

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591714

研究課題名(和文) 全脳虚血に対する β ブロッカーの脳保護に関する研究

研究課題名(英文) The effects of beta-blockers on global cerebral ischemia in rats

研究代表者

井上 聡己 (INOUE, SATOKI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50295789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000 円、(間接経費) 630,000 円

研究成果の概要(和文)：β ブロッカーによる全脳虚血に対する脳保護効果を検討した。保護効果があるとするならば、この効果が虚血発症前の予防的投与に依存するのか、虚血発症後の治療的效果を有するものか検討した。ラットによる低血圧+総頸動脈楔紮モデルをもちいた。propranolol、esmolol、landiololを虚血前投与した場合効果がないだけでなくpropranololでは死亡率が上昇した。しかし虚血後投与を開始した場合esmolol、landiololは海馬CA1の障害を軽減した。致死的なショック時にはβ1受容体遮断は有害であるが、ショック離脱後に選択的にβ1受容体遮断することは脳保護効果を発揮した。

研究成果の概要(英文)：The neuroprotective effects of pre- or post-ischemic administration of propranolol (a non-selective beta-adrenoreceptor antagonist), esmolol and landiolol (selective beta-adrenoreceptor 1 antagonists) against forebrain ischemia were investigated in rats. Methods: Intravenous administration of beta-blockers in male Sprague-Dawley rats was started 30 min before or 60 min after 8 min bilateral carotid artery occlusion combined with hypotension under isoflurane anesthesia. The animals were evaluated neurologically and histologically after this 5-day period. Results: Pre-ischemic treatment with beta-blockers failed to provide neuroprotection. Post-ischemic treatment with esmolol and landiolol, but not with propranolol, reduced neuronal injury following forebrain ischemia. Conclusions: Post-ischemic treatment with esmolol and landiolol provided neuroprotection, whereas treatment with propranolol failed to show neuroprotection.

研究分野：麻酔蘇生学

科研費の分科・細目：7306

キーワード：脳虚血 脳蘇生

1. 研究開始当初の背景

ブロッカーは過去 30 年にわたり高血圧治療の First-line drug として使用されている。降圧効果のみならず特に心筋梗塞後、心不全、心筋症、流出路狭窄などの予後を改善することが知られている。また、ブロッカーによる周術期心臓イベントの抑制効果も報告されている。このような背景によりブロッカー使用者は増加傾向にある。心臓に対する保護効果だけでなく非選択的ブロッカーであるプロプラノロールが局所脳虚血モデルにおいて梗塞体積を減少させることが以前より報告されてきている。さらに近年、選択的 1 ブロッカーであるランジオロール、エスモロールにも局所脳虚血モデルにおいて脳保護効果があることが報告された。しかしながら梗塞部位による壊死を特徴とする局所脳虚血と遅発性神経細胞死を特徴とする全脳虚血ではその障害発生機序に差異が存在し脳保護に対する反応も違ふとされる。選択的な虚血脆弱部位の神経細胞死を特徴とする全脳虚血に対するブロッカーの効果は現在不明である。臨床において全脳虚血は心停止などの心臓イベント時に生じるものであり、ブロッカーが心臓イベントの抑制に効果があるだけでなく、不幸にして心臓イベントが発生した場合にも一過性の全脳虚血に対し保護作用を示すのならブロッカーの投与は推奨されるべきである。また、蘇生後にブロッカーを投与することで生存率を改善させたという報告もあり、蘇生後投与(一過性の全脳虚血後投与)のブロッカーに神経細胞死抑制効果があるのか検討することは臨床的な治療開始のタイミングを検討するうえでも重要と考えられた。

心停止後の蘇生に成功したとしても一過性全脳虚血による蘇生後脳障害は克服されたとは言えず、蘇生後の社会復帰を妨げる原因となっている。心臓イベントを予防することと共に、不幸にして生じた場合いかに脳障害を軽減するかというのが重要である。この点においてブロッカーは心臓イベントに対して予防的効果があることが分かっており、かつ一過性全脳虚血による神経細胞死に対しても抑制効果を持つならば合目的な薬剤といえる。一方で、ブロッカーの慢性的投与は心停止からの蘇生を困難にする可能性も指摘されている。もし、予防的ブロッカー投与が一過性全脳虚血による神経細胞死に対して悪影響をもたらすならば、心臓イベント予防効果は優れるが、一旦生じた場合かえって状況を悪化させる可能性も否定できず、予防的ブロッカー投与に対し再考が必要となるかもしれない。また、投与時期に対してもブロッカーの発症後投与が効果あるならばより臨床的な時間経過で治療計画への応用が検討できるためその意義は大きいと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、一ブロッカーによる全脳虚血に対する脳保護効果を検討するものである。また、一ブロッカーに保護効果があるとすれば、この効果が虚血発症前の予防的投与に依存するのか、虚血発症後の治療的効果を有するものか検討する。我々はラットを用いた両側内頸動脈結紮による全前脳虚血(BCAO)モデルを用い研究を行ってきた。今回、BCAOモデルを使用するが、薬剤であるブロッカーの投与は皮下に埋め込んだ Osmotic Pump によって持続的に投与すした。Osmotic Pump による持続投与により単回投与でなくより臨床に則した薬剤投与になる。各薬剤(プロプラノロール、エスモロール、ランジオロール)についてBCAO施行前または後より投与を開始し5日後の神経学的評価まで投与を継続した。これにより一過性全脳虚血後の遅発性神経細胞死に対するブロッカーの予防的意義と発症後の治療的意義について検討しようと考えた。

3. 研究の方法

ラットを用いた両側総頸動脈遮断+脱血低血圧モデルを使用し全脳虚血を作成する。このモデルに対し、1、2非選択的ブロッカーであるプロプラノロール、1選択的ブロッカーであるエスモロール、ランジオロールを虚血発症前または虚血発症後より投与を開始し、各薬剤の予防的または治療的脳保護効果を検討した。評価の方法としては虚血負荷5日後の行動機能評価と組織学的評価を用いて行った。

実験1:一過性全脳虚血に対する予防的ブロッカー投与の影響

対象はSDラット300-350gのオス。12時間サイクルの照明下、水、飼料へは自由接触可の専用施設で管理

1. Osmotic pump(Alzet model 2ML1; DURECT Corp., Cupertino, CA, USA)による薬剤投与前日夕方より絶食とした対象を、イソフルラン麻酔下で気管挿管して調節呼吸を行った。大腿静脈を剥離しカテーテルを留置し、カテーテルは皮下を通し背部皮下に埋めた Osmotic pump に接続した。溶液投与速度は10 μ l/hで行うが、生理食塩水10 μ l/h(コントロール群)、プロプラノロール100 μ g/kg/min(プロプラノロール群)、エスモロール200 μ g/kg/min(エスモロール群)、ランジオロール50 μ g/kg/min(ランジオロール群)で虚血30分前より投与を開始し、5日間持続投与する。各群20匹とした。

2. 全前脳虚血モデルの作成イソフルラン麻酔下で気管挿管、人工呼吸を施行しPaO₂=130-150mmHg、PaCO₂=35-40mmHgに維持した(ハーバード型人工呼吸器)。尾動脈にPE50、右外頸静脈にPE60カテーテルを留置。両側の総頸動脈を慎重に剥離、露出し、ヘパリン100単位/kg投与の後、右外頸静脈より脱血により平均動脈圧を35mmHgに維持し、

両側総頸動脈を血管クリップにより遮断した(両側総頸動脈遮断+脱血低血圧モデル)。虚血時間は10分。虚血時間、低血圧レベルは負荷後5日間で海馬CA1領域において70-90%程度の細胞死が見られる程度として当施設において決定した。虚血終了後、返血しカテーテルを抜去して閉創する。この間、直腸温、側頭筋温をモニターし(モナサーム、マリンクロット社製)、ヒーティングランプを用いて37.5度に保った。虚血負荷後の体温の影響を考慮して、虚血終了後まで体温を測定して適宜加温、冷却した。終了後、麻酔より覚醒させ22度に保った観察箱で5時間観察する。1時間ごとに体温を測定するが加温、冷却はしなかった。

3.機能評価虚血5日後に行った。Sanoらの方法に基づき(Anesthesiology, 1992 Feb;76(2):221-8.)運動機能と活動性の評価を行う。実際には運動機能としてメッシュゲージを上る能力を3段階で評価し、活動性の評価としては仕切り線のついたオープンフィールド(30cm四方の16個の仕切りにて構成)を用い、規定時間内にラットが侵入した仕切りの数を活動性の指標とする。また、麻痺、異常行動、異常興奮の有無なども記録した。

4.組織学的評価組織還流は十分な酸素投与と下でサイオペンタール50mg腹腔内投与し、ヘパリン含生理食塩水であらかじめ脱血したのち緩衝化ホルマリンを経心臓的に150-200ml還流した。標本(bregmaより後方約2-4mm)を取り出し24-48時間、4度で保存。エタノールとブタノールにて脱水後、パラフィンにて固定し切片を作成した。切片はbregmaより後方約3.3mmのところを選択し、海馬のCA1、CA3領域を評価の対象として光学顕微鏡下に正常ニューロン数をカウントした。

実験2:一過性全脳虚血に対する治療的ブロッカー投与の影響

実験1と同様だが再還流1時間後から生理食塩水10μl/h(コントロール群),プロプラノロール100μg/kg/min(プロプラノロール群),エスモロール200μg/kg/min(エスモロール群),ランジオロール50μg/kg/min(ランジオロール群)で投与を開始し、5日間持続投与した。各群20匹とする。神経学的検討及び組織学的検討は実験1と同様に行った。

4.研究成果

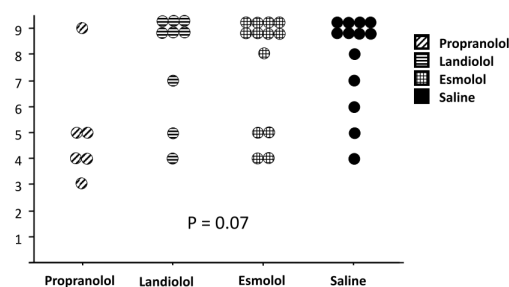
実験1

The number of dead animals and mortality rate in the exp 1

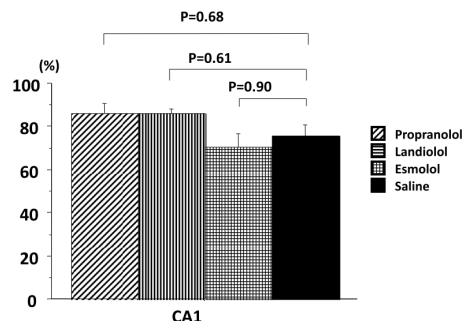
	Total	Dead	Rate
Propranolol	14	9	0.64
Landiolol	14	7	0.5
Esmolol	13	3	0.23
Saline	14	3	0.21

ブロッカー予防的投与での死亡率はプロプラノロールで64%と高かったが有意差は見られなかった。また、エスモロール、ランジオロールでも死亡率は高い傾向にあった。

Motor function test in the exp 1



Dead neuron percentage in the exp 1



行動学的、組織学検討においてブロッカーの予防的投与には効果が見られなかった。

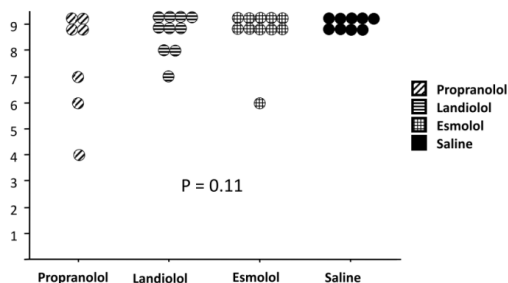
実験2

The number of dead animals and mortality rate in the exp 2

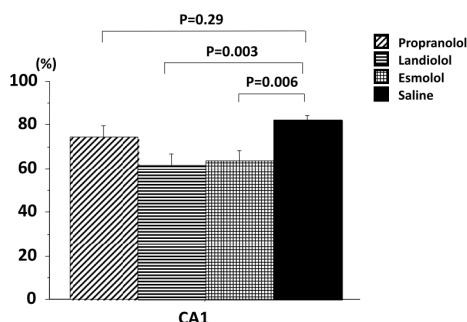
	Total	Dead	Rate
Propranolol	13	6	0.46
Landiolol	14	4	0.29
Esmolol	14	3	0.21
Saline	13	3	0.23

ブロッカーの治療的投与においてプロプラノロールは依然高い死亡率を示したが有意差はなかった。

Motor function test in the exp 2



Dead neuron percentage in the exp 2



ブロッカーの治療的投与では行動学的な有意差は見られなかったがランジオロール、エスモロールにおいて神経細胞死の割合を減少させた。

考察

ブロッカーの虚血前投与は局所脳虚血では効果あるが全脳虚血では効果はなかった。局所脳虚血は梗塞領域を生じさせるモデルであり、全脳虚血は虚血に対し脆弱な部位の選択的死亡を生じるモデルとされる。ブロッカーは脆弱な部分への保護効果は弱いのかもしないと考えられた。虚血後投与ではブロッカーは脳保護的に作用した。出血時にブロックすると乳酸値、エピネフリン値、サイトカインレベルが上昇すると報告されている。出血時には 1 刺激が予後を改善という報告もある。虚血前投与でもブロッカーは脳保護的であるが脱血による悪条件が保護効果を打ち消した可能性がある。今後は脱血を伴わない総頸動脈+椎骨動脈遮断モデルで検討する必要があるかもしれない。局所モデルでも虚血後投与の検討が必要と考えられる。また、ブロッカーの中でプロプラノロールはよい結果を示せなかった。プロプラノロールは 1,2 ブロッカーであり、脳には 1 受容体の割合が多いことや、2 刺激には脳保護効果があるという報告から、2 遮断が悪影響したのかもしれない。今回の結果からエスモロール、ランジオロールの虚血後投与に効果があったことで臨床的に使用法としては非常に意義深いものと考えられる。な

ぜなら通常脳虚血を発生してから治療が始まるからである。しかしながら心疾患などで心臓的な予後改善効果を期待してブロッカーを投与されている場合に不幸にして心停止した場合蘇生に成功しても神経学的改善は望めなく、場合によっては死亡率を上昇させてしまう可能性も示唆された。

結語

ラット全前脳虚血においてランジオロール、エスモロールは虚血前投与では脳保護効果を示さないが、虚血後投与では脳保護効果を期待できる。

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 2 件)

1. 井上聡己、川口昌彦、古家仁、麻酔とアポトーシス『脳虚血とアポトーシス、Anesthesia 21 Century、査読なし、14 巻 2012、27-32
2. 井上聡己、麻酔薬の脳保護作用、医学のあゆみ、査読なし、掲載予定

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 井上聡己、ラット全脳虚血モデルに対する受容体阻害薬の虚血前、虚血後投与の影響、第 20 回奈良麻酔部会 2013/3/8 橿原市
2. 井上聡己、川口昌彦、受容体受容体遮断薬の脳保護への可能性 遮断薬の脳保護への可能性、第 32 回日本蘇生学会総会 2013/11/9 東京
3. 井上聡己、ランジオロール:周術期使用例から心機能低下症例への展開、Cardiovascular Seminar 2014、大阪 2014/1/31
4. 井上聡己、ICUにおけるランジオロールの使用経験、第 21 回奈良麻酔部会 2014/3/8 橿原市

〔図書〕(計 1 件)

1. Editors: Hiroyuki Uchino, Kazuo Ushijima, Yukio Ikeda, Nuroanesthesia and Cerebro-Spinal Protection、Springer Japan KK 発行予定

〔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

井上 聡己 (INOUE Satoki)
奈良県立医科大学 医学部 准教授

研究者番号：50295789

(2) 研究分担者

川口 昌彦 (KAWAGUCHI Masahiko)
奈良県立医科大学 医学部 教授
研究者番号：60275328

古家 仁 (FURUYA Hitoshi)
奈良県立医科大学 医学部 教授
研究者番号：70183598

(3) 連携研究者

()

研究者番号：