

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462139

研究課題名(和文) 心奇形患児の脳機能障害を回避する選択的脳灌流法の開発と成人への応用

研究課題名(英文) Development of selective cerebral perfusion to prevent brain injury in children with congenital cardiac diseases and its application for adult patients

研究代表者

三島 晃 (MISHIMA, Akira)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00254277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈に奇形がある子供の心臓手術では、人工心肺を使用し選択的脳灌流法と呼ばれる特殊な方法で脳に血液を送る。私たちは簡便な選択的脳灌流法をラットで開発し、チアノーゼのある子供に適した灌流法を見出すために、酸素濃度の低い環境で飼育した若齢ラットを用いて選択的脳灌流の実験を行った。脳の神経細胞の障害は、早期の変化を捉える特殊な顕微鏡検査で調べた。低酸素下で飼育した若齢ラットは正常ラットに比較し脳障害が強く、チアノーゼの子供の選択的脳灌流には一層の注意と工夫が必要である。

研究成果の概要(英文)：In cardiac surgery of children with anomaly of the aortic arch, brain blood is supplied by a particular method, called selective cerebral perfusion under using cardiopulmonary bypass. We devised a simple selective cerebral perfusion model on rats. To develop an adequate procedure for children with cyanosis, we conducted experiment on selective cerebral perfusion in juvenile rats bred under hypoxic environment. Neural damage of brain was investigated with a special microscopic examination that detected early neural injury. Brain damage caused by the selective cerebral perfusion was more serious in juvenile rats bred under hypoxic environment than in normal rats. So, we should be careful about the selective cerebral perfusion of children with cyanosis.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：選択的脳灌流 脳虚血モデル 肺高血圧 低酸素血症 若齢ラット

1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児や乳幼児は脳の発達過程にあり、人工心肺を使用する心臓大血管手術後に軽微な脳障害が生じても臨床所見として把握することが困難で、術後早期および中期には評価や治療ができないことが多い。

(2) 新生児・乳幼児期手術の治療成績向上に伴い遠隔期における生活の質にも関心が寄せられている。しかし当該患児は心疾患に基づく肺高血圧と低酸素血症を有し、選択的脳灌流を用いる体外循環が特異な病態を持つ患児の脳にどのような影響を及ぼすのか殆ど研究されていない。

2. 研究の目的

(1) 人工心肺を使用する心臓大血管手術が、肺高血圧と低酸素血症を特徴とする重症心奇形を持つ乳幼児の脳機能に与える障害(脳の発達障害や高次機能障害など)を究明しこれを回避する人工心肺技術や薬物治療法などの開発を目的とする。

(2) 当該手術時は、片側の総頸動脈から選択的脳灌流を行う。患児の病態に合わせ、低酸素による肺高血圧若齢ラットを用い、選択的脳灌流がもたらす脳の早期微小変化を病理組織学的に検討する。

3. 研究の方法

(1) 動物実験計画の承認：本研究は本学医学研究科動物実験委員会の承認を受け、動物実験計画申請書 H27M-30 に基づき実施した。

(2) 選択的脳灌流モデル：臨床に即した片側の脳灌流モデルを次の手順で作成した。
 実験前日に両側椎骨動脈を焼灼離断した。
 翌日に気管内挿管、人工呼吸下に左大腿動脈脱血、右総頸動脈送血で脳灌流の体外循環を確立した。

(3) 若齢肺高血圧ラット作成：4週ラットを10%酸素下で10日間飼育した。肺高血圧は肺動脈圧を直接測定して確認した。

(4) 選択的脳灌流実験：気管内挿管をおこない人工呼吸器の管理下に、脳の体外循環確立後に左総頸動脈を遮断し、10ml/Kg/min(80~90ml/min/100g・brain)の片側選択的脳灌流(希釈率20~30%)を1時間実施、その後1時間再灌流して脳を摘出した。若齢ラットの肺高血圧群、非肺高血圧群、成獣ラットの非肺高血圧群について、各群の対照群を合わせ合計6群で灌流実験を行った。

(5) 評価項目：次の項目を計測・評価した。
 体・肺循環の指標、脳動脈圧、血液ガスなどを計測した。循環動態は体血圧に依存するので、収縮期体血圧を100~110mmHgに麻酔深度と補液で調整した。

脳の病理組織学は Argyrophil -III silver 染色を用い、早期脳障害を示す dark neurons(DNs)の発現を次の5段階のGradeに分類およびスコア化して評価した。



DNs: Block type DNs: Scattering type
 Grade 1: no DNs
 Grade 2: focal scattering
 Grade 3: focal block
 Grade 4: diffuse scattering
 Grade 5: diffuse block

(6) 統計処理：数値は平均±標準偏差で示した。統計学的有意検定は、SPSS(IBM v23)で行い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

4. 研究成果

(1) 椎骨動脈焼灼処置ラットの脳内循環動：選択的脳灌流の灌流量(0~30ml/Kg/min)と脳内動脈圧の関係を計測した。椎骨動脈温存および焼灼の両群ともに脳動脈圧は灌流量に相関して上昇した($p < 0.0001$)。椎骨動脈焼灼群は温存群に比較し脳動脈圧は何れの灌流量でも12~15mmHg低下した($p < 0.0001$)。椎骨動脈温存および焼灼の両群ともに脳動脈圧は流量に相関して上昇した($p < 0.0001$)。完全に脳血流を遮断すると平均脳動脈圧は 8.1 ± 1.2 mmHg(95%CI:6.3~9.7mmHg)で静脈圧と同等となる。椎骨動脈焼灼は約60%の成功率といわれているが、血流遮断時に脳動脈圧が10mmHg以下であれば、椎骨動脈が完全に遮断されていると判断できる。椎骨動脈遮断の成否の評価も可能な選択的脳灌流モデルが作成された。

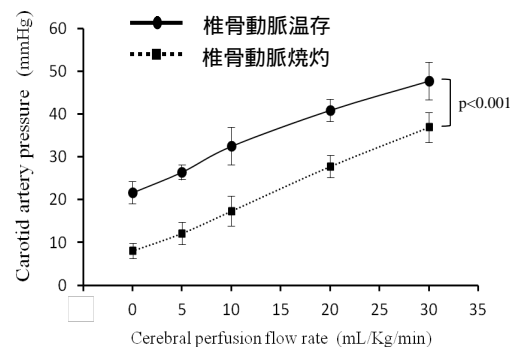


図1：灌流量と脳内動脈圧

(2) 片側選択的能灌流では非肺高血圧の成熟ラットは若齢ラットより脳の障害をきたし易い。特に海馬の障害が強い傾向があり、成人は小児より選択的脳灌流手術後にせん妄や記憶障害などをきたしやすい臨床症状と相関する可能性がある。30分を超える片側選択的脳灌流は推奨されていないという現

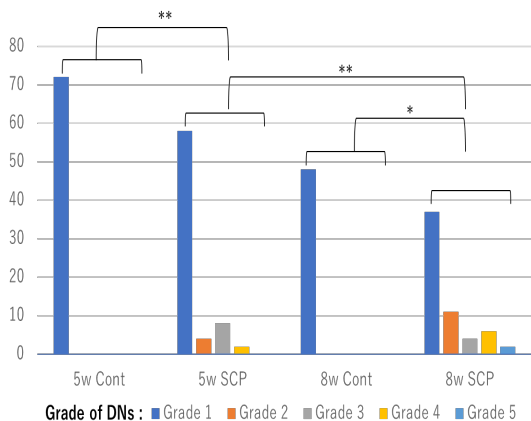
状のコンセンサスと齟齬は無かった。

椎骨動脈焼灼の成否：完全血流遮断時の能動脈圧は 7.7 ± 2.1 mmHg で(1)の成果よりどのラットも完全焼灼・離断されていた。

循環指標などの結果：灌流中の脳動脈圧は灌流群 15.1 ± 3.2 、対照群 37.4 ± 6.7 mmHg ($p < 0.001$)であった。体循環の指標と血液ガス分圧、pH等には、灌流群で灌流中と灌流後のHb($p < 0.002$)とBE($p < 0.03$)が低下し、再灌流時の体血圧が高かった($p < 0.02$)が、その他は4群間で有意差が無かった。

脳病理所見(DNsの発現)：DNsの発現Gradeと頻度を下図に示す。

(*: $p < 0.01$, **: $p < 0.01$)



1) 4群間のGrade分布に差がある(ANOVA, $p < 0.01$)、2) 対照群にはDNsは発現しない、3) 選択灌流の反対側の変化が強い($p < 0.01$)、4) 成熟ラットが若齢ラットよりDNsのGradeが強い($p < 0.02$)、5) 海馬の障害が強い傾向にありGrade 5は成獣の海馬にのみ確認された、6) 灌流中と灌流後のHbとBEはDNsの発現に相関しない、7) 再灌流時の体血圧はDNs発現に相関し($p < 0.03$)再灌流障害も生じた可能性がある。

(3) 若齢肺高血圧ラットモデルの検証：低酸素環境下で10日間飼育した4週齢ラットの循環動態と血液ガスの解析結果を示す。有意な肺高血圧の成立が確認された。

平均肺動脈血圧：低酸素飼育群は 36.1 ± 7.3 、対照群は 16.7 ± 2.2 mmHg ($p < 0.001$)であった。

血液ガス分析結果：低酸素飼育群では、動脈血 CO_2 分圧 (46.1 ± 8.7 mmHg, $p < 0.01$)、Hb (21.0 ± 0.9 g/dL, $p < 0.001$)、Ht (61.9 ± 2.7 %, $p < 0.001$)、 K^+ (21.0 ± 0.9 mEq/L, $p < 0.01$)が対照群より高値で、pH (7.32 ± 0.06 , $p < 0.001$)、Base Exes (-2.1 ± 1.8 mEq/L, $p < 0.05$)は対照群より低値であった。肺障害の進行で血中の CO_2 の排出が悪く呼吸性アシドーシスとなっていた。

(4) 低酸素による若齢肺高血圧ラットでは、片側の選択的脳灌流による早期の脳虚血障害が起こりやすい。これは、若齢肺高血圧ラットが低酸素による虚血耐性を獲得すると

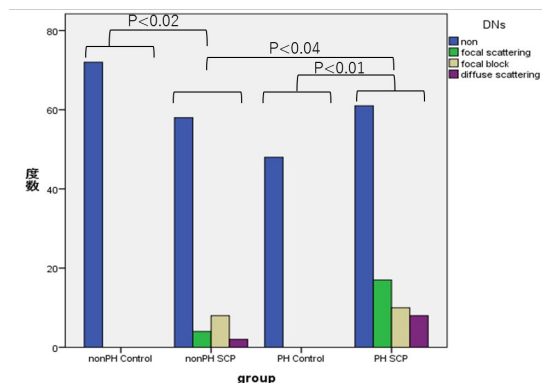
いう実験前の予想に反した結果であった。低酸素誘導肺高血圧群はHbが高く良好な酸素運搬能に関わらず、非肺高血圧群に比べ早期脳障害を示すDNsの発現率が高く、特に海馬では強く発現する。臨床では冷却による脳保護法が併用され、片側の椎骨動脈灌流も維持されるので、早期脳障害の発現リスクは軽減すると推測される。したがって今回の成果が臨床にすべて直結する訳ではないが、チアノーゼを伴う小児の大動脈弓術後に海馬機能を含めた高次脳機能がどのように推移するのか慎重に経過観察する必要があると示唆された。また低酸素耐性が得られない原因を解明することにより、選択的脳灌流による小児の早期脳障害を回避する手段の解明と術後の脳機能向上が期待される。

椎骨動脈焼灼の成否：両側頸動脈遮断時の脳動脈圧は 8.1 ± 1.5 mmHg で(1)の成果よりどのラットも完全焼灼・離断されていた。

肺高血圧(PH)の成立：平均肺動脈圧はPH群 35.1 ± 6.7 、非PH群 17.0 ± 2.0 mmHg ($p < 0.00001$)で有意な肺高血圧が完成していた。

循環指標などの結果：灌流中の脳動脈圧は灌流群 16.3 ± 3.2 、対照群 36.8 ± 5.8 mmHg ($p < 0.00001$)で、PHの有無に差はなかった。体循環指標と血液ガス分圧、pH等には4群間で有意差はなく、PH群は非PH群に比し、Hbと K^+ が高く、BEが低かった($p < 0.0005$)。

脳病理所見(DNsの発現)：選択的脳灌流による早期脳障害は低酸素による肺高血圧ラットで強く生じた。DNsの発現Gradeと頻度をグループ別に下図に示す。



DNs発現に有意な因子は、肺高血圧($p < 0.03$)、選択的脳灌流($p < 0.001$)、選択的脳灌流対側脳半球(0.001)であった。更にDNsの詳細な検討により、1) 発現率は肺高血圧-選択的脳灌流群 87.5%、非肺高血圧-選択的脳灌流群 33%、対照群 0% ($p < 0.05$)、2) Gradeによる発現強度は肺高血圧-選択的脳灌流群は非肺高血圧-選択的脳灌流群に比較し強い($p < 0.04$)、3) 皮質、線条体、海馬、脳幹に広くみられ、有意に発現する部位は無い、4) 海馬での発現強度に有意差があり肺高血圧-選択的脳灌流群が最も強い($p < 0.05$)、事が判明した。

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)

[学会発表](計 3 件)

三島 晃、若齢肺高血圧ラットでは選択的脳灌流による虚血脳障害が高率に発生する、第 53 回日本小児循環器学会総会・学術集会、2017 年 7 月 7 日～7 月 9 日、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)、発表確定

三島 晃、椎骨動脈切断モデルを用いた選択的脳灌流による早期脳障害の病理学的検討、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017 年 4 月 27 日～4 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

三島 晃、選択的脳灌流による若齢ラットの早期脳障害の解析、第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会、2017 年 2 月 27 日～3 月 1 日、グランド日航東京台場(東京都・港区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

三島 晃(MISHIMA, Akira)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00254277

(2)研究分担者

浅野 実樹(ASANO, Miki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：20275134

野村 則和(NOMURA, Norikazu)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：80363935

鵜飼 知彦(UKAI, Tomohiko)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：40347399

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

石田 章真(ISHIDA, Akimasa)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20632607