

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 3 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591705

研究課題名（和文） 脳虚血再灌流時の吸入麻酔薬による脳保護作用とアンドロジェンの役割

研究課題名（英文） The role of androgen on brain protection by inhalation anesthetics during cerebral reperfusion

研究代表者

内田 昌良（UCHIDA MASAYOSHI）

岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10362146

研究成果の概要（和文）：

脳梗塞の発症頻度には性差があり性ホルモンがこの機序に強く関与している。一方、吸入麻酔薬によるプレコンディショニングによる脳保護効果にも性差がみられるのでセボフルランと性ホルモンとの相互作用を検討した。虚血再灌流後の脳軟膜動脈内皮機能を評価するため、S-Dラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて頭蓋内有窓を作成し、虚血再灌流前後の中大脳動脈領域における脳軟膜動脈の内皮機能をアセチルコリンの局所投与（有窓内投与）によって血管内皮機能を評価した。セボフルランの吸入では、虚血再灌流による血管内皮機能障害の減弱効果は残念ながら認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

The diagnosis of perioperative cerebral ischemia is difficult, but the onset of cerebral infarction is fatal. Thus, the prevention of such event is very important for anesthetic management. Gender differences are observed in the incidence of cerebral infarction, and generally the incidence of cerebral infarction is less in females than males. It is suggested that the estrogen is strongly involved in this mechanism. On the other hand, there is little information about the role of androgen regarding ischemic events. It has been reported that neuroprotective effect through preconditioning induced by inhalation anesthetic was found only in males, and not seen in females. There is a possibility that the gender difference is involved in the protective effect of inhaled anesthetic for the brain ischemia. Then we intended to investigate the interaction between androgen and sevoflurane regarding cerebral protective effect. Firstly, in order to evaluate the cerebral endothelial function following ischemia/reperfusion, we used the closed cranial window preparation associated with the middle cerebral artery occlusion model in the Sprague-Dawley rat. To evaluate the cerebrovascular endothelial function before and after cerebral ischemia/reperfusion, topical administration of acetylcholine could be applied. Unfortunately, by the inhalation of sevoflurane, the attenuation effect of vascular endothelial dysfunction caused by ischemia/reperfusion was not observed.

Additionally, we evaluated the tissue oxygen partial pressure of spinal cord (PsptO<sub>2</sub>) following aortic cross-clamping and -unclamping. In anesthetized rabbits, we prepared

for measurement of PsptO2 following aortic cross-clamping using tissue PO2 monitoring. In the experiment, we allocated 18 animals into 3 groups, (d) control group; n=6, (e) estrogen ( $17\beta$  estradiol:  $20\mu\text{g}$ ) group; n=6, (f) fulvestrant pretreatment (1mg/kg) group; n=6. Administration of  $17\beta$  estradiol improved deterioration of the values in PsptO2 at 20 min after aortic cross-clamping and 0, 2, 5 min after aortic unclamp. The improvement was diminished by pretreatment of fulvestrant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：脳虚血 再灌流 脳保護 吸入麻酔薬 性ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

周術期脳虚血、及び脳梗塞の発症は術中診断が困難であるばかりか、致命的でもあり重篤な後遺症を残す危険があるため、その予防と対策は麻酔管理上非常に重要である。

一般的に脳梗塞の発症頻度には性差が認められており、女性は男性よりも低い。しかしながら閉経後には、その頻度が急上昇することが知られているため、エストロゲンがこの機序に強く関与していることが示唆されている。これに対しアンドロジェンの脳虚血における作用はほとんど解明されていない。臨床的に男性では、急性脳梗塞発症後の血中テストステロン値は急激に減少することが報告されており (Dash et al., 1991)、高齢者においては、テストステロンの急激な減少は脳梗塞の予後を悪くすることが報告されている (Jeppesen et al., 1996)。

オスのラット中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルにおいて、生理的濃度を超えるテストステロンを投与したものは、精巣摘出したものと比較して梗塞サイズが拡大することが報告された (Cheng et al., 2007, Hawk et al., 1998)。また近年、オスのマウス MCAO モデルにおける生理的低用量のアンドロジェンを投与した群が精巣摘出した群より脳梗塞サイズを縮小し、運動機能回復を促進する可能性を我々は報告した (Uchida M et al., JCBFM 2009)。これらの作用機序にはアンドロジェンレセプターが強く関与していると考えられるが (Uchida M et al., JCBFM 2009)、脳虚血後の血流改善作用やアンドロジェンがアンドロジェンレセプターに作用した後の genomic action として、脳保護作用があるとされる種々のタンパク発現に関しては、ほとんど解明されていない。

## 2. 研究の目的

一方、吸入麻酔薬であるイソフルランによるプレコンディショニングによる脳保護効果がオスにのみ認められ、メスではみられないという報告もあり、この作用機序には Akt のリン酸化による活性化がオスにのみ生じることが示唆されている (Kitano H et al,

JCBFM 2007)。

このように、麻酔薬の種類によっては脳虚血における保護作用に性差がみられる可能性がある。これを研究、そして作用機序を解明することは、臨床上非常に有用であり、個々の症例に対しどのような麻酔方法がより適切かを決定する上で重要である。臨床的に安全でより有効的に脳保護を得られる麻酔法を確立することを本研究の目的とし、今回は麻酔臨床上頻繁に使用されるイソフルランとセボフルランについて検討する。

## 3. 研究の方法

吸入麻酔薬であるイソフルランおよびセボフルランとアンドロジェンとの相互作用を検討する。

虚血再灌流後の脳軟膜動脈内皮機能を評価するため、Sprague-Dawley ラット MCAO モデルにおいて頭蓋内有窓を作成し、虚血再灌流前後の中大脳動脈領域における脳軟膜動脈の各種麻酔薬による反応性、二酸化炭素応答、性差、アンドロジェン投与量、2 型糖尿病の有無、年齢の観点から観察する。脳軟膜動脈血管径を再灌流 10 分前、再灌流 1、5、10 時間後に評価する。梗塞領域を比較するためラット MCAO モデルを作成し、再灌流 22 時間後に脳を摘出し梗塞領域を 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) 染色にて評価する。

特に梗塞領域の比較で有意差が得られた群間においては、別のコホートで MCAO 再灌流 4 時間後にペナンプラ領域を採取し、中枢神経保護作用に重要な役割を果たしているといわれる Akt の活性化の程度を phosphorylated Akt (pAkt)/totalAkt (tAkt) として Western Blotting を用いて定量的に評価する。

### ラット中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデル

Sprague-Dawley ラットを仰臥位にて頸部前面を正中切開し総頸、外頸、および内頸動脈を剥離し、外頸動脈遠位部を切除後、小切開を加え、そこから塞栓糸として先端をコーティングした 4-0 ナイロン糸を内頸

動脈に向けて挿入する。レーザードップラーの数値が急激に低下し、30%以下となった時に中大脳動脈閉塞と判断する。塞栓糸を2時間後に引き抜き、再灌流する（この時には頭蓋内有窓が作成されている。）。

#### 頭蓋内有窓(cranial window)モデル

MCAOモデル作成後、腹臥位とし脳固定装置に固定し、麻酔を維持する。直径約5mm開頭し硬膜とクモ膜を切開反転させ、カバーガラス付きリングを歯科用セメントで密着させ、脳脊髄液の漏れをなくす。3本のカテーテルをリングに接続し、それぞれ人工髄液流入量、排出用、内圧測定用とする。内圧を5cmH<sub>2</sub>Oに調節し、window下にある脳軟膜動脈を生体顕微鏡（オリンパス社製、SNZ-10:現有）で拡大し、血管径をvideomicrometer（オリンパス社製、VM-20:現有）で測定する。

#### 4. 研究成果

虚血再灌流後の脳軟膜動脈内皮機能を評価するため、Sprague-DawleyラットMCAOモデルにおいて頭蓋内有窓を作成し、虚血再灌流前後の中大脳動脈領域における脳軟膜動脈の各種麻酔薬による反応性、二酸化炭素応答を評価する予定であったが、ラットMCAOモデルと頭蓋内有窓の併存は体位の関係で困難であり、脳虚血モデルを途中で変更したため（Buchan AM, Stroke 1992; 背臥位で頸部腹側正中切開し、総頸動脈を露出結紮後、頬骨弓の2-3mm吻側にドリルで穴をあけ直視下に中大脳動脈を露出クリップで閉塞・再灌流）、実験系の確立に時間を要した。

そこでまず脊髄虚血モデルで性ホルモンの神経保護作用を確認することを行い、性ステロイド（エストロゲン; 17 $\beta$ -エストラジオール 20 $\mu$ g）を脊髄虚血前に投与することにより、脊髄組織分圧の低下抑制作用がみられるか検討した。エストロゲンによって、脊髄組織酸素分圧の減少は減弱され、性ステロイドが脊髄保護効果を持つ可能性が示唆された。また、このエストロゲンの作用がエストロゲンレセプターを介する作用か否かを検討する目的で fulvestrant（エストロゲンレセプター拮抗薬; ICI 182,780 1mg/kg）を前処置し、エストロゲンの脊髄組織酸素分圧の減少減弱作用が拮抗されることから、この脊髄保護効果がエストロジェ

ンレセプターの活性化によることが示唆された。

ラットの虚血モデルにおいては、虚血再灌流後の脳軟膜動脈内皮機能を評価するため、Sprague-Dawleyラット中大脳動脈閉塞モデル（Buchanのモデル）において頭蓋内有窓を作成し、虚血再灌流前後の中大脳動脈領域における脳軟膜動脈の内皮機能をアセチルコリンの局所投与（有窓内投与）によって血管内皮機能を評価した。セボフルランの吸入では、虚血再灌流による血管内皮機能障害の減弱効果は残念ながら認められなかった。

#### 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12件）

1. Iida M, Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Iida H: Adenosine monophosphate-activated protein kinase regulates platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell migration. Arch Biochem Biophys; 530: 83-92, 2013 (査読有)
2. Takenaka M, Iida H, Matsumoto S, Yamaguchi S, Yoshimura N, Miyamoto M. Successful Treatment by Adding Duloxetine to pregabalin for peripheral neuropathy induced by paclitaxel. Am J Hosp Palliat Care 2012 (in press) (査読有)
3. Iwata K, Iida H, Iida M, Takenaka M, Tanabe K, Fukuoka N, Uchida M. Nicorandil protects pial arterioles from endothelial dysfunction induced by smoking in rats. J Neurosurg Anesth (in press) (査読有)
4. Iida H, Iida M, Takenaka M. Anesthesia and cerebrospinal microcirculation: assessment using cranial- and spinal-window techniques. J Anesth. 26, 143-146, 2012 (査読無)
5. Minami K, Iida M, Iida H. Case report: central venous catheterization via internal jugular vein with associated formation of perioperative venous

- thrombosis during surgery in the prone position. *J Anesth.* 26, 464-466, 2012 (査読有)
6. Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Iida M, Kozawa O, Iida H. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt on basic fibroblast growth factor-induced glial cell line-derived neurotrophic factor release from rat glioma cells. *Brain Reseach.* 1463, 21-29, 2012 (査読有)
  7. Chen K, Tanabe K, Yanagidate F, Kawasaki Y, Zhang L, Dohi S, Iida H. Intrathecal endothelin-1 has antinociceptive effects in rat model of postoperative pain. *Eur J Pharmacology.* 697, 40-46, 2012 (査読有)
  8. Iwata K, Tanabe K, Sugiyama Y, Tanaka M, Takenaka M, Iida H. Anesthetic management for a patient with very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Anesth.* 26, 957-958, 2012 (査読有)
  9. Doi T, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Cuong NT, Kageyama Y, Iida Y, Kondo A, Akamatsu S, Otsuka T, Iida H, Kozawa O, Ogura S. Effect of antithrombin III on glycoprotein Ib/IX/V activation in human platelets: suppression of thromboxane A<sub>2</sub> generation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 87, 57-62, 2012 (査読有)
  10. Tanabe K, Kozawa O, Iida H. Midazolam suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced interleukin-6 release from rat glial cells. *J Neuroinflammation.* 8, 68, 2011 (査読有)
  11. Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Iida H, Dohi S, Kozawa O. Mechanisms of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *J Neuroinflamm.* 7, 16, 2010 (査読有)
  12. Iida H, Iida M, Takenaka M, Fukuoka N, Dohi S. Comparative effects of cilostazol and aspirin on the impairment of endothelium-dependent cerebral vasodilation caused by acute cigarette smoking in rats. *J Thromb Thrombolys.* 29, 483-488, 2010 (査読有) [学会発表] (計 101 件)
  1. Matsumoto S, Matsumoto K, Aoki T, Takenaka M, Iida H. Transdermal fentanyl patch improves postoperative pain relief and early functional recovery in patients receiving primary total knee arthroplasty. 14th world congress on pain. (Milan, Italy) August 27-31, 2012
  2. Iwata K, Iida M, Fukuoka N, Kito K, Iwata C, Michino T, Tanabe K, Takenaka M, Iida H. Effects of topical and intravenous JM1232(-) on cerebrovascular reactivity in rats. American Society of Anesthesiologists 2012 Annual Meeting. (Washington, D.C., USA) October 13-17, 2012
  3. Yoshimura N, Takenaka T, Iida Y, Miyamoto M, Yamaguchi S, Matsumoto S, Tanabe K, Iida H. Efficacy of cervical facet rhizotomy for patients with cervicogenic headache. American Society of Anesthesiologists 2012 Annual Meeting. (Washington, D.C., USA) October 13-17, 2012
  4. Michino T, Takenaka M, Uchida M, Iida M, Kumazawa M, Sugimoto J, Tanabe K, Iwata K, Iida H. Pial arteriolar vasoconstriction after unclamping of abdominal aortic cross-clamp is not associated with obvious cerebral endothelial dysfunction. American Society of Anesthesiologists 2012 Annual Meeting. (Washington, D.C., USA) October 13-17, 2012
  5. Iida M, Iida H, Takenaka M. Mechanisms underlying endothelial dysfunction by acute cigarette smoking in rat. 26th International Symposium on Cerebral Blood Flow Metabolism and Function. (Barcelona, Spain) May 25-28, 2011
  6. Sugiyama Y, Tanabe K, Iida H. Effects of intravenous anesthetics and sedatives on mucin production in cultured human

- airway epithelial cells. American Society of Anesthesiologists 2011 Annual Meeting. (Chicago, USA) October 15-19, 2011
7. Yoshimura N, Takenaka M, Yamaguchi S, Miyamoto M, Matsumoto S, Iida H. Efficiency of facet rhizotomy for patients with recurrent lumbar pain after a spinal fusion. American Society of Anesthesiologists 2011 Annual Meeting. (Chicago, USA) October 15-19, 2011
  8. Takada M, Inoue C, Sudani T, Suzuki A, Iida H. Intravenous Administration of Flurbiprofen axetil can treat mesenteric traction syndrome -evaluation using systemic vascular resistance index and FloTrac™ sensor. American Society of Anesthesiologists 2011 Annual Meeting. (Chicago, USA) October 15-19, 2011
  9. Iwata K, Iida M, Fukuoka N, Tanabe K, Takenaka M, Iida H. Nicorandil prevents the pial arteriolar endothelium from oxidative stress induced by smoking in rats. American Society of Anesthesiologists 2011 Annual Meeting. (Chicago, USA) October 15-19, 2011
  10. Iida M, Iida H, Takenaka M, Tanabe K. The effects of varenicline associated with acute smoking on the endothelial function in cerebral vessels in rats. American Society of Anesthesiologists 2010 Annual Meeting. (San Diego, USA) October 16-20, 2010
  11. Takenaka M, Iida M, Iida H. Preconditioning with estrogen improves the deterioration of the tissue oxygen partial pressure of spinal cord after Aortic Cross-Clamping. American Society of Anesthesiologists 2010 Annual Meeting. (San Diego, USA) October 16-20, 2010
  12. Minami K, Takada M, Murata T, Inoue C, Sudani T, Iida H. Intravenous Flurbiprofen Prevents Mesenteric Traction Syndrome - Evaluation with FloTrac® Sensor. American Society of Anesthesiologists 2010 Annual Meeting. (San Diego, USA) October 16-20, 2010
- [図書] (計5件)
1. 飯田宏樹 : 宗圓聰, 紺野慎一編. ペインクリニックではどのように注射をしているのですか? 運動器の痛みをとる・やわらげる. 174-177, メジカルビュー社(東京), 2012
  2. 飯田宏樹, 加藤真有美 : 澄川耕二編. 禁煙. 麻酔前の評価・準備と予後予測—病態に応じた周術期管理のために. 46-52, 克誠堂出版(東京), 2012
  3. 飯田宏樹 : 飯田宏樹, 福井弥己郎, 伊達久, 安部洋一郎編. 神経破壊・刺激法. よくわかる神経ブロック法. 20-21, 中外医学社(東京), 2011
  4. 飯田宏樹, 福岡尚和 : 高崎眞弓, 河本昌志, 川真田樹人, 岡本博嗣編. 肺動脈カテーテルが肺動脈に入らない. 麻酔科トラブルシューティング A to Z. 406-407, 株式会社文光堂(東京), 2010
  5. 飯田宏樹 : 森田浩之編. 肩こり. いきなり名医! 見わけが肝心、不定愁訴—訴えの見極め方と治療の極意—. 50-54, 日本医事新報社(東京), 2010
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 内田 昌良 (UCHIDA MASAYOSHI)  
岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号 : 10362146
- (2) 研究分担者
- 飯田 宏樹 (IIDA HIROKI)  
岐阜大学・医学系研究科・教授  
研究者番号 : 30159561
- 研究分担者
- 飯田 真美 (IIDA MAMI)  
岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号 : 80350859