

平成22年6月14日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591634

研究課題名（和文） 酸感受性イオンチャンネルを標的とした脊髄保護法の開発

研究課題名（英文） Target of acid sensitive ion channel for spinal cord protection

研究代表者

齋川 仁子（SAIKAWA SATOKO）

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20404569

研究成果の概要（和文）：

ラット脊髄虚血モデルを用い脊髄虚血後くも膜下腔に酸感受性イオンチャンネル阻害薬を投与し、その後の運動機能への影響を検討した。生理食塩水投与群(S群)では、全てのラットが虚血後から対麻痺となり72時間後まで継続した。一方、PCTX1 20 μ g投与群(P群)でも対麻痺が認められ、S群との間に差は見られなかった。ラット脊髄虚血後の運動機能障害に対し、酸感受性イオンチャンネル阻害薬は脊髄神経細胞保護効果を示さなかった。

研究成果の概要（英文）：

Recently, it is known that acid sensing ion channel (ASIC) in the central nervous system might be involved in the ischemic spinal cord injury. This study have shown whether the antagonist of ASIC could prevent the spinal cord ischemia in rats. Our data showed that, while IT morphine could induce irreversible paraplegia, Both PcTx and Flurbuprofen could prevent neurological function from morphine inducing paraplegia. Our data suggested that paraplegia after IT morphine might be involved into NO-guanylate cyclase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009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

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：ASIC、対麻痺、脊髄虚血、マイクログリア、アストロサイト、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

胸部下行大動脈遮断による脊髄虚血は、胸腹部大動脈手術後の最も悲惨な合併症である対麻痺を来しそれは患者および家族の生活に多大な損害を与える。血管外科手術で最も困難な領域であるため、現在でもその予防ならびに治療に関して世界中で様々な研究が行われている。しかし、血管外科医および麻酔科医はこの合併症の予防および治療について様々な手段を講じているが、その発生率はいまだ約5-30%と報告されており、いまだ解決できない領域となっている。

虚血性脊髄障害では、興奮性アミノ酸をはじめとする様々な神経伝達物質の放出とそれに引き続くさまざまなイオンチャンネルの開口ならびに細胞内情報伝達がその障害に関与していることは知られている。しかしながら、虚血性脊髄障害の病態生理ならびにその治療に関して多くの研究が行われてきたが、低体温療法にのみ明らかな神経保護効果が認められた (Kakinohana M, et al. Anesthesiology, 1999) だけで、それ以外の治療戦略 (興奮性アミノ酸拮抗薬、カルシウム拮抗薬、静脈麻酔薬、揮発性麻酔薬、虚血耐性、ミトコンドリア保護など) に関しては、未だ解決できていない状況である。このことから、虚血による細胞内ATP枯渇-細胞脱分極-神経伝達物質放出-細胞内Ca濃度上昇-過剰な酵素反応という従来の仮説以外に、その根幹にある細胞外酸性変化の関与が重要であると考えられるようになってきた。このような状況から、「従来のターゲット (興奮性神経伝達物質抑制、抗アポトーシス療法など) 以外に、その上流にある虚血性細胞外酸性変化とそれに引き続く細胞機能変化を解明すること」は、その治療戦略として非常に重要であると考えられる。最近、中枢神経系のシナプス小胞からの神経伝達物質放出に、細胞外のpHが影響しており、特にProton-gated currentsがこの現象に大きく関与していることが報告されている。最近の研究では、ASICが脳虚血の病態に大きく影響しているこ

とが報告されてきた。

2. 研究の目的

今回の研究目的は、薬理学、組織学的 (免疫染色) および分子生物学的手法を用い、虚血脊髄におけるASICの解剖学、生化学および生理学的分布変化・各サブタイプ別の関与およびその修飾による神経保護効果について検討することであった。

3. 研究の方法

(1) くも膜下カテーテル挿入

雄性SDラット (BW:300-350g) を、純酸素および5%イソフルラン吸入により麻酔導入を行った。その後、頭部固定手術台 (ステレオ装置) に頭部を固定し、後頭部より後頭-環椎間膜に切開を入れくも膜下腔へ到達した。その部位より、PE-10カテーテル (8.5cm) を尾側に挿入し、くも膜下カテーテルを留置した。麻酔から覚醒後、後肢運動機能異常のないことを確認し、5日間観察した。

(2) 脊髄虚血作成

雄性SDラット (BW:300-350g) を、60%酸素および2-2.5%イソフルラン自発呼吸吸入により麻酔維持した。尾動脈よりPE-50カテーテルを挿入し、血圧を測定した。左大腿動脈から、2Frフォガティカテーテルを挿入 (11cm) した。左頸動脈から20Gageのテフロンカテーテルを挿入し、脱血ラインとした。ヘパリン200単位投与後、フォガティカテーテルのバルーンを膨らませ、左内頸動脈から脱血し脊髄虚血侵襲を与えた。6分間虚血後、バルーンを収縮させさらに頸動脈より血液を戻した。全てのカテーテルを抜去し、創部を閉創し手術を終了した。麻酔から覚醒させ、後肢運動機能の評価した。

(3) 虚血脊髄における脊髄内ASICの変化

脊髄虚血24時間後に4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定した脊髄を摘出した。その脊髄から凍結切片を作成し、神経細胞 (NeuN)、アストロサイト (GFAP)、あるいはマイクログリア (OX-42) とASICに関する一次抗体を用い、蛍光性二次抗体を用い蛍光免疫染色した。

(4) くも膜下腔内ASIC拮抗薬投与による脊髄虚血後の下肢運動機能への影響

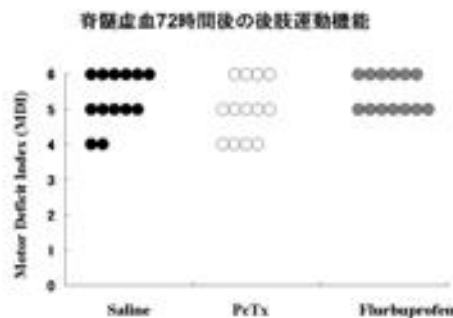
くも膜下カテーテルを挿入したラットに対し、脊髄虚血侵襲を与えた。脊髄虚血開始15分前に、くも膜下カテーテルより、ASIC阻害薬であるPcTx1あるいはFlurbuprofenを投与し、その

後の運動機能への影響を検討した。さらに、脊髄虚血72時間後に脊髄を摘出し、病理組織学的ならびに TUNEL 染色を施行した。

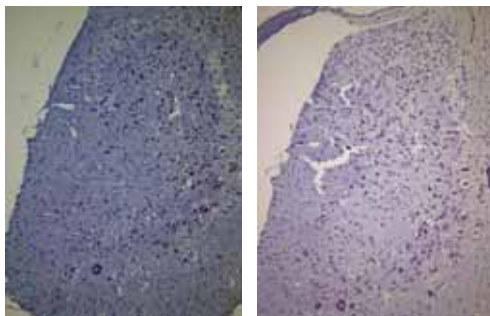
4. 研究成果

(1) 虚血脊髄における脊髄内 ASIC の変化
脊髄虚血 24 時間後の脊髄（腰髄膨大部）において、ASIC の発現を検討したが、Sham 手術後の脊髄と比較し、ASIC の発現に有意な差は認められなかった。（脊髄神経細胞上に ASIC の発現は認められた）

(2) くも膜下腔内 ASCI 拮抗薬投与による脊髄虚血後の下肢運動機能への影響

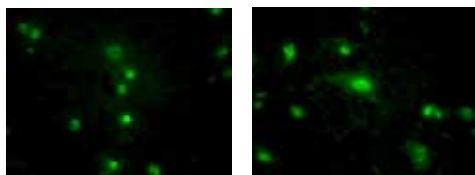


(3) 脊髄虚血後病理組織学のおよび TUNEL 染色検討



生理食塩水群

PcTx1 投与群



生理食塩水群

Flurbiprofen 投与群

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 4 件)

① Codeluppi S, Svensson CI, Hefferan MP, Valencia F, Silldorff MD, Oshiro M, Marsala M, Pasquale EB. The Rheb-mTOR pathway is

upregulated in reactive astrocytes of the injured spinal cord. J Neurosci 査読有 2009、29 巻、1093-104

② 垣花学 大動脈手術と脊髄保護. 査読有 2009 58 巻、315-26

③ 垣花学 胸部下行大動脈瘤手術における脊髄機能モニタリングの実際. Anest. 査読無 2008、12 巻、30-34.

④ Kakinohana M, Abe M, Miyata Y, Oshiro M, Saikawa S, Arakaki K, Kuniyoshi Y, Sugahara K. Delayed response of transcranial myogenic motor-evoked potentials monitoring to spinal cord ischemia during repair surgery for descending thoracic aortic aneurysm. J Anesth 査読有 2008 22 巻 304-7

[学会発表] (計 3 件)

① 垣花学: 脊髄保護を考慮した麻酔方法. 日本心臓血管麻酔学会第13回学術大会. 2008. 11. 1-2. 沖縄. Cardiovascular Anesthesia, 12:S75, 2008

② Manabu Kakinohana, Yuji Miyata, Satoko Saikawa, Tatsuya Fuchigami, Kazuhiro Sugahara: Preanesthetic HRV Can Predict Remifentanyl-Inducing Bradycardia during Induction of Anesthesia. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting October 18-22, 2008 Orlando, Florida, USA

③ 垣花学: 脊髄機能モニタリングの実際. 日本麻酔科学会第55回学術集会. 2008. 06. 12-14. 横浜.

[図書] (計 1 件)

① 垣花学 脳保護・脳蘇生, 坂部武史(編), 203-214, 克誠堂出版, 東京, 2008.

[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:

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

斎川 仁子 (SAIKAWA SATOKO)
国立大学法人琉球大学・医学部附属病院・
助教
研究者番号：20404569

(2) 研究分担者

垣花 学 (KAKINOHANA MANABU)
国立大学法人琉球大学・医学部・准教授
研究者番号：20274897
比嘉 達也 (HIGA TATSUYA)
国立大学法人琉球大学・医学部附属病院・
助教
研究者番号：10404568
大城 匡勝 (OSHIRO MASAKATSU)
国立大学法人琉球大学・医学部附属病院・
助教
研究者番号：00315483

(3) 連携研究者