

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791596

研究課題名(和文)四肢虚血リモートプレコンディショニングによる脳虚血耐性機序の解明

研究課題名(英文)neuroprotective effect of remote limb ischemic preconditioning

研究代表者

山下 理(YAMASHITA, Satoshi)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20610885

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)：四肢虚血リモートプレコンディショニング(remote limb ischemic preconditioning:RLIP)は短時間の四肢虚血を繰り返し施行することで離れた臓器の虚血耐性を誘導する。これまで主に心臓において有効性を示唆する多くの研究があるが、early phaseにおける脳での長期間の保護効果について検討した報告は少ない。今回、ラット一過性局所脳虚血モデルを用いて虚血後7日間にわたる下肢RLIPの神経保護効果について検討し、脳梗塞体積・神経学的スコアの有意な改善を認めた。

RLIPは臨床応用の可能性が高い方法と考えられ、今後保護効果の機序について詳細な検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Several studies have shown the beneficial effects of remote limb ischemic preconditioning (RLIP) on brain protection. But there have been few investigations that evaluated its long-term protective effects. The present study examined the neuroprotective effects of RLIP 7 days after reperfusion in a rat focal ischemic model.

there were no physiologically relevant differences among groups for the body weight and all monitored variables. RLIP reduced infarct size (176 ± 79.1 mm³, 62.1 ± 60.0 mm³; $P=0.003$). Neurological score was significantly better in the RLIP group than in the control group (12.2 ± 5.2 , 3.4 ± 3.7 at 7 day of reperfusion; $P=0.002$).

The present study demonstrates that RLIP induced by noninvasive tourniquet reduces ischemic injury in rats. The protective effects of early phased tolerance were sustained at 7 days. Since RLIP is simple and non-invasive, it has potential for clinical use.

研究分野：麻酔

キーワード：四肢虚血リモートプレコンディショニング early phase 脳 長期保護 中大脳動脈閉塞モデル(MCAO)

1. 研究開始当初の背景

四肢虚血リモートプレコンディショニング (remote limb ischemic preconditioning: RLIP) は短時間の四肢虚血を繰り返し施行することで離れた臓器の虚血耐性を誘導する。これまで主に心臓において有効性を示唆する多くの研究があるが、early phase における脳での長期間の保護効果について検討した報告は少ない。プレコンディショニング反応はプレコンディショニング刺激から虚血までの時間間隔で大きく2つに分けられ、数時間持続する early phase と開始は遅いが長期間、2-3日持続する delayed phase がある。この2つの phase は異なるメカニズムによって保護効果を発揮すると考えられている。early phase はイオンチャンネルの透過性や局所ホルモン、アデノシンや NO、ブラジキニンなどの放出を伴うタンパク質の翻訳後修飾に影響する。delayed phase は遺伝子発現やタンパク質新生、これは内皮状態、止血、免疫反応や細胞のエネルギー代謝などが含まれるとされる。

この2つのプレコンディショニング刺激を直接比較した研究はほとんどないが early phase ではその効果が弱く効果も一時的であるとする報告が多い。

2. 研究の目的

これまでの報告では全脳虚血モデルにおいては海馬の遅発性神経細胞死をみるため虚血後7日での評価となっているが、局所脳虚血モデルでは虚血後1-2日での評価が多く、これは早期には神経保護効果を認めても時間経過とともにその有意差がなくなってしまふことが指摘されてきた。RLIP では early phase のプレコンディショニングが多く、当教室でも直接脳虚血プレコンディショニングモデルにおいて early phase での保護効果を認めている (J Cereb blood Flow Metab

2002;22:161-170) ことから今回、ラットー過性局所脳虚血モデル、中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion: MCAO) モデルを用いて early phase における虚血後7日間にわたる下肢 RLIP の神経保護効果について神経学的・組織学的に検討した。

全脳虚血モデル

報告者 (年)	RPO条件	虚血	評価	結果・機序
Dave (2006)	両後肢、ターニケット 1 (10 min) - R (10 min) or 1 (30 min) - R (30 min)	RPC 48 h後 Asphyxial cardiac arrest (8min)	7日後 海馬CA1領域の損傷	RPCは2min CCA 遮断と同等の神経保護効果
Sun (2006)	両大脳動脈遮断 1 (10 min) - R (10 min) 3 cycle	RPC虚血 4-VO 全脳虚血 (8min)	7日後 海馬CA1領域の損傷 8 h, 12 h, 1 day, 3 day, 5 dayの P38 MAPK	P38 MAPKの活性化
Zhao (2007)	両大脳動脈遮断 1 (10 min) - R (10 min) 3 cycle	RPC虚血 4-VO 全脳虚血 (8min)	7日後 海馬CA1領域の損傷 0, 6h, 24h, 48hの NO, NOS	NOやNOSの活性増加

図 1

局所脳虚血モデル

報告者 (年)	RPO条件	虚血	評価	結果・機序
Ren (2008)	左大脳動脈遮断 1 (5 min) - R (5 min) or 1 (15 min) - R (15 min) 2 or 3 cycle	RPC虚血 12hr or 2日後 再灌流 permanent MCAO plus 30min 両CCA 閉塞	48日後 Infarct volume	Time windowを cycleで保護効果に 差が出る可能性
Hu (2012)	ターニケット 1 (5 min) - R (5 min) 3 cycle	RPC 1h後 MCAO (2h)	24日後 Infarct volume 神経スコア 血腫マーカー	Adenosine A1 receptorの活性化、 酸化ストレスや 炎症の誘導、 内因性枯死化 機序の抑制

図 2

3. 研究の方法

RLIP の虚血方法として大腿動脈を露出させ直接遮断する方法もあるが、侵襲度が大きくなるためターニケットを用いた方法を今回用いた。下肢の色調、パルスオキシメーター脈波の消失で血流遮断を確認した。

プレコンディショニング刺激の条件付けに関しては、これまでの報告より同じ時間の虚血でも複数回の方が有効性は高く、また3回と5回では差は認めないことから回数は3回とし、時間は preliminary study で1時間以上の虚血では跛行を生じるラットを認め、また他の報告で30分以上のターニケットで組織学的に神経変性がみられるということから10分を3回とし、再灌流時間について

はイソフルランなどの吸入麻酔薬はそれ自体動物実験レベルでは神経保護作用を認められており、麻酔暴露時間をできるだけ短時間とするため5分とした。

当初はプレコンディショニング刺激終了直後に本虚血を施行したが、保護効果としては十分でなく、様々な液性因子の伝達・修飾の時間も考慮して1時間の間隔を空けた。

雄性 Wistar ラット (8-9W, 280-350g) を用いてシリコンコーティングした 4-0 ナイロン糸挿入による 2 時間の中大脳動脈虚血を施行し虚血後 1, 3, 7 日目の神経学的評価と虚血後 7 日目に灌流固定し脳梗塞体積を算出した。虚血 1 時間前に右大腿部に巻いたターニケットを加圧して 10 分間の虚血・5 分間の再灌流のサイクルを 3 回施行した。ナイロン糸挿入後ラットを覚醒させ 2 時間後再度全身麻酔を行い、ナイロン糸を抜去した。神経学的評価は general status, simple motor, complex motor, sensory の 4 つの異なる要素からなるスコアリングの加点にて行った (0:best, 48:worst) (ANESTH ANALG 2004;99:896-903)。

方法 (1)

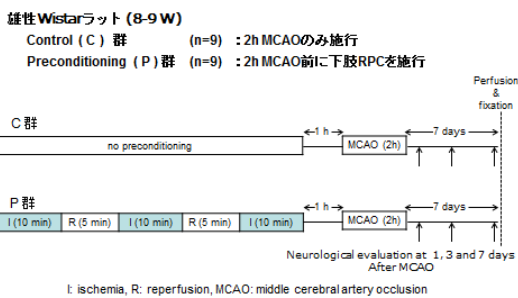


図 3

MCAO model

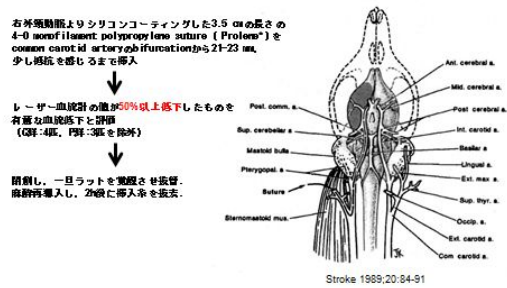


図 4

図 5 Neurologic Scoring system (ANESTH ANALG 2004;99:896-903)

General status	Spontaneous activity (5 min) Body symmetry Gait (open bench top)
Simple motor	Front limb symmetry Circling / bench top Circling / holding tail Hind limb placement
Complex motor	Vertical screen climbing Beam walking (s)
Sensory	Forelimb touch (needle) Hind limb touch (needle) Trunk touch (needle) Vibrissae touch Face touch (needle)

各項目 0-4点 (Simple motor 1項目, sensory 3項目は 0-2点) で評価しその合計点を算出。
0点 the minimum (best) score ← 48点 the maximum (worst) score

4. 研究成果

コントロール (C) 群 (n=9) と RLIP 群 (P) (n=9) で虚血前の生理学的諸量に有意差はなかった。脳梗塞体積は C 群 : $176.7 \pm 79.1 \text{ mm}^3$, P 群 : $62.1 \pm 60.0 \text{ mm}^3$ (P=0.003) となった。神経学的スコアは両群間で有意差がみられ、虚血 7 日目では C 群 : 12.2 ± 5.2 , P 群 : 3.4 ± 3.7 (P=0.002) となった。

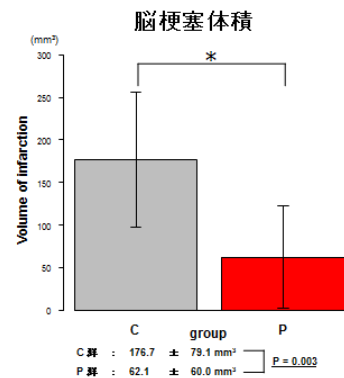


図 6

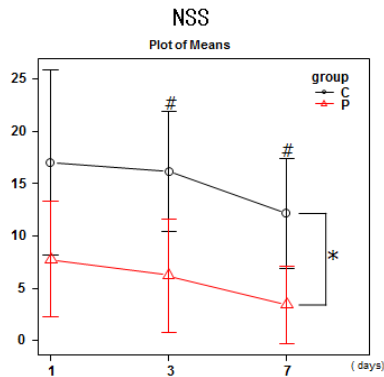


図7

ターニケットを用いた RLIP による虚血後 7 日目までに及ぶ有意な神経保護効果を認められた。プレコンディショニングの中でも四肢のような組織を使用するリモート虚血プレコンディショニングは臨床応用の可能性が高い方法と考えられる。

保護効果の機序については凝固線溶系，血管内皮細胞や炎症反応などの関与が示唆されているが，何らかの液性因子が複合的に作用している可能性がある。保護効果はプレコンディショニング虚血の時間・回数、その後の虚血までの時間間隔によって大きく変わりうることを示唆された。今回は詳細な機序の解明までは至らず，今後の検討課題であるが，ターニケットを用いた RLIP による有意な神経保護効果が今回の研究で認められた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

山下 理，石田 和慶，松本 美志也
四肢虚血リモートプレコンディショニングによる脳保護効果の検討
第 19 回日本神経麻酔集中治療学会
2015 年 4 月 10・11 日
長良川国際会議場・じゅうろくプラザ
(岐阜県・岐阜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 理 (YAMASHITA, Satoshi)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20610885