

機関番号：16301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591744

研究課題名 (和文) 脊髄圧迫部位の血流をリアルタイムに測定するシステムの開発

研究課題名 (英文) Development of the device of real-time direct measurement of spinal cord blood flow at the site of compression

研究代表者

森野 忠夫 (MORINO TADAO)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20380248

研究成果の概要 (和文)：シリコンと非接触型レーザー血流計を用いて、ラット脊髄圧迫時の脊髄血流と虚血の影響を調査した。20gの重さで脊髄は完全虚血となり、20分間の圧迫では運動障害は可逆性であるが、40gでは非可逆性であった。そのメカニズムとして、圧迫部位での虚血は、マイクログリア増殖を含む炎症、神経細胞やオリゴデンドロサイトのapoptosisを引き起こし、さらに血液脊髄関門が破壊されるためと考えられた。

研究成果の概要 (英文)：We were able to observe real-time blood flow at the site of compression and to obtain the critical compression force (20g) for a rat spinal cord injury model using a novel device to measure blood flow. We found that 20 minutes of ischemia/compression periods induces reversible hindlimb motor function damage. However, 40 minutes of that produces irreversible paralysis. The mechanisms of the damage include inflammation induced by proliferated and activated microglia, apoptosis in neuron and oligodendrocyte and blood-spinal cord barrier damage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊髄損傷、脊髄虚血、脊髄血流測定、マイクログリア、apoptosis

1. 研究開始当初の背景

急性の脊髄損傷の過程として、損傷直後に出血や軸索断裂などの直接的な障害が起こ

る。その後、圧迫や血管の破綻によって脊髄内虚血が起こり、続いて炎症や細胞のapoptosisを引き起こしていわゆる2次損傷

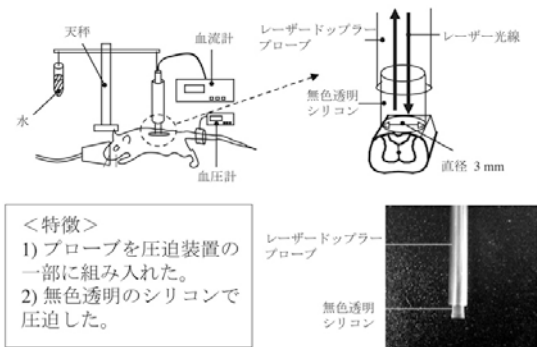
が起り、障害が拡大する。虚血は脊髄2次障害のトリガーとなりうるため、虚血による神経障害のメカニズムを知ることは重要である。しかしこれまでに圧迫部位の血流をリアルタイムにモニターできる実験系は無かった。

2. 研究の目的

非接触型レーザードップラー血流計を用いて、脊髄圧迫部位の血流をリアルタイムに測定できる実験系を作り、脊髄虚血と運動機能障害の関連性を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 血流測定装置の作製：天秤を用いて負荷を調節できる重りの先端に柔らかい透明なシリコンを取り付け、中空の重りの中に非接触型レーザードップラー血流計を設置して、圧迫部位での血流がリアルタイムに計れるように作成した(図1)。



(図1) 血流測定装置の略図

(2) ラット脊髄虚血モデル：Wister rat 雌を使用した。ハロセン麻酔下に T11 脊髄を露出し硬膜上から血流測定装置を置き、重さを 5, 10, 20, 30, 40g で測定した。また、持続圧迫時間は 20, 40 分とした。

(3) ラット後肢運動機能の評価：BBB score を用いて、圧迫後、3・7・14 日後に評価した。

(4) 組織学的検討：組織学的検討は、それぞれの群で、血液脊髄関門の破綻を調べるための Evans Blue 染色を圧迫後 24, 72 時間後に、炎症を引き起こすマイクログリアの増殖を調べるために OX-42 染色を 72 時間後に、また、細胞のアポトーシスを調べるために TUNEL 染色を 72 時間後に行った。

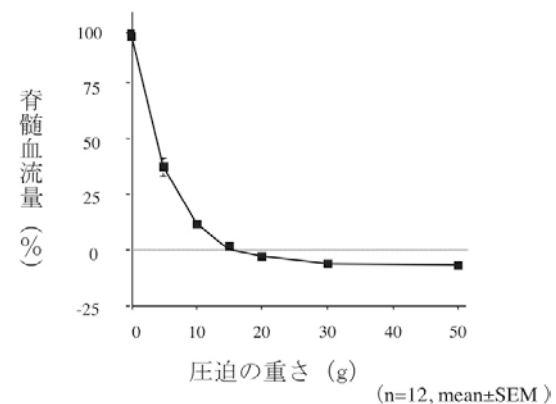
4. 研究成果

(1) 圧迫の重さと脊髄血流の関係：約 5g の圧迫で脊髄血流は半分以下になり、20g の圧迫で血流は 0 を下回り虚血となった。30g、50g と重さを増やしても血流は大きく変化

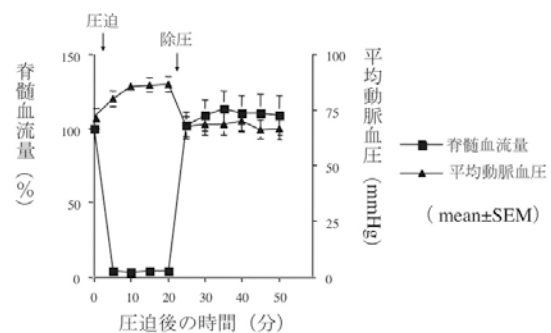
しなかった。よって、ラット脊髄を完全に虚血するためには 20g の圧迫で充分であると考えられた(図2)。

(2) 20g の重さで、20 分間圧迫と 40 分間圧迫を行った場合の、圧迫中及び圧迫解除後の脊髄血流量の変化：両群とも圧迫中は完全虚血となっていたが(図3)、圧迫解除後は、20 分間圧迫では圧迫前と同じ血流量まで回復したのに対して、40 分間圧迫では圧迫以前の約 70% までしか血流の回復が認められなかった(図4)。

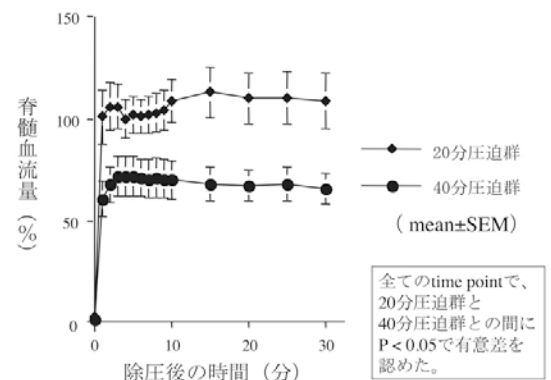
(3) 後肢運動機能評価：。20分圧迫群はsham群と比較し有意な差を認めなかった。一方、40分圧迫群は3日後のBBB scoreでsham群と比べ有意な低下を示したが、7日後では3群間に差を認めなかった(図5)。



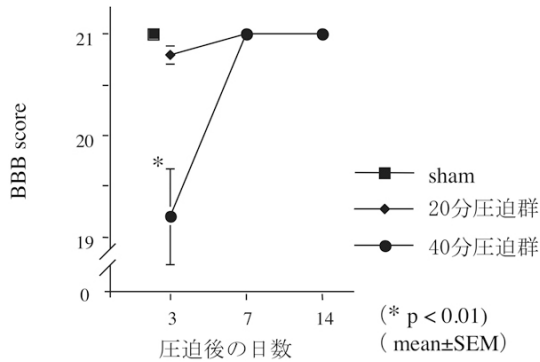
(図2) 圧迫の重さと血流の関係



(図3) 圧迫中の脊髄血流の推移



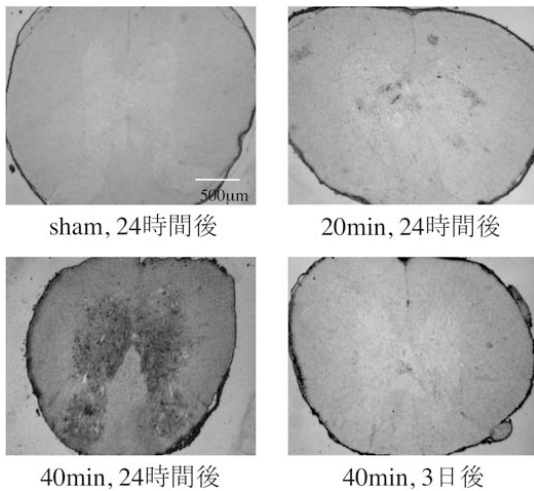
(図4) 除圧後の脊髄血流の推移



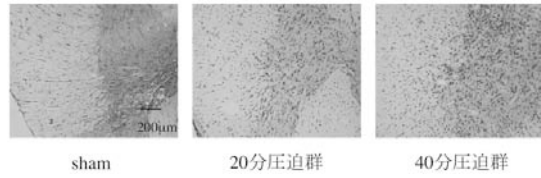
(図5) BBB scoreの推移

(4) 組織学的検討 :

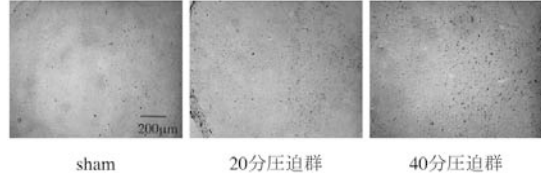
- ① Evans Blue による血液脊髄関門の評価 : Sham 群では Evans blue 溶液の漏出は認めなかった。20 分圧迫群では 24 時間後で多少の Evans blue 溶液の漏出が認められた。40 分圧迫群の 24 時間後の組織では、灰白質を中心に著明な Evans blue 溶液の漏出が認められ、血液-脊髄関門の破綻が起こっていることが示唆された。しかし、3 日後では漏出が見られず、血液-脊髄関門の破綻は修復されていると考えられた(図 6)。
- ② OX-42 による microglia の評価 : 20 分圧迫群では軽度のマクログリアの増殖が認められた。一方、40 分圧迫群では著明なマクログリアの増殖を認めた(図 7)。
- ③ TUNEL 染色による apoptosis の評価 : 20 分圧迫群では sham 群と比較して、アポトーシスを示す細胞が軽度増加していた。40 分圧迫群では、アポトーシスを示す細胞の著明な増加を認めた (図 8) 。



(図 6) Evans Blue 染色



(図 7) OX-42 染色



(図 8) TUNEL 染色

(5) 結論 :

- ① 新しい脊髄血流測定装置を開発し、圧迫の重さと脊髄血流との関係を調べ、 20g の圧迫でラット脊髄は完全に虚血される。
- ② 20 分間の脊髄虚血では運動機能はほとんど障害されず、40 分間の虚血では障害される。
- ③ 虚血により血液-脊髄関門の破綻が起こり、その後の炎症、アポトーシスへと繋がると考えられた。
- ④ 除圧後の脊髄血流の回復はその後の運動機能障害に大きく影響すると考えられた。

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)

1.Hamamoto Y, Ogata T, Morino T, Hino M, Yamamoto H.
Prostaglandin E1 analog increases spinal cord blood flow at the point of compression during and after experimental spinal cord injury.

Spinal Cord. 2010 Feb;48(2):149-53. Epub 2009 Aug 18. (査読有)

2.Hamamoto Y, Ogata T, Morino T, Hino M, Yamamoto H.

Real-time direct measurement of spinal cord blood flow at the site of compression: relationship between blood flow recovery and motor deficiency in spinal cord injury. Spine. 2007 Aug 15;32(18):1955-62. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1.Hamamoto Y; Ogata T; Morino T; Hino M; Yamamoto H

Real-time direct measurement of spinal cord blood flow at the compression part: relationship between blood flow and motor deficiency in the spinal cord injury
52nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2006.3.19-22. (Chicago)

2. 森野忠夫

脊髓一過性虚血後の組織学的変化：神経血管閉門の障害と炎症・アポトーシスについて。

第22回日本整形外科学会基礎学術集会
2007年10月25～26日。浜松

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/orthopedic/research/bloodflow.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森野 忠夫 (MORINO TADAO)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20380248

(2) 研究分担者

尾形 直則 (OGATA TADANORI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30291503

