

平成22年6月14日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791094  
 研究課題名（和文） どの酸化ストレスマーカーが脳虚血再灌流障害の指標になりうるか？  
 研究課題名（英文） Which oxidative-stress marker can be the index of the brain ischemia-reperfusion injury?  
 研究代表者  
 坂本 英俊（SAKAMOTO HIDETOSHI）  
 帝京大学・医学部・講師  
 研究者番号：90349267

研究成果の概要（和文）：脳梗塞部位からの細胞傷害マーカーである 3-nitrotyrosine および 8-nitroguanosine は脳虚血再灌流障害の指標としては適切でないことが判明した。グリチルリチン酸はラット中大脳動脈脳梗塞モデルにおいて、梗塞巣を減少させ、神経学的スコアリングを改善させることが判明した。しかしながら、マーカーとして期待された、脳脊髄液 HMGB1 は神経学的スコアリングと相関がなく、少なくとも中大脳動脈脳梗塞モデルにおいて、脳脊髄液 HMGB1 はその虚血および脳障害の実態を反映しないことが判明した。今後、さらなる研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that 3-nitrotyrosine and 8-nitroguanosine, which are cytotoxic markers from the cerebral infarction site, are not appropriate as markers of the cerebral ischemia-reperfusion injury. We also demonstrated that glycyrrhizin acid decreased an infarct size in a rat middle cerebral artery occlusion model, and that improved a neurological scoring. However, there was no correlation between neurological scoring and HMGB1 in cerebrospinal fluid, which was expected as a marker. HMGB1 in cerebrospinal fluid does not reflect the brain ischemia and damage, at least, in a rat middle cerebral artery occlusion model. Further investigation is required to confirm the possibility of HMGB1 as the marker of the cerebral ischemia-reperfusion injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：脳・神経 薬理学 虚血再灌流、酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 虚血再灌流は日常臨床において人工

心肺使用時、血栓溶解療法、血栓除去術、タニケット使用手術、臓器移植などで見

られる。しかし、この虚血再灌流は時として重篤な細胞傷害を起し、これを契機として多臓器不全へと発展し、致命的な結果を来すことがある。そのメカニズムについては徐々に解明されつつあるも、虚血再灌流障害を迅速に診断しすばやく治療に結びつけるという手段についてはいまだ確立されたものはない。

(2) 虚血再灌流障害は酸素フリーラジカルによる細胞傷害(酸化ストレス)を起点としており、細胞膜の脂質過酸化反応、DNA酸化反応および蛋白酸化反応を中心とした連鎖反応である。

(3) 脂質過酸化反応のマーカーである malondialdehyde (MDA) および isoprostane は、アラキドン酸を由来とするプロスタグランジン類似物質で安定した物質であり、感度および特異度が高く、血清や尿中の測定が可能のため、臨床応用できる可能性の高いマーカーである。

(4) 虚血再灌流後に見られる一酸化窒素(NO)の増加と酸素フリーラジカル産生がおこり、蛋白構成成分や核酸の構成成分と反応することにより生じる、3-nitrotyrosine や 8-nitroguanosine が細胞障害のマーカーとして期待でき、近年測定が可能になった。

(5) 最近の報告によれば、核内クロマチン安定化作用のある High-mobility group box 1 (HMGB1)は虚血・再灌流直後に細胞外に放出される重要な後期メディエーターであり、そのサイトカイン誘発作用により細胞傷害を来すことが示唆されている。虚血再灌流障害において、治療のターゲットとなりうるだけでなく、治療効果のマーカーとなりうると思われる。

(6) 以上より、脳虚血再灌流障害の早期診断法のためのマーカーの有用性を検討し、治療戦略として確立することを目標に本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

(1) ラット線条体にあらかじめマイクロダイアリスプローブを装着し、中大脳動脈閉塞モデルを用いて、再灌流後の 3-nitrotyrosine や 8-nitroguanosine の変化の測定を行い、再灌流後の経時変化による病理学的変化とこれら酸化ストレスマーカーとの関連を明らかにする。

(2) 虚血・再灌流傷害の細胞傷害マーカーとして HMGB1 の脳内からの放出動態を Enzyme

Linked Immunosolvent Assay (ELISA 法)を用いて検討する。

(3) 梗塞神経細胞より放出された HMGB1 が脳虚血再灌流障害の 1 つのマーカーになり得るかどうかを経時的に脳脊髄液を採取して検討する。

(4) 虚血再灌流時にみられるフリーラジカルや炎症メディエーターである HMGB1 に対する拮抗作用があり、肝臓、腸管での虚血再灌流障害に対して有効であるグリチルリチン酸(GA)が、脳虚血再灌流障害に対して有効であるか、検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ①体重230~250g前後のWistar雄ラットを使用して、中大脳動脈脳梗塞モデルの手法の確立を行なった後、マイクロダイアリス法を用いて脳梗塞部位からの細胞傷害マーカーである 3-nitrotyrosine や 8-nitroguanosine の測定を行なった。モデル作成5-7日前にペントバルビタル麻酔(50 mg/kg)後、ラット実験用脳定位固定器具にラット頭蓋を固定し、Paxinos & Watsonの脳地図に従って、マイクロダイアリス用カニューレを両側線条体に留置した。線条体は脳虚血再灌流で他の脳部位よりも虚血に対して脆弱性があることが知られている。マイクロダイアリス用カニューレを硬膜より刺入し、Bregmaから前後; -1.4 mm, 外側; 5.0 mm, 背腹; -2.8 mm に留置する。最後に歯科用セメントにて固定した。

②中大脳動脈脳梗塞モデルおよび脳灌流液の採取は以下の方法で行なった。2%イソフルラン麻酔後、シリコンコーティングナイロン糸を中大脳動脈に90分間挿入し再灌流をした。マイクロダイアリスプローブは2  $\mu$  l/min で灌流し、20分毎にfraction collectorにて灌流液を採取した。測定はHPLCを用いて行なった。

(2) グリチルリチン酸(GA)の脳神経保護効果の検討

①体重230~250gの雄Wistarラットを使用した。中大脳動脈脳梗塞モデルはシリコンコーティングナイロン糸を中大脳動脈に挿入して中大脳動脈閉塞モデルを作成し、90分後に再灌流した。再灌流直後および再灌流12時間後にGA 100 mg/kg (5 ml/kg)、または生理食塩水(NS) 5 ml/kgを腹腔内投与しGAの影響も検討した。

②脳脊髄液採取および神経学的スコアリングは、中大脳動脈閉塞前(コントロール)、再灌流直後、再灌流12時間後、再灌流24時間後に行った。

神経学的スコアリング

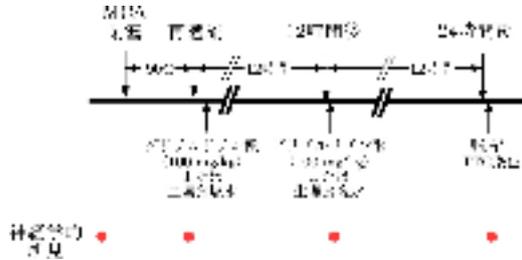
前肢屈曲と後肢牽引を基に点数化 (0~4 点)  
前肢屈曲

0	尾をもってつるすと両側ともまっすぐ
1	左側を挙げるようにねじる運動
2	右肘と手首は曲がったまま

後肢牽引

0	牽引したときに左側と比較して差がない
1	牽引したときに左側と比較して幾分弱い
2	右側は明らかに弱く、動かないと足底が見える

③再灌流 24 時間後脳を摘出し、TTC (2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride) 染色にて、脳梗塞巣を比較した。

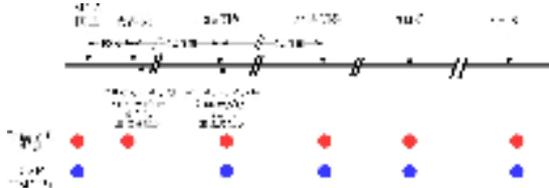


(3) GA の脳保護効果と脳脊髄液 HMGB1 のマーカーとしての検証について

①体重 230~250g の雄 Wistar ラットを使用した。中大脳動脈脳梗塞モデルはシリコンコーティングナイロン糸を中大脳動脈に挿入して中大脳動脈閉塞モデルを作成し、90 分後に再灌流した。再灌流直後および再灌流 12 時間後に GA 100 mg/kg (5 ml/kg)、または生理食塩水 (NS) 5 ml/kg を腹腔内投与し GA の影響も検討した。

②脳脊髄液採取および神経学的スコアリングは、中大脳動脈閉塞前 (コントロール)、再灌流直後、再灌流 12 時間後、再灌流 24 時間後、再灌流 3 日後、再灌流 7 日後に行った。

③HMGB1 の測定は ELISA 法を用いて行なった。また、神経学的スコアリングと髄液 HMGB1 の相関についても検証した。



4. 研究成果

(1)3-nitrotyrosine と 8-nitroguanosine のマーカーとしての検証

①再灌流後 0 分~160 分の 3-nitrotyrosine および 8-nitroguanosine の測定を行なった結果、微量も採取されず、全て negative という結果であった。

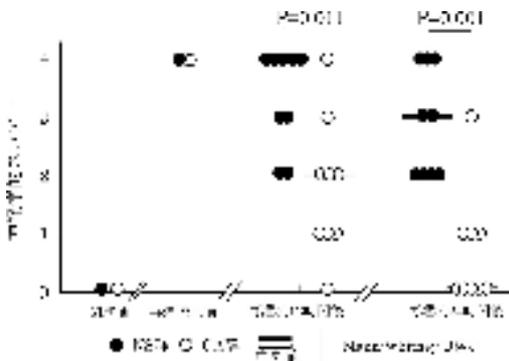
②再灌流後 24 時間モデルに対して 7 サンプル採取し、測定を行なったが、3-nitrotyrosine および 8-nitroguanosine いずれも negative であった。

③再灌流後 96 時間モデルに対して、7 サンプル採取したが、3-nitrotyrosine および 8-nitroguanosine いずれも negative であった。

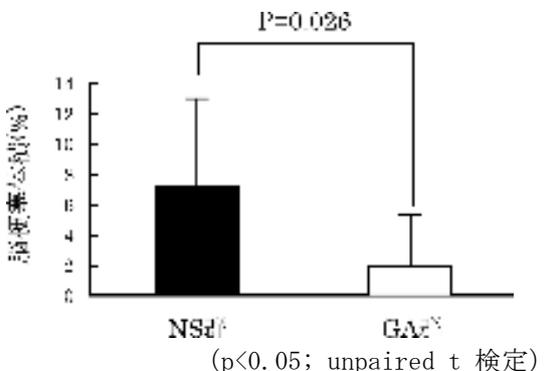
④以上の結果から、3-nitrotyrosine および 8-nitroguanosine は脳虚血再灌流障害の指標としては適切でないことが判明した。

(2)GA の脳保護効果の検討

①GA 処置群は再灌流 12 時間後と 24 時間後の神経学的スコアを有意に改善した。(両群とも n=9)



②脳梗塞巣の割合は、GA 群では有意に減少していた。



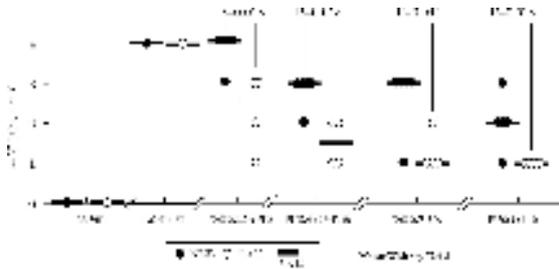
③GA はラット中大脳動脈脳梗塞モデルにお

いて、梗塞巣を減少させ、神経学的スコアリングを改善させることが判明した。

(3) GA の脳保護効果と脳脊髄液 HMGB1 のマーカーとしての検証について

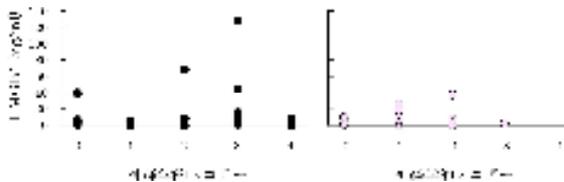
①神経学的スコアリングの推移

(2)①の結果と同様 GA 群で優位な改善を認めた。



②HMGB1 と神経学的スコアリングの関連

NS 群 Spearman 相関係数 = -0.115 P=0.869  
GA 群 Spearman 相関係数 = -0.115 P=0.668



再灌流 3 日後まで脳脊髄液 HMGB1 のデータがそろっていた NS 群 (5 例) と GA 群 (4 例) を繰り返しのある 2 元配置分散分析で行ったが、2 群間に差は認めなかった。

③以上の結果から、少なくとも中脳動脈脳梗塞モデルにおいて、脳脊髄液 HMGB1 はその虚血および脳障害の実態を反映しないことが判明した。

④ HMGB1 は早期の神経細胞死に関係し脳虚血後の脳での神経炎症を遷延させるという報告があり、抗 HMGB1 抗体は脳虚血による脳梗塞を改善するという事も報告されている。今後は、脳脊髄液ではなく血液中の HMGB1 濃度を測定することで、グリチルリチン酸の脳虚血再灌流障害に対する効果とその HMGB1 拮抗作用との関連を検討する必要がある。

⑤グリチルリチン酸の神経保護作用が HMGB1 を介した機序であるかどうかは今後の検討を要する。

(4)総括：脳梗塞部位からの細胞傷害マーカーである 3-nitrotyrosine および 8-nitroguanosine は脳虚血再灌流障害の指標としては適切でないことが判明した。グリチルリチン酸が脳梗塞モデルにおいて脳保護効果を示すことが判明した。HMGB1 に着目し、脳脊髄液 HMGB1 値の変化を検討したが、マーカーとしての役割は果たさなかった。今後、さらなる研究が必要である。

## 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 1 件)

仙頭佳起、坂本英俊、澤井淳、高田純子、福田悟、森田茂穂、グリチルリチン酸のラット脳神経保護効果、日本麻酔科学会第 57 回学術集会、2010 年 6 月 4 日、マリンメッセ福岡 (福岡県)

[図書] (計 0 件)

[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

研究代表者

坂本 英俊 (SAKAMOTO HIDETOSHI)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：90349267