

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10507

研究課題名(和文)低酸素時の至適換気方法と血管作動薬の脳保護効果

研究課題名(英文) Ventilatory effects and neuroprotective effects of vasoactive drug under hypoxia

研究代表者

石山 忠彦 (ISHIYAMA, Tadahiko)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：90293448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの左内頸動脈結紮切離後に低酸素環境に15分間暴露した。暴露後、ノイロトロピン2mlまたは生食2mlを腹腔内投与した。1週間後に生存率、神経学的欠損スコアを評価した。海馬歯状回・大脳皮質の神経細胞数や、マクロファージ/ミクログリアに発現するCD68陽性細胞数も評価した。脳梗塞巣体積は、脳虚血・低酸素暴露24時間後に測定した。1週間後の生存率と神経学的スコアはノイロトロピン群で有意に高かった。海馬歯状回・大脳皮質の細胞数やCD68陽性細胞数には有意差はなかった。脳梗塞巣体積は、ノイロトロピン群で有意に減少していた。低酸素下での脳虚血に対して、ノイロトロピンが保護効果を有す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mice were exposed to hypoxia for 15 minutes combined with cerebral ischemia caused by left common carotid arterial ligation. After the exposure to hypoxia/ischemia, either normal saline or neurotrophin was injected intraperitoneally. We evaluated survival rate and neurological deficit score after 1 week. We examined the number of neurons in the hippocampal dentate gyrus and cerebral cortex, and also evaluated immunostaining for CD68 expressed in macrophage and microglia. We measured the cerebral infarction volume 24 hours after hypoxia/cerebral ischemia exposure. The survival rate and neurological score after 1 week were significantly higher in the neurotrophin group. There were no differences in the number of cells in the hippocampal dentate gyrus and cerebral cortex, and the number of CD68 positive cells. Cerebral infarct volume was significantly reduced in the neurotrophin group. We concluded that neurotrophin may have a protective effect on cerebral ischemia under hypoxia.

研究分野：麻酔と脳循環

キーワード：低酸素 脳虚血 ノイロトロピン

1. 研究開始当初の背景

低酸素血症は麻酔中に起こりうる重篤な合併症の一つである。緊急手術を受ける患者で術前より低酸素状態の陥っている場合や、肺手術のようにあらかじめ術中に一時的な低酸素が予測される場合もある。低酸素状態による脳障害は、患者の予後に重大な影響をもたらす。どの程度の低酸素により脳障害が起きるのかについては、まだよくわかっていない。低酸素による脳傷害に対して、どのような薬物に脳保護効果があるのかについての知見もない。麻酔中予期せぬ低酸素状態や心停止に陥ることは散見される。脳動脈瘤クリッピング術での脳動脈の一時クリップ、人工心肺での脳灌流低下・停止など一時的な脳虚血が予見される手術もある。一過性低酸素状態と脳虚血を組み合わせた時の、脳傷害の程度は研究されていない。また脳保護効果のある薬物についての知見もない。ワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液のノイロトロピンは、下行性抑制系賦活作用や末梢循環改善作用があり、帯状疱疹後神経痛などの神経傷害性疼痛の治療に用いられている。動物実験では坐骨神経傷害モデルで末梢神経保護作用が報告されている。しかし、ノイロトロピンが中枢神経保護作用を有するのかわかっていない。近年脳虚血や脊髄虚血の動物モデルを用いた研究で、ベータ遮断薬のランジオロールが神経保護作用を持つことが報告されている。しかし、ランジオロールの脳血管に対する作用についての報告はない。ランジオロールは、脊髄保護作用があると言われているが、中枢神経保護作用があるのかわかっていない。

2. 研究の目的

マウスを低酸素状態に暴露させて、脳傷害の程度を検討する。

マウスを脳虚血と低酸素に暴露させて、脳傷害の程度とノイロトロピンの保護作用を検討する。

ウサギを脳虚血に暴露させて、ランジオロールの効果を検討する。

3. 研究の方法

低酸素状態に暴露させた脳傷害の程度を検討：マウスをイソフルラン麻酔下に低酸素として $PaO_2 = 40 \text{ mmHg}$ となるように吸入酸素濃度を 8~10% として 15 分間吸入させた。体温は、ヒーティングパッドを用いて 37 ± 0.5 に維持した。7 日後に脳を摘出し、脳梗塞巣を測定した。

脳虚血と低酸素に暴露させた脳傷害の程度とノイロトロピンの保護作用の検討：マウスをイソフルラン麻酔下に左総頸動脈を結紮・切離した。その後吸入酸素濃度 8% の低酸素に 15 分間暴露させた。脳虚血・低酸素

暴露後に生理食塩液 2 mL (生食群) またはノイロトロピン 2 mL (ノイロトロピン群) の腹腔内投与を行った。体温は、ヒーティングパッドを用いて 37 ± 0.5 に維持した。神経学的機能は、脳虚血・低酸素暴露後 1 週間の生存率および神経学的欠損スコア (neurological deficit score: 0 = 正常 ~ 5 = 死亡) を用いて評価した。海馬歯状回・大脳皮質の神経細胞数はクレシルバイオレット染色で検討した。また、マクロファージ/ミクログリアに発現する CD68 に対して免疫染色を行った。脳梗塞巣の体積は、脳虚血・低酸素暴露から 24 時間後に脳を摘出しクライオスタットで脳の切片を作成した。TTC 染色を行い脳梗塞巣の体積を測定した。

ランジオロールの正常脳血管への作用の検討：ニホンシロウサギをペントバルビタールで全身麻酔し、気管切開をして人工呼吸した。体温はヒーティングパッドを用いて 39.0 ± 0.5 に管理した。側頭部を開頭してクラニアルウインドウを作成した。クラニアルウインドウ内は人工髄液を用いて 0.1 ml/h で灌流した。人工髄液は、空気と 5% 炭酸ガスの混合気体でバブリングした。ランジオロールは人工髄液で溶解後、更に人工髄液で 10^{-14} 、 10^{-12} 、 10^{-10} 、 10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} mol/l に調整した。それぞれの濃度のランジオロールをクラニアルウインドウ内に 5 分投与し、その前後で脳血管径を測定した。

脳虚血に暴露させた後の、ランジオロールの効果の検討：ニホンシロウサギをペントバルビタールで全身麻酔し、気管切開をして人工呼吸した。体温はヒーティングパッドを用いて 39.0 ± 0.5 に管理した。側頭部を開頭してクラニアルウインドウを作成した。クラニアルウインドウ内は人工髄液を用いて 0.1 ml/h で灌流した。人工髄液は、空気と 5% 炭酸ガスの混合気体でバブリングした。全脳虚血は腕頭動脈、左総頸動脈、左鎖骨下動脈の 15 分間の遮断で作成した。コントロール群では人工髄液を、ランジオロール群では 10^{-6} mol/l のランジオロールを全脳虚血開始後 5 分より再灌流後 120 分まで灌流した。脳血管径の測定は、虚血開始 30 分前、虚血開始直前、虚血開始後 10 分、再灌流後 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 分に行った。

4. 研究成果

低酸素に暴露させたマウスでは、吸入酸素濃度を 8~10% と低下させても脳梗塞巣は認められなかった。吸入酸素濃度を 8% 以下にすると死亡するマウスが続出したため、吸入酸素濃度 8% 以下での脳傷害の程度についての検討は不可能であった。吸入酸素濃度 8~10% の低酸素状態への暴露は、マウスに対して脳傷害を来さないことがわかった。

左総頸動脈結紮・切離による脳梗塞と吸入酸素濃度 8% の低酸素状態への暴露では、ノ

イロトロピンを投与したマウスで、有意に生存率が高かった。(Log-Rank 検定)

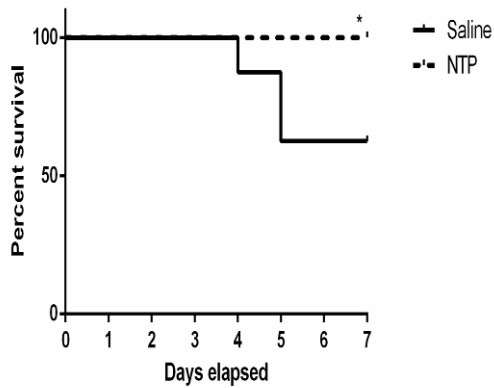
(図1)

図1：生存率の比較

生食群 vs. ノイロトロピン群 : 62.5% vs. 100%

Saline : 生食群

NTP : ノイロトロピン群



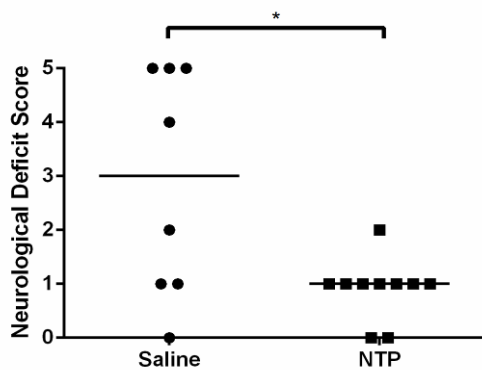
神経学的機能検査においては、ノイロトロピンを投与したマウスで、有意に神経学的欠損スコアが低く、脳の機能が保たれていた。(図2)

図2：神経学的機能検査

生食群 vs. ノイロトロピン群 : 3; 0-5 vs. 1; 0-2, (median; range)

Saline : 生食群

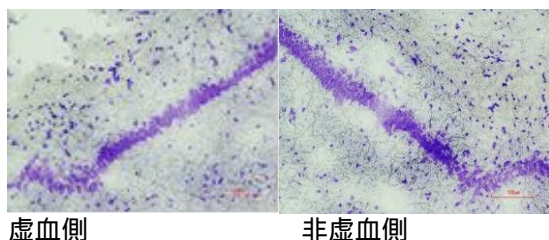
NTP : ノイロトロピン群



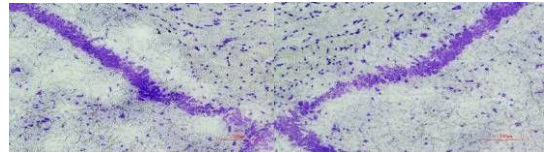
海馬歯状回および大脳皮質の単位面積あたりの生存細胞数は生食群とノイロトロピン群で有意差は無かった。(図3)

図3、4：海馬および大脳皮質の単位面積あたりの生存細胞数(クレシルバイオレット染色)

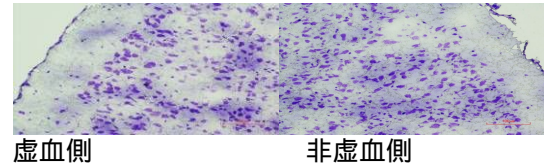
海馬 生食群



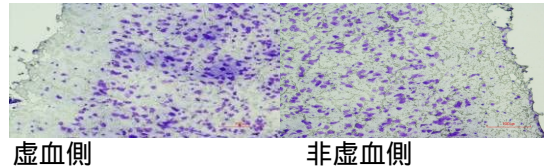
海馬 ノイロトロピン群



大脳皮質 生食群

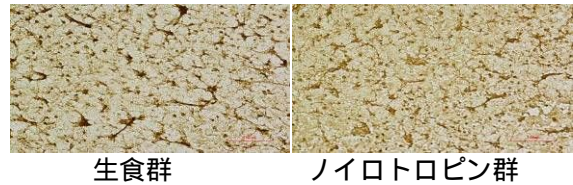


大脳皮質 ノイロトロピン群



CD68 陽性細胞は両群に有意差はなかった。(図4)

図4：CD68 に対する免疫染色



低酸素暴露 24 時間後の脳梗塞巣体積は、ノイロトロピン投与群で有意に少なかった。(図5、6)

図5：脳梗塞巣の体積

生食群 ノイロトロピン群

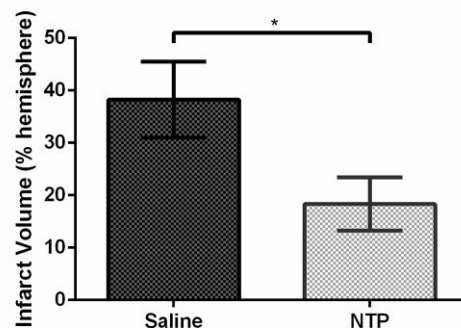


図6：脳梗塞巣の体積

生食群 vs. ノイロトロピン群 : 38.3±7.2% vs. 18.3±5.1% (mean±SEM)

Saline : 生食群

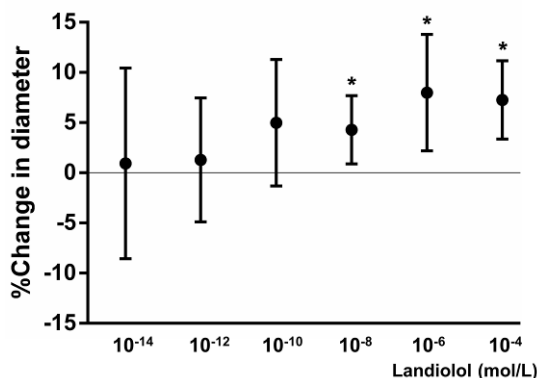
NTP : ノイロトロピン群



以上の結果から、低酸素単独では脳傷害を来さないが、脳虚血と低酸素の組み合わせでは、脳に傷害を来すことが分かった。この脳傷害に対して、ノイロトロピンは保護作用を有していた。低酸素・脳虚血が予想される手術の麻酔では、ノイロトロピンが有用であることが示唆された。

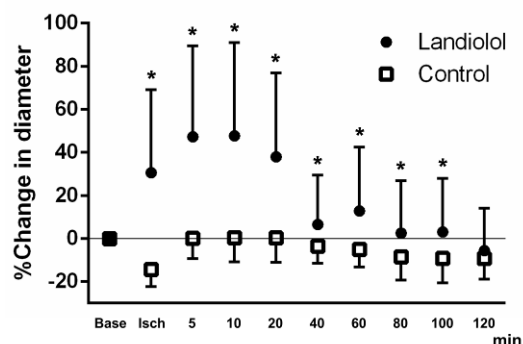
ランジオロールは正常の脳血管に対して、弱い拡張作用を示した。(図7)

図7: ランジオロールの正常脳血管に対する作用



ランジオロールは虚血後の脳血管に対して、著明な拡張作用を示した。(図8)

図8: 脳虚血・再灌流前後での脳血管径の比較



以上の結果から、ランジオロールは正常脳血管に比べて、虚血後の脳血管に対して強い拡張作用を有することがわかった。虚血後の脳血管拡張作用は脳保護に好ましい影響を与える可能性がある。

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 3 件)

菱山壮平、古藤田真和、三井一葉、石山忠彦、松川隆: マウス虚血低酸素モデルにおけるワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液の脳保護作用の検討. 第21回日本神経麻酔・集中治療学会、6月、

下関、2017

浅野伸将、新谷則之、鈴木和博、菱山壮平、石山忠彦: 脳虚血・再灌流の脳血管に対する、アドレナリン、又はアドレナリンとランジオロール併用の直接的効果の検討. 第19回日本神経麻酔・集中治療研究会、4月、岐阜、2015

菱山壮平、浅野伸将、石山忠彦、三井一葉、松川隆: ランジオロールがウサギの脳表動脈に及ぼす作用についてのcranial window法を用いた検討. 第19回日本神経麻酔・集中治療研究会、4月、岐阜、2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

石山 忠彦 (ISHIYAMA, Tadahiko)
山梨大学・大学院総合研究部・准教授
研究者番号: 90293448

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

玉木 章雅 (TAMAKI, Fumimasa)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号: 90324201

浅野 伸将 (ASANO, Nobumasa)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号: 30456470

新谷 則之 (SHINTANI, Noriyuki)
山梨大学・大学院総合研究部・臨床助教
研究者番号: 60456473

池本 剛大 (IKEMOTO, Kodai)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号: 50530127

(4)研究協力者

なし