

## ウサギ脊髄虚血再灌流モデルにおける

## ischemic preconditioning の神経細胞保護効果について

## 学位論文内容の要旨

【背景】胸腹部大動脈瘤手術における虚血性脊髄障害は、術後の quality of life に大きな影響を及ぼす重篤な合併症である。当講座では手術手技の工夫及び薬理学的脊髄保護の研究を行ってきた。Ischemic Preconditioning (IPC) の臓器保護効果についての研究が多数報告され、IPC 後 3 時間以内のみ発現する 'early' IPC と 12~24 時間後に発現し約 72 時間まで持続する 'late' IPC の 2 つのタイミングがあるとされている。更に early IPC における adenosine triphosphate (ATP) 依存性カリウム ( $K_{ATP}$ ) チャンネルの構造及び役割の詳細が明らかになってきた。これにより  $K_{ATP}$  チャンネル開口薬による Pharmacological preconditioning (PPC) の研究が進められ、心筋・脳などの臓器で虚血に対する臓器保護効果が認められたが、脊髄についての報告は少ない。我々は、ウサギ脊髄虚血再灌流モデルを用いて非選択的  $K_{ATP}$  チャンネル開口薬である nicorandil が PPC 効果を持つことを報告した。

【目的】IPC と nicorandil による PPC の脊髄保護効果を比較し、更に非選択的  $K_{ATP}$  チャンネル阻害剤である glibenclamide を先行投与することによる脊髄保護効果の変化をみることで、脊髄における early IPC での  $K_{ATP}$  チャンネルの役割を検討すること。

【対象と方法】New Zealand White Rabbits 雄 3.5 ~ 4.5 kg を 24 羽を以下の 4 群に無作為に分け、ウサギ脊髄虚血モデル (バルーン付きカテーテルによる 15 分間の腎動脈下腹部大動脈遮断により脊髄虚血を誘発) を作成。薬剤投与はすべて静脈内投与。大動脈遮断 (AXC) 直前及び解除 5 分後に動脈血ガス分析を行った。

control (C) group (n=6) : 15 分間の AXC, 15 分間の再灌流. ischemic preconditioning (IPC) group (n=6) : 5 分間の一過性 AXC (=IPC) 及び 5 分間の再灌流の後 AXC. nicorandil (N) group (n=6) : AXC 10 分前に nicorandil 100  $\mu$ g/kg 投与. IPC+Glibenclamide (G) group (n=6) : IPC 5 分前に glibenclamide 3mg/kg 投与。脊髄保護効果の評価は、運動神経機能評価については虚血 8 時間後、24 時間後、48 時間後に Johnson Score による 6 段階評価を行った。病理組織学的評価は、虚血 48 時間後で採取した L3-4 レベルの脊髄 Hematoxylin-Eosin 染色標本の脊髄前角運動神経細胞数を計測した。統計学的検討は、Johnson Score の比較については、群内比較には Wilcoxon signed rank test, 群間比較には Mann-Whitney U test を用いた。連続変数の比較は One-way analysis of variance 及び Fischer post hoc testing を用いた。

P-value はすべて 0.05 未満で有意差とした。

【結果】各群間において血行動態、直腸温、動脈血ガス分析の各項目に有意差を認めなかった。運動神経機能については、群内比較では IPC+G 群で 8 時間後と 48 時間後の比較で 48 時間後の score は有意に低かった。C 群、IPC 群、N 群では有意差は認めなかった。群間比較では、全ての時点で IPC 群は C 群、IPC+G 群より有意に高値であった。IPC 群と N 群間には有意差はなかった。病理組織所見では、IPC 群と N 群の脊髄前角においては多数の大きな多棘の運動神経細胞が認められ、大部分の核は核膜が平滑で核小体を確認できた。これに対し C 群、IPC+G 群では運動神経細胞の細胞体は萎縮し、核が凝集している細胞体が多く見られた。前者を計測した運動神経細胞数では、C 群と比較して IPC 群及び N 群では有意に高値であった。C 群と IPC+G 群間に有意差は認めなかった。以上より 5 分間の虚血及び 5 分間の再灌流による IPC は nicorandil による PPC と同等の神経保護効果を持ち、その作用は glibenclamide の前投与により消失することがわかった。

【考察】本研究では、5 分間の虚血及び 5 分間の再灌流を採用し、early IPC 効果が得られることが示された IPC を惹起する虚血時間を 5 分間とした理由は、諸家の報告の多くが 5 分間を採用していたことに加え、ヒト心房細胞にて 4-5 分間の虚血及び 5 分間の再灌流のパターンが最も preconditioning 効果が得られたとする Ghosh らの報告にも基づいている。

early IPC は mitochondrialK<sub>ATP</sub> チャンネルの活性化によるものとする報告が多く見られ、選択的 mitochondrialK<sub>ATP</sub> チャンネル開口薬 diazoxide 及び阻害剤 5-hydroxydecanoic acid (5-HD) を用い、diazoxide が心筋・脳において PPC 効果を持つことを示した研究も報告されている。ウサギ脊髄虚血モデルにおいて diazoxide 5mg/kg の虚血前投与が PPC 効果を持つことが示されている一方、5-HD 20mg/kg の前投与によっては diazoxide の PPC 効果は消失せず、glibenclamide 1mg/kg の前投与により消失したとする報告もあり、脊髄においては sarcolemmalK<sub>ATP</sub> チャンネルの関与も否定できない。この点から脊髄における early IPC の機序については、更なる研究が必要である。

IPC と PPC の相違点として、脊髄血流 (SCBF) に対する影響が挙げられる。IPC による虚血再灌流後の SCBF の増加を示す報告がいくつかあるが、一方で 30-100 µg/kg の nicorandil 投与は SCBF を変化させないとする報告がある。脳の hyperaemia は虚血による障害が軽度な領域では回復を加速させるが、不可逆的障害を受けた領域では二次的な障害を招くとする報告もあり、IPC による再灌流時の SCBF の増加の神経保護効果への影響については研究が必要である。

運動神経学的評価の指標は、客観的評価として Johnson score を、定量的評価として脊髄 H-E 染色切片での形態学的に正常な脊髄前角細胞数を用いた。本モデルでは 15 分間の大動脈遮断により脊髄での apoptosis が誘導されることが解っている。C 群、IPC+Glib 群で多く見られた核の凝集、細胞体の萎縮といった前角細胞の変性の所見は apoptosis を示唆する所見であった。各群内での score の経時的変化に注目すると、IPC+G 群でのみ虚血 8 時間後と比べ 48 時間後の score は有意に低値であったが、IPC 群、N 群では差は認めなかった。このことから IPC 及び PPC が apoptosis の誘導を抑制する可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀  
副 査 教 授 北 畠 顕  
副 査 教 授 佐々木 秀 直

学 位 論 文 題 名

## ウサギ脊髄虚血再灌流モデルにおける

## ischemic preconditioning の神経細胞保護効果について

本研究の目的は、ウサギ脊髄虚血再灌流モデルにおいて、'early' ischemic preconditioning(IPC)と nicorandil による pharmacological preconditioning(PPC)の脊髄保護効果を比較すること、及び脊髄における early IPC での adenosine triphosphate 依存性カリウム( $K_{ATP}$ )チャンネルの役割を検討することである。

New Zealand White Rabbits 雄 3.5 - 4.5 kg を 24 羽を以下の 4 群に無作為に分け、Balloon catheter を用いて、腎動脈下腹部大動脈遮断(AXC)により apoptosis が優位に生じるとされる 15 分間の脊髄虚血を引き起こした後に再灌流した。薬剤投与はすべて静脈内投与とした。薬剤は、nicorandil; $K_{ATP}$  チャンネル開口薬, glibenclamide; $K_{ATP}$  チャンネル阻害薬を用いた。control (C) group (n=6): 15 分間の AXC, 15 分間の再灌流。IPC group (n=6): 5 分間の一過性 AXC(=IPC)及び 5 分間の再灌流の後 AXC。nicorandil (N) group (n=6): AXC10 分前に nicorandil 100  $\mu$ g/kg 投与。IPC+glibenclamide (G) group (n=6): IPC5 分前に glibenclamide 3mg/kg 投与。脊髄保護効果の評価は、運動神経機能評価については虚血 8 時間後、24 時間後、48 時間後に Johnson Score による 6 段階評価を行った。病理組織学的評価は、虚血 48 時間後で採取した L3-4 レベルの脊髄 Hematoxylin-Eosin 染色標本の脊髄前角運動神経細胞数を計測し比較した。

各群間において血行動態、直腸温、動脈血ガス分析の各項目に有意差を認めなかった。運動神経機能については、全ての時点で IPC 群は C 群、IPC+G 群より有意に高値であり、IPC 群と N 群は同等であった。群内で経時的変化を比較すると、IPC+G 群で 8 時間後と 48 時間後の比較で 48 時間後の score は有意に低かった。C 群、IPC 群、N 群では有意な経時的変化は認めなかった。病理組織所見では、IPC 群と N 群の脊髄前角においては多数の大きな多棘の運動神経細胞が認められ、大部分の核は核膜が平滑で核小体を確認できた。これに対し C 群、IPC+G 群では運動神経細胞の細胞体は萎縮し、核が凝集している細胞体が多く見られ apoptosis が示唆された。前者を計測した脊髄前角における運動神経細胞数では、IPC 群及び N 群は C 群と IPC+G 群と比較して有意

に高値であり、IPC 群と N 群間には差は無かった。C 群と IPC+G 群間に有意差は認めなかった。この結果は、Johnson score による運動神経機能の結果とよく一致した。以上より 5 分間の虚血及び 5 分間の再灌流による early IPC は nicorandil による PPC と同等の神経保護効果を持ち、その作用は glibenclamide の前投与により消失することがわかった。このことから、early IPC が虚血に対する脊髄保護効果を発現する機序に  $K_{ATP}$  チャネルの活性化が関与していることが示唆された。本実験モデルでは 15 分間の大動脈遮断により necrosis と apoptosis 両方が誘導されることがこれまでの研究で解っている。本研究の病理組織所見と Johnson Score による神経機能の経時的変化は、IPC 及び PPC は apoptosis を抑制することを示唆していると考えられる。このことをより明らかにするためには、観察期間を延長すること、経時的な組織学的変化を検討すること、より直接的な組織学的 apoptosis の検討が必要と考えられ、今後の検討課題である。

公開発表では、副査の北畠教授から IPC と PPC における脊髄血流の変化と脊髄保護効果発現の機序に関して、佐々木教授から脊髄虚血により誘導される apoptosis の観点から虚血後の観察期間の妥当性に関して、主査の安田教授から大動脈外科における本研究の意義に関して等、質問がなされた。これらの質問に対し、申請者は自らの実験結果、臨床体験、この分野に関する文献などをもとに、誠実に、かつ適切な回答を成しえた。

本研究は、大動脈手術に伴う脊髄障害に対する IPC 及び PPC の臨床応用にむけて、機序解明の一端を担ったものであり、胸腹部大動脈瘤治療の今後の展開に重要な寄与をしようるものと評価される。

審査員一同は、申請者の学識に合わせて、この研究が関連領域研究と臨床成績の進展に成果を評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（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。