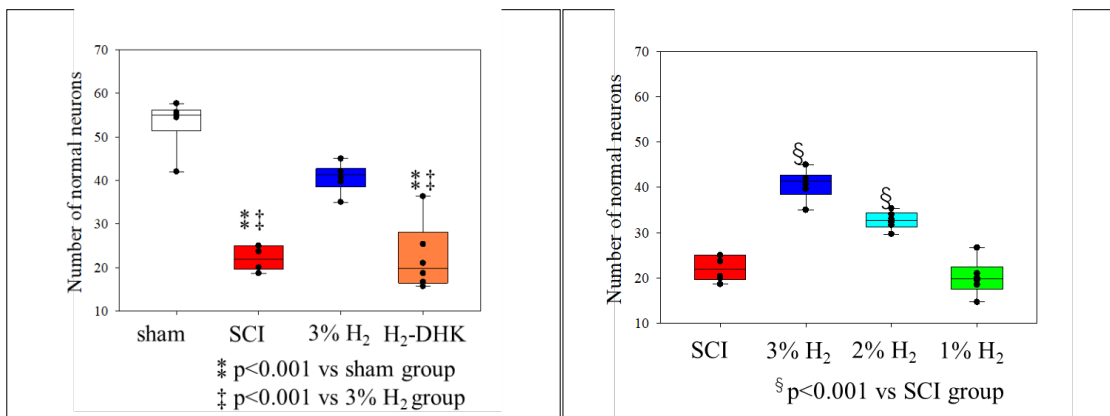
## (3) 下肢運動機能

脊髄虚血群で下肢運動機能の有意な低下がみられたが、2%、3%水素群ではこの運動機能低下は有意に抑制され、その効果は濃度依存性であった。DHK 群では、3%水素群と比較して下肢運動機能の有意な低下がみられ、DHK の前投与により水素の脊髄虚血予防効果は消失した。



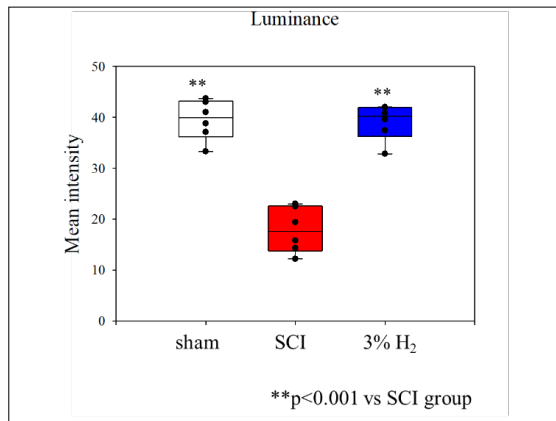
## (4) 正常神経細胞数

脊髄虚血群では正常神経細胞数の有意な減少がみられた。2%、3%水素群では脊髄虚血群と比較して、正常神経細胞数の有意な増加が認められた。DHK 群では、3%水素群と比較して正常神経細胞数が有意に減少していた。



## (5) 脊髄前角における GLT-1 発現量

脊髄虚血群において Sham 群と比較して、脊髄前角における GLT-1 発現量は減少したが、3%水素吸入により発現量は回復した。



本研究結果より水素吸入は脊髄虚血後再灌流障害を減弱し、その効果は濃度依存性である事が示された。またその機序として脊髄前角における GLT-1 発現増加によるグルタミン酸濃度低下が関与する事が示唆された。

## 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)

[雑誌論文] (計1件)

1. Aya Kimura, Koichi Suehiro, Akira Mukai, Yohei Fujimoto, Tomoharu Funao, Tokuhiko Yamada, Takashi Mori. Protective effects of hydrogen gas against spinal cord ischemia-reperfusion injury. J Thorac Cardiovasc Surg, 2021; in press.

[学会発表] (計2件)

1. 木村 文、末廣 浩一、向 陽、西川 精宣：脊髄虚血に対する水素吸入の有効性—脊髄マイクロダイアライシスによる検討 日本麻酔科学会第67回学術集会 Web開催, 2020年6月
2. Aya Kimura, Koichi Suehiro, Takashi Mori: Protective Effects of Hydrogen Gas against Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury: A Microdialysis Study in the Spinal Ventral Horn, International Anesthesia Research Society 2021 annual meeting, Web開催, 2021年5月

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

末廣 浩一 (SUEHIRO, Koichi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10735806

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aya Kimura, Koichi Suehiro, Akira Mukai, Yohei Fujimoto, Tomoharu Funao, Tokuhiko Yamada, Takashi Mori	4. 巻 -
2. 論文標題 Protective effects of hydrogen gas against spinal cord ischemia-reperfusion injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木村文、末廣浩一、向陽、西川精宣
2. 発表標題 脊髄虚血に対する水素吸入の有効性 - 脊髄マイクロダイアライシスによる検討
3. 学会等名 第67回日本麻酔科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aya Kimura, Koichi Suehiro, Takashi Mori
2. 発表標題 Protective Effects of Hydrogen Gas against Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury: A Microdialysis Study in the Spinal Ventral Horn
3. 学会等名 International Anesthesia Research Society 2021 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------