



Controlled low-flow reperfusion after warm brain ischemia reduces reperfusion injury in canine model

宗像, 宏

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-03-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3143

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003143>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	宗像 宏
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 3143 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	平成 23 年 3 月 7 日

【 学位論文題目 】

Controlled low-flow reperfusion after warm brain ischemia reduces reperfusion injury in canine model(低流量灌流法は犬を用いた全脳、温阻血後に発生する再灌流障害を軽減する)

審 査 委 員

主 査	教 授	前川 信博
	教 授	甲村 英二
	教 授	平田 健一

(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

Controlled low-flow reperfusion after warm brain ischemia reduces reperfusion injury in canine model

低流量灌流法は
犬を用いた全脳、温阻血後に発生する再灌流障害を軽減する

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 大北 裕教授)

宗像 宏

【背景】

近年急性 A 型大動脈解離に対する手術成績は手術手技や補助手段の進歩により飛躍的に向上している。しかしながら約 20-30%の症例で何らかの臓器灌流障害を合併し、臓器障害の進行や悪化によって依然高い死亡率を認める。脳の灌流障害は急性 A 型大動脈解離の約 6-25%に認め、これらの症例に対する手術死亡率は 14-55%と報告され、明らかな予後不良因子である。また手術に成功し救命しえたとしても高度脳障害が残存し、遠隔期の Activities of Daily Living(ADL)を低下させる植物状態や脳死などの臨床上のジレンマに遭遇する。

このような術後脳障害が起こる原因として、術前の温阻血時間が影響しているため、速やかな再灌流による虚血解除が最重要であることに疑う余地はない。また脳灌流障害による虚血脳へ大動脈解離手術により通常血流で脳虚血の解除・再灌流すること、いわゆる脳虚血再灌流障害が術後脳障害悪化に大きく関与していると考えた。

そこで低流量再灌流法を用いることで脳浮腫をはじめとする脳虚血再灌流障害を軽減し、結果として神経学的予後の改善が期待できると仮説した。実際の臨床で、急性 A 型大動脈解離に合併した頸動脈灌流障害の患者に、救急外来で大腿動脈脱血・右総頸動脈送血による簡便な血液冷却装置を組み込んだバイパス回路による中枢神経救済システムを確立した。大動脈手術前に虚血脳へ早急に低流量で再灌流することが術後の神経学的脳障害を軽減することを証明した(参考文献)。

今回ビーグル犬を用いて全脳、温阻血後に発生する再灌流障害に対する再灌流量調節モデルを作成し、虚血再灌流時の低流量灌流法

の有用性を検討した。

【方法】

10kg 前後のビーグル犬を用いて全身麻酔にて手術を行った。胸骨正中切開し上行から弓部大動脈及び頸部分枝を露出した。まずは自己心拍を残した状態で、頸部分枝及び弓部大動脈単純遮断による体循環を停止し、全脳を含む全身虚血モデルを作製した。この自己心拍を維持した全身虚血状態を15分間継続した後、弓部大動脈遮断の解除を行い体循環を再開させ、全脳を除く全身の再灌流を開始した。脳血流の再開はローラーポンプを用いた大腿動脈脱血・右腋窩動脈送血の回路を使用し再灌流を行った。この時の再灌流流量によって2群に分け、3時間の調節再灌流を行なった後、実験を終了した。再灌流流量は右頸動脈血流(RCCA flow ; ml/min)を指標とし、RCCA flow 比を以下のように定義した。

$$\text{RCCA flow 比} = (\text{全脳虚血前の RCCA flow の平均}) / (\text{再灌流時の RCCA flow の平均})$$

また2群をRCCA flow 比によって以下のように設定した。

●Control (C) 群 (n=5) : RCCA flow 比 1.0 を目標に調節再灌流を施行

●低流量再灌流 (L) 群 (n=5) : RCCA flow 比 0.4 を目標に調節再灌流を施行

実験中は体血圧 (FAP ; mmHg)、脳波 (EEG)、右頸動脈血流量 (RCCA flow)、神経学的所見の経時的変化を記録すると同時に、血液データ (pH, PaO₂, PaCO₂, Hb, PvCO₂, ラクテート) を評価した。また再灌流3時間で実験は終了し、早急に右大脳半球を摘出し脳含水率 (%) と病理学的所見 (血管周囲の浮腫細胞数 (Hematoxylin-Eosin 染色)、脱核細胞数 (Nissl 染色)、アポトーシス評価 (TUNEL 染色)、NF-κB (免疫学的染色)) から再灌流障害の評価を行なった。

【結果】

1. 全脳虚血後の再灌流量調節モデルの妥当性の検討

2群間で虚血前<Pre>、全脳虚血時<Isch>、脳再灌流時<Rep>におけるFAP・RCCA flow・血液データを比較したところ、FAPと血液データでは両群において統計学的有意差を認めなかった。また全例大動脈遮断から2分以内に脳波は消失しており、完全な脳虚血が作成されたことが証明された。RCCA flow は、<Pre>および<Isch>では有意差は認めなかったものの、<Rep>ではC群が 85.4 ± 29.5 ml/min (RCCA flow 比: 1.22 ± 0.16) で、L群が 29.3 ± 12.5 ml/min (RCCA flow 比: 0.46 ± 0.11) であり、両群間で有意差を認めた ($p < 0.0001$)。以上より今回作成した15分間の大動脈遮断法による全脳虚血後の再灌流量調節モデルは、妥当であることが証明できた。

2. 低流量再灌流法の有用性に関する検討

次にこの再灌流量調節モデルを使用し低流量再灌流法の有用性について検討した。

a. 神経学的変化

再灌流時の自発呼吸の再開・脳波の再現の有無を評価した。

自発呼吸の再開はC群の全例で認めなかったが、L群では2例 (40%、再開時間 60, 150 分) に認め、L群が神経学的予後が良好である傾向が示された ($p = 0.11$)。

また再灌流後の脳波の変化では、C群は全例脳波の再出現を認めなかったが、L群では4例 (80%、平均脳波再現時間 86.0 ± 66.5 分) で再出現し、統計学的に有意差 ($p = 0.01$) を認めた。

b. 脳含水率

再灌流3時間後の右大脳半球における脳含水率を評価した。

C群: $45.0 \pm 3.9\%$ vs L群: $38.6 \pm 3.5\%$ であり、L群で脳含水率が有意に低

かった ($p=0.0227$)。また全 10 例の検討でも、再灌流流量と脳含水率との間に正の相関関係が存在した ($p=0.049$, $r=0.66$, $y=36.8+5.9X$)。

c. 病理学的検討

脳浮腫の評価に血管周囲の浮腫性変化陽性細胞の数を、脳神経細胞障害の評価に核障害を免れた細胞の数を、アポトーシス評価に TUNEL 染色陽性の細胞数と、免疫学的染色にて NF κ B 活性化陽性細胞の有無を調べた。

●浮腫性変化陽性細胞数：C 群： 4.1 ± 0.9 vs L 群： 1.3 ± 0.3 ($p=0.0001$)
再灌流流量との間に正の相関関係が存在 ($p=0.0024$, $r=0.70$, $y=-0.03+3.2X$)

●核障害を免れた細胞数：C 群： 7.0 ± 2.6 vs L 群： 34.1 ± 9.4 ($p=0.0002$)
再灌流流量との間に負の相関関係が存在 ($p=0.0009$, $r=0.76$, $y=47.8-32.2X$)

●TUNEL 染色陽性の細胞数：C 群： 379.2 ± 4.3 vs L 群： 93.8 ± 63.0
($p=0.0003$)

再灌流流量との間に正の相関関係が存在 ($p=0.0041$, $r=0.82$, $y=-40.4+334.3X$)

●NF κ B 活性化陽性の細胞数：C 群で多い傾向にあった。

以上より低流量再灌流を施行した L 群では、浮腫性変化陽性の細胞数が少なく、脳含水率が低かった。またアポトーシス反応が抑制され細胞障害が軽減し、NF κ B 活性が抑えられる傾向にあった。これら虚血再灌流障害が軽減され、L 群において自発呼吸の早期再開といった神経学的予後の改善を認めた。

【考察】

脳の灌流障害を伴った急性 A 型大動脈解離に対する手術成績の改善には術後に生じる脳障害の軽減が重要であると考え、今回我々は脳虚血後の低流量再灌流が虚血再灌流障害を軽減させることを証明した。

至適な再灌流量については検討の余地があるが、虚血前血流の

0.3-0.6 倍に設定した低流量はビーグル犬における再灌流障害を軽減し、神経学的予後を改善させた。

全脳温阻血モデルを使用し、再灌流量に注目した虚血再灌流調節モデルの報告は少ない。今回ローラーポンプを用いて再灌流調節モデルを確立した。

再灌流流量と脱核細胞数や TUNEL 染色陽性細胞が相関関係にあることが示されたことは、虚血再灌流障害にアポトーシスが大きく関与していることを意味し、低流量再灌流がアポトースを抑制し再灌流障害を軽減する事が判明した。

実験の課題として再灌流後 3 時間しか観察していない事、脳血流量を右頸動脈血流量で評価した事、脳血流の評価に脳組織圧を評価しなかった事などが考えられた。

【結語】

ビーグル犬を用いた全脳 15 分温阻血後の再灌流量調節モデルを使用し、再灌流を 3 時間行った。低流量で再灌流することが虚血再灌流障害を軽減させ、神経学的予後を改善させることを証明した。脳灌流障害伴う急性 A 型大動脈解離に対する低流量再灌流法は、再灌流障害を軽減させる有効な治療法と考えられた。

【参考文献】

Controlled earlier reperfusion for brain ischemia caused by acute type A aortic dissection.

Ann Thorac Surg. 2009 Apr;87(4):e27-8.

Munakata H, Okada K, Kano H, Izumi S, Hino Y, Matsumori M, Okita Y.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2097 号	氏 名	宗像 宏
論文題目 Title of Dissertation	低流量灌流法は犬を用いた全脳、温阻血後に発生する再灌流障害を軽減する Controlled low-flow reperfusion after warm brain ischemia reduces reperfusion injury in canine model		
審査委員 Examiner	主 査 前川 信博 前川信博 Chief Examiner 副 査 甲村 英二 甲村英二 Vice-examiner 副 査 平田 健一 平田健一 Vice-examiner		

[目的]

脳の灌流障害を伴った急性 A 型大動脈解離に対する手術成績の改善には術後に生じる脳障害の軽減が重要である。虚血再灌流を低流量にすることで脳浮腫をはじめとする脳障害を軽減し、結果として神経学的予後の改善が期待できるという仮説を検証するため、(1) ビーグル犬を用いて全脳、温阻血後に発生する再灌流障害に対する再灌流量調節モデルを作成し、(2) 虚血再灌流時の低流量灌流法の有用性を検討した。

[方法]

10kg 前後の全身麻酔下ビーグル犬を用いた。まずは自己心拍を残した状態で、頸部分枝及び弓部大動脈単純遮断による体循環を停止し、全脳を含む全身虚血モデルを作製した。この自己心拍を維持した全身虚血状態を 15 分間継続した後、弓部大動脈遮断の解除を行い体循環を再開させ、全脳を除く全身の再灌流を開始した。脳血流の再開はローラーポンプ

を用いた大腿動脈脱血・右腋窩動脈送血の回路を使用し 3 時間再灌流した後、実験を終了した。再灌流流量は右頸動脈血流 (RCCA flow ; ml/min) を指標とし、虚血前値に対する虚血後の比 (RCCA flow 比) によって、Control (C) 群 (n=5: RCCA flow 比 1.0 を目標) と低流量再灌流 (L) 群 (n=5: RCCA flow 比 0.4 を目標) の 2 群を設定した。脳波 (EEG)、右頸動脈血流量 (RCCA flow) を記録した。実験終了時、右大脳半球を摘出し、脳含水率 (%) 測定と病理標本作成をおこなった。

[結果]

- 全脳虚血後の再灌流量調節モデルの妥当性の検討
全例大動脈遮断から 2 分以内に脳波は消失し、完全な脳虚血が作成されたことが証明された。RCCA flow 比は C 群: 1.22 ± 0.16 、L 群: 0.46 ± 0.11 であった ($p < 0.0001$)。
- 低流量再灌流法の有用性に関する検討
 - 神経学的変化
自発呼吸の再開は C 群の全例で認めなかったが、L 群では 2 例 (40%、再開時間 60, 150 分) に認めた ($p = 0.11$)。また再灌流後、C 群は全例脳波の再出現を認めなかったが、L 群では 4 例 (80%、平均脳波再現時間 86.0 ± 66.5 分) で再出現した ($p = 0.01$)。
 - 脳含水率
再灌流 3 時間後の右大脳半球において、C 群: $45.0 \pm 3.9\%$ 、L 群: $38.6 \pm 3.5\%$ であり、L 群で脳含水率が有意に低かった ($p = 0.0227$)。
 - 病理学的検討
 - 浮腫性変化陽性細胞数: C 群: 4.1 ± 0.9 、L 群: 1.3 ± 0.3 ($p = 0.0001$)
 - 核障害を免れた細胞数: C 群: 7.0 ± 2.6 、L 群: 34.1 ± 9.4 ($p = 0.0002$)
 - TUNEL 染色陽性細胞数: C 群: 379.2 ± 4.3 、L 群: 93.8 ± 63.0 ($p = 0.0003$)
 - NF- κ B 活性化陽性の細胞数: C 群で多い傾向にあった。

結果のまとめ: 低流量再灌流群では、(1) 神経学的予後の改善 (自発呼吸の早期再開や脳波再出現) を認め、(2) 浮腫性変化陽性の細胞数が少なく、脳含水率が低く、またアポトーシス反応が抑制され細胞障害が軽減し、NF- κ B 活性が抑えられる傾向にあった。

[考察]

全脳温阻血モデルを使用し、再灌流量に注目した虚血再灌流調節モデルの報告は少ない。今回ローラーポンプを用いる再灌流調節モデルを確立した。

検討の余地はあるが、虚血前血流の 0.3-0.6 倍に設定した低灌流量はビーグル犬における再灌流障害を軽減し、神経学的予後を改善させた。

再灌流流量と脱核細胞数や TUNEL 染色陽性細胞数とが相関することは、低流量による再灌流がアポトーシスを抑制し再灌流障害を軽減する可能性を示す。

実験の課題として再灌流後 3 時間しか観察していない事、脳血流量を右頸動

脈血流量で評価した事、脳血流の評価に脳組織圧を評価しなかった事がある。

[結語]

ビーグル犬を用い、全脳 15 分温阻血後の再灌流量調節モデルを作成し、低流量で再灌流を行うことによって虚血再灌流障害を軽減させ、神経学的予後も改善した。低流量再灌流法は、脳灌流障害伴う急性 A 型大動脈解離の術後脳障害を軽減させうる有効な治療法となりうる可能性がある。

本研究は、脳の虚血再灌流障害における再灌流量の役割について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった低流量再灌流法の有用性を実験的に示し、脳灌流障害伴う急性 A 型大動脈解離の術後脳障害の治療法について、重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。