

平成21年 5月26日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18689038

研究課題名 (和文) 遺伝子工学的手法を用いた脊髄微小血管の血流維持機構の解明と麻酔薬作用に関する研究

研究課題名 (英文) The regulatory mechanism of microvessels and anesthetic effects on micro-circulation in spine.

研究代表者

中畑 克俊 (NAKAHATA KATSUTOSHI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70332971

研究成果の概要：脊髄実質内の微小血管は脊髄神経細胞を栄養し、機能させるため重要な役割を果たしている。本研究では、大脳実質内微小血管と同様、脊髄でも一酸化窒素合成酵素を介する血管拡張反応を示すことができた。また一部の麻酔薬が、低酸素状態や高二酸化炭素状態などの病的状態における脊髄の灌流低下を改善させることが分かった。本研究は脊椎手術や脊髄損傷患者に対する治療等および麻酔・集中治療管理の発展に大いに寄与する

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
19年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
20年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
年度			
年度			
総計	17,100,000	5,130,000	22,230,000

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・蘇生学

キーワード：脊髄動脈、微小循環、一酸化窒素、カリウムチャネル、麻酔薬

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 脊髄は、末梢組織からの情報を脳へ伝達する経路であると同時に、脳からの情報を末梢に伝達し、生命機能を統合維持するための極めて重要な器官である。脊髄神経細胞を直接栄養している脊髄実質内微小血管はその摘出が困難であるため、これら血管における薬理学的研究はこれまで成功していない。

(2) 研究代表者は脳スライス切片を用い大脳皮質内の微小血管をコンピュータ上で解

析する手法をすでに確立させ、脳神経細胞に近接する微小血管についての薬理学的研究結果を報告してきた。これまでの報告から、脳虚血時、高炭酸ガスおよびアシドーシス時には血管拡張因子である一酸化窒素および血管平滑筋上のK<sup>+</sup>チャネルの活性化を介して脳血流が維持されることが明らかにされた。また、これら脳血流維持機構には脳実質内血管に近接する神経および神経支持組織から放出された一酸化窒素およびカリウムイオンが重要な因子であることも明らかに

してきた。

(3) 一方、虚血などストレス時に産生されたフリーラジカルや興奮性アミノ酸は、一酸化窒素合成や $K^+$ チャネルの活性を低下させ脳血流維持機構を障害する可能性が示唆されている。脊髄は脳同様に神経細胞からなる組織であるが、これら脳における知見をもってしても脊髄内血管における血流維持機構については全く解らない。

## 2. 研究の目的

(1) われわれは脳スライス切片を用い大脳皮質内の微小血管をコンピュータ上で解析する手法をすでに確立させ、脳神経細胞に近接する微小血管についての薬理学的研究結果を報告してきた。これまでの報告から、脳虚血時、高炭酸ガスおよびアシドーシス時には血管拡張因子である一酸化窒素および血管平滑筋上の $K^+$ チャネルの活性化を介して脳血流が維持されることが明らかにされている。また、これら脳血流維持機構には脳実質内血管に近接する神経および神経支持組織から放出された一酸化窒素およびカリウムイオンが重要な因子であることも明らかになっている。

(2) 本研究では、血流機構に関与する酵素やチャネルの選択的作用薬および拮抗薬を用いる薬理学的手法のほか、確実な因果関係解明のため神経型一酸化窒素合成酵素ノックアウトマウスなどの遺伝子操作した動物を使い遺伝工学的手法を用いて、脊髄実質内微小血管で以下の仮説を証明し、脊髄血流維持機構はもとよりこれら機構に及ぼす麻酔薬の作用機序を明らかにするものである。

① 脊髄虚血時に伴う低酸素、高炭酸ガスおよびアシドーシスは脊髄内微小血管を刺激し、一酸化窒素および $K^+$ チャネルの活性化を介して血流を維持している。同時に、これら病的刺激は近接する脊髄神経細胞および神経支持細胞を刺激し、一酸化窒素合成酵素の中でもとりわけ神経型酵素を介して産生された一酸化窒素が脊髄血流維持に重要な役割を果たしている。また、これら病的状態が及ぼす脊髄微小血管の反応性の変化には分節間および同分節内に部位差があり、その相違が一酸化窒素および $K^+$ チャネル活性の程度の違いを反映したものである。

② 麻酔薬は虚血時に発生するフリーラジカルや興奮性アミノ酸の作用を抑制し、一酸化窒素および $K^+$ チャネルを介した脊髄血流維持システムを賦活することで、病的状態における脊髄の灌流低下を改善させる。

## 3. 研究の方法

(1) ハロタンで麻酔したラットもしくはマウスを開胸し、冷却したクレブス液約 50ml を 100mmHg の圧をかけながら左心室より灌流し、血管内血液をすべて洗い流したあと頸髄を摘出する。次に、ピプラトームを用いて脊髄の腹側と背側を含むスライス標本 (厚さ約 125  $\mu\text{m}$ ) を作成する。この際、脊髄標本は酸素 95% + 炭酸ガス 5% で通気した 4°C 冷却クレブス液内を作成する。ついで、この脊髄スライス標本を酸素 93% + 炭酸ガス 7% (われわれのシステムではこの条件下で pH=7.4 となる) で通気し、37°C に加温したクレブス液で満たした観察用チャンパーに入れ、顕微鏡を用いて脊髄内動脈 (径 5-10  $\mu\text{m}$ ) を観察する。顕微鏡に装着したビデオカメラで動脈の画像を撮影し、メディアコンバータを介してコンピュータに取り込んだ後、動脈径の変化をコンピュータ画面上で血管径測定用のソフトウエアを用いて解析する。

① フロスタグランディン  $F_{2\alpha}$  (0.5  $\mu\text{M}$ ) で標本中の動脈を収縮させたのち、通気ガスを低酸素群では酸素 93% + 炭酸ガス 7% に、高炭酸ガス群では酸素 90% + 炭酸ガス 10% に切り替え、それぞれ低酸素あるいは高炭酸ガスによる脊髄血管拡張作用を観察する。観察チャンパー内の pH、酸素分圧、炭酸ガス分圧を現行の血液ガス分析装置で測定する。これまでの研究結果により、低酸素群では酸素分圧が 50mmHg 程度、高炭酸ガス群では炭酸ガス分圧が 50mmHg (pH=7.3) 程度となることが明らかとなっている。これらの脊髄血管拡張 (収縮) 作用が、各種  $K^+$ チャネル拮抗薬 (イペリオトキシン [large-conductance カルシウム依存性; 0.1  $\mu\text{M}$ ]、カリブドトキシン [intermediate-conductance カルシウム依存性; 0.1  $\mu\text{M}$ ]、アバミン [small-conductance カルシウム依存性; 0.1  $\mu\text{M}$ ]、グリベンクラミド [ATP 感受性; 5  $\mu\text{M}$ ]、4-アミノヒリディン [電位依存性; 1mM]、 $\text{BaCl}_2$  [内向き整流性; 10  $\mu\text{M}$ ]、一酸化窒素合成酵素阻害薬 (L-NAME; 100  $\mu\text{M}$ )、可溶性グアニレートシクレス阻害薬 (ODQ; 1  $\mu\text{M}$ )、NMDA 受容体拮抗薬 (MK-801; 10  $\mu\text{M}$ ) および各種フリーラジカルスカベンジャー (スーパーオキシドディスムターゼ [SOD; 150U/ml]、カタラーゼ [1200U/ml]、デフェロキサミン [1mM]) 処置で抑制されるか否かを検討する。

これら一連の検討により、低酸素および高炭酸ガスが脊髄内微小血管に及ぼす作用を知ることができ、その血管拡張作用が、 $K^+$ チャネル、一酸化窒素、NMDA 受容体あるいはフリーラジカルを介するか否かを明らかにできる。

② 同様に揮発性麻酔薬イソフルラン、セボフルラン (0.5-2.0 MAC) を通気ガスに付加、あるいは静脈麻酔薬プロポフォール (0.1-10  $\mu$ M)、ケタミン (0.1-10  $\mu$ M)あるいは局所麻酔薬リドカイン (1-50  $\mu$ M)を投与して、血管の反応を観察する。また、それぞれの麻酔処置後における低酸素および高炭酸ガスによる血管反応性についても観察する。これら麻酔薬による脊髄血管反応性の変化が、各種K<sup>+</sup>チャネル拮抗薬、一酸化窒素合成酵素阻害薬、可溶性グアニレートシクレス阻害薬、NMDA 受容体拮抗薬および各種フリーラジカルスカベンジャー処置で抑制されるか否かを検討する。

(2) 上記の薬理的検討内容を、前脊髄動脈灌流域とそれ以外の部位あるいは脊髄分節毎に分けて行い、脊髄微小血管反応性の部位差を明らかにする。

(3) 一酸化窒素合成酵素遺伝子ノックアウトマウス (神経型、内皮型、誘導型の3種)、ATP感受性K<sup>+</sup>チャネルノックアウトマウスにおいて、これらマウスの脊髄標本で、低酸素および高炭酸による脊髄血管拡張反応が、K<sup>+</sup>チャネル拮抗薬、一酸化窒素合成酵素阻害薬、可溶性グアニレートシクレス阻害薬、NMDA受容体拮抗薬および各種フリーラジカルスカベンジャーで影響を受けるか否かを検討し、これらの血管拡張の機序を明らかにする。次に、各種麻酔薬自体が脊髄微小血管に及ぼす作用を明らかにする。その作用機序に、K<sup>+</sup>チャネル、一酸化窒素、NMDA受容体あるいはフリーラジカルが関与するか否かを検討する。

以上の検討により、内皮型、神経型および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子欠損状態、あるいはATP依存性K<sup>+</sup>チャネル遺伝子変異状態で、低酸素および高炭酸ガスが脊髄内微小血管に及ぼす作用が、麻酔薬によりどのように修飾されるか、またその機序へのK<sup>+</sup>チャネル、一酸化窒素、NMDA受容体あるいはフリーラジカルの関与を明らかにできる。これらの研究結果から、脊髄血流維持機構における、一酸化窒素合成酵素およびK<sup>+</sup>チャネルの役割を明らかにできる。

#### 4. 研究成果

(1) 平成18年度は、マイクロベッセル観察システムを用いてラット頸髄内の微小血管を観察し、アセチルコリンによる血管弛緩反応のメカニズムを薬理的に検討した。

①ハロセン麻酔下にウィスターラットを開胸し、左心室から人工脳脊髄液を灌流させなが

ら右心房を切開脱血し、迅速に頸部脊髄を摘出した。4℃人工脳脊髄液中でピプラトームを用いて厚さ約125  $\mu$ mの脊髄スライス標本を作成した。この標本を酸素93%+炭酸ガス7%で通気した37℃人工脳脊髄液で満たした観察用チャンパーに入れ、倒立顕微鏡にて脊髄実質内の微小血管を観察した。血管平滑筋が壁在する内径3-10  $\mu$ mの微小血管を観察した。これらの血管はその径から毛細血管直前の抵抗血管であることが推測された。顕微鏡画像はビデオカメラで取り込み、デジタル変換した後コンピュータ画面上で解析ソフトを用いて血管径を計測した。

②酸素93%+炭酸ガス7% (P<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 40 mmHg)にて30分間通気した脊髄スライス標本にプロスタグランディンF<sub>2 $\alpha$</sub> を加え、標本内動脈を収縮させた。その後、アセチルコリン (0.1-10  $\mu$ M)を灌流液に追加した。アセチルコリンは濃度依存性に脊髄内微小血管を拡張させることが分かった。また、一酸化窒素合成阻害薬である1-NAME処置下では、アセチルコリンによる血管拡張反応はみられなかった。以上の結果から、我々が以前報告した大脳実質内微小血管と同様、脊髄でも一酸化窒素合成酵素を介する血管拡張反応が確認できた。

(2) 続いて、揮発性麻酔薬イソフルラン、セボフルラン (0.5-2.0 MAC) を通気ガスに付加、あるいは静脈麻酔薬プロポフォール (0.1-10  $\mu$ M)、ケタミン (0.1-10  $\mu$ M)を投与して、アセチルコリンによる血管拡張反応を観察した。現在、得られた結果をもとに、データを解析しており、大脳実質内微小細動脈との違いを検討中である。脊髄分節間および同分節内の前後部位による血管反応性の違いについても実験結果を検討中である。

(3) マイクロベッセル観察システムを用いてラット頸髄内の微小血管を観察し、前年度に行った薬理的検討内容を、前脊髄動脈灌流域とそれ以外の部位あるいは脊髄分節毎に分けて行った。またこれら結果をもとに、各種遺伝子ノックアウトマウスおよびトランジェニックマウスの脊髄実質内血管について検討を行った。

①まず、これらマウスの脊髄標本で、低酸素および高炭酸による脊髄血管拡張反応が、K<sup>+</sup>チャネル拮抗薬、一酸化窒素合成酵素阻害薬、可溶性グアニレートシクレス阻害薬、NMDA受容体拮抗薬および各種フリーラジカルスカベンジャーで影響を受けるか否かを検討した。これら病的状態が及ぼす脊髄微小血管の反応性の変化には分節間および同分節内に部位差があり、その相違が一酸化窒素およ

びK<sup>+</sup>チャンネル活性の程度の違いを反映したものであることを一部確認した。

②次に、各種麻酔薬自体が脊髄微小血管に及ぼす作用を観察した。その作用機序に、K<sup>+</sup>チャンネル、一酸化窒素、NMDA受容体あるいはフリーラジカルが関与するか否かを検討し、実験結果の解析を進めている。ついで、麻酔薬の低酸素あるいは高炭酸ガスによる脊髄血管拡張反応に及ぼす作用を検討し、その作用が、各種K<sup>+</sup>チャンネル拮抗薬、一酸化窒素合成酵素阻害薬、可溶性グアニレートシクレス阻害薬、NMDA受容体拮抗薬および各種フリーラジカルスカベンジャー処置で抑制されるか否かを検討した。一部の麻酔薬では、病的状態における脊髄の灌流低下を改善させることを確認したが、これらがフリーラジカルや興奮性アミノ酸、一酸化窒素およびK<sup>+</sup>チャンネルを介した反応であるかどうかを明確に確認するまでには至っていない。

#### 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)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中畑 克俊 (NAKAHATA KATSUTOSHI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70332971