

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591809

研究課題名（和文） 脊髄虚血後モルヒネ誘発痙性対麻痺の機序解明に関する研究～一酸化窒素の関与～

研究課題名（英文）Nitric oxide involving in the opioid-induced paraplegia

研究代表者

垣花 学（Kakinohana Manabu）

国立大学法人琉球大学医学部・准教授

研究者番号：20274897

研究成果の概要（和文）：

ラット脊髄虚血モデルを用い脊髄虚血後くも膜下モルヒネ投与による痙性対麻痺への一酸化窒素の関与について検討した。モルヒネ 30mg（M群）では投与後2時間から対麻痺となりその後運動機能は回復しなかった。一方、モルヒネとODQ（MI群）では対麻痺となることはなく投与後72時間目で歩行可能であった。ラット脊髄虚血後くも膜下モルヒネによる痙性対麻痺にモルヒネ-NO-sGC-cGMPという反応系の重要性が確認された。

研究成果の概要（英文）：

Our previous study showed that opioid receptor activation even after short-lasting spinal cord ischemia in the rat could cause irreversible paraplegia. This study elucidated the relationship between nitric oxide and morphine inducing paraplegia after spinal cord ischemia. While IT morphine alone could induce irreversible paraplegia, the combination between IT morphine and ODQ failed to induce neurological deficit. Our results suggested that nitric oxide-guanylate cyclase-cGMP pathway should be involved in the inducing paraplegia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔科学

キーワード：対麻痺、脊髄虚血、オピオイド、一酸化窒素、痙性対麻痺

1. 研究開始当初の背景

胸部下行大動脈遮断による脊髄虚血は、胸腹部大動脈手術後の最も悲惨な合併症である対麻痺を来しそれは患者および家族の生活に多大な損害を与える。血管外科手術で最も困難な領域であるため、現在でもその予防ならびに治療に関して世界中で様々な研究が行われている。しかし、血管外科医および麻酔科医はこの合併症の予防および治療について様々な手段を講じているが、その発生率はいまだ約5 - 30%と報告されており、いまだ解決できない領域となっている。

約10年前より、当教室ではラット大動脈遮断による脊髄虚血モデルを用いた様々な研究を行い、多くの報告を行ってきた。特に、麻薬による虚血性脊髄障害の増悪作用に関する研究では、大血管手術に対する麻酔方法の再検討を促す衝撃的な結果を多数報告してきた (Anesthesiology 2003; 98:862, Anesth Analg 2003;96:769, Anesth Analg 2004;99:1528, Anesth Analg 2005;100:327, Anesth Analg 2006;102:1217, Br J Anaesth 2006;96:88)。さらに最近では、マウスの大動脈弓部 (左内頸動脈と左鎖骨下動脈との間) を遮断することによる脊髄虚血モデル (マウス脊髄虚血モデル) も作成し研究に用いている。

これまでの研究結果から、通常では運動機能異常を誘発しないモルヒネが、非障害性短時間の虚血侵襲を与えた脊髄に投与されると、モルヒネ投与量依存的に下肢運動機能異常 (モルヒネ誘発痙性麻痺) を誘発すること、この運動機能異常は、虚血脊髄のオピオイド受容体、特に μ 、オピオイド受容体を介する (受容体は関与しない) こと、非障害性短時間虚血侵襲を与えた脊髄にモルヒネを投与すると、脊髄からのグルタミン酸放出を増加させ、それに引き続き脊髄運動神経のNMDA受容体を刺激することにより神経細胞死を誘発すること、 μ 2 受容体刺激薬投与により、このモルヒネ誘発脊髄運動神経障害を予防できることなどが明らかとなった。さらに、最近ではモルヒネ誘発痙性対麻痺にグ

リア (特にアストロサイト) - 神経細胞相互作用 (Glia-Neuronal Interaction) が関与している可能性があるという結果を見出している。

ところで、最近我々の研究から虚血性脊髄障害後の痙性麻痺に、一酸化窒素 (Nitric Oxide:NO) が大きく関与していることが明らかとなってきた。従来の報告では、脊髄虚血後の痙性対麻痺は、虚血侵襲に最も脆弱である抑制系介在神経 (GABA/Glycine 神経) が脱落することにより脊髄前角にある運動神経が脱抑制され異常興奮することが原因であると考えられていた。しかし我々の研究で、虚血性脊髄障害後の痙性が一酸化窒素合成酵素阻害により改善することが判明し、さらにこのNOの起源は、Ia afferent 神経や活性型アストロサイトである可能性もわかってきた。この研究結果から、脊髄由来の痙性麻痺にNOが関与している可能性は非常に高いと考えられる。このような最近の研究結果から、痙性麻痺を特徴とするモルヒネ誘発対麻痺に於いても、NOが関与している可能性が出てきた。

2. 研究の目的

麻薬による虚血性脊髄障害の増悪作用に関する研究では、大血管手術に対する麻酔方法の再検討を促す衝撃的な結果を多数報告してきた。また、この痙性麻痺に、一酸化窒素 (Nitric Oxide:NO) が大きく関与していることが明らかとなってきた。そこで我々は、「オピオイド誘発対麻痺にNOが関与する」という仮説、つまり「虚血脊髄においてオピオイド受容体を刺激すると、脊髄内オピオイド受容体を介しNOが合成され痙性対麻痺を誘発する」という仮説を検討した。

3. 研究の方法

(1) くも膜下カテーテル挿入

雄性SDラット (BW: 300-350g) を、純酸素および5%イソフルラン吸入により麻酔導入を行った。その後、頭部固定手術台 (ステレオ装置) に頭部を固定し、後頭部より後頭-環椎間膜に切開を入れくも膜下腔へ到達した。その部位より、PE-10カテーテル (8.5cm) を尾側に挿入し、くも膜下カテーテルを留置した。麻酔から覚醒後、後肢運動機能異常のないことを確認し、5日間観察した。

(2) 脊髄虚血作成

雄性SDラット(BW:300-350g)を、60%酸素および2-2.5%イソフルラン自発呼吸吸入により麻酔維持した。尾動脈よりPE-50カテーテルを挿入し、血圧を測定した。左大腿動脈から、2Fr フォガティカテーテルを挿入(11cm)した。左頸動脈から20Gageのテフロンカテーテルを挿入し、脱血ラインとした。ヘパリン200単位投与後、フォガティカテーテルのバルーンを膨らませ、左内頸動脈から脱血し脊髄虚血侵襲を与えた。6分間虚血後、バルーンを収縮させさらに頸動脈より血液を戻した。全てのカテーテルを抜去し、創部を閉創し手術を終了した。麻酔から覚醒させ、後肢運動機能を評価した。

(3) モルヒネ誘発性対麻痺に対するくも膜下L-NAMEならびに各種NOS合成酵素阻害薬投与の影響

ラットを、生理食塩水投与群、L-NAME投与群に分けた。その後、後肢運動機能が正常(歩行可能)であることを確認した後に、くも膜下カテーテルからモルヒネ30 μ gを投与した。モルヒネ投与2時間後に、くも膜下カテーテルからL-NAMEを投与した。後肢運動機能ならびに後肢痙攣性測定は、虚血前、虚血後30分(モルヒネ投与前)、1時間、2時間(NOS阻害薬投与前)、L-NAME投与後10分、20分、30分、60分とした。

(4) 脊髄内NOS発現に関する解剖学的検討

非障害性脊髄虚血後モルヒネ30 μ g(M群)あるいは生理食塩水10 μ l(S群)をくも膜下腔に投与した。虚血48時間後に、経心臓的にヘパリン加生理食塩水(4)250mLならびに4%パラフォルムルダリド400mLで灌流固定した。切り出した脊髄からクライオスタットを用い、10-20 μ mの凍結切片を作成した。神経細胞に対してはNeuN、アストロサイトに対してはGFAP、マイクログリアに対してはOX-42を一次抗体として用い、蛍光性二次抗体を用い蛍光免疫染色した。蛍光顕微鏡(現有機器)でco-localizationを観察し、それぞれのNOS発現の局在を確認した。

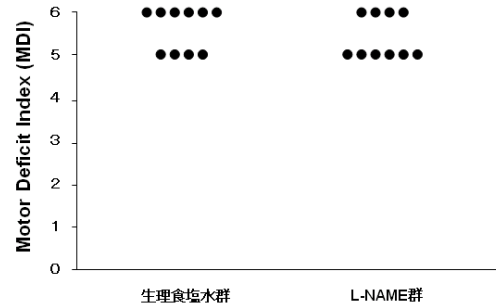
(5) モルヒネ誘発性対麻痺に対するくも膜下グアニレートサイクラーゼ阻害薬(ODQ)投与の影響

ラットを、生理食塩水投与群、ODQ投与群に分けた。その後、後肢運動機能が正常(歩行可能)であることを確認した後に、くも膜下カテーテルからモルヒネ30 μ gを投与した。モルヒネ投与2時間後に、くも膜下カテーテルからODQを投与した。後肢運動機能は、虚血前、虚血後30分(モルヒネ投与前)、1時間、2時間(ODQ阻害薬投与前)、ODQ

投与後10分、20分、30分、60分とした。

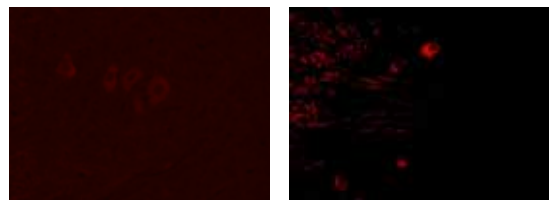
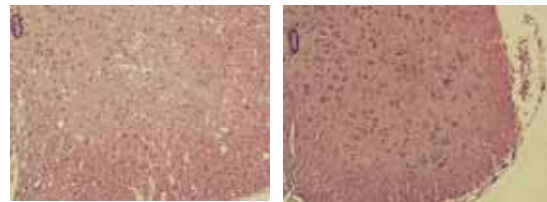
4. 研究成果

(1) モルヒネ誘発性対麻痺に対するくも膜下L-NAMEの影響



L-NAME投与は、モルヒネ誘発性麻痺の発生を抑制した。

(2) 脊髄内NOS発現に関する解剖学的検討

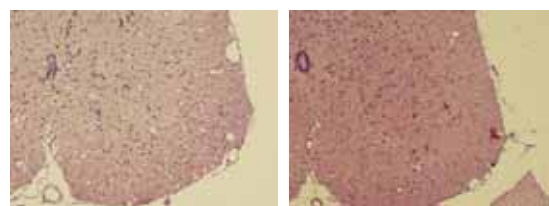


モルヒネ投与群

生理食塩水群

脊髄虚血48時間後のM群では、神経細胞脱落が認められNOSの発現も明らかではなかった。

(3) モルヒネ誘発性対麻痺に対するくも膜下グアニレートサイクラーゼ阻害薬(ODQ)投与の影響



モルヒネ単独群

モルヒネ + ODQ 群

ODQは、くも膜下モルヒネ投与による痙攣性対

麻痺の発生を抑制し、さらに虚血後 48 時間目の運動機能を改善した。

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4件)

Codeluppi S, Svensson CI, Hefferan MP, Valencia F, Silldorff MD, Oshiro M, Marsala M, Pasquale EB. The Rheb-mTOR pathway is upregulated in reactive astrocytes of the injured spinal cord. J Neurosci 査読有 2009、29 巻、1093-104

垣花 学 大動脈手術と脊髄保護。麻酔。査読有 2009 58 巻、315 - 26

垣花 学 胸部下行大動脈瘤手術における脊髄機能モニタリングの実際。Anet。査読無 2008、12 巻、30-34.

Kakinohana M, Abe M, Miyata Y, Oshiro M, Saikawa S, Arakaki K, Kuniyoshi Y, Sugahara K. Delayed response of transcranial myogenic motor-evoked potentials monitoring to spinal cord ischemia during repair surgery for descending thoracic aortic aneurysm. J Anesth 査読有 2008 22 巻 304-7

[学会発表](計3件)

垣花学: 脊髄保護を考慮した麻酔方法。日本心臓血管麻酔学会第13回学術大会。2008.11.1-2. 沖 縄。Cardiovascular Anesthesia, 12:S75, 2008

Manabu Kakinohana, Yuji Miyata, Satoko Saikawa, Tatsuya Fuchigami, Kazuhiro Sugahara: Preanesthetic HRV Can Predict Remifentanyl-Inducing Bradycardia during Induction of Anesthesia. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting October 18-22, 2008 Orlando, Florida, USA

垣花学: 脊髄機能モニタリングの実際。日本麻酔科学会第55回学術集会。2008.06.12-14. 横浜.

[図書](計1件)

垣花学 脳保護・脳蘇生, 坂部武史(編), 203-214, 克誠堂出版, 東京, 2008.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

垣花 学 (KAKINOHANA MANABU)

国立大学法人琉球大学・医学部・准教授
研究者番号：20274897

(2)研究分担者

中村 清哉 (NAKAMURA SEIYA)

国立大学法人琉球大学医学部附属病院・講師
研究者番号：00363680

斎川 仁子 (SAIKAWA SATOKO)

国立大学法人琉球大学医学部附属病院・助教
研究者番号：20404569

比嘉 達也 (HIGA TATSUYA)

国立大学法人琉球大学医学部附属病院・助教
研究者番号：10404568

(3)連携研究者