

機関番号：37104
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20591821
研究課題名(和文) 脳脊髄虚血再灌流障害に対する電磁気刺激を用いたポストコンディショニング作用の検討
研究課題名(英文) Ischemic postconditioning by electric or magnetic stimulation against the reperfusion injury after cerebral or spinal ischemia
研究代表者
原田 秀樹 (Harada Hideki)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：30198923

研究成果の概要(和文)：ラット一過性局所脳虚血モデルを用いて経頭蓋電気刺激を虚血前後に印可しそのプレコンディショニング及びポストコンディショニング作用の有無を検討した。虚血再灌流時に賦活化されるサイトカインやMAPKの出現を念頭に置いた電磁気刺激条件を印可した所、即時型耐性獲得は認められたが、ポストコンディショニング作用は認められなかった。また虚血後印可による耐性獲得に対する修飾作用も認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We explored the postconditioning induced by transcranial electric stimulation in the early phase of reperfusion after transient focal cerebral ischemia. Event though, we used the condition of electrical stimulation to enable to induce the protective cytokine or MAPK, there is not protective effects of postconditioning nor any influence for the results of rapid preconditioning induced by electrical stimulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

分野：医歯薬学

分科：外科系臨床医学

細目：麻酔・蘇生学

細目表キーワード：蘇生学

細目表以外のキーワード：ポストコンディショニング

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

これまで数多くの実験的脳保護薬が開発されてきたが、臨床応用されたものは殆どない。新たな治療戦略の1つとして内因性の脳保護作用のメカニズムを賦活するプレコンディショニング作用が報告されてきたが、これは、脳虚血、けいれん、高圧酸素付加、代謝抑制、酸化ストレス、低酸素、高体温などのそれ自身が神経細胞にとって致命的となりうる可能性を持つ刺激を、非致命的な程度に加える事で、その後の致命的虚血に対する耐性を獲得する現象として知られており、麻酔領域の薬剤でもイソフルレンなどの吸入麻酔薬においても報告されている。心大血管手術における選択的脳灌流など、臨床的に脳虚血が予測される場合に適応可能となるプレコンディショニングの手法と異なり、予期できない脳虚血が不幸にして一旦起こってしまった際に、虚血再灌流時期に意図的に間歇的な再灌流途絶を企てる事で保護作用を得るというポストコンディショニング作用は、周術期のみならず適応範囲も広いと考えられ、臨床応用されれば極めて有用かも知れない。

2. 研究の目的

本研究は申請者らが発見した電磁気刺激による脳脊髄虚血プレコンディショニング保護作用について、より臨床的に重要と考えられるポストコンディショニング作用の存否を確認し、周術期電磁気刺激を神経保護法として臨床応用へと展開させるための研究基盤を確立する事が目的である。計画していた具体的な研究項目は次のものであった。

1. 脳虚血モデルにおける、電磁気刺激によるポストコンディショニングの存否

2. 脊髄虚血モデルにおける、電磁気刺激によるポストコンディショニングの存否

(1) ラット脊髄虚血再灌流時に、事前に硬膜外腔に埋め込んだ刺激電極からの電気刺激及び経脊椎的に磁気刺激を施行し、病理学的、行動学的検討を加え、脊髄虚血における電気刺激によるポストコンディショニングの存否を検討する。

(2) ラット脳虚血再灌流時に、経頭蓋的に電磁気刺激を施行し、病理学的、行動学的検討を加え、脳虚血における電磁気刺激によるポストコンディショニングの存否を検討する。

3. 研究の方法

虚血再灌流傷害に対し骨髄間葉系幹細胞(BMSCs)の梗塞後脳室内投与は機能改善に効果的で、また脳損傷後には脳室近傍幹細胞系が活性化される事が報告されている。ポストコンディショニングとして電磁気刺激に効果があるとすれば、虚血後CSFに含まれるこれらの細胞系を賦活化するサイトカイン、

各種タンパクの出現が鍵となるかも知れない。ポストコンディショニング作用に最適な電磁気刺激条件を得る為に、虚血後に賦活化される幹細胞系まで念頭にいれ細胞内伝達機構が関与するかを検証し、また伝達機構に対する電磁気刺激の影響を調べた。それらの知見を元に脳虚血再灌流障害に対する電磁気刺激を用いたプレコンディショニング及びポストコンディショニング作用に関して検討した。

(1) 脳虚血モデルの作成

① 酸素+空気+イソフルラン麻酔

② 塞栓糸を用いた一過性中大脳動脈モデルを作製(虚血時間は15、75分間)

(2) 虚血後脳脊髄液中に出現するMAPK系蛋白の活性化および最適電磁気刺激条件の検討

① 15分虚血再灌流群(15-MCAO群)、75分群(75-MCAO群)の48時間後にCSFを採取しBMSCs培養液に添加し72時間後まで検討した。比較対象としてCSFのみ(CSF群)、添加なし(Control群)も作製し、細胞保護をin vitroで検討した。

② それぞれの群でAkt、Erk1/2の活性化を経時的に検討した。

③ ソレノイドコイルを用い各種電磁気刺激条件下のMAPK系細胞保護蛋白の活性化を検討した。

(3) 経頭蓋電磁気刺激によるプレコンディショニング及びポストコンディショニング獲得

実験グループ

① 70分間局所脳虚血のみ:再灌流後にTTC染色、及びcresyl violet染色、Modified neurological severity score(mNSS), Adhesive removal test, Rotarod testによる二重盲目試験を用い細胞死と行動評価を行う。

② 電磁気刺激によるプレコンディショニング群;虚血負荷の24時間前に経頭蓋電磁気刺激によるconditioning後に脳虚血モデル作製。

③ 電磁気刺激によるポストコンディショニング群;虚血再灌流後に各種条件で電磁気刺激を施行する。

1) 虚血再灌流直後に修正型電気けいれんを負荷する。

2) 虚血再灌流直後に電磁気刺激を負荷する。

3) 虚血再灌流15分後に修正型電気けいれんを負荷する。

4) 虚血再灌流15分後に電磁気刺激を負荷する。

④ 再灌流前後で電磁気刺激を加え、electrical preconditioningに影響を与えるかを確認する。

⑤評価指標

a)行動学的評価; Modified neurological severity score (mNSS), Adhesive removal test, Rotarod test による二重盲目試験
b)梗塞体積; TTC 染色、及び cresyl violet 染色による二重盲目試験

⑥評価時期; 虚血再灌流から1日後、3日後、1、2、4、8週間の各時点で、3. の評価指標について検討を加える。

4. 研究成果

(1) 虚血後脳脊髄液中に出現する MAPK 系蛋白の活性化および最適電磁気刺激条件の検討

15-MCAO 群、75-MCAO 群で CSF 容量依存性に細胞増殖が認められ 15-MCAO 群において顕著であった。培養細胞は CD90(+), CD34(+), CD45(+), CD106(-) であり形態学的にも全ての群において間葉系細胞の特徴を有した。Akt, Erk1/2 については、CSF を加えた群全てで Erk1/2 は活性化し 15-MCAO 群で顕著であった。電磁気刺激を用いて in vitro において MAPK 系の活性化をもたらす条件を検討した所また BMSCs に対するソレノイドコイルを用いた 2mT の電磁気刺激において Western Blott 法による解析では、Erk1/2 の活性化及び p38 の抑制が認められ、電磁気刺激による細胞保護作用の可能性が示唆された。

(2) 経頭蓋電磁気刺激によるプレコンディショニング及びポストコンディショニング獲得

虚血前後の血圧、血糖、血液ガス、ヘマトクリットに、群間差はなかった。梗塞体積は、コントロール群 (と比べて、プレコンディショニング群が有意に少なかった。180 分虚血中の神経学的所見に差はなかったが、2, 4, 7 日後の所見はプレコンディショニング群が有意に良好であった。ポストコンディショニング群に関しては、いずれの電磁気刺激条件においても、コントロール群と比較し梗塞体積及び神経学的所見に保護効果は認められなかった。

結語

電磁気刺激により in vitro においては細胞保護をもたらす細胞内伝達機構が活性化される。しかしながら、脳虚血モデルにおいては、それらの条件を用いた虚血再灌流時のポストコンディショニング作用を確認することは出来なかった。

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 7 件)

1. Kuboyama K, Harada H, (2 番目、6 人中) Astrocytic P2Y₁ receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia. JCBFM in press (査読有)

2. Orito K, Harada H (2 番目、6 人中) Cerebrospinal Fluid following Cerebral Ischemia Accelerates the Proliferation of Bone Marrow Stromal Cells in vitro. The Kurume Medical Journal; (2010) 57; 21-28 (査読有)

3. 原田秀樹 (1 番目、3 人中) 総説: ポストコンディショニングによる脳保護の可能性 - 心筋虚血から脳虚血への展開 - 臨床麻酔; 2010; (34) 1253-1257

4. 脇田瞳, 原田秀樹, (11 番目、11 人中) 側彎症手術における術中脊髄モニタリング 脊椎・脊髄の解剖学的偏位と術中モニタリング波形の変化. 脊髄機能診断学; 2010; (31) 110-117 (査読有)

5. 山田圭, 原田秀樹, (11 番目、11 人中) 術中脊髄モニタリングにおける true positive 例の神経学的予後と術中対応策の考察. 西日本脊椎研究会誌; 2009; (35) 39-45 (査読有)

6. 山田圭, 原田秀樹, (10 番目、10 人中) 術中脊髄モニタリングで警告発信を行う基準の検討 CMAP によるモニタリングの問題点を含めて. 西日本脊椎研究会誌; 2008; (34) 139-144 (査読有)

7. 山田圭, 原田秀樹, (10 番目、10 人中) 特発性側彎症における術中脊髄モニタリング 矯正操作後の MEPs の波形の変化についての考察. 脊髄機能診断学; 2008; (29) 127-132 (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. Bilateral bispectral index monitoring

during experimental surgery for the middle cerebral artery occlusion in rats
Gotannda Y, Harada H, (2 番目、8 人中)40th Annual Meeting Neuroscience (2010 年 11 月・サンディエゴ)

2. 側彎症手術における術中脊髄モニタリング～術前の脊椎・脊髄解剖学的評価と術中誘発電位変化との関連性～
津田勝哉, 原田秀樹, (2 番目、6 人中)
日本麻酔科学会第 57 回学術集会 (2010 年 6 月・福岡)

3. Propofol Prevents Anandamide-Induced Apoptosis Via Non-Connabinoid Receptor-Mediated Mechanism
Kameyama N, Harada H, (4 番目、6 人中)
ASA Annual Meeting (2009 年 10 月・ニューオリンズ)

4. Propofol Prevents Anandamide-Induced Cell Death in Endothelial Cells
Itoh T, Harada H, (2 番目、5 人中)
ASA Annual Meeting (2009 年 3 月・サンディエゴ)

5. 脳虚血後脳脊髄液は骨髄間葉系幹細胞の増殖を加速する
原田秀樹, (1 番目、4 人中)
第 13 回日本神経麻酔・集中治療研究会 (2009 年 3 月・大阪)

6. Role of adrenoceptors in the regulation of DARPP-32 phosphorylation in neostriatal neurons
Hara M, (1 番目、5 人中)
Neuroscience 2008 (2008 年 11 月・ワシントン)

7. Cerebrospinal fluid after transient cerebral ischemia supports viability and proliferation of born marrow stromal cells in vitro for regenerative medicine
Harada H, (1 番目、5 人中)
Neuroscience 2008 (2008 年 11 月・ワシントン)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：実験動物用脳波電極
発明者：原田秀樹
権利者：久留米大学
種類：特許願
番号：特願 2010-174737
出願年月日：2010 年 9 月 3 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：脳内血流測定デバイス
発明者：原田秀樹
権利者：久留米大学
種類：特許
番号：4491582
取得年月日：2010 年 4 月 16 日
国内外の別：日本
〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 秀樹 (HARADA HIDEKI)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：30198923

(2)研究分担者

三島 康典 (MISHIMA YASUNORI)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：30258470
新山 修平 (NIIYAMA SHUHEI)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：40258455
原 将人
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：10330862