

一過性脳虚血ラットにおける脳機能障害と 静脈麻酔薬ならびに人工酸素運搬体の有効性に関する研究

学位論文内容の要旨

高齢化社会の到来により、虚血性脳血管疾患の罹患率・死亡率の増加が予想される。虚血性脳疾患の治療にあたっては、できるだけ早期に虚血領域の血流を再開させること、虚血再灌流直後に生じる活性酸素などのフリーラジカル産生を抑制することが、脳機能障害後遺症を軽減する上で重要である。現在、急性期治療には、組織プラスミノゲン活性化因子などの血栓溶解薬、あるいはエダラボンなどのフリーラジカル消去薬が使用されているが、重篤な副作用が生じる可能性も報告されており、新たな治療薬物の開発が続けられている。プロポフォールは、全身麻酔薬として繁用されている静脈麻酔薬であり、薬理効果として脳保護作用も報告されている。これとは反対に脳保護作用はないとする知見もあり、一定の見解が得られていない。TRM-645 (TRM) は、新規ナノカプセル型人工酸素運搬体であり、輸血代替物にとどまらず、虚血性疾患における酸素治療といった新たな臨床応用への可能性が期待されている。本研究では、脳虚血後の脳機能障害とその治療という視点から、一過性脳虚血後の遅発性脳機能障害を電気生理学的および行動学的手法を用いて評価し、プロポフォールおよび人工酸素運搬体 TRM の遅発性脳機能障害に対する効果を明らかにすることを目的とした。

両側の総頸動脈に 10 分間の血流遮断を加えた 2 血管閉塞 (2VO) モデルラットを用いて、虚血中および虚血前後の脳循環動態、脳波 (EEG) および海馬歯状回での長期増強現象 (LTP) の変化を調べた。プロポフォールについては、手術中に起こり得る脳虚血を想定して、プロポフォールまたはハロセン麻酔開始 1 時間後に 2VO を施行し、さらに 1 時間麻酔を維持した。虚血 7 日目に LTP 形成について検討した。TRM (Hb 濃度: 6 g/dl) に関しては、2VO 直後に TRM または対照として生理食塩水 (生食) を経静脈的に投与し、虚血 4 日目の LTP 形成と高架式十字迷路 (EPM) 試験による不安関連行動の変化を検討した。さらに、虚血時の脳循環動態に対する影響を調べるため、前頭前野での皮質脳血流量の変化と海馬歯状回での組織酸素分圧の変化を測定した。また、TRM については、大腿動脈からの急性脱血によって作製した急性動脈出血モデルを用いての検討も行った。

皮質血流量は、2VO によって虚血前値の約 40~50% に低下し、再灌流直後に一時的な過灌流状態となったが、虚血後 1 および 4 日目には虚血前のレベルまで回復した。EEG は、2VO によって速波成分 (α と β 波) の減少と、徐波成分 (δ 波) の有意な増加が生じた。虚血再灌流後、1 日目には虚血中と鏡像的な脳波変化を示したが、4 日目には虚血前と同様の周波数分布に回復した。即ち、2VO 後 4 日目には脳血流量も EEG による大脳皮質の電氣的活動も虚血前値に復しており、遅発的な脳機能障害を示す所見は認められなかった。一方、海馬歯状回での LTP の経時的変化では、1 日目に比べ 4 日目で LTP 形成障害がより強くみられ、少なくとも 7 日目までその障害程度が持続することが明らかとなった。即ち、

2VO 直後よりも 4 日目において強い LTP 形成障害が認められたという事実は、海馬におけるシナプス伝達が遅発的に障害されることを示しており、海馬 LTP の測定によって脳血流量や EEG の変化よりも鋭敏に、遅発的な脳機能障害を検出することができることを意味している。

手術中の虚血に対する静脈麻酔薬プロポフォール[®]の脳保護効果を検討する目的で、プロポフォールあるいはハロセン麻酔中に、2VO を施行し、7 日目に LTP を測定した。プロポフォール群とハロセン群の LTP 形成は対照群に比較して有意に障害されていた。即ち、プロポフォールはハロセン同様に脳虚血による遅発性脳機能障害を改善したとは考えられず、手術中の虚血に対しては十分な脳保護効果を有していない可能性が示唆された。

TRM の一過性脳虚血後の脳機能障害に対する効果の検討する目的で、2VO 開始直後に尾静脈より 2.5 ml/kg (TRM-2.5 群) または 5 ml/kg (TRM-5 群) を投与した。TRM は 2VO 後 4 日目における LTP 形成障害を用量依存的に改善し、TRM-5 群では偽手術 (Sham) 群と同程度の LTP 形成を示し、生食投与 2VO 群との間に有意差が認められた。さらに、記憶とは関係しない生得的な不安水準の評価方法である EPM 試験を用いた行動学的検討では、実験中の照明強度を暗条件 (20 lux) に設定することによって、2VO による不安関連行動変化が観察された。即ち、生食投与 2VO 群では、Sham 群に比較して、オープンアーム滞在時間が有意に減少しており、脳虚血によって不安が惹起されることが明らかとなった。一方、TRM 投与 2VO 群では、用量依存的にオープンアーム滞在時間が延長し、TRM-5 群では Sham 群とほぼ同様のオープンアーム滞在時間を示した。TRM による 2VO 後の LTP 形成障害ならびに不安惹起に対する改善作用の機序については、脳血流量の経時的変化では群間に相違がなかったが、2VO による脳組織酸素分圧の低下が TRM-5 群で有意に抑えられたことから、直径が赤血球の約 1/30 と小さい TRM が、赤血球が通過できない微少な側副路を通して虚血領域へ到達し酸素を供給した結果ではないかと考えられた。

人工酸素運搬体 TRM の急性動脈出血に対する有効性を検討した。大腿動脈から 25 ml/kg を脱血後、TRM または 2 および 3 倍量の生食を輸液して、脱血後 4 日目の LTP を測定した。また、脱血前後の脳血流量と脳組織酸素分圧の経時的な変化を測定した。TRM 投与群では、脱血量の 1 および 1.5 倍量の投与によって、Sham 群とほぼ同程度に LTP の形成が認められた。一方、生食群では 3 倍量の投与によっても LTP 形成が障害される傾向が認められた。即ち、TRM は脱血に伴う脳機能障害を改善することが明らかとなった。脳血流量については TRM1.5 倍群と生食 3 倍群間に差は認められなかったが、脳組織酸素分圧については、生食群では経時的に低下する傾向を示したのに対して、TRM 群では一定のレベルを維持し、輸液 50 分以降では TRM 群と生食群間に有意差が認められた。これは、脳循環不全を招来するような急性大量出血時に、酸素供給能を有する TRM を輸液として投与することで、出血によって低下した脳組織酸素分圧を、効率よく維持し、結果として予後の改善が可能となることを示している。

以上より、2VO による遅発的な脳機能障害の指標として、海馬歯状回での LTP 形成と高架式十字迷路試験による不安関連行動の評価が有用であることが明らかとなった。手術中の虚血に対する静脈麻酔薬プロポフォールの脳保護効果は、本実験条件では示すことができなかったが、人工酸素運搬体 TRM-645 の 2VO および急性動脈出血による脳機能障害への改善効果が明らかとなった。これらの結果は、急性虚血性脳血管疾患や急性大量出血に対する人工酸素運搬体の有用性を示唆するものであり、酸素供給療法としての新たな臨床応用の可能性を示しているものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 森 本 裕 二
副 査 教 授 吉 岡 充 弘
副 査 教 授 丸 藤 哲

学 位 論 文 題 名

一過性脳虚血ラットにおける脳機能障害と

静脈麻酔薬ならびに人工酸素運搬体の有効性に関する研究

脳虚血性疾患の治療では、脳機能障害の進展を防止することが重要である。本研究では、一過性脳虚血後の遅発性脳機能障害を電気生理学的および行動学的手法を用いて評価し、静脈麻酔薬プロポフォールおよび人工酸素運搬体 TRM-645 (TRM) の遅発性脳機能障害に対する効果を明らかにすることを目的とした。両側総頸動脈を10分間閉塞する2血管閉塞(2VO)モデルラットを用いて、2VOの脳血流量、脳波 (EEG) および海馬歯状回での長期増強 (LTP) 現象への影響を調べた。プロポフォールの実験では、プロポフォールまたはハロセン麻酔中に2VOを施行し、7日目にLTP形成について検討した。TRM (Hb濃度: 6 g/dl)の実験では、2VO直後にTRMまたは生理食塩水(生食)を投与し、4日目のLTP形成と不安関連行動の変化を検討した。また、大腿動脈からの急性動脈出血(25 ml/kg)実験では、脱血後にTRMまたは生食を投与して、4日目の生存率とLTPを測定した。脳血流量は、2VOによって前値の約50%に低下したが、4日目には虚血前のレベルまで回復した。EEGは、2VOによって速波成分の減少と徐波成分の有意な増加が生じたが、4日目には2VO前と同様の周波数分布に回復した。この結果は、遅発的な脳機能障害は脳血流量や脳波からは評価できないことを示している。LTP形成の経時的変化では、2VO後1日目に比べ4日目から少なくとも7日目まではLTP形成障害がより強いことが示された。プロポフォールの脳保護効果についての検討では、プロポフォール群のLTP形成は対照群と比較して有意に障害され、プロポフォールはハロセン同様にLTP形成障害を改善せず、脳虚血に対する十分な脳保護効果を有していない可能性が示唆された。TRMの脳保護効果についての検討では、TRMは2VO後4日目におけるLTP形成障害を用量依存的に改善し、TRM 5 ml/kg群ではSham群と同程度のLTP形成を示した。高架式十字迷路試験では、TRM投与2VO群では、用量依存的にオープンアーム滞在時間が延長し、TRM 5 ml/kg群ではSham群とほぼ同程度のオープンアーム滞在時間を示し、2VOによる不安水準の上昇を改善した。この改善作用の機序については、2VO中の脳組織酸素分圧の低下がTRM群で有意に抑えられたことから、直径が赤血球の約1/30と小さいTRMが、赤血球が通過できない微少な血管系を通じて虚血領域へ酸素を供給した結果ではないかと考えられた。急性出血後4日目の生存率の比較では、Control

群に比べ、TRM 群と Saline 3 倍群で有意な生存率の上昇が認められた。また、TRM 1.5 倍群と Saline 3 倍群間では生存率に有意差は無く LTP 形成は、TRM 投与群では Sham 群とほぼ同程度に LTP 形成が認められたが、生食群では 3 倍量の投与によっても LTP 形成が障害される傾向が認められた。TRM は Saline より少ない投与量で急性動脈出血後の生存率と LTP 形成障害を改善することが明らかとなった。TRM 群も Saline 群も共にその投与により脳血流量は脱血前値以上に増大したが、脳組織酸素分圧は TRM 群では Saline 群より常に高値を示し、投与 50 分以降では TRM 1.5 倍群と Saline 3 倍群との間に有意差が認められた。即ち、TRM は、急性動脈出血後の循環不全による組織低酸素状態を改善することによって、生存率および生存ラットの脳機能障害を軽減すると考えられた。以上より、脳虚血に対するプロポフォールの脳保護効果は、検証することができなかった。しかし、TRM が脳保護効果を有することが確認され、虚血性脳疾患の新たな治療手段となる可能性が示唆された。

発表後、副査の吉岡教授からこれまでの治療法と比較して TRM を用いた治療法の利点と位置付けおよびプロポフォールの他のモデルでの有効性とその作用機序について、丸藤教授から実験に使用したプロポフォールの投与量と循環動態の変動および遅発性細胞死への効果についての質問がなされた。主査の森本教授からプロポフォール実験中の脳血流量、虚血による脳機能障害の長期的変化および TRM の脳機能保護効果の機序について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は実験成績と過去の文献などを引用し、概ね適切に回答した。

本論文は、脳虚血に対する静脈麻酔薬プロポフォールと人工酸素運搬体 TRM-645 の効果について明らかにし、特に TRM-645 の虚血性脳疾患への急性期治療への酸素供給療法としての可能性を示唆した点において高く評価され、新たな治療手段につながるものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、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。