

学 位 論 文 題 名

Lazaroid Reduces Production of IL-8 and IL-1
Receptor Antagonist in the Postischemic Spinal Cord Injury

(ラザロイドは虚血後脊髄障害におけるインターロイキン8と
インターロイキン1受容体拮抗体の生成を抑制する)

学位論文内容の要旨

【背景】大動脈手術後の脊髄障害は生活の質を極端に損なう合併症であり、それを回避することは血管外科において長く未解決の問題であった。最近の研究で、21-アミノステロイド(ラザロイド)は脂質過酸化反応を抑制する機序により、中枢神経系の虚血再灌流障害に保護的に働くことが示されてきた。虚血再灌流障害の成立機序においては、内皮細胞も重要な役割の1つを演じるが、ラザロイドが脊髄虚血後の内皮細胞障害を軽減するかどうかはあまり検討されていなかった。内皮細胞障害の際に、種々の炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカインが生成されてくることが知られているが、われわれはウサギ虚血性脊髄障害モデルにおいてこうした炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカインの生成にラザロイドが影響を及ぼすか否か検討した。

【対象と方法】ウサギ脊髄虚血モデル(New Zealand white rabbits (n=26) ; 体重3.2 ±0.1kg)を用いた。全身麻酔後気管切開、調節呼吸下に上下肢動脈圧、心拍数、直腸温をモニターし、後腹膜経路で20分間の腎動脈下大動脈遮断(AXC)を行い脊髄虚血モデルを作成した。直腸温は全手技を通じて38℃以上にコントロールした。脂質過酸化阻害のinterventionとしてラザロイドU74389Gを使用し、AXC直前に3mg/kgを静脈内投与したL群(n=10)と同量の生理食塩水を投与したP群(n=10)に分類した。さらに腎動脈下大動脈の剥離、テーピングのみ施行し、AXCは行わないで同量の生理食塩水を投与したS群(n=6)を作成した。AXC前、AXC解除5分前、5分後、1時間後にELISA法でインターロイキン(IL)-8, 1 β , 1受容体拮抗体(1Ra)を、バイオアッセイ法で腫瘍壊死因子 α (TNF α)を測定した。脂質過酸化阻害による脊髄保護効果を評価するため、AXC 24、48時間後にTarlovスコアによる機能評価をした後犠牲死させ、摘出脊髄より前記のサイトカインの測

定ならびにHE, K-B, GFAPの3種の染色標本を作成し病理学的評価を加えた。

【結果】血漿中のIL-8, 1RaはAXC前値と比較して、L群、P群共にAXC解除1時間後においても上昇を続けた。L群のIL-8, 1RaはP群のそれと比較して有意に低値であった ($p < 0.05$)。血漿中のTNF α はAXC解除5分後に最大値となり以後は低下した。IL-1 β 値は測定感度以下であった。脊髄組織内IL-8濃度はP群と比較してL群で有意に低値であった ($p < 0.05$)。脊髄組織内IL-1Ra、TNF α 濃度はL群で低い傾向にあったが有意差はなかった。Tarlov Scoreは24, 48時間後共にL群で有意に良好であった (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.02$)。病理所見はP群で灰白質の軟化、出血、神経細胞の壊死を多数認めたが、L群では軽度萎縮した神経細胞を散見する程度で、障害は明らかに軽度であった。

【考察】脊髄機能評価や病理学的評価は既存の報告とほぼ同等の結果であり、脊髄虚血を作成するという点では、われわれの実験モデルは妥当であると考えられる。炎症性サイトカインであるIL-8がAXC解除1時間後で既に血漿中で有意に上昇しており、また脊髄組織中でも上昇していた事実より、IL-8上昇のsourceは、虚血再灌流による内皮細胞障害や活性化白血球が存在する虚血脊髄である可能性が大であると考えられる。ラザロイド前処置がこれらを有意に抑制したことより、ラザロイドが脊髄虚血再灌流による内皮細胞障害や白血球の活性化を軽減することが示唆された。抗炎症性サイトカインであるIL-1RaもIL-8と同様の上昇を示し、その原因は手術侵襲やIL-8による刺激であるといわれている。S群で手術経過とともに上昇を続けたのは手術侵襲によるものと思われるが、ラザロイド投与群でそれが軽減された理由は、おそらくIL-8上昇が抑制されたことに起因するであろう。IL-1 β 値が測定感度以下であったのは、IL-1Raの存在がこれを抑制したためと考えられた。TNF α は種々のサイトカイン生成のトリガーであるといわれており、われわれのモデルでもIL-8の生成を刺激した可能性はある。しかしTNF α の測定値はAXC解除5分後に最大値となり以後は低下したこと、実験群間の測定有意差がないことから、IL-8の実験群間の測定有意差の原因とはならないと思われる。おそらくラザロイドはマクロファージや活性化白血球からのTNF α 放出には大きな影響を及ぼさないものと思われる。炎症性サイトカインによる血管平滑筋細胞増殖は遅発性脊髄障害に関与すると言われており、炎症性サイトカインの上昇を早期に検出し、これを低下させることは脊髄障害防止に大きな臨床的意義があるものとする。

【結論】ウサギ虚血性脊髄障害モデルにおいてAXC前のラザロイド投与により、全身および虚血脊髄からのIL-8およびIL-1Raの産生が抑制され、脊髄機能や病理学的評価が

有意に改善した。即ちラザロイドが虚血脊髄における内皮細胞障害および白血球活性化を軽減していることが今回初めて明らかになった。さらなる基礎的、臨床的検討が必要ではあるが、ラザロイドが大血管術後の脊髄障害防止に非常に有用である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顯

副 査 教 授 丸 藤 哲

副 査 教 授 安 田 慶 秀

学 位 論 文 題 名

Lazaroid Reduces Production of IL-8 and IL-1 Receptor Antagonist in the Postischemic Spinal Cord Injury

(ラザロイドは虚血後脊髄障害におけるインターロイキン8と
インターロイキン1受容体拮抗体の生成を抑制する)

大動脈手術後の脊髄障害を回避することは血管外科において長く未解決の問題であった。最近の研究で、21-アミノステロイド(ラザロイド)は脂質過酸化反応を抑制する機序により、中枢神経系の虚血再灌流障害に保護的に働くことが示されてきたが、ラザロイドが脊髄虚血後の内皮細胞障害を軽減するか否かはあまり検討されていなかった。本研究ではウサギ虚血性脊髄障害モデルにおいて内皮細胞障害の際に生成される炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカインにラザロイドが影響を及ぼすか否か検討した。

ウサギ脊髄虚血モデル(New Zealand white rabbits ; 3.2±0.1kg)を用いた。全身麻酔後気管切開、調節呼吸下に上下肢動脈圧、心拍数、直腸温(38℃以上にコントロール)をモニターし、後腹膜経路で20分間の腎動脈下大動脈遮断(AXC)を行い脊髄虚血モデルを作成した。AXC直前にラザロイドU74389Gを3mg/kg静脈内投与したL群(n=10)、同量の生理食塩水を投与したP群(n= 10)、AXCは行わないS群(n=6)を作成した。AXC前、AXC解除5分前、5分後、1時間後にELISA法で血漿中のインターロイキン(IL)-8, 1 β , 1受容体拮抗体(1Ra)を、バイオアッセイ法で腫瘍壊死因子 α (TNF α)を測定した。AXC 24、48時間後にTarlovスコアによる脊髄機能評価をした後犠牲死させ、摘出脊髄より前記のサイトカインの測定ならびにHE, K-B, GFAPの3種の染色標本を作成し病理学的評価を加えた。

血漿中のIL-8, 1RaはAXC前値と比較して、L群、P群共にAXC解除1時間後においても上昇を続け、L群でP群と比較して有意に低値であった(p<0.05)。血漿中のTNF α はAXC

解除5分後に最大値となり以後は低下した。IL-1 β 値は測定感度以下であった。脊髄組織内IL-8濃度はP群と比較してL群で有意に低値であった(p<0.05)。脊髄組織内IL-1Ra、TNF α 濃度はL群で低い傾向にあったが有意差はなかった。Tarlov Scoreは24, 48時間後共にL群で有意に良好であった(それぞれp<0.01, p<0.02)。病理所見はP群で灰白質の軟化、出血、神経細胞の壊死を多数認めたが、L群では軽度萎縮した神経細胞を散見する程度で、障害は明らかに軽度であった。

脊髄機能評価や病理学的評価は既存の報告とほぼ同等の結果であり、本研究の実験モデルは妥当と考えられた。IL-8上昇のsourceは、虚血再灌流による内皮細胞障害や活性化白血球が存在する虚血脊髄である可能性が大であると考えられ、ラザロイド前処置がこれらを有意に抑制したことより、ラザロイドが脊髄虚血再灌流による内皮細胞障害や白血球の活性化を軽減することが示唆された。IL-1RaもIL-8と同様の上昇を示し、その原因は手術侵襲やIL-8による刺激であるといわれている。S群での上昇は手術侵襲の関与が考えられるが、ラザロイド投与でそれが軽減されたのは、IL-8上昇の抑制によるものであろう。IL-1 β 値が測定感度以下であったのは、IL-1Raの存在がこれを抑制したためと考えられた。TNF α は種々のサイトカイン生成のトリガーであるといわれており、本研究のモデルでもIL-8の生成を刺激した可能性はある。しかしラザロイドはマクロファージや活性化白血球からのTNF α 放出には大きな影響を及ぼさないものと思われた。

以上をまとめると、ウサギ虚血性脊髄障害モデルにおいてAXC前のラザロイド投与により、全身および虚血脊髄からのIL-8およびIL-1Raの産生が抑制され、脊髄機能や病理学的評価が有意に改善した。即ちラザロイドが虚血脊髄における内皮細胞障害および白血球活性化を軽減していることが今回初めて明らかになった。

学位論文の公開発表に際し、副査の丸藤教授からはサイトカインを検討した理由、測定下限値の問題、再灌流後投与での有用性、主査の北畠教授から臨床での使用薬剤、ラザロイドの臨床応用の可能性、TNF α が早期に上昇する理由、副査の安田教授から脊髄組織での内皮細胞の病理学的変化、将来の薬物的治療の方向性などについて質問があった。申請者は豊富な実験結果と、蓄積された学識をもって、文献的考察も交えて誠実かつ概ね適切に回答し得た。

本研究はラザロイドが虚血脊髄における内皮細胞障害、白血球活性化を軽減することを初めて明らかにし、今後さらなる基礎的、臨床的検討が必要ではあるが、大血管術後脊髄障害防止への臨床応用に重要な示唆を与えるものと評価できる。

審査員一同は、申請者の豊富な学識に併せ、本研究が関連領域研究の進展に与える成果を評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。