

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19591799
 研究課題名 (和文) 全身の炎症反応が脳虚血および低体温による脳保護効果へ及ぼす装飾作用
 研究課題名 (英文) The effect of systemic inflammation to ischemic brain damage and hypothermic protection
 研究代表者
 石田和慶 (ISHIDA KAZUYOSHI)
 山口大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：80314813

研究成果の概要：全身の炎症反応の合併が脂肪塞栓などの脳虚血性病態の増悪を招き、また臨床でも周術期の炎症反応の合併が術後の高次脳機能障害の合併と関連することを示すことができた。本研究成果は周術期に合併する炎症反応を修飾・軽減することにより周術期の脳障害や高次脳機能障害の発生を軽減できる可能性を示していると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：Lipopolysaccharide、全身炎症反応、脂肪塞栓、脳浮腫、脳梗塞、術後高次脳機能障害

1. 研究開始当初の背景

頭部外傷や脳梗塞後の脳障害の進展を抑制する目的で低体温療法が施行されているが、動物実験ほどの有効性はない。臨床での低体温療法は長期であり、体温低下にともなう免疫機能の低下は全身の著明な炎症反応を引き起こす。すなわち低体温療法は脳障害後に全身の炎症を惹起しながら脳への治療を施していることとなる。人工心肺を用いた心臓手

術中に生じる脳梗塞も重篤であるが、ラットの人工心肺下の局所脳虚血モデルでは、人工心肺を用いない場合に比べ脳梗塞、障害の発生が重症となることがわかっている。人工心肺も著明に全身の炎症反応を短時間引き起こすため、臨床的に全身の高炎症下に生じる脳梗塞といえる。このように脳虚血に全身の炎症反応が合併した場合、脳梗塞の増悪に関与していると推測されるが、これまでにあら

かじめ随伴する全身の炎症反応と脳梗塞の修飾作用についての検討はなされていない。

2. 研究の目的

(1)ラットを用い Lipopolysaccharide (LPS)をあらかじめ投与し全身炎症を惹起した状態で脳塞栓を作成し、非炎症動物と比較して脳梗塞、脳障害への修飾作用を検討する。

(2)臨床において、周術期の炎症反応と術後高次脳機能障害障害 (post operative cognitge dysfunction:POCD) との関連を検討する。

3. 研究の方法

(1)動物実験

①グループ分け

99匹の Wistar rat (体重 280-320g) を用いた。ラットは無作為にコントロール(C)群 33 匹、生食前投与 triolein 注入(生食-triolein)群 33 匹、LPS 前投与 triolein 注入(LPS-triolein)群 33 匹の 3 群に分けた。全群で最終の評価時間に応じて 2 時間、24 時間、72 時間各 11 匹に分けた。

②LPS 前投与

2%イソフルランをマスクで短時間吸入させ、尾静脈ラインを確保し、C 群、生食-triolein 群では生理食塩水を 0.5ml/kg、LPS-triolein 群では 5mg/kg (LPS を生理食塩水で 5mg/0.5ml で作成)を投与した。

③脂肪塞栓モデル

24 時間後、4%イソフルランをマスクで吸入させ、尾動脈に血圧、血液ガスおよび血糖値分析用のラインを挿入した。気管挿管後、2%イソフルランで人工呼吸を開始した。右側頭筋および直腸に体温測定用プローベを挿入した。

右の総頸動脈を頸部の正中切開により露出し、外頸および内頸動脈を剥離した。後頭動脈、pterygopalatine 動脈、上甲状腺動脈は切離し、外径が 0.61mm のポリエチレンカテーテルを外頸動脈から逆行性に挿入し、内頸動脈との分岐

部に留置した。40%酸素投与下 1.5%のイソフルランを吸入させ循環が安定したところで、2 μ L の triolein をマイクロシリンジで 5 分かけて注入した。C 群は 2 μ L の生理食塩水を注入した。ポリエチレンカテーテルを除去し、創を縫合した。麻酔薬投与を中止し、十分な自発呼吸を確認し気管チューブを抜去した。

プラスチックボックスにラットを入れて酸素 3L を投与し 30 分観察した。

④神経学的評価

triolein または生食注入 2、24、72 時間後に行った。各群で神経学的スコア(全身状態、運動・皮質運動能・感覚障害、障害なし 0 点、最大 48 点)を評価した。

⑤脳水分量測定

神経学的評価後各群 5 匹のラットを再び麻酔し気管内挿管、人工呼吸を行った。その後断頭し脳をすみやかに取り出した。脳を左右の皮質、皮質下および小脳の 5 つに切り出した。これらの切片はオープン(110 $^{\circ}$ C)で 24 時間乾燥させ乾燥重量法で脳水分量を測定した。

⑥傷害面積の測定

神経学的評価後各群 6 匹のラットを 10%のホルマリンで固定した。Bregma から 1.7mm 頭側、3.8mm、7.8mm 尾側の部分を 8 μ m の厚さで切り出し HE 染色を行なった。NIH イメージで評価し傷害面積を測定した。

(2)臨床研究

①対象と方法

心臓大血管群 71 例および整形手術(股関節から下肢)49 例を対象とした。整形手術症例は年齢により 50 歳以上の整形高齢群 35 例、50 歳以下の整形若年群 14 例とした。年齢を一致させた非手術 10 症例をコントロール(C)群とした。

麻酔薬は心臓大血管手術ではフェンタニル (30 μ g/kg)、ミダゾラム (0.4mg/kg)、イソフルラン (0-1%)を用い、整形手術ではイソフルランに少量フェンタニルを用い、一部の症例では硬膜

外麻酔を併用した。

②神経心理学検査

Mini-mental State Examination (MMSE)、Digit Span、Digit Symbol、かなひろいテストを手術前と術後 7~12 日目に行なった。術前値より 20%以上低下症例を POCD とした。

③炎症反応の検討

手術後 1 週間目まで体温、白血球数、C-reactive protein (CRP) の測定を行い POCD との関連を検討した。

(3)統計処理

生理学的緒量の検定には repeated-measured analysis of variance (ANOVA) を、患者背景、梗塞体積、脳浮腫の検定には χ^2 検定 one-way または two way ANOVA を用い、Scheffé test で検定した。神経学的スコアには Kruskal-Wallis test を行い Mann-Whitney U-test を用いた。P < 0.05 を有意とした。

4. 研究成果

(1)動物実験

①生理学的緒量 (table1)

LPS-triolein 群では麻酔導入後の体温が 38.1℃と上昇しており、LPS 投与に伴う炎症反応の合併を示唆していた。各群で triolein または生理食塩水注入前後での生理学的緒量の差はなかった。

Table 1. 生理学的緒量

群	平均血圧 (mmHg)	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	血糖値 (mg/dL)	ヘマトクリット (%)	側頭筋温 (°C)
C (n=33)							
preinjection	97 ± 15	7.46 ± 0.02	170 ± 16	40 ± 2	185 ± 33	38 ± 2	37.1 ± 0.1
postinjection	94 ± 9	7.46 ± 0.03	175 ± 18	39 ± 2	173 ± 23	38 ± 2	37.1 ± 0.2
生食-triolein (n=33)							
preinjection	101 ± 10	7.45 ± 0.02	173 ± 15	40 ± 1	190 ± 24	38 ± 3	37.1 ± 0.3
postinjection	104 ± 9	7.44 ± 0.03	174 ± 17	39 ± 2	172 ± 18	38 ± 3	37.0 ± 0.2
LPS-triolein (n=33)							
preinjection	96 ± 11	7.46 ± 0.02	180 ± 13	39 ± 1	183 ± 11	39 ± 3	37.2 ± 0.3
postinjection	99 ± 11	7.45 ± 0.02	184 ± 14	39 ± 2	172 ± 13	37 ± 3	37.0 ± 0.2

平均 ± 標準偏差

②神経学的評価 (table2)

C 群に比べ生食-triolein 群、LPS-triolein 群では各観察時点でのスコアは高く、また、LPS-triolein 群では生食-triolein 群に比べて各観察時点でのスコアは高かった。生食-triolein 群、LPS-triolein 群では 24 時間のスコアは 2 時

間よりも高かった。

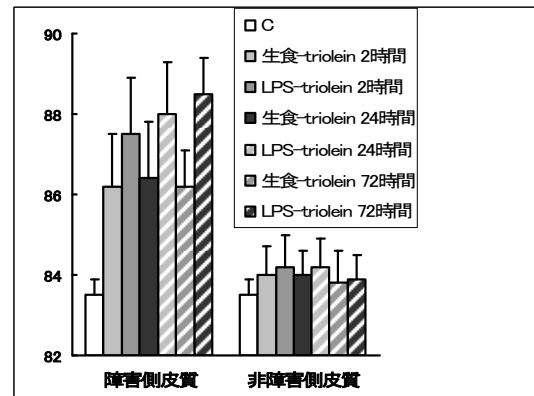
Table 2. 神経学的スコア

群	観察時間			
	時間 (n)	2 (11)	24 (11)	72 (11)
C		2 (0-4)	2 (0-4)	0 (0-4)
生食-triolein		22 (15-27)*	27 (17-31)* [§]	24 (15-29)*
LPS-triolein		27 (19-33)* [#]	32 (23-35)* ^{##}	30 (21-35)* [#]

medai (range) * p < 0.05 vs. C # p < 0.05 vs. 生食-triolein § p < 0.05 vs. 2時間

③脳水分量 (下図)

障害側皮質での脳水分量を示す。C 群(2 時間群のみ提示)に比べて、生食-triolein 群、LPS-triolein 群ともに脳水分量は多く、LPS-triolein 群では生食-triolein 群よりも水分量は高かった。皮質下でも同様の結果となった(データ表示せず)。



④傷害面積 (table 3)

傷害面積は、C 群に比べ生食-triolein 群、LPS-triolein 群では大きく、LPS-triolein 群では生食-triolein 群に比べて障害面積は大きかった。群内で経時的変化に伴う障害面積の変化はなかった。

Table 3. 障害面積

群	観察時間			
	時間 (n)	2 (6)	24 (6)	72 (6)
C		0	0	0
生食-triolein		31 ± 11*	35 ± 15*	36 ± 5*
LPS-triolein		43 ± 14* [#]	47 ± 16* [#]	46 ± 10* [#]

平均 ± 標準偏差 * p < 0.05 vs. C # p < 0.05 vs. 生食-triolein

(2)臨床研究

①患者背景と術中因子 (表1)

心臓大血管群において 53 例で CPB を使用し、

高血圧やクレアチニンが1mg/dlを超える腎機能障害、脳梗塞の既往症例が多かった。20%以上のスコアの低下を示した神経心理学検査数が1検査のみの症例は、心臓大血管手術群で29例(41%)、2検査以上の症例は13例(18%)、整形高齢群ではそれぞれ6例(17%)、1例(3%)であった。整形若年群では1検査の症例が1例(7%)でC群では0であった。

表1 患者背景

群(n)	心臓大血管(71)	整形高齢(35)	整形若年(14)	C(10)
年齢(歳)	63±14	65±9	28±9*	62±13
性別(男:女)	41:30	9:26*	8:6	5:5
術式				
CABG	18	股関節 17	4	-
弁	28	大腿 7	3	-
大血管	13	膝 11	6	-
先天心	2	下腿 0	1	-
複合手術	8			
その他	2			
術前合併症				
高血圧(%)	58(82)*	14(40)	0	2
糖尿病(%)	13(18)	3(9)	0	1
腎障害				
Cre(mg/dl)	1.09±0.77*	0.75±0.2	0.73±0.14	-
Cre>1(%)	24(34)*	4(11)	0	-
血液透析(%)	3(4)	0	0	0
脳梗塞既往(%)	25(35)*	4(11)	0	0
人工心肺有/無	53/18	-	-	-
麻酔時間(分)	513±176*	255±78	239±106	-
術後人工呼吸(時)	12±16	0	0	-
ICU入室時間(時)	55±60	0	0	-
1検査以上低下	29(41)*	6(17)	1(7)	0
2検査低下	13(18)*	1(3)	0	0

P<0.05 VS 他群、 VS 整形高齢

心臓大血管手術では、2つ以上の神経心理学検査症例で20%以上低下した症例において、腎障害、術前脳梗塞の合併(MRI または CT で評価)、プラークスコアが5点以上、上行大動脈病変 grade IV(5mm以上のプラークあり)を合併した症例が多かった。CPBの使用は明らかな因子ではなかった。麻酔時間、術後人工呼吸時間、ICU滞在時間も長かった(表2)。

心臓血管症例では炎症反応とPOCDの合併は明らかではなかった。整形外科手術ではPOCD症例は術後1週間までのCRPが高く、POCDと炎症反応の関与が示唆された(表3)。

表2 POCD症例の患者背景術中因子

低下検査数(n)	≥2(13)	1(16)	なし(42)
年齢(歳)	69±10	65±9	60±16
性別(男/女)	7/6	10/6	23/18
合併症			
糖尿病	2(15)	3(19)	8(19)
高血圧	10(77)	14(88)	34(88)
腎障害(Cre>1%)	8(62)*	4(25)	4(25)
画像で脳梗塞有(%)	4/10(40)*	5/9(56)*	4/25(16)
プラークスコア>5mm(%)	5(42)*	3(20)	5(15)
大動脈 grade III/IV(%)	0/3(27)*	0	1/0(3)
麻酔時間(分)	622±251*	558±189	463±118
術後人工呼吸(h)	24±24*	10±5	9±13
ICU滞在時間(h)	67±43*	47±17	54±74
炎症反応			
WBC前(/ul)	5798±1592	5370±1405	5965±1762
後(/ul)	16766±5843	14816±4102	15700±5003
CRP前(mg/dl)	0.46±0.51	0.33±0.36	0.69±1.2
後(mg/dl)	12.5±6.3	11.2±6.2	11.1±6.3

*P<0.05 VS 高次機能低下なし *P<0.1 VS 高次機能低下なし
大動脈 grade III, プラーク<5mm; IV, プラーク≥5mm

表3 整形外科POCD症例の術中因子

低下検査数(n)	≥1(6)	なし(29)
年齢(歳)	64±12	65±9
性別(男/女)	0/6	9/20
術式		
股関節	17	5
大腿	7	0
膝	11	1
全身麻酔	0	13
全身+硬膜外麻酔	6*	16
麻酔時間(分)	227±29	260±84
炎症反応		
WBC前(/ul)	5735±1669	5883±1730
後(/ul)	7573±1993	8232±2674
CRP前(mg/dl)	2.12±3.74	1.91±2.45
後(mg/dl)	10.53±4.97*	4.8±5.13

*P<0.05 VS 高次機能低下なし

今回の検討から、ラットに Lipopolysaccharide (LPS)を静注し軽度の全身の炎症反応をあらかじめ惹起しておく、投与後24時間後に脂肪を飛散させる脂肪塞栓モデルを作成した場合、その脳障害は神経学的スコア、脳浮腫、傷害面積ともに増悪することがわかった。また、術後のPOCDの発生において特に整形手術において炎症反応が関与していることがわかった。

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0件)

[学会発表] (計3件)

① The 2009 annual meeting of american society of anesthesiologist
[Cognitive dysfunction and cognitive behavioral impairment in cardiac and non-cardiac surgery]

Kazuyoshi Ishida, Takefumi Sakabe

2009年10月20日

② 日本麻酔科学会第55回学術集会
[麻酔後の高次脳機能障害及び日常生活動作の変化—心臓大血管手術VS整形外科手術—]
石田和慶、坂部武史(シンポジウム)

2008年6月12日

③ 日本心臓血管麻酔学会第12回学術大会
[心臓大血管手術及び整形手術後の高次脳機能および日常生活動作の変化に関する検討]

2007年9月16日

石田和慶、坂部武史

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田和慶 (Ishida Kazuyoshi)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80314813

(2) 研究分担者

飯田靖彦 (Iida Yasuhiko)

山口大学・医学部附属病院・助手

研究者番号：90304485

(3) 研究分担者

平田孝夫 (Hirata Takao)

山口大学・医学部附属病院・助手

研究者番号：40420533

(4) 研究分担者

坂部武史 (Sakabe Takefumi)

山口大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40035225

(5) 連携研究者 なし

