

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670599

研究課題名(和文) 側副血行増強をターゲットとした一酸化窒素吸入による脊髄保護への挑戦

研究課題名(英文) Strategy for neuroprotective effect of NO inhalation against ischemic spinal cord injury

研究代表者

垣花 学 (KAKINOHANA, Manabu)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20274897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではラット大動脈遮断による虚血性脊髄障害に対する亜硝酸ナトリウムならびに一酸化窒素吸入の神経細胞保護効果について検討した。その結果、亜硝酸ナトリウム投与は、脊髄虚血後の脊髄血流を血圧依存的に増加させ、側副血行の増強作用を示すことが示唆された。しかし、一酸化窒素吸入では、その効果は認められなかった。亜硝酸ナトリウムに大動脈遮断中の脊髄血流増加効果は認められたが、脊髄神経保護効果は認められなかった。その理由としては、大動脈遮断解除による全身性アシドーシスにより亜硝酸ナトリウムの血管拡張作用が増強され、低血圧を誘発することが関与していると推測された。

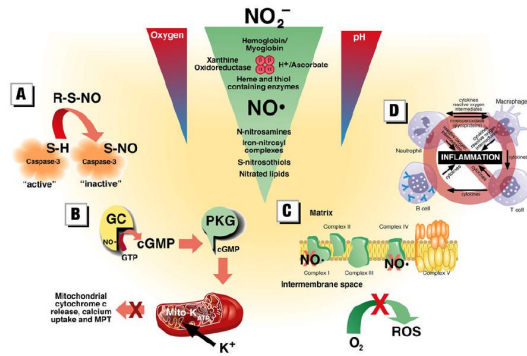
研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the neuroprotective effects of sodium nitrite or NO inhalation therapy against ischemic spinal cord injury. The results of in this study demonstrated that enhancement of collateral network by sodium nitrite, but not NO inhalation, could produce significant increase in spinal cord blood flow during spinal cord ischemia. However, this increase in spinal cord blood flow could not induce neuroprotection against spinal cord ischemia.

研究分野：麻酔科学

キーワード：一酸化窒素 脊髄虚血 遅発性脊髄障害 側副血行路 亜硝酸ナトリウム

1. 研究開始当初の背景

大血管手術後の虚血性脊髄障害は、未だ解決されない術後合併症である。現在の脊髄保護戦略の趨勢は、側副血行路からの血流維持である。近年、一酸化窒素 (NO) 吸入療法による肺外臓器の保護効果が注目されている。(図1)



(図1)

その機序として、吸入された NO の代謝産物のひとつである Nitrite (NO<sub>2</sub>) が全身に循環し、低酸素環境 (虚血部位) で NO に還元されることにより側副血行路からの血流改善が起こると報告されている (図2)。



(図2)

2. 研究の目的

本申請研究では、この吸入 NO の肺外効果として期待できる脊髄への側副血行路の増

強を目的とした“NO吸入療法による脊髄保護”をテーマとして、神経学的、電気生理学的、病理組織学的そして分子生物学的手法によりその効果を証明し臨床応用に繋げたいと考えている。

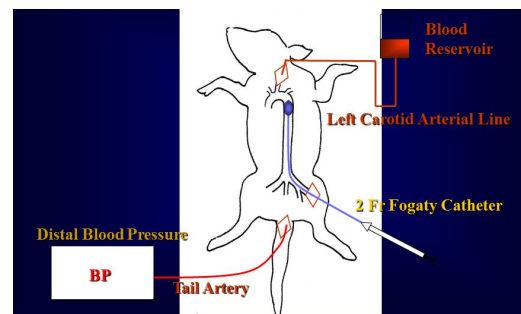
3. 研究の方法

(1)ラット脊髄虚血モデル作成(Taira Y, et al. Stroke 1996 ; 27 : 1850 - 7)(図3)

雄SDラット(BW:350~400g)をイソフルラン+60%酸素で全身麻酔し、経口挿管する。尚、亜硝酸ナトリウム飲水群では虚血5日前から2mM亜硝酸ナトリウムを飲水させ、またNO吸入群ではNO40ppm吸入を麻酔開始時から行った。尾動脈からPE-50カテーテル(血圧測定)、左大腿動脈から2Fr.フォガティカテーテル(胸部下行大動脈まで挿入:約11cm)、左総頸動脈から20G.テフロンカテ挿入(脱血用)。

ヘパリン200単位投与後、フォガティカテーテル先端バルーンを膨張、同時に左総頸動脈から脱血にて脊髄虚血作成。

(頸動脈からの脱血リザーバーは、実験台より52cm(40mmHg)、78cm(60mmHg)、104cm(80mmHg)と高さを調節することで遮断中枢側血圧を調節することが可能:血圧変化に伴う側副血行路の血流変化を評価した。)



(図3)

8分間の脊髄虚血後にバルーン収縮および脱血した血液の返血。

閉鎖し麻酔から覚醒させた。

(2) ラット脊髄血流測定(既に施行可能)

ラットを、Sham 群、亜硝酸ナトリウム飲水 + 脊髄虚血群、水道水飲水 + 脊髄虚血群に分ける。全身麻酔下(上記1参照)に、腹臥位とし第10胸椎から第1腰椎レベルに切開。

第11/12胸椎間から硬膜外腔アプローチした。

第11/12胸椎間硬膜外腔にペンシルタイプレーザー血流計(径1.5mm)を装着し血流測定。

測定ポイントは虚血前・中(遮断中枢側血圧40、60、80mmHg)虚血後10分とした。

(遮断中枢側血圧を変化させることによる脊髄血流変化がNO吸入群で酸素吸入群と比較し増加することを確認した。)

(3) ラット脊髄虚血モデルにおける神経学的運動機能評価 ~NO吸入群と酸素吸入群との比較~

ラットは、亜硝酸ナトリウム飲水群と酸素水道水飲水群とした。

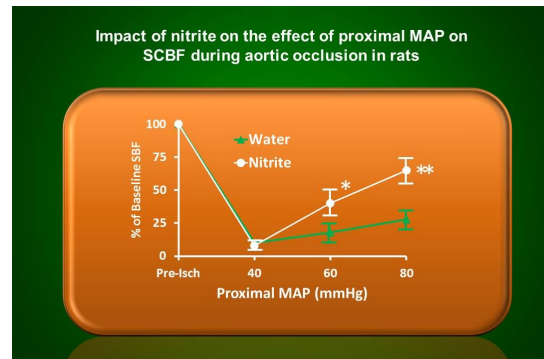
脊髄虚血は、遮断中枢側血圧は40mmHg、虚血時間は6~10分間で時間をふり、Quantal bioassay法を用い50%のラットが対麻痺となる虚血時間(P50)を求め、両群間で比較した。

#### 4. 研究成果

(1) 脊髄虚血中の脊髄血流に及ぼす亜硝酸ナトリウム飲水の効果

大動脈遮断中の脊髄血流は、対照群において遮断中枢側血圧上昇により有意に増加した。さらに亜硝酸ナトリウム飲水群では、中枢側血圧上昇による脊髄血流増加効果が、著明に増加していた。(図4)これは亜硝酸が虚血部位で一酸化窒素に還元され、その

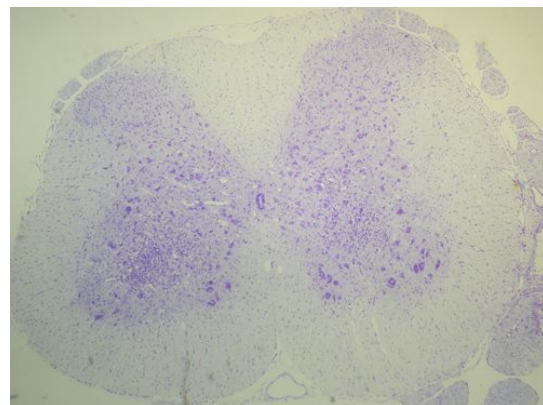
一酸化窒素が側副血行に関わる血管を拡張させ、側副血行路の血流を増加させたためと考えられた。



(図4)

(2) 亜硝酸ナトリウム飲水による虚血性脊髄障害への影響

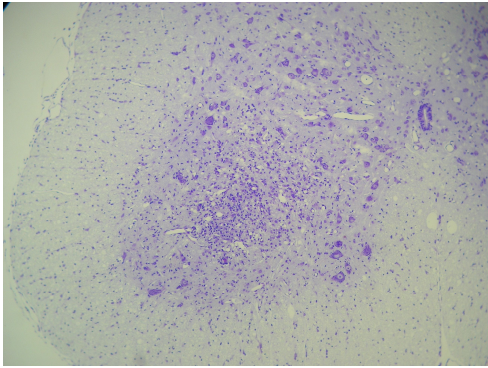
大動脈遮断による虚血性脊髄障害に対する亜硝酸ナトリウム飲水の効果は、脊髄血流は増加したにも関わらず神経保護効果は認められなかった。また、組織学的にも腰椎膨大部のlamina V~VIIの中型神経細胞の障害が認められ(図5)それは水道水群の障害と同等であった。



(図5)

(3) ラット脊髄虚血モデルにおける神経学的運動機能評価 ~NO吸入群と酸素吸入群との比較~

大動脈遮断による虚血性脊髄障害(遮断中枢側血圧40mmHg)に対する亜硝酸ナトリウム飲水の効果は、脊髄血流は増加したにも関わらず神経保護効果は認められなかった(図6)



(図6)

今回の結果から、亜硝酸塩はラット大動脈遮断による脊髄虚血時に、虚血部位の低酸素、アシドーシスなどにより一酸化窒素へ還元され、その一酸化窒素が側副血行路に関わる血管を拡張させ、脊髄血流を血圧依存的に増加させたと考えられた。しかしながら、亜硝酸ナトリウムを慢性投与されたラットでは、対照群と比較しても神経学的予後に影響を及ぼさなかった。その原因としては、虚血部位での側副血行路増強による脊髄血流増加効果が、神経学的予後を改善させるまでに至っていなかった可能性があると思われた。

また、一酸化窒素吸入により脊髄虚血後神経学的予後が改善しなかった要因としては、一酸化窒素の濃度、一酸化窒素吸入による血中亜硝酸濃度あるいは虚血部位で発生したNOによるフリーラジカル増加(ペロキシニトレート)が考えられた。

#### 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 2 件)

T Fukuda, M Kakinohana, C Takayama, M Matsushita, K Sugahara. Dietary supplementation with sodium nitrite can exert neuroprotective effects on global cerebral ischemia/reperfusion in mice. J Anesth 2015 (in press) 査読有

M Kakinohana. Protective effects of anesthetics on the spinal cord. Curr Pharm des 2014 ; 20 : 5744 – 50 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
出願年月日：  
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)  
琉球大学大学院・医学研究科・教授  
研究者番号：20274897

##### (2) 研究分担者

中村清哉 (NAKAMURA, Seiya)  
琉球大学大学院・医学研究科・准教授  
研究者番号：00363680

比嘉達也 (HIGA, Tatsuya)  
琉球大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10404568

和泉俊輔 (IZUMI, Shunsuke)  
琉球大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90649401

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：