

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791075  
 研究課題名（和文） 脊髄虚血後の遅発性対麻痺の病態と炎症性メディエータの関与  
 研究課題名（英文） The influence of inflammatory mediators on the pathophysiology of delayed paraplegia after spinal cord ischemia.  
 研究代表者  
 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

研究成果の概要（和文）：近年注目されている炎症性サイトカインである high mobility group box 1 (HMGB1) 蛋白を阻害することで脊髄虚血による神経損傷が軽減するかどうか検討した。家兔を対照群（C群、生理食塩水投与）、低用量抗 HMGB1 抗体投与群（L群、総量 1000  $\mu$ g）、高用量抗 HMGB1 抗体投与群（H群、総量 2000  $\mu$ g）の3群に分けた。家兔の腹部大動脈を13分間遮断することで脊髄虚血を作成した。再還流後、7日間後肢運動機能（5段階評価、4:正常、0:麻痺）を評価し、病理組織標本で脊髄前角の正常細胞数を測定した。3群間に後肢運動機能のスコア並びに脊髄前角の正常細胞数の差はみられなかった。抗 HMGB1 抗体単独での脊髄虚血保護効果は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：Recently, high mobility group box 1 protein (HMGB1) related to cytokine gets into the limelight. We investigated whether the ischemic spinal cord injury in rabbits was reduced to inhibit the activation of HMGB1. We assigned rabbits to three groups (n=5 in each); a control group, low dose anti- HMGB1 antibody group (segmental administration of 1000  $\mu$ g anti- HMGB1 antibody), high dose anti- HMGB1 antibody group (segmental administration of 2000  $\mu$ g anti- HMGB1 antibody). Spinal cord ischemia was produced by occluding the abdominal aorta for 13 min. After the reperfusion, hindlimb motor function (score range: 4, normal to 0, paraplegia) was assessed daily for 7 days, and then the number of normal neurons in the anterior spinal cord was counted. There were no significant intergroup differences in neurological scores and the numbers of normal neurons. The ischemic spinal cord injury in rabbits was not reduced to inhibit the activation of HMGB1.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：脳・脊髄虚血

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・神経科学、脊髄、虚血、麻酔科学

## 1. 研究開始当初の背景

胸腹部大動脈瘤手術後に生じる脊髄虚血（対麻痺）は、様々なモニタや術中管理の改良により減少傾向にあるものの、その発生を完全に防止できないのが現状である。特に近年の報告では手術後遅発性に対麻痺が生じる割合が増加傾向である。

遅発性対麻痺の原因として術後発症した脊髄虚血（低灌流、塞栓などが原因）の他に、術中発生した虚血の病態進行による遅発性神経細胞死が考えられている。遅発性神経細胞死の機序としてアポトーシスを支持する報告もあるが、我々は家兎を用いた脊髄虚血モデルでTUNEL染色による病理組織学的評価と虚血後脊髄組織のDNA解析からアポトーシスとの関連は乏しいこと、病態進行と一致した経時的なマクロファージの増殖所見から炎症反応の関与を報告した。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。ただし近年、病態初期のサイトカインの放出を制御するだけでは有効な効果が得られないことから、病態後期メディエータの存在が検討され、現在HMGB1がkey mediatorとして注目されている。HMGB1は元来多くの細胞核内に存在し、DNAの立体構造保持に関わる蛋白であるが、細胞損傷により細胞外に多量に放出される（一部サイトカインの刺激によりマクロファージより能動的に放出）と更なるサイトカインの放出を促し、炎症の増幅、持続に関与するといわれている。

HMGB1は神経細胞内にも存在することは確認されており、基礎研究では培養神経細胞における虚血侵襲時のHMGB1添加が細胞傷害を増悪することや、マウスにおける脳虚血に伴うHMGB1発現が報告され、臨床研究でも脳梗塞患者で血清HMGB1が健常人より上昇していることを示した報告がある。HMGB1が上昇するのは8~32時間後といわれ、これは我々が継続して研究している遅発性対麻痺の病態進行の時間経過と一致（対麻痺発症、マクロファージの増殖：ともに脊髄虚血約24時間後）するため、その関与が強く疑われる。炎症反応、特にHMGB1の関与を検討することは、遅発性神経細胞死の機序解明につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

脊髄虚血・対麻痺は、未だその予防、治療

法が確立されていない。神経細胞は脆弱でかつ再生は困難なため、治療としては病態進行阻止（二次的傷害阻止）が目標となるが、病態メカニズムが複雑かつ多様で有効な治療に結びついていない。

われわれは家兎を用いた脊髄虚血モデルで遅発性対麻痺（遅発性神経細胞死）の病態に炎症反応が関与する可能性を見出した。この病態を解明することは病態進行阻止（二次的傷害阻止）に直結し、また炎症反応制御は比較的臨床応用可能と思われ、遅発性対麻痺（遅発性神経細胞死）の病態進行と炎症反応機序の発展的な検討を行いたいと考える。特に近年、病態初期に放出される炎症性サイトカインだけでなく、後期メディエータとしてhigh mobility group box 1(HMGB1)蛋白の存在が注目されている。遅発性神経細胞死の病態に後期メディエータの関連は強いと考え、後期メディエータであるHMGB1を制御することで病態進行阻止の可能性を評価することを主目的とする。

## 3. 研究の方法

家兎 (New Zealand White Rabbit, 2.5±0.2kg) を用いた。これら15羽を対照群 (C群、生理食塩水投与)、低用量抗HMGB1抗体投与群 (L群、総量1000μg)、高用量抗HMGB1抗体投与群 (H群、総量2000μg) の3群に分けた (n=5)。前日より一晩絶食にしたのち (飲水可)、イソフルランによる緩徐導入で全身麻酔をかけ、耳の静脈から点滴ルートを確認し、乳酸リンゲル液40ml/hrで輸液した。ペントバルビタール30mgを静注し、深麻酔下で気管挿管を行った。気管挿管後にベクロニウム1mg投与し筋弛緩を得た。酸素濃度40%で人工呼吸を行い、イソフルラン2~3%、ベクロニウム1mgの適宜単回投与 (総量4mg前後)、フェンタニル10μg/kgの適宜単回投与 (総量30μg/kg前後) で麻酔維持した。体温は食道温と傍脊柱温 (腰椎レベル) をモニタし、傍脊柱温が38度前後になるように、冷却、加温した。血圧をモニタするために、両大腿動脈よりカテーテル (PE-60) を挿入した。大動脈遮断部位の中枢と末梢に位置するように、右大腿動脈から18cm、左大腿動脈から5cm挿入し、ここからの採血により血液ガス分析を行った。血圧は中枢側の平均動脈圧が60mmHg以上になるように麻酔薬やフェニレフリン持続投与でコントロールした。またPaCO<sub>2</sub>が40±2mmHgになるように、一回換気量、呼吸回数を調節した。

家兔を側臥位とし、肋弓下を頭尾側方向に5cm切開し、後腹膜経路で腎動脈下レベルの腹部大動脈を表出させた。PE-60カテーテルで腎動脈下腹部大動脈をテーピングし、遮断用のゴム管の中を通した。

薬液は大動脈遮断直前、再灌流後6時間、18時間に静脈内投与した。抗HMGB1抗体はモノクローナル抗HMGB1ポリクローナル抗体

(SHINO-TEST Co. Sagamihara, Japan)を用いた。L群は大動脈遮断直前に400 $\mu$ g、再灌流後6時間、18時間に300 $\mu$ gずつ、総量1000 $\mu$ g投与した。同様にH群は大動脈遮断直前に800 $\mu$ g、再灌流後6時間、18時間に600 $\mu$ gずつ、総量2000 $\mu$ g投与した。C群は大動脈遮断直前に0.8ml、再灌流後6時間、18時間に0.6mlずつ(H群と溶液量同じ)投与した。

ヘパリン500単位を静注したのち、ゴム管にて大動脈を13分間絞扼遮断した。虚血前から再灌流15分後まで1分毎に分節的脊髄誘発電位(Segmental spinal cord evoked potentials:SSCEP)をモニタした。左坐骨神経を露出、刺激を行い、L5、6の椎弓に穿刺した電極で記録した。後シナプス要素と考えられているN3が平坦化することで、脊髄虚血の確認とし、N3が平坦化するまでの時間を3~7分とすることで、脊髄虚血の均一性を図った。

再灌流15分間観察し、ジアゼパム0.2mg/kgとセファゾリンナトリウム100mgを筋肉注射し、閉創した。麻酔薬投与を中止し、麻酔覚醒、抜管した。

再灌流12時間後と7日目まで毎日、後肢運動機能を観察した。運動機能スコアはDrummondらの方法(4:正常、3:後肢を体下に引き込むことができるが、正常ではない、2:重力に抗して後肢を動かすことは出来るが、体下に引き込むことが出来ない、1:重力に抗して後肢を動かすことは出来ない、0:完全麻痺)を利用した。

再灌流7日後、脊髄を取り出しホルマリン固定を行い、ヘマトキシリンエオジン染色にて病理組織学的評価を行った。この際、L5レベル脊髄前角正常細胞数を数え、定量的評価も行った。

データ値は平均±標準偏差で示した。生理学的諸量は分散分析を行い、群間の差を調べ、差の部位は多重比較検定(Scheffe検定)で確認した。後肢運動機能スコアと第5腰椎レベルの正常前角細胞数は、ノンパラメトリック検定(Kruskal-Wallis検定)を行った。P<0.05で有意差ありとした。

#### 4. 研究成果

生理学的諸量で3群間の差はなかった(表)。

再灌流7日目の後肢運動機能はC群で3:1羽、0:4羽、L群で1:1羽、0:4羽、H群

表 生理学的諸量

	平均動脈圧 (中値)(mmHg)	平均動脈圧 (末期)(mmHg)	食道温 (℃)	後背柱温 (℃)
<b>コントロール群</b>				
虚血前	82±8	82±21	37.8±0.2	38.1±0.1
虚血5分後	67±1	70±2	38.0±0.1	38.1±0.2
再灌流15分後	81±2	87±2	37.8±0.1	38.2±0.2
<b>HMGB1低用量群</b>				
虚血前	56±8	41±8	38.2±0.2	38.0±0.2
虚血5分後	80±13	8±1	38.1±0.2	38.1±0.2
再灌流15分後	81±7	83±5	38.2±0.2	38.0±0.3
<b>HMGB1高用量群</b>				
虚血前	81±13	45±17	38.0±0.0	38.0±0.2
虚血5分後	62±12	8±3	38.0±0.0	38.0±0.1
再灌流15分後	83±6	80±5	38.0±0.2	38.0±0.2

	pH	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	血糖値 (mg/dL)	Hct (%)
<b>コントロール群</b>					
虚血前	7.35±0.07	183±28	40±3	157±21	32±3
虚血5分後	7.34±0.07	188±25	41±2	158±18	32±3
再灌流15分後	7.34±0.08	182±23	38±1	165±38	31±3
<b>HMGB1低用量群</b>					
虚血前	7.35±0.06	183±23	43±2	158±27	31±2
虚血5分後	7.35±0.06	201±17	41±2	162±25	31±4
再灌流15分後	7.35±0.02	188±17	38±3	148±17	29±2

で2:1羽、1:1羽、0:3羽であった。3群間の運動機能に差はなかった(図1)。

腰椎L5レベルの脊髄前角の正常神経細胞数も、C群で23-70個、L群で13-42個、H群で

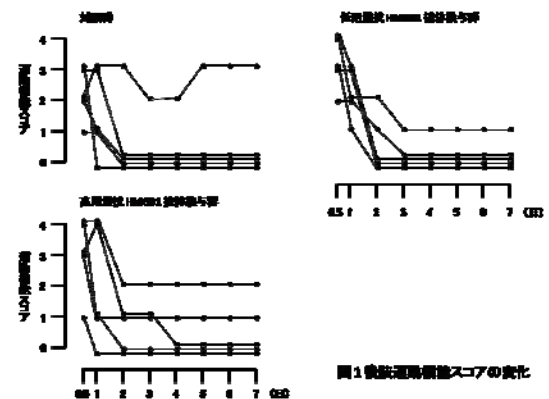
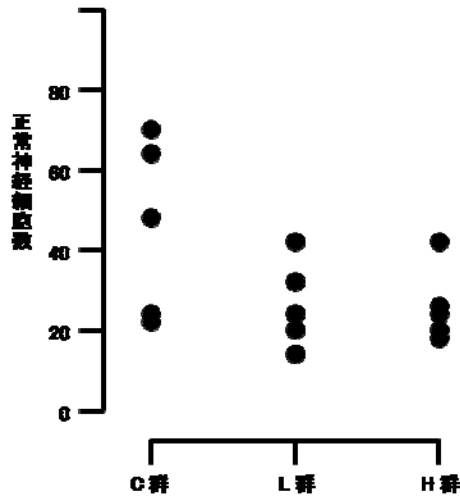


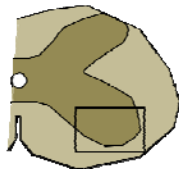
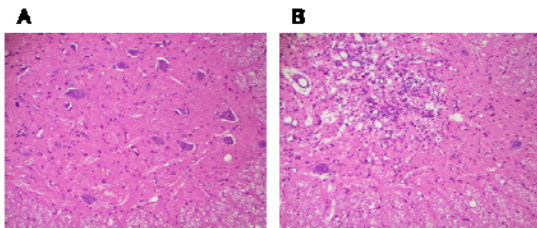
図1 後肢運動機能スコアの変化

19-41個(図2)で、3群間に差はなく、抗HMGB1抗体による脊髄保護効果は認められなかった。

**図2 脊髄前角正常神経細胞数(L5レベル)**



高度運動機能障害（スコア $\leq$ 1）を来した家兔は、脊髄前角に殆ど正常な神経細胞はみられず、炎症細胞の浸潤を認めた（図3）。



**図3 第5 腰髄レベル前角神経細胞**  
(HE染色、 $\times$ 100)

A: 後肢運動機能スコア4  
B: 後肢運動機能スコア0

脊髄虚血の病態にHMGB1の関与を示唆する報告もあるが、HMGB1のみを阻害するだけでは、保護はできないことが判明した。他の抗炎症薬との組み合わせにより、脊髄虚血保護の可能性を検討したい。

#### 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

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

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

松本 美志也 (MATSUMOTO MISHIYA)

山口大学・医学部・教授

研究者番号：60243664