

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09268

研究課題名（和文）脊髄虚血再灌流障害を予防、回避するための脳脊髄液中のバイオマーカーの同定

研究課題名（英文）To identify the biomarker in cerebrospinal fluid to prevent the spinal cord ischemia reperfusion injury

研究代表者

山中 勝弘 (Yamanaka, Katsuhiro)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：70729384

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：非常に不本意ながらマウス手術手技の習得にかなりの時間を要した上、マウスモデルの確立に至らなかった。

文献的には4.5分の遮断、9分の遮断でそれぞれ遅発型モデル、即時型モデルができるとの報告であったが結果的には全く安定せず最後までモデルの確立に至らなかった。確立できなかった理由は深部体温の影響かもしくは遮断時間の問題なのか調べるための研究も行ったが結果的には遅発性モデルの作成に至ることができなかった。一方で即時型モデルは作成できたが死亡率が極めて高く実験の継続には至らなかった。本研究では臨床経験から照らし合わせると特に遅発型モデルの確立が重要であったが確立できずその原因は不明であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄虚血再灌流障害に伴う脊髄障害回避のための研究は必須であり本研究は非常に重要と考えるが今回の研究は不本意な結果となりモデルの確立に至らなかった。しかしながら今後も本分野の研究を継続していくことは非常に重要である。しかしながらマウスSCIモデルを使った研究報告は少なくその理由は今回の我々が行ったようにモデルの安定性が得られないことが原因であったと推察された。やむなく今後はラットモデルへ変更していくことを目下模索中である。

研究成果の概要（英文）：We was not able to establish the mouse model of spinal cord ischemia-reperfusion.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：動脈瘤 再灌流障害

## 1. 研究開始当初の背景

胸部大動脈瘤、胸腹部大動脈瘤手術後の脊髄障害(spinal cord ischemia-reperfusion injury: SCI)は最も重篤な合併症の一つで患者の QOL、予後に大きな影響を与える。SCI の発生頻度は未だ高く、熟練した外科医が手術を行っても 5-10%の頻度で SCI を認める。SCI 発症の誘因には様々な因子が関与しており、その予防策として 代表的なものに① 術前に大前根動脈の同定、② 術中の運動誘発電位 (motor evoked potential: MEP)を用いた脊髄機能のモニタリング、③ 低体温、④ 左心バイパスや体外循環を用いた遠位側大動脈灌流、⑤ 脳脊髄液ドレナージといった方法が報告されている。しかしながら SCI を完全に回避する有効な脊髄虚血モニタリング方法は報告されていない。一方、我々はこれまでに実際の胸腹部大動脈瘤手術のデータを解析することで SCI 発症のリスク因子の解析(1) (2)を行うとともに、ウサギ SCI モデルを用いて SCI 発症のメカニズムの解明に努めてきた(3) (4)。

## 2. 研究の目的

SCI を確実に予防し、さらに早期に診断する脊髄虚血モニタリング方法は確立されていない。緊急手術の場合は救命のため一刻を争うことも多く大前根動脈の同定が困難な場合も少なく無い。MEP は術中の体温や麻酔の影響を大きく受けるためその有効性には限界がある。また、術中低体温が止血機能や肺合併症へ及ぼす影響は無視できない。さらに患者の完全覚醒が得られるまでは SCI の診断を下すことはできず SCI の診断に遅れる場合が少なくない。したがって、SCI を完全に回避できる、麻酔方法など他の因子に影響を受けない脊髄虚血モニタリング方法の開発は医学的急務である。

マウス SCI モデルを用いて脊髄内、脳脊髄液内、血液中の炎症性マーカー、炎症性サイトカインの推移、相関関係を検討し、胸部大動脈瘤・胸腹部大動脈瘤手術の術後合併症である脊髄障害を予防、回避するための脊髄虚血モニタリングとしてバイオマーカーを同定することである。

## 3. 研究の方法

マウス SCI モデルの作成：全身麻酔を施した野生型マウスを開胸し、左総頸動脈と左鎖骨下動脈間の大動脈および左鎖骨下動脈をマイクロクリップ<sup>®</sup> で一定時間遮断することにより、それぞれ即時型 SCI モデル (9 分遮断)、遅延型 SCI モデル (4.5 分遮断)を作製する。脊髄虚血作成中、直腸温度モニターで中枢温を測定し大動脈遠位側の血流の評価は組織血流計を用いて行う。脳脊髄液の採取(10) (11)：全身麻酔を施したマウスを仰臥位として顕微鏡下で頸部背側正中を縦切開し頸二腹筋と大後頭直筋は剥離、セパレートする。頸部を体幹から 135 度にやや前屈させ硬膜を直視して大槽より毛細管を穿刺して脳脊髄液を採取する。

- 1) Sham 群 (開胸のみ)、即時型 SCI 群 (9 分遮断)、遅延型 SCI 群 (4.5 分遮断) の 3 群に分け SCI モデルを作成し Basso Mouse Scale (BMS)を用いて定量的運動機能評価を術後 48 時間まで 6 時間おきに行う。
- 2) 術後 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 時間後にマウスより上記②の方法で脳脊髄液を採取し、他、血液、脊髄も同時に採取する。

採取した検体を ERISA 法でインターロイキン(IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17, granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, C reactive protein, fibrinogen, lactate などの濃度を定量評価する。脳脊髄液の白血球の細胞数をカウントし脳脊髄液の pH を測定しそれぞれ時間経過での変化を検討し 3 群で比較する。

#### 4 . 研究成果

結論から述べるとモデルの確立ができなかった。

マウス手術手技じたいにかなりの時間を要した。なんとか手技安定後に実験を継続して行ったが文献的には 4.5 分の遮断、9 分の遮断でそれぞれ遅発型モデル、即時型モデルができるとの報告であったが結果的には全く安定せず最後までモデルの確立に難渋し確立に至らなかった。

手技安定後に深部体温の影響かもしくは遮断時間の問題なのか調べるために遮断時間をそれぞれ 5 分、6 分、7 分、9 分、10 分としさらには深部体温を 36 度、36.5 度、37 度、37.5 度としてモデル作成を行ったが結果的には遅発性モデルの作成に至ることができなかった。一方で即時型モデルは作成できたが死亡率が極めて高く実験の継続には至らなかった。

本研究では臨床経験から照らし合わせると特に遅発型モデルの確立が重要であったが確立できずその原因は不明であった。脊髄採取などの基本的技術習得は確立できたが脊髄液採取は困難を極めた。

SCI 回避のための研究は必須であり本研究は非常に重要と考えるが今回の研究は不本意な結果となったが今後も継続していく必要が重要である。しかしながらマウス SCI モデルを使った研究報告は少なくその理由は今回の我々が行ったようにモデルの安定性が得られないことが原因であったと推察された。やむなく今後はラットモデルへ変更していくことを目下模索中である。

| 深部体温  | 遮断時間 | N    | SCI (%)<br>即時型 | SCI (%)<br>遅発型 | 48時間以内の<br>SCIの死亡率 |
|-------|------|------|----------------|----------------|--------------------|
| 36度   | 5分   | N=5  | 0              | 0              |                    |
| 37度   | 5分   | N=6  | 0              | 1 (17%)        | 100%               |
| 37.5度 | 5分   | N=7  | 0              | 2 (29%)        | 100%               |
| 36.5度 | 6分   | N=11 | 1 (9%)         | 1 (9%)         | 50% (delayは生存)     |
| 37.5度 | 6分   | N=24 | 0              | 4 (16%)        | 25%                |
| 37.5度 | 7分   | N=12 | 2 (16%)        | 0              | 100%               |
| 37.5度 | 9分   | N=4  | 0              | 0              |                    |
| 37.5度 | 10分  | N=22 | 17             | 0              | 52%                |

1. Kawanishi Y, et al. ATS. 2007
2. Kawanishi Y, et al. ATS. 2007
3. Kawanishi Y, et al. JTCVS. 2007
4. Izumi S, et al. JTCVS. 2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 岡田 健次<br><br>(Okada Kenji)<br><br>(90284356) | 神戸大学・医学研究科・教授<br><br><br><br>(14501) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |