

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591650
 研究課題名 (和文) ウサギの脊髄虚血モデルに対する Rho-kinase 阻害剤の脊髄保護効果の検討
 研究課題名 (英文) Protective effects of cold spinooplegia with fasudil against ischemic spinal cord injury in rabbits
 研究代表者
 中島 淳博 (NAKASHIMA ATSUHIRO)
 九州大学病院・助教
 研究者番号：10260704

研究成果の概要 (和文)：

ウサギの脊髄虚血モデルにおいて、Rho-kinase 阻害薬 (Fasudil<エリル注 SR>)の脊髄保護効果が示唆されました。Rho-kinase 阻害薬 (Fasudil<エリル注 SR>)の血管拡張による局所の血流改善作用や好中球遊走抑制による抗炎症作用等によって、神経細胞が保護された結果、対麻痺の合併を減少させようと考えられました。

研究成果の概要 (英文)：

This study has revealed that fasudil has a neuroprotective effect against ischemic spinal cord injury in rabbits. Inhibition of the Rho/Rho kinase pathway by fasudil reduces the number of infiltrating cells in the ventral horn and prolongs the expression of eNOS. In the near future, ROCK may be an important therapeutic target for paraplegia induced by spinal cord ischemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：脊髄虚血, rho-kinase inhibitor, 虚血再灌流障害, spinooplegia

1. 研究開始当初の背景

現在でも下行大動脈瘤手術や胸腹部動脈瘤手術時の、脊髄虚血による対麻痺合併率は、施設によって差はあるものの、数%から20%とも言われ、術後の患者様の QOL を左右する重篤な合併症の一つである。これまでも、脊髄保護目的に、様々な薬剤療法や低温療法などの動物実験および、脊髄ドレナージや各種モニターの臨床応用などがされてきたが、いまだに確立された脊髄保護法はないのが現状である。しかしながら、その一方

で、各種診断装置 (エコー, CT, MRI 等) の開発, 診断技術の進歩, 高齢化の進行, 生活様式の欧米化によって、動脈瘤の患者様は確実に増加しており、今後ますます、術後の対麻痺合併という事態は深刻化すると思われる。そのため、脊髄虚血による対麻痺の予防は、下行大動脈瘤手術や胸腹部動脈瘤手術の成績向上に大きく貢献することが期待される。

2. 研究の目的

下行大動脈瘤手術や胸腹部動脈瘤手術中の脊髄の虚血・再還流によって、アラキドン酸代謝系や nNOS などのフリーラジカル産生系が活性化し、その結果大量のフリーラジカルが産生される。このような酸化ストレスによって、直接的にも神経細胞は障害を受けるが、この酸化ストレスによって好中球やマクロファージなどの炎症細胞が活性化し、サイトカインを放出した結果、神経細胞のアポトーシスがおこり、梗塞領域が拡大するとも言われている。

Rho は標的蛋白である Rho-kinase (蛋白質リン酸化酵素) と結合することにより Rho-kinase を活性化する。活性化された Rho-kinase はミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化を促進し、MLC 脱リン酸化を阻害することでアクチンとミオシンの親和性を増加させ、心筋の収縮を増加させることが主な働きとされていた。しかし、この他にも、Rho-kinase の活性化増大は、心筋肥大、炎症性サイトカインの放出や炎症細胞の浸潤、遺伝子発現にまで影響を及ぼし、さらに急性・慢性の心血管障害形成を引き起こし、特に冠動脈攣縮、動脈硬化、虚血再灌流障害、心筋梗塞後の remodeling への関与が報告されている。

Rho-kinase 阻害薬 Fasudil は従来より血管拡張薬としてクモ膜下出血後の脳血管攣縮に使用されている。また近年、rho-kinase 阻害薬はラットの脳虚血モデルにおいて梗塞サイズを縮小させることが報告されており、脳梗塞急性期の治療薬として期待されている。虚血再灌流障害に対する Rho-kinase inhibitor の有用性は他に、肝臓の分野でも研究され有用性が証明されているが、脊髄における有用性を示した報告はない。今回我々はウサギの脊髄虚血モデルを用いて虚血脊髄組織における Rho-kinase 活性および Fasudil の効果を検討・解析し、臨床応用をめざす。

3. 研究の方法

2.5kg~3kg の日本白ウサギの脊髄虚血モデルを用いて本研究を行う。モデルを 3 群に分け、大動脈遮断直後に分節された腰動脈内にカテーテルを通して、それぞれ約 30 秒かけて注入する。Group1: 38℃ の生理食塩水 (5ml/kg), Group2: 4℃ の生理食塩水 (5ml/kg), Group3: 4℃ の Fasudil (0.1mg/kg) + 生理食塩水 (Total 5ml/kg)。それぞれの群での再灌流後のウサギ後脚の運動機能、生化学的検査、病理学的所見を比較検討する。ウサギ後脚運動機能に関しては Tarlov score を用いて、詳細に評価する。組織学検査では HE 染色での脊髄前角細胞の necrosis の有無、炎症細胞浸潤の程度を観察する。また、免疫染色での eNOS の発現を観察する。以上の点において、Rho-kinase

inhibitor 投与群と用いなかった群で比較検討を行う。

再還流後の脊髄内の Rho-kinase の発現が増加しているとすれば、endothelial nitric oxide synthase (eNOS) の発現が down regulate され、NO の産生も減少すると考えられる。本施設では平成 14 年度の科学研究費基盤研究(C) (研究実績報告は平成 16 年度) により心筋ではあるが、再灌流時の活性酸素スカベンジャーとしての NO の重要性を報告した。本研究は脊髄においても、同様の結果が期待でき、さらに臨床応用をめざして検討しようとするものである。脊髄内で、Rho-kinase inhibitor により Rho-kinase 活性を抑え、再灌流障害を回避し、虚血・再還流後の運動機能 (脊髄機能) が保たれることが証明されれば、その結果、臨床応用への道につながる事が期待される。

動物実験

本動物実験は九州大学大学院医学研究院動物実験倫理審査委員会の承認を得て行われた。

① 髄虚血モデル

24G の留置針を marginal ear vein に留置する。左総頸動脈に 24G の留置針を留置し中枢側動脈圧ラインとする。深部温を直腸温でモニターし、38℃ を維持する (電気ランプ使用)。全身麻酔後に右大腿動脈より 5F カテーテルを腹部大動脈に向けて 10~12cm 挿入する (これは、左腎動脈と大動脈分岐部の間に位置する)。径開腹操作で腹部大動脈を露出し、左腎動脈の抹消側、分岐部の中枢側および後腸間膜動脈にテープをかける。また、同時に左腎動脈~分岐部の間にカテーテルの先端があることを確認する。ヘパリン (200U/kg) を投与し、左腎動脈の抹消側、分岐部の中枢側および後腸間膜動脈を直視下に遮断 (左腎動脈~分岐部までの腰動脈のみ分節) して 15min 閉塞する。閉塞解除後、カテーテルを抜去し、創を 2 層で縫合する。

② Rho-kinase inhibitor (fasudil) の注入

モデルを 3 群に分ける。大動脈遮断直後に分節された腰動脈内にカテーテルを通して、それぞれ約 30 秒かけて注入する。Group1: 38℃ の生理食塩水 (5ml/kg), Group2: 4℃ の生理食塩水 (5ml/kg), Group3: 4℃ の Fasudil (0.1mg/kg) + 生理食塩水 (Total 5ml/kg)。

③ データ解析

実験中は、心拍数、心電図、血圧、は連続的にアナログ-デジタル変換機 (PowerLab System, AD Instrument, Ltd, Dunedin North, New Zealand) で変換し、Windows コンピューターに記録保管する。再還流後、4 時間、8 時間、24 時間の時点でウサギ後脚の運動機能を判定

する。24時間の判定終了後、実験動物は過量の Fentanyl citrate と塩化カリウムで安楽死させる。組織学的評価、生化学的評価のために、第2腰椎～第5腰椎を摘出する。

後脚運動機能:再還流後、4時間、8時間、24時間の時点でウサギ後脚の運動機能を Tarlov score (0 : no movement, 1 : slight movement, 2 : sit with assistance, 3 : sit alone, 4 : weak hop, 5 : normal hop) にて判定する。

病理組織学的検査:再灌流24時間後の組織標本はH&E染色を行い、脊髄前角の神経細胞の necrosisの有無、炎症細胞/食細胞浸潤の程度を観察する。また、免疫染色を行いeNOSの発現の程度を観察を行う。

4. 研究成果

【後脚機能の評価の結果】

術後4時間: group1はgroup2($P < 0.01$)およびgroup3($P < 0.001$)と比べて有為にscoreが低かった。Group2とgroup3間には有為差は認めなかった。

術後8時間: group1はgroup2($P < 0.05$)およびgroup3($P < 0.01$)と比べて有為にscoreが低かった。また、group2もgroup3($P < 0.05$)と比べて有為にscoreが低かった。

術後24時間: group1とgroup2間に有為差は認めなかった。Group1はgroup3($P < 0.01$)に比べ有為にscoreが低く、group2もgroup3($P < 0.05$)に比べscoreが有為に低かった。

【摘出した第2～第5腰椎の免疫・組織学的検討】

①正常神経細胞数

Group3はgroup1($P < 0.01$)およびgroup2($P < 0.05$)と比較し、有意に正常神経細胞数が多かった。

②脊髄前角内への浸潤細胞数

Group3はgroup1($P < 0.001$)およびgroup2($P < 0.001$)と比較し、有意に浸潤細胞数が少なかった。

③神経細胞内eNOSの発現

Group3では他のgroupと比較し、術後24時間の時点でもeNOSが多く発現する傾向が認められた。

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 件)

〔学会発表〕(計2件)

馬場 啓徳, 田ノ上 禎久, 小田 晋一郎, 小林 真理子, 前田 武俊, 富永 隆治:ウサギの脊髄虚血モデルによる対麻痺に対する Rho-kinase 阻害薬の有効性の検討・日本循環器学会九州地方会(2007年12月, 別府)

馬場 啓徳, 田ノ上 禎久, 木村 聡, 小田 晋一郎, 小林 真理子, 前田 武俊, 富永 隆治:ウサギの脊髄虚血モデルによる対麻痺に対する Rho-kinase 阻害薬の有効性の検討・日本心臓血管外科学会総会(2008年2月, 福岡)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 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

<http://cs1.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 淳博 (NAKASHIMA ATSUHIRO)
九州大学病院・助教
研究者番号：10260704

(2) 研究分担者

田ノ上 禎久 (TANOUE YOSHIHISA)
九州大学病院・助教
研究者番号：40372742

(3) 連携研究者

()

研究者番号：