

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591798
 研究課題名 (和文) 一過性脳虚血再灌流後の脳血管反応性変化に及ぼす活性酸素種の影響に関する研究
 研究課題名 (英文) The effects of reactive oxygen species on the cerebral vascular reactivity after transient cerebral ischemia
 研究代表者
 飯田 靖彦 (IIDA YASUHIKO)
 山口大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：90304485

研究成果の概要：脳虚血後の血管反応性の変化に焦点を当て活性酸素種の関与を明らかにし、エダラボンの修飾作用について検討した。一過性脳虚血再灌流後の血管拡張は虚血早期より約 1 時間後まで継続し、内皮依存性弛緩反応は減弱することがわかった。血管拡張の機序として活性酸素種が関与しているかどうかは明らかでなかった。内皮依存性弛緩反応減弱の機序については superoxide や過酸化水素の関与が考えられた。また、エダラボンは一過性脳虚血後の内皮依存性弛緩反応減弱に効果を示さなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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 脳血流 内皮依存性弛緩反応 活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

脳の虚血再灌流では、superoxide などの活性酸素種が生成される。動物実験では、superoxide は再灌流後早期に生成が始まり、およそ 2 時間持続すると報告されている。再灌流時の superoxide 生成は脳血管反応性にも影響を与える。Nelson らは、再灌流早期か

ら脳血管の拡張がおこり、約 2 時間継続することを報告している。この血管拡張は superoxide の生成時間と一致し、同時に存在する血液脳関門の透過性亢進と相まって、アルブミンなどの血管外への漏出から脳浮腫や頭蓋内圧亢進につながる可能性を示して

いる。一方で再灌流後に血管内皮依存性弛緩反応は減弱するという報告がある。10分間の脳虚血再灌流では、アセチルコリンによる血管拡張反応は抑制される。また、別の報告では15分間の虚血再灌流後、早期にはアセチルコリンによりむしろ血管収縮反応が起こるが、時間経過とともに拡張反応へと変化していくことが示されている。アセチルコリンへの異常な反応の持続時間は superoxide の生成時間と一致しており、ラジカル除去剤の前処置によって収縮反応は抑制されることから、アセチルコリンによる血管反応に活性酸素種が関与している可能性がある。

以上のことから、脳虚血再灌流後の血管拡張および血管内皮機能の障害には、いずれも superoxide などの活性酸素種の関与が示唆される。

一方、フリーラジカル除去剤であるエダラボンは、脳梗塞急性期に作用し、脳浮腫、脳梗塞、神経症候、遅発性神経細胞死などの虚血性脳血管障害の発現及び進展（増悪）を抑制することから臨床でも広く使用されている。In vitro の研究では血管内皮障害を抑制する作用もあり、脳虚血再灌流後の血管反応性障害を軽減できる可能性がある。

本研究では、脳虚血後の血管反応性の変化に焦点を当て活性酸素種の関与を明らかにし、フリーラジカル除去剤であるエダラボンの修飾作用について検討する。

2. 研究の目的

- (1) 一過性脳虚血後の脳血流増加と血管反応性変化を経時的に検討する。さらに虚血時間による反応性の違いを明らかにする。
- (2) 脳血流増加や血管反応性変化における活性酸素種の関与を明らかにする。
- (3) エダラボンをはじめとしたフリーラジカ

ル除去剤の血管反応性変化への修飾作用を検討し、最も効果的な除去剤は何か、最適な投与時期はいつかを明らかにする。

3. 研究の方法

家兔をセボフルランで麻酔導入し、耳静脈より静脈ルートを確認。チオペンタール投与後気管挿管し、ベクロニウム投与後、人工呼吸を開始する。麻酔はイソフルラン 1~1.5%（吸入酸素濃度 50%）で維持し、動脈血二酸化炭素分圧が 35~40mmHg となるように呼吸設定を行う。大腿動脈より血圧測定と動脈血採取用に、大腿静脈より輸液と薬液投与用にカテーテルを留置する。家兔をスフィンクスポジションとし、頭蓋骨を固定する。頸部にネックターニケットを巻いておく。レギチンを持続投与し、呼気終末陽圧換気を併用しながら血圧を 50mmHg 未満に調節する。次にネックターニケットを 20psi で加圧し脳虚血を作成する。加圧することで血圧が一時的に上昇するので、レギチンの追加投与で血圧を調整する。脳虚血状態は、頭部に装着した脳波計で平坦脳波を観察することで確認する。決められた時間の虚血後、ターニケットを解除し再灌流させる。この際、血圧が低下するので、フェニレフリン投与で平均血圧を正常化させる。

イソフルラン麻酔下に家兔をスフィンクスポジションとし、頭蓋骨を固定する。頭部に切開を加え頭蓋骨を露出し、頭蓋骨に穴（径 1cm）をあける。硬膜を注意深く切除し、レギチンを用いてカバーガラスで蓋い窓を設ける。窓内を人工髄液で満たし、30分間の定常状態を保った後に血管を観察する。脳軟膜動脈を生体顕微鏡とそれに接続したビデオカメラシステムを通してモニタに描出する。動脈径の変化をビデオテープに経時的に記録したのち、血管径変化を解析することで、血

管の反応性を検討する。

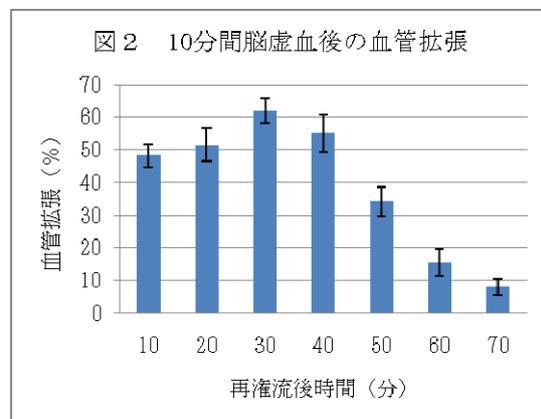
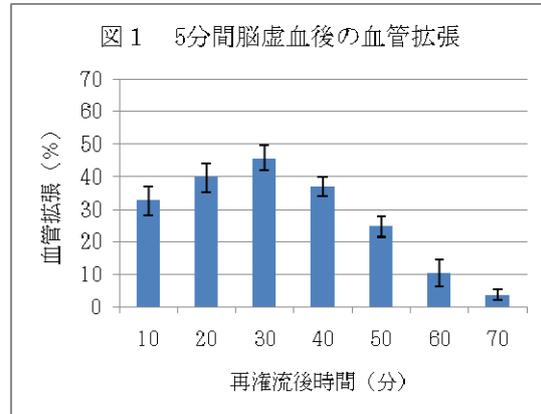
プロトコール

- (1) 虚血再灌流後の脳血管拡張を虚血前, 再灌流後 (10 分毎に 70 分まで) に検討する。虚血時間は 5 分と 10 分とする。
- (2) 活性酸素腫除去薬である superoxide dismutase (SOD : superoxide 除去薬 60U/ml), catalase (hydrogen peroxide 除去薬 40U/ml), deferoxamine (hydroxy radical 除去薬 1 mM), ebselen (peroxynitrite 除去薬 50 μM) を虚血 15 分前に窓内に投与し, 10 分間の虚血後の脳血管拡張を虚血前, 再灌流後 (10 分毎に 70 分まで) に検討する。
- (3) アセチルコリン (10^{-6} M) に対する血管反応性を虚血前, 再灌流後 (30 分から 15 分毎, 1 時間まで) に検討する。血管反応性の検討は, 窓内へアセチルコリンを局所投与し血管反応を観察することで行う。
- (4) 活性酸素腫除去薬である SOD, catalase, deferoxamine, ebselen を虚血 15 分前もしくは虚血再灌流直後に窓内投与し, アセチルコリン (10^{-6} M) に対する血管反応性を虚血前, 再灌流後 (30 分から 15 分毎, 1 時間まで) に検討する。
- (5) エダラボンを虚血 15 分前もしくは再灌流直後から 2mg/kg/h で静脈内持続投与し, アセチルコリン (10^{-6} M) に対する血管反応性を虚血前, 再灌流後 (30 分から 15 分毎, 1 時間まで) に検討する

4. 研究成果

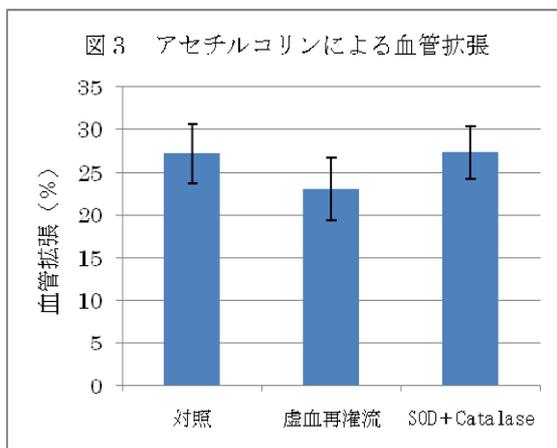
- (1) 5 分間の脳虚血で, 再灌流 10 分後から虚血前の $33 \pm 4\%$ (平均 \pm 標準偏差) の拡張がみられ, 30 分後ピークに達し ($46 \pm 4\%$), 1 時間後まで持続した。虚血時間を 10 分に延長しても同様の血管拡張

がみられた, 再灌流 10 分後で $48 \pm 3\%$, 30 分後で $62 \pm 4\%$ と, 虚血時間が長いほど拡張の程度が強い傾向にあった (図 1, 2 参照)。



- (2) 脳虚血再灌流後の血管拡張は superoxide dismutase (SOD), catalase, deferoxamine の虚血前投与にて抑制される傾向にあったがいずれも有意な抑制ではなかった。
- (3) 10 分間の虚血前後でアセチルコリン (10^{-6} M) を窓内に投与し血管反応を検討したところ, 再灌流後 50 分程度まではアセチルコリンによる拡張反応は乏しかった。よって, ほぼ虚血前の血管径に戻る再灌流後 70 分にアセチルコリンによる血管反応の比較を行うこととした。虚血 70 分後にアセチルコリンによる脳血管拡張は 15%程度抑制された (図 3 参照)。
- (4) SOD および catalase の虚血前窓内投与

にて再灌流後のアセチルコリンによる血管拡張反応の減弱は抑制された(図3参照)。SODあるいはcatalaseの単独投与では抑制効果が乏しく、deferoxamine、ebselenの虚血前投与では反応に変化はなかった。



(5) エダラボンの虚血前もしくは虚血再灌流直後の静脈内持続投与は、再灌流後のアセチルコリンによる血管拡張反応の減弱に影響を与えなかった。

以上のことから、一過性脳虚血再灌流後の血管拡張は虚血早期より約1時間後まで継続し、内皮依存性弛緩反応は減弱することがわかった。血管拡張の機序として活性酸素種が関与しているかどうかは明らかでなかった。内皮依存性弛緩反応減弱の機序についてはsuperoxideや過酸化水素の関与が考えられた。また、エダラボンは一過性脳虚血後の内皮依存性弛緩反応減弱に効果を示さなかった。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[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

飯田 靖彦 (IIDA YASUHIKO)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90304485

(2) 研究分担者

松本 美志也 (MATSUMOTO MISHIYA)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60243664

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

山下 敦生 (YAMASHITA ATSUO)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50379971

(3) 連携研究者

なし