

一過性脊髄虚血動物モデルにおけるフリーラジカスカベンジャーの脊髄保護効果の検討

伊藤 寿美子

川崎医科大学麻酔・集中治療医学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 胸腹部大動脈手術後の重篤な合併症に、対麻痺がある。大動脈遮断による脊髄への血液供給の途絶と、再還流によって発生するフリーラジカルがその発症に関与していると報告されている。本研究では一過性脊髄虚血動物モデルを用いて、再還流後にフリーラジカスカベンジャーを投与し、運動ニューロン数、運動ニューロンの断面積と神経学的所見から脊髄保護効果を検討した。22羽の日本白色家兎を用いて、左腎動脈下大動脈を20分間閉塞した。再還流30分後にエダラボン 3mg/kgを投与し48時間後(E48H群, n=6)、7日後(E7D群, n=6)のそれぞれの神経学的所見と脊髄運動ニューロンの組織学的所見より、その脊髄保護効果を虚血群(コントロール群, n=6)および正常群(シャム群, n=4)と比較検討した。

コントロール群で全例、対麻痺となった。脊髄1横断面あたりの正常ニューロン数は、エダラボン投与群で有意に改善していた(コントロール群 6 ± 12 , E48H群 38.2 ± 40 , E7D群 24 ± 19)。正常運動ニューロン1個あたりの平均断面積は、E48H群、E7D群でそれぞれコントロール群と比較して有意に大きかった。しかし、E48H群はシャム群より有意に大きかったが、E7D群はシャム群より有意に小さかった(コントロール群 113 ± 117 , E48H群 408 ± 298 , E7D群 267 ± 159 , シャム群 377 ± 23)。また、E7D群の脊髄組織において正常運動ニューロンと虚血性運動ニューロンの混在が認められた。

再還流30分後のフリーラジカスカベンジャー投与は、コントロール群と比較して48時間後の神経学的所見は改善した。しかし、組織学的所見では運動ニューロン数はコントロール群よりも増加していたが、運動ニューロンの断面積はシャム群よりも大きく細胞性浮腫が確認された。7日後の神経学的所見でも改善がみられ、運動ニューロン断面積においても縮小がみられたが、虚血性運動ニューロンが混在しており、細胞浮腫より萎縮への進行が考えられ、エダラボン7日後での脊髄保護効果は不十分であると考えられる。この結果より、エダラボンは一過性脊髄虚血に対して神経保護作用を持つものの、遅発性神経障害を完全には抑制できなかった。

(平成20年10月30日受理)

キーワード：一過性脊髄虚血、フリーラジカスカベンジャー、細胞性浮腫

緒言

胸腹部大動脈手術後の対麻痺は、その発生頻度は5~15%と報告されていた¹⁻³⁾。それを予

防するために薬理的、外科手技的に様々な試みが行われ、発生率が5~10%へと低下⁴⁾したが、依然として重篤な合併症である。

別刷請求先
伊藤寿美子
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学麻酔・集中治療医学

電話：086 (462) 1111
ファックス：086 (464) 1188
Eメール：sumisumi@med.kawasaki-m.ac.jp

術後対麻痺の原因の大部分が一過性脊髄虚血によるが、興奮性アミノ酸放出や一酸化窒素によるニューロン死、細胞内 Ca^{2+} 過剰、炎症、アポトーシス、フリーラジカルによる細胞障害が報告されている⁵⁾。虚血が起こると嫌気性代謝によるアシドーシスの進行によって Na^+ が細胞内に流入し、 Na^+ 負荷のために細胞は膨張する。そして再還流によって Ca^{2+} が流入し、再還流時に発生するフリーラジカルによる細胞膜障害によりさらに細胞内 Ca^{2+} が増加し、最終的には細胞膜破壊を起し、不可逆的变化となり細胞死をきたす⁶⁾。また、再還流後にはアラキドン酸代謝系や一酸化窒素合成酵素からのフリーラジカル産生による酸化ストレスも、細胞死を助長する⁷⁾。

このことから再還流時にフリーラジカルスカベンジャーを投与することにより細胞死への経路を遮断し、再還流障害を軽減あるいは阻止できる可能性が考えられる。

Abe *et al.*⁸⁾ はラットの中大脳動脈閉塞モデルを用いて、フリーラジカルスカベンジャーを投与することによって、虚血後の脳浮腫を軽減させることを証明した。さらに Nishi *et al.*⁹⁾ はその抗浮腫作用は容量依存的であることを証明した。その後、Takahashi *et al.*¹⁰⁾ がウサギー過性脊髄虚血モデルにおいても48時間後の脊髄保護効果を示唆している。しかし、これらの研究ではその評価は神経学的所見と組織学的所見による正常運動ニューロン数によって効果を判定しているが、両者間において必ずしも所見が一致していないものもある。

神経細胞は一般に障害を受けると可逆的細胞浮腫を経て細胞死へ至る。Kiyoshima *et al.*¹¹⁾ は、ウサギー過性脊髄虚血モデルを用いて15分間の脊髄虚血を行い、再還流8時間後には運動ニューロンの細胞体の膨張が見られ、それらのウサギでは分節脊髄誘発電位の回復が不良であったことを報告している。これらのことから、本研究では一過性脊髄虚血動物モデルを用いて再還流後にフリーラジカルスカベンジャーを投与し、運動ニューロンの断面積を測定すること

によって細胞障害を評価するとともに神経学的評価を行うことで、その脊髄保護効果を詳細に検討した。

対象と方法

本研究は、川崎医科大学動物実験委員会の承認(05-064, 07-007)を受け、川崎医科大学動物実験指針に基づき実施された。牝の日本白色家兎22羽(体重 3.1 ± 0.4 kg)を使用した。

麻酔および一過性脊髄虚血モデルの作成

ケタミン 20mg/kg、キシラジン 2 mg/kg を筋肉内に投与し、5%セボフルレンと酸素を吸入させて麻酔を導入した。ウサギを仰臥位とし、自発呼吸下に亜酸化窒素-酸素 1 : 1 の混合気に1.5~2%セボフルレンを添加し、これを吸入させることで麻酔維持を行った。耳介静脈に24Gカテーテルを挿入留置し、乳酸リンゲル液を $4 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ で投与を開始し、麻酔覚醒まで続行した。体温は直腸温を持続測定し、ヒートランプを使用して $38 \sim 39.5^\circ\text{C}$ に維持した。一過性脊髄虚血モデルは Sakurai *et al.*¹²⁾ の方法で作成した。すなわち、左および右大腿動脈を剥離し、ついでヘパリン300単位を静脈内に投与した。そして右大腿動脈より4Frのバルーン付カテーテル(アローウェッジプレッシャーカテーテル、アロウジャパン株式会社、東京)を腹部大動脈に15cm挿入し留置した(図1)。このカテーテルの先端圧を持続的に測定し、これを中枢動脈圧とした。ついで左大腿動脈に24Gカテーテルを挿入し、これを介して末梢動脈圧を持続測定した。上記の外科操作を終了後、30分間循環動態を安定させた。そして末梢動脈圧波形が消失するまでバルーンをインフレートし大動脈を閉塞し、これを維持した。20分後、バルーンをデフレートすることによって再還流を行った。再還流30分後、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボン(ラジカット®田辺三菱製薬株式会社、大阪) 3 mg/kgあるいは生理食塩水を静脈内に投与した。再還流60分後、全てのカテーテルを抜去し、動物を麻酔から覚

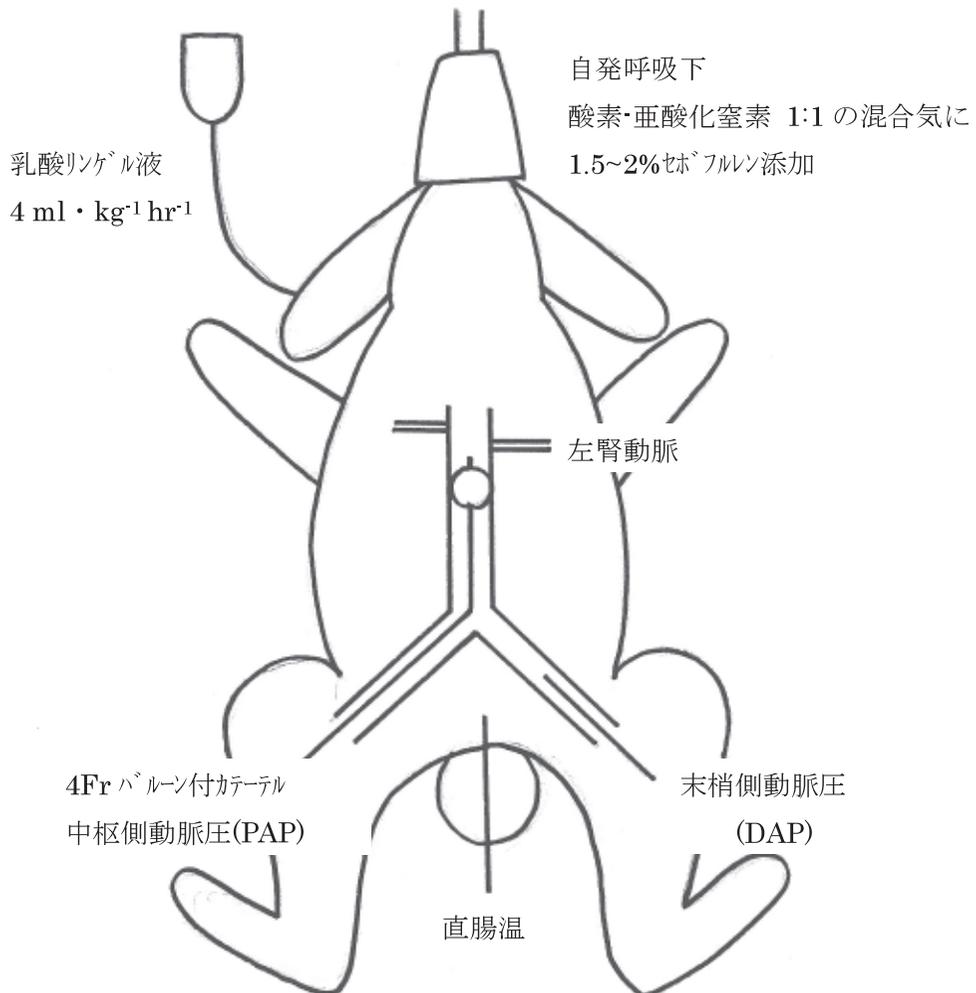


図1 一過性脊髄虚血モデル

醒させた。

動物を以下のグループに分けて観察を行った。

シャム群 (n=4)：麻酔およびすべての外科操作を行うが、大動脈閉塞を行わない群。

コントロール群 (n=6)：20分間の大動脈閉塞および再還流30分後に生理食塩水の静脈内投与を行う群。

エダラボン群 (E 群：n=12)：20分間の大動脈閉塞および再還流30分後にエダラボン (3 mg/kg) 静脈内投与を行う群。

E 群をさらに次の2群に分けた。

エダラボン48時間群 (E48H 群：n=6)：再還

流後48時間経過観察を行う群。

エダラボン7日群 (E7D 群：n=6)：再還流後7日間経過観察を行う群。

大動脈閉塞前、大動脈閉塞10分、20分、再還流30分、60分で平均中枢動脈圧 (MPAP)、平均末梢動脈圧 (MDAP)、体温を記録し、さらに動脈血を採取し、血液ガス分析 (pH, PaO₂, PaCO₂) を行った。血糖は大動脈閉塞前にのみ測定した (図2)。

神経学的評価

再還流48時間後あるいは7日後に Drummond の

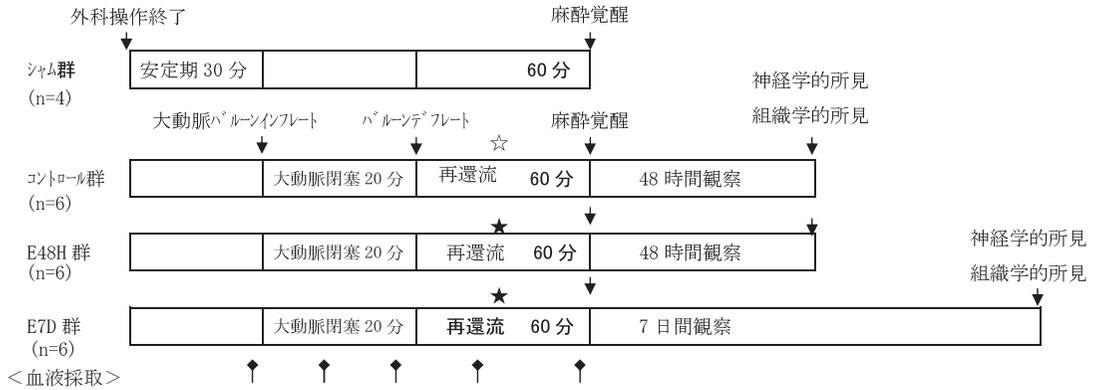


図2 実験プロトコール

★：再還流30分後にエダラボン 3 mg/kg を静脈内投与

☆：再還流30分後に生理食塩水を静脈内投与

↑：血液採取

シヤム群：外科操作のみで、大動脈閉塞は行わない群、

コントロール群：外科操作終了後、20分間の大動脈閉塞を行い、再還流30分後に生理食塩水投与を行った群、

E48H群：20分間の大動脈遮断を行い、再還流30分後にエダラボンを投与し、その後48時間経過観察を行う群、

E7D群：20分間の大動脈遮断を行い、再還流30分後にエダラボンを投与し、その後7日間経過観察を行う群

神経学的スコア¹³⁾により後肢の運動機能を評価した。すなわち下肢運動機能を0 = 対麻痺、1 = 後肢を動かすことができるが体重を支えられない、2 = 体重を支えることが出来るが跳躍できない、3 = 跳躍できるが正常ではない、4 = 正常として5段階にスコアリングした。

組織学的評価

E48H群およびE7D群でそれぞれ再還流48時間および7日後の神経学的評価の後、ペントバルビタール100 mg/kgを静脈内投与後、心停止を確認し、ついで第5腰椎レベルの脊髄(L5)を摘出し10%ホルマリンで10日間、固定を行いパラフィン包埋した。これを5 μ mにスライスし、HE染色を行った。脊髄の形態学的変化は光学顕微鏡を用いて100~400倍率で観察した。画像処理プログラム (IPLab, scanalytics Inc., Rockville, USA) を用いて1横断面あたりの脊髄前角の運動ニューロン数とその運動ニューロンの個々の断面積を測定した。虚血性運動ニューロンはニッスル小体の欠如を伴う細胞質の好酸性染色、核濃縮の出現と定義した¹⁴⁾。

統計学的評価

統計学的解析はStatMate III (ATMS Co., Ltd., 東京) を用いて行い、結果は平均±標準偏差で表した。MPAP, MDAP, pH, PaO₂, PaCO₂, 体温, 血糖値の比較にはNewman-Keuls testを用い、運動ニューロンの断面積とニューロン数、神経学的スコアの比較にはMann-Whitney U testを使用した。危険率p<0.05を有意差ありとした。

結果

各群の大動脈閉塞前、閉塞中および再還流後の動脈圧、血液ガス、体温、血糖値の平均値を表1に示した。各群間でいずれの値にも有意差はなかった。各群においてPaCO₂ 23~30 mmHg, pH7.44~7.53の範囲で軽度の呼吸性アルカローシスを認めたが、群間でPaCO₂, pHに有意差はなかった(表1)。

神経学的評価の結果を図3に示した。シヤム群では全例スコア4.0であった。E48H群ではスコアは3.2±1.5であり、E7D群とコントロール群と比較して有意に高かった(E7D群2.8±1.6, コントロール群0.17±0.4, p<0.001)。E群内ではE7D群よりE48H群が高値であり、有意差

表1 大動脈閉塞前後での動脈圧, 血液ガス, 体温, 血糖の推移

	MPAP(mmHg)	MDAP(mmHg)	pH	PaO2(mmHg)	PaCO2(mmHg)	Temp(°C)	Glucose(mg/dl)
(大動脈閉塞前)							
コントロール群	80±5.5	80±7	7.51±0.09	140±43	30±8	38.9±0.6	100±13
E48H群	93±20	92±19	7.48±0.06	164±35	30±7	36.7±3.9	123±33
E7D群	85±20	85±14	7.51±0.04	189±30	26±8	38.4±1.3	83±17
(大動脈閉塞10分)							
コントロール群	104±17	14±4	7.52±0.06	149±34	25±4	38.6±0.7	
E48H群	102±19	15±4	7.45±0.78	167±36	27±5	38.1±0.9	
E7D群	106±19	17±4	7.51±0.05	179±18	24±2	38.1±1.6	
(大動脈閉塞20分)							
コントロール群	106±15	14±4	7.53±0.07	153±32	24±5	38.7±0.5	
E48H群	107±14	15±4	7.49±0.06	177±26	27±5	38.7±0.8	
E7D群	109±14	17±5	7.49±0.05	188±26	24±5	38.2±1.4	
(再還流30分)							
コントロール群	87±12	85±12	7.49±0.06	154±42	25±2	38.8±0.6	
E48H群	100±18	96±18	7.45±0.04	179±24	26±5	38.1±0.7	
E7D群	86±23	82±20	7.45±0.07	192±18	26±4	38.3±1.3	
(再還流60分)							
コントロール群	91±9	91±12	7.49±0.05	149±33	23±4	38.9±0.6	
E48H群	99±18	96±17	7.44±0.07	178±27	29±7	38.2±0.6	
E7D群	78±14	76±13	7.46±0.09	189±30	23±2	38.5±1.1	

大動脈閉塞10, 20分のMDAPは大動脈遮断のため大動脈閉塞前, 再還流30, 60分の値よりも低下した各測定時期において, それぞれの測定項目はコントロール群と比較してE48H群, E7D群とも有意差はなかったMPAP: 平均中枢動脈圧, MDAP: 平均末梢動脈圧, PaO2: 動脈血酸素分圧,

PaCO2: 動脈血二酸化炭素分圧, Temp: 体温, Glucose: 血糖

コントロール群: 脊髄虚血-再還流後生食投与群, E48H: 脊髄虚血-再還流後エダラボン投与し48時間経過観察を行う群

E7D: 脊髄-再還流後エダラボン投与し7日間経過観察を行う群

数値は平均±標準偏差で表示した

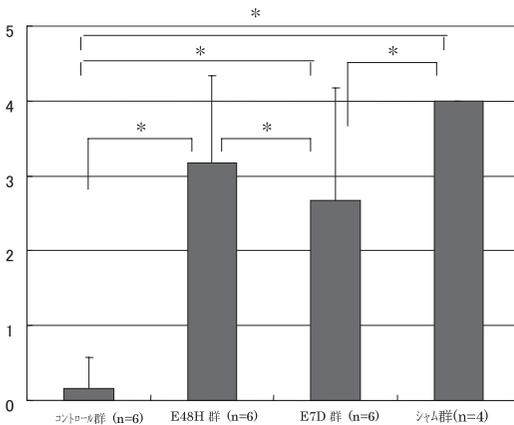


図3 神経学的スコアの比較

神経学的スコアリングシステムによる後肢運動機能評価 (0=対麻痺, 4=正常)

E48H群は, E7D群とコントロール群と比較して, 有意に高く, E群内では, E7D群よりE48H群のほうが有意に高かった。(* = p<0.001)

シャム群: 外科操作のみで, 大動脈閉塞は行わない群,

コントロール群: 外科操作終了後, 20分間の大動脈閉塞を行い, 再還流30分後に生理食塩水投与を行った群, E48H群:

20分間の大動脈遮断を行い, 再還流30分後にエダラボンを投与し, 48時間経過観察を行う群

E7D群: 20分間の大動脈遮断を行い, 再還流30分後にエ

ダラボンを投与し, 7日間経過観察を行う群

が認められた(E7D群 2.8 ± 1.6 , E48H群 3.2 ± 1.5 , $p < 0.001$).

図4に代表的な脊髄(L5)の組織像を示した。シャム群の脊髄組織像では4例中4例で灰白質の構造は保たれており, 明るい核と細胞質にニッスル小体を有する正常運動ニューロンが確認できた。コントロール群は灰白質に空胞形成

を認め, 運動ニューロンの細胞質は濃いピンク色に濃染, 縮小し, 核は脱落していた。E48H群は6例中1例に虚血性運動ニューロンを認めるが, それ以外はシャム群同様に運動ニューロンの形態は保たれていた。E7D群では6例中6例で正常な運動ニューロンと細胞質が濃染, 縮小した虚血性運動ニューロンが混在し, 6例

中3例に白質の空胞形成を確認した。
 脊髓1断面あたりの正常ニューロンの数を

図5に示した。シャム群で最も多く、ついで
 E48H群、E7D群の順であった(シャム群69±

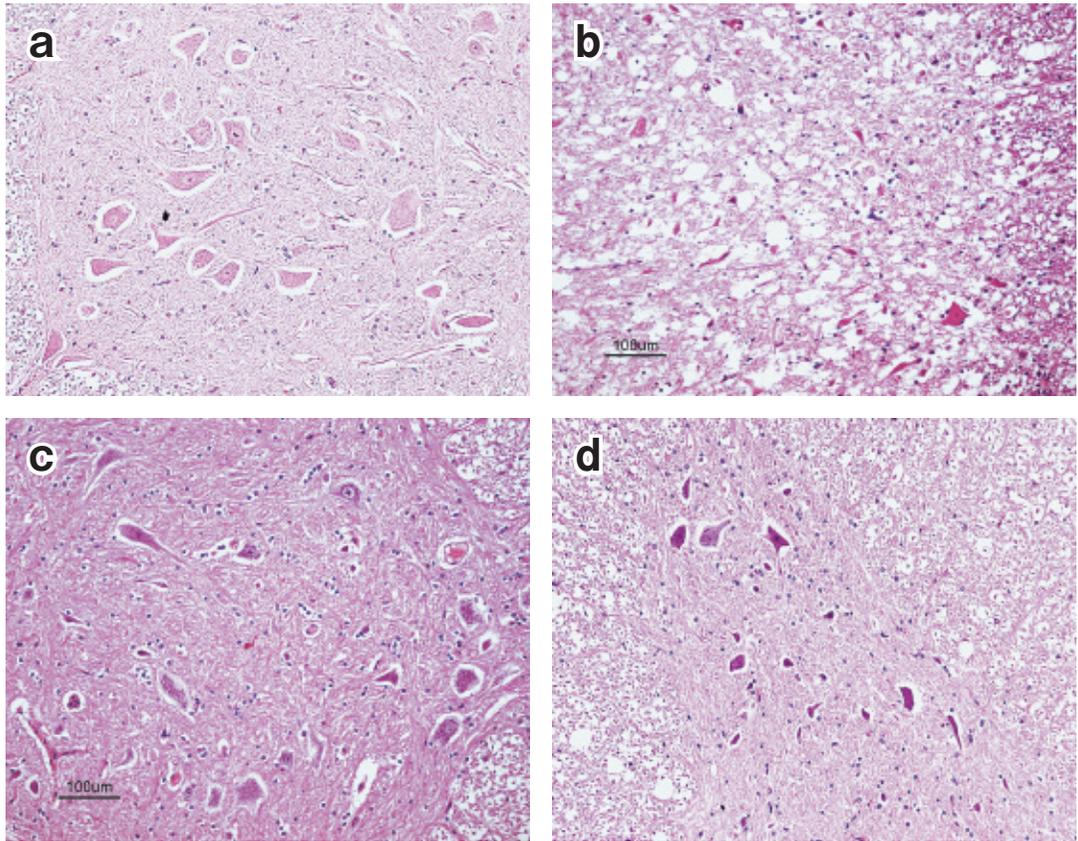


図4 脊髓組織像(L5)(HE染色 ×100)

a)シャム群：灰白質の構造は保たれており、運動ニューロンは明るい核と細胞質にはニッスル小体が確認できる。
 b)コントロール群：灰白質には空胞形成を認める。運動ニューロンの細胞質は塩基性を失い濃いピンク色に濃染、縮小し、核は脱落している。c)E48H群：脊髓組織の構造はシャム群同様に保たれ運動ニューロンの明るい核と細胞質のニッスル小体が確認できる。d)E7D群：正常な運動ニューロンと、細胞質が濃染、縮小した虚血性運動ニューロンの混在と白質の空胞化が確認できる。

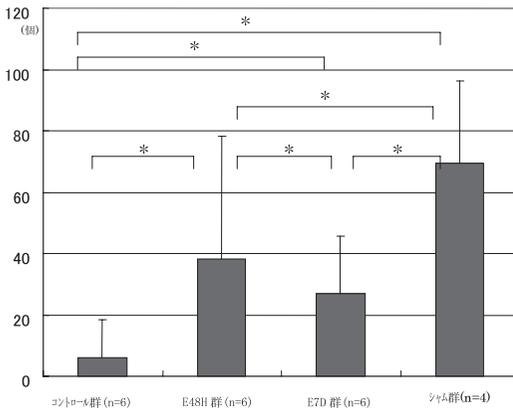


図5 正常運動ニューロン数(個)の比較

脊髓1断面あたりの正常運動ニューロン数を示す。

シャム群が最も多く、ついでE48H群、E7D群の順であった。コントロール群が最も少なく、E7D群、E48H群と比較して有意差がみられた。また、E48H群でE7D群より有意に多くの正常運動ニューロンが認められた。(*=P<0.001)

シャム群：外科操作のみで、大動脈閉塞は行わない群、コントロール群：外科操作終了後、20分間の大動脈閉塞を行い、再還流30分後に生理食塩水投与を行った群、E48H群：20分間の大動脈遮断を行い、再還流30分後にエタラポンを投与し、その後48時間経過観察を行う群、E7D群：20分間の大動脈遮断を行い、再還流30分後にエタラポンを投与し、その後7日間経過観察を行う群

22個, E48H 群 38.2 ± 40 個, E7D 群 24 ± 19 個).
そしてコントロール群では 6 ± 12 個と最も少なく,
コントロール群と比較してE48H 群, E7D
群で有意差が認められ ($p < 0.001$), またE48H
群でE7D 群より有意に多くの正常ニューロン
が認められた ($p < 0.001$).

正常運動ニューロン1個あたりの平均断面積
を図6に示した. コントロール群で運動ニュー
ロンの断面積が最も小さく, E48H 群で最も大
きかったがE7D 群はシャム群より小さく,
各群間に有意差が認められた (コントロール群
 $113 \pm 177 \mu\text{m}^2/\text{個}$, E48H 群 $408 \pm 298 \mu\text{m}^2/\text{個}$,
E7D 群 $267 \pm 159 \mu\text{m}^2/\text{個}$, sham 群 $377 \pm 23 \mu\text{m}^2/\text{個}$,
 $p < 0.001$).

考 察

本研究において, 再還流30分後のエダラボン
3 mg/kg の静脈内1回投与によってコントロール
群に比べて, 再還流48時間後の神経学的スコ
アと組織学的所見の両者に改善が見られた. 再
還流7日後でも神経学的スコアは改善しており
組織学的にも運動ニューロンの断面積は縮小し
ていたが, 一方で虚血性運動ニューロンが出現
しており, 再還流7日後の脊髄保護作用は不十分
であった.

胸腹部大動脈手術後に発症する対麻痺には,
麻酔覚醒後から発症している急性対麻痺と, 術
後早期には症状がなく数日して発症する遅発性
対麻痺の2つのタイプがある. 急性対麻痺は発
症してしまうと治療は困難であるが, 遅発性対
麻痺は再還流後, 数時間で発症する血液-脊髄
関門の破綻とそれに続く脊髄浮腫による脊髄コ
ンパートメント症候群が原因であると推定され
ており, 治療可能と考えられている^{11, 15, 16}. 脳
脊髄液ドレナージは, 脳脊髄液圧を低下させる
ことによって脊髄血流を増加させるために, 遅
発性対麻痺の改善が報告されている^{16, 17}. し
かし, 脳脊髄液ドレナージは脊髄浮腫を改善さ
せるものではなく, 2次的な脊髄保護効果であ
る. さらに, 術後の硬膜下血腫の発生は3.5%で,
発症した場合の死亡率は50~67%にもものぼると

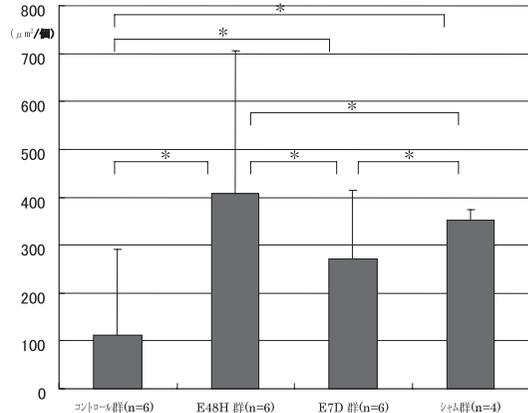


図6 正常運動ニューロンの断面積 ($\mu\text{m}^2/\text{個}$) の比較
正常運動ニューロン1個あたりの平均断面積を示す. コ
ントロール群で運動ニューロンの断面積が最も小さく,
E48H 群で最も大きく, E7D 群はシャム群より小さく群
間に有意差が認められた. (* : $p < 0.001$)

シャム群: 外科操作のみで, 大動脈閉塞は行わない群,
コントロール群: 外科操作終了後, 20分間の大動脈閉
塞を行い, 再還流30分後に生理食塩水投与を行った群,
E48H 群: 20分間の大動脈遮断を行い, 再還流30分後に
エダラボンを投与し, その後48時間経過観察を行う群,
E7D 群: 20分間の大動脈遮断を行い, 再還流30分後に
エダラボンを投与し, その後7日間経過観察を行う群.

報告されており, その使用を危惧している報告^{18, 19}もある. エダラボンは脳において抗浮腫
作用を有し, 静脈内投与による髄液への移行性
も良好であることから, 脊髄においても抗浮腫
作用が推測され, 致命的な副作用も報告されて
いない.

Takahashi *et al.*¹⁰ はウサギを用いて, 一過性
脊髄虚血後のエダラボンの効果を報告してい
る. 彼らはウサギの左腎動脈以下の15分間の大
動脈遮断において, 再還流30分後のエダラボン
の投与は再還流8時間後, 24時間後, 48時間
後の脊髄において, 運動ニューロンに対して
有害である神経型一酸化窒素合成酵素, Cu/Zn
superoxide dismutase の活性を抑制し, 神経保護
作用を有する内皮型一酸化窒素合成酵素を増加
させることを免疫組織化学的に証明した. さ
らに再還流7日後の組織学のおよび神経学的評価
においてエダラボンに神経保護作用のあること
を報告している. 彼らの報告は本研究の結果と
同様の結果であったが, コントロール群に対麻
痺を発症した症例がなく, 体温測定の記事もな

いためエダラボン以外の影響を除外できない。すなわち、彼らの動物モデルの脊髄虚血の程度が軽度であった可能性が考えられる。とくに体温に関しては Wass *et al.*²⁰⁾ はイヌの脳虚血実験において、わずかな温度変化でもその神経学的予後に重要な影響を与えると報告しており、さらに、Matsumoto *et al.*²¹⁾ もウサギの脊髄虚血モデルにおいて、脳同様に脊髄でも酸素の代謝率は体温が1℃低下するごとに約5%低下すると報告しており、低体温による脊髄保護効果の可能性は否定できない。

本研究では組織学的所見において正常運動ニューロンの数とその断面積を指標として細胞障害を評価した。これまでに脳虚血においてはその梗塞面積からエダラボンの抗浮腫効果が報告されているが、脊髄虚血における報告はない。再還流後の神経学的スコアの悪化には脊髄の浮腫が大きく関わっている。細胞浮腫のメカニズムとして、細胞容積を調節する膜の障害による細胞性浮腫と血液-脊髄関門の崩壊による血管性浮腫がある¹⁴⁾。神経細胞は虚血に陥ると細胞膜 Na⁺ 透過性が増大し浸透圧が増大するために、Na⁺ 流入に伴い多量の水分子が細胞内に移動し、細胞浮腫を惹起する²²⁾。また、Ca チャネルの障害の結果、細胞内に高濃度の Ca が貯留し、細胞は膨化するとともに細胞の破壊が始まる²³⁾。このことからニューロンの断面積は細胞性浮腫を反映し、それによって細胞障害を評価することができるのではないかと考えた。

本研究の問題点として自発呼吸管理の影響、虚血時間、エダラボンの投与時期がある。二酸化炭素は強力な血管拡張作用があり、PaCO₂が低下すると血管は収縮する。一般に虚血研究において、PaCO₂の影響を除外するためには気管挿管による調節呼吸を行うのが望ましいとされている。本研究では気管挿管と人工呼吸による影響を避け、低侵襲とするために自発呼吸下に虚血-再還流モデルを作成した。自発呼吸の影響でわずかに低二酸化炭素血症となったが各群間に有意差はみられていない。Michenfelder *et al.*²⁴⁾ はイヌでは極度の貧血がなければ PaCO₂

が20 mmHg 以上あれば脳虚血は生じないと報告している。

Zivin *et al.*²⁵⁾ は15~30分の腹部大動脈の閉塞によって、脊髄運動ニューロン障害をきたし対麻痺を発症すると報告している。本研究ではこれを参考に確実な20分間の一過性脊髄虚血モデルを作成した。本研究で用いた Sakurai¹²⁾ らの大動脈バルーン閉塞法は低侵襲の脊髄虚血誘発法として知られている。この方法によって左腎動脈の遠位0.5~1.5 cm での閉塞が確認はされているが、個体差、側副血行路の影響は否定できない。ウサギの脊髄への血液供給は、大動脈から分節的に直接脊髄へ供給されている。故に、大動脈閉塞部以下のレベルの脊髄が虚血となる。しかし、ヒト同様に血管の奇形や側副血行路による血液供給の可能性は、否定できない。本研究ではそれらの事を考慮して、大動脈閉塞中に末梢動脈圧波形の消失により血液のバックフローが無いことを確認した。

エダラボンの投与時期は脊髄虚血前、虚血中、虚血後が可能である。静脈内投与されたエダラボンの血中濃度が安定するのは投与後30分であり、一方、虚血におけるフリーラジカル産生は再還流後60~75分に増加する²⁶⁾ ことから、われわれは再還流後30分にエダラボンを投与した。

脊髄虚血において正常運動ニューロン数によって細胞障害を評価した研究は報告されているが、その断面積によって細胞障害を評価した報告は1例しかない。Jellish *et al.*²⁷⁾ はウサギー過性脊髄虚血モデルを用いて、マグネシウムの脊髄クモ膜下投与の脊髄保護作用を調べている。彼らは運動ニューロンの形態学的所見に加えて運動ニューロンの面積も測定している。彼らの所見では大きな運動ニューロンの面積は600~2500 μm^2 であり、200 μm^2 以上を正常運動ニューロンとして数えており、その基準は本研究のシャム群の平均細胞断面積 (377 \pm 23 μm^2 /個) より小さい。細胞断面積を用いて評価する場合、考慮すべき点は正常と細胞障害の境界をどこで区別するかである。本研究では、シャム群の細胞断面積を基準として細胞障害の判定

を行った。運動ニューロンの断面積が大きければ細胞の萎縮はないと考えられるが、さらに細胞障害が進行すれば細胞性浮腫を経て萎縮となることから、その境界の評価は困難であり、断面積のみで細胞障害を評価することには限界があるのかもしれない。本研究では運動ニューロン断面積においてE48H群が明らかにシャム群より大きく細胞性浮腫の存在が示唆され、シャム群より小さかったE7D群は神経学的スコアもE48H群やシャム群より低下していた。このことから、E7D群における運動ニューロンの断面積の縮小は抗浮腫効果というよりは、むしろ運動ニューロンの萎縮と考えられる。

E7D群の組織所見において神経学的評価では正常であったにもかかわらず、正常運動ニューロンと細胞質が濃染し縮小した虚血性運動ニューロンの混在が見られたことから、遅発性神経障害の可能性が考えられた。運動ニューロンの断面積がE48H群よりE7D群で小さかったのは、細胞性浮腫が軽快したのではなく非可逆性変化に進行したことによる細胞の萎縮の可能性が考えられた。脊髄保護効果は不十分であったと考えられる。この結果より、エダラボンは一過性脊髄虚血に対して神経保護作用を持つものの、遅発性神経障害を完全には抑制できないことが証明された。エダラボンの投与時期、投与方法、投与量などについての今後の研究が必要である。

まとめ

一過性脊髄虚血動物モデルにおいて、再還流後48時間では組織学的に細胞性浮腫はみられたものの運動ニューロン数は保たれており、神経学的所見からもフリーラジカルスカベンジャーによる脊髄保護効果が認められた。しかし、再還流後7日では神経学的予後は改善したが、組織学的に遅発性神経障害は抑制できなかった。

謝辞

本稿を終えるにあたりご指導、御校閲を賜りました本学麻酔・集中治療科教室、藤田喜久教授、本研究を

行うにあたりご協力いただきました本学組織・電子顕微鏡センター、医用実験センター、医用生物センターの皆様、研究補助員の織本真澄さんに深謝いたします。

引用文献

- 1) Livesay JJ, Cooley DA, Ventemiglia RA, Montero CG, Warrian RK, Brown DM, Duncan J.M: Surgical experience in descending thoracic aneurysmectomy with and without adjuncts to avoid ischemia. *Ann Thorac Surg* 39: 37-46, 1985
- 2) Crawford ES, Crawford JL, Safi HJ, Coselli JS, Hess KR, Brooks B, Norton H.J, Glaeser DH: Thoracoabdominal aortic aneurysms: preoperative and intraoperative factors determining immediate and long-term results of operations in 605 patients. *J Vasc Surg* 3: 389-404, 1986
- 3) Svensson LG, Crawford E.S, Hess KR, Coselli JS, Safi HJ: Experience with 1509 patients undergoing thoracoabdominal aortic operations. *J Vasc Surg* 17: 357-368, 1993
- 4) Conrad MF, Ye JY, Chung TK, Davison JK, Cambria RP: Spinal cord complications after thoracic aortic surgery: Long-term survival and functional status varies with deficit severity. *J Vasc Surg* 48: 47-53, 2008
- 5) Haan PD, Kalkman CJ, Jacobs MJ.H.M.: Pharmacologic neuroprotection in experimental spinal cord ischemia. *J of Neurosurg Anesth* 13: 3-12, 2001
- 6) 橋本克次, 吉岡淳, 今橋憲一, 楠岡英雄: カルシウムと再還流障害. *呼吸と循環* 49: 43-49, 2001
- 7) Love S: Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* 9: 119-131, 1999
- 8) Abe K, Yuki S, Kogure K: Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke* 19: 480-485, 1988
- 9) Nishi H, Watanabe T, Sakurai H, Yuki S, Ishibashi A: Effect of MCI-186 on brain edema in rats. *Stroke* 20: 1236-1240, 1989
- 10) Takahashi G, Sakurai M, Abe K, Itoyama Y, Tabayashi K: MCI-186 prevents spinal cord damage and affects enzyme levels of nitric oxide synthase and Cu/Zn superoxide dismutase after transient ischemia in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126: 1461-1466, 2003
- 11) Kiyoshima T, Fukuda S, Matsumoto M, Iida Y, Oka S, Nakakimura K, Sakabe T: Lack of evidence for apoptosis as a cause of delayed onset paraplegia after spinal cord ischemia in rabbits. *Anesth Analg* 96: 839-846, 2003
- 12) Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Aoki M, Sadahiro M,

- Tabayashi K: Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits. *J Vasc Surg* 27: 720-725, 1998
- 13) Drummond JC, Moore SS : The influence of dextrose administration on neurologic outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology* 70: 64-70, 1989
 - 14) Matsumoto M, Iida Y, Wakamatsu H, Ohta K, Nakakimura K, Xiong L, Sakabe T: The effect of N^G-nitro-L-arginine-methyl ester on neurologic and histopathologic outcome after transient spinal cord ischemia in rabbits. *Anesth Analg* 89: 696-702, 1999
 - 15) Jacobs TP, Kempinski O, McKinley D, Dutka AJ, Hallenbeck JM, Feuerstein G: Blood flow and vascular permeability during motor dysfunction in a rabbit model of spinal cord ischemia. *Stroke* 23: 367-373, 1992
 - 16) Fleck TM, Koening H, Hutschala D, Wolner E, Grebenwoger M: Cerebrospinal fluid drainage during thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Anesthesiology* 99: 1019-20, 2003
 - 17) Cheung AT, Weiss SJ, McGarvey ML, Stecker MM, Hogan MS, Escherich A, Bavaria JE: Intervention for reversing delayed-onset postoperative paraplegia after thoracic aortic reconstruction. *Ann Thorac Surg* 74: 413-421, 2002
 - 18) Leyvi G, Romachandran S, Wasnick JD, Plestis K, Cheung AT, Drenger B: Risk and benefits of cerebrospinal fluid drainage during thoracoabdominal aortic aneurysm surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 19: 392-399, 2005
 - 19) Dardik A, Perler BA, Roseborough GS, Williams GM: Subdural hematoma after thoracoabdominal aortic aneurysm repair: an underreported complication of spinal fluid drainage? *J Vasc Surg* 36:47-50, 2002
 - 20) Wass CT, Lanier WL, Hofer RE, Scheithauer BW, Andrews AG: Temperature changes of ≥ 1 degree $^{\circ}\text{C}$ alter functional neurologic outcome and histopathology in a canine models of complete cerebral ischemia. *Anesthesiology* 83: 325-335, 1995
 - 21) Matsumoto M, Iida Y, Sakabe T, Sano T, Ishikawa T, Nakakimura K: Mild and moderate hypothermia provide better protection than a burst-suppression dose of thiopental against ischemic spinal cord injury in rabbits. *Anesthesiology* 86: 1120-1127, 1997
 - 22) 田中耕太郎: 虚血性脳組織損傷のメカニズム. *神経内科* 58: 116-131, 2003
 - 23) Siesjo BKO: Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 77: 169-184, 1992
 - 24) Michenfelder JD, Theye RA : The effects of profound hypocapnia and dilutional anemia on canine cerebral metabolism and blood flow. *Anesthesiology* 31: 449-457, 1969
 - 25) Zivin JA, DeGirolami U, Hurwitz EL : Spectrum of neurological deficits in experimental CNS ischemia. *Arch Neurol* 39: 408-412, 1982
 - 26) Suzuki K, Kazui T, Terada H, Umemura K, Ikeda Y, Bashar AHM, Yamashita K, Washiyama N, Suzuki T, Ohkura K, Yasuike J: Experimental study on the protective effects of edaravone against ischemic spinal cord injury. *J of thorac cardiovasc surg* 130: 1586-1592, 2005
 - 27) Jellish WS, Zhang X, Langen KE, Spector MS, Scalfani MT, White FA: Intrathecal magnesium sulfate administration at the time of experimental ischemia improves neurological functioning by reducing acute and delayed loss of motor neurons in the spinal cord. *Anesthesiology* 108: 78-86, 2008

Effects of a Free Radical Scavenger on Spinal Cord Injury after Transient Ischemia in Rabbits.

Sumiko ITO

*Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan*

ABSTRACT Oxygen- free radical species play detrimental roles in ischemia and post-reperfusion injuries. In this study, the author examined the effect edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one), a free radical scavenger, on hindlimb motor function and histopathology after a transient episode of spinal cord ischemia in an animal model.

Twenty-two Japanese white rabbits underwent spinal cord ischemia by occlusion of the aorta distal to the origin of the left renal artery for 20 min using a balloon inflation technique. The animals were assigned to four groups: a sham group (catheter placement without balloon inflation; n= 4), a control group (ischemia followed by 3ml saline i. v. injection 30 min after reperfusion with a 48 hr recovery period; n= 6), and E48H and E7D group (ischemia followed by 3 mg/kg edaravone injection 30 min after reperfusion, with 48 hr and 7 day recovery periods, respectively; n= 6 in each group). Hindlimb motor function was assessed during the recovery periods. The histopathology of the lumbar spinal cord was also examined.

All animals in the control group became paraplegic with marked histopathologic changes such as significant motor neuron cell loss, nuclear membrane fragmentation and vacuoles in the lumbar spinal cord. In both edaravone-treated groups, hindlimb motor function was better preserved for 48 hr and 7 days than in the control group. When compared with the control group, the edaravone-treated groups had significantly greater numbers of normal neurons in the anterior spinal cord (6 ± 12 , 38.2 ± 40 and 24 ± 19 , control group, H48H group and E7D group, respectively). While the mean motor neuron area in the animals of the E48H group was greater than that of those in the sham group, it became smaller in the animal of the E7D group (113 ± 117 , 408 ± 298 , 267 ± 159 and 377 ± 23 , control group, H48H group, E7D group and sham group, respectively). In addition, ischemic neuron along with normal neurons were observed in the animals of the E7D group. These histopathologic findings of edaravone-treated groups are compatible with neuronal cellular edema at 48 hrs and a partial neuronal death at 7 days postischemia.

The results of this study suggest that edaravone provides a partial protection against 20 min ischemic spinal cord injury in rabbits, but that delayed neuronal death cannot be completely prevented.

(Accepted on October 30, 2008)

Key words : Paraplegia, Free radical scavenger, Spinal cord ischemia, Neuron area, Cellular edema

Corresponding author

Sumiko Ito

Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine,
Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki,
701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 464 1188

E-mail : sumisumi@med.kawasaki-m.ac.jp