

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11052

研究課題名(和文) 病態進行時期に注目した炎症反応制御による脊髄虚血保護効果の研究

研究課題名(英文) Research of inflammatory responses with the progress of ischemic spinal cord injury.

研究代表者

山下 敦生 (YAMASHITA, Atsuo)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50379971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年臨床報告が増加している遅発性対麻痺の病態に、虚血再灌流傷害の進行による遅発性神経細胞死が考えられている。我々はそれに炎症反応が関与していることを見出し研究してきた。炎症反応のシグナルであるサイトカインは複数存在し、相互的に関与すると考え、家兎脊髄虚血モデルを用いて虚血再灌流後1日目、2日目、3日目、4日目、5日目の腰部脊髄標本を採取した。今後サイトカイン濃度を測定し経時的な変化に対応したサイトカイン制御を試みる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

明確な保護法が確立されていない胸腹部大動脈瘤手術に伴う脊髄虚血に対して、炎症反応を制御することにより虚血再灌流による神経障害を軽減出来れば、患者の予後に寄与すると考えられる。現在、炎症反応を制御する薬剤は複数臨床使用されており、動物実験にて効果が認められれば、臨床治験も1から薬剤を開発するより早く出来ることが推測される。

研究成果の概要(英文)：Recently, the spinal cord ischemia after aortic procedures shows a marked tendency of delayed onset paraplegia. This pathologic mechanism of delayed neurological deficit is thought of the involvement in the progression of ischemia and reperfusion injury. We found that the inflammatory responses played a role in the progression of ischemia and reperfusion injury. We thought that various cytokines reciprocally operated on the progression of inflammatory responses. In this study, we extirpated the spinal cord of New Zealand white rabbits euthanized at 1,2,3,4 and 5 days after the spinal cord ischemia and reperfusion. We will analysis the quantity of cytokine in the spinal cord over time, and attempt control of the inflammatory responses.

研究分野：麻酔科学

キーワード：脊髄虚血 胸腹部大動脈瘤 炎症反応 対麻痺

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胸腹部大動脈瘤手術に伴う脊髄虚血・対麻痺を防ぐため、低体温療法、Adamkiewicz 動脈の同定・再建、脊髄血流を増加させるための血管拡張薬投与、昇圧薬投与、脳脊髄液ドレナージ療法、脳神経保護作用のある薬剤投与など様々な方法が研究されてきたが、いまだ確実な方法は確立出来ていない。臨床では色々な方法を組み合わせているのが現状で、いまだ 5~10%の対麻痺発生率が報告されている。中でも近年は手術直後に対麻痺が発生するのではなく、遅発性(術後1~5日後)に対麻痺が発生したとする報告が増加傾向である。したがって多くの研究者は手術技術の進歩や複数の脊髄虚血保護法による術中管理により、手術中に脊髄神経細胞が虚血壊死に至る程度が軽減されたものの、完全ではないため徐々に神経細胞を障害されると考え、そのメカニズムの解明とその制御による脊髄虚血保護に注目している。

2. 研究の目的

遅発性発症の原因として術中に生じた虚血再灌流傷害の病態進行による遅発性神経細胞死が考えられている。虚血再灌流傷害の機序としてグルタミン酸過剰放出、細胞内 Ca 濃度上昇を起因とする小胞体ストレスやミトコンドリア機能不全、フリーラジカル産生などが提唱されているが、我々はそのメカニズムの一因として炎症反応⁽¹⁾の関与を報告した。活性化したマクロファージは好中球などの炎症性細胞を活性化し各種炎症性サイトカインを放出するといわれ、これらのシグナル伝達により血管透過性亢進、循環障害が生じ、細胞傷害、組織傷害に至るとされる。そこで我々は抗サイトカイン抗体投与に脊髄虚血保護効果の検討を行ってきた。その中で IL-1 受容体拮抗薬(アナキンラ)投与により遅発性発症の対麻痺の病態進行を遅らせる効果を認めたと、病態進行は止められなかった(図1)。脊髄虚血により引き起こされる炎症反応は、虚血後数週間続くといわれ⁽²⁾、IL-1 以外の因子または虚血数日後の因子の病態制御が更なる脊髄虚血保護戦略の鍵になると考え、本研究では病態進行時期に注目して機序並びに保護効果を検討したいと考えた。

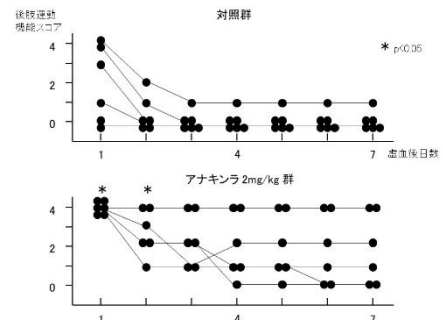


図1 アナキンラ投与による家兎後肢運動機能スコアの経時的変化

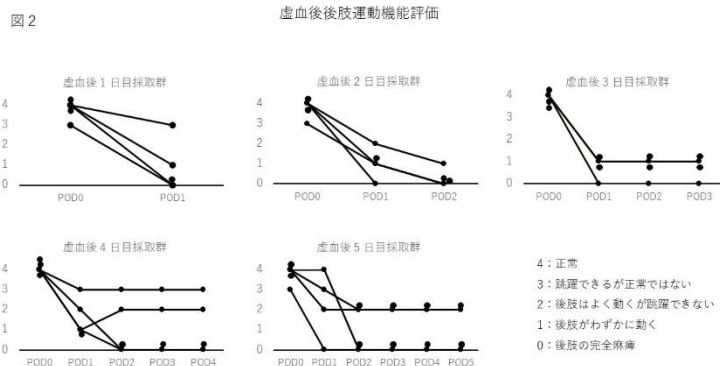
3. 研究の方法

(1)脊髄虚血再灌流後の経時的脊髄サイトカイン濃度測定

家兎脊髄虚血モデルを用いて、脊髄虚血再灌流後1日目、2日目、3日目、4日目、5日目(各n=4)の腰部脊髄標本を採取した。脊髄虚血方法は、イソフルランとフェンタニルとベクロニウムによる人工呼吸全身麻酔下に家兎(体重3kg前後)の左側腹部を切開し、後腹膜アプローチで腎動脈分岐付近の大動脈を露出させ、腹部大動脈にテーピングをかけ、クリップにて15分間の腹部大動脈遮断を行った。上半身(耳動脈)と下半身(大腿動脈)で血圧、心拍数を測定し、腹部大動脈遮断により大腿動脈の血圧が低下し脈圧が消失することで遮断の成否を判断した。遮断解除後、腿動脈の血圧と脈圧が回復することを確認し、閉創後全身麻酔から覚醒させ、1~5日後まで後肢運動機能を評価(4:正常、3:跳躍できるが正常ではない、2:後肢はよく動くが跳躍できない、1:後肢がわずかに動く、0:後肢の完全麻痺)した。予定の脊髄虚血再灌流後の観察期間に達したら、全身麻酔下に腹臥位で第4~7腰椎棘突起上を切開し、椎弓切除後にチオペンタールを大量投与し安楽死させ、直ちに腰部脊髄標本を採取し、-80で冷凍保存した。対照群として脊髄虚血を行わないSham群1日目、2日目、3日目、4日目、5日目(各n=2)も同様に腰部脊髄標本を採取し、-80で冷凍保存した。冷凍保存された脊髄標本100mgを切り出し、1mlの溶解試薬の中でホモジナイズし、遠心分離機にて上澄み液を抽出した⁽³⁾。この上澄み液を用いてELISA法にてIL-1、IL-6、TNF-濃度を測定した。

4. 研究成果

家兎20羽に対して大動脈遮断により脊髄虚血を行った。これらを一群4羽ずつとし、脊髄虚血再灌流後1日目、2日目、3日目、4日目、5日目まで後肢運動機能評価をした後、安楽死させ腰部脊髄標本を採取した。それぞれの群における後肢運動機能評価を図2に示す。虚血再灌流直後の麻酔科覚醒時には、ほぼ全例後肢運動機能低下は無く、脊髄虚血再灌流後1日目に後肢運動機能低下を



来し、遅発性対麻痺を認めた。家兎 10 羽に対して対照群として大動脈遮断のみを行わない Sham 手術を行い、これらを一群 2 羽ずつとし、Sham 手術後 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目、5 日目まで後肢運動機能評価をした後、安楽死させ腰部脊髄標本を採取した。後肢運動機能障害を来した家兎は認めなかった。これらの冷凍脊髄標本を用いて溶解上澄み液を採取した。ELISA 法による IL-1、IL-6、TNF- α 濃度の測定結果は、今後我々の研究費を用いて研究を継続する予定である。当初の推測のように、これらのサイトカインのピークが異なれば、そのタイミングでこれらのサイトカインの作用を抑制する薬剤投与が、脊髄虚血保護に関与する可能性が考えられ、今後の研究に繋がると思われる。

参考文献

- (1) The temporal profile of the reaction of microglia, astrocytes, and macrophages in the delayed onset paraplegia after transient spinal cord ischemia in rabbits.
Matsumoto S, Yamashita A et.al. Anesth Analg;96:1777-84,2003
- (2) Targeting astrocytes for stroke therapy.
Zhao Y, Rempe DA Neurotherapeutics;7:439-51,2010
- (3) The evolution of chemokine release supports a bimodal mechanism of spinal cord ischemia and reperfusion injury. Smith PD et.al. Circulation;126[suppl 1]S110-7, 2012

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 (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
研究分担者	松本 美志也 (MATSUMOTO Mishiya) (60243664)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	石田 和慶 (ISHIDA Kazuyoshi) (80314813)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授 (15501)	
研究分担者	山下 理 (YAMASHITA Satoshi) (20610885)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	