慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	冷却人工髄液の持続的クモ膜下腔注入による脊髄冷却法とその脊髄保護効果の検討
Sub Title	Spinal cord protection using continuous cord cooling system
Author	河西, 未央(Kasai, Mio) 吉武 明弘(Yoshitake, Akihiro)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	ratの側方開胸に関する手技は安定するようになったが, ratの髄腔内操作は困難であった。本研究と同時に行っていた「脱細胞化心臓」に関する研究課題においても, ratの側方開胸を用いる必要があったために当初の実験計画とは異なるが, 実現可能性などの点からこちらの実験へのeffortが増える形となったので「脱細胞」関連の実験成果を記載する。我々は脱細胞化臓器(肝臓, 腎臓)の他ラットへの部分移植を行うことによって起こる脱細胞化マトリックスへの生体細胞の遊走現象に関して, それらをラットの心臓で行い, 他臓器と同様に血管内皮細胞などの遊走・浸潤現象を認めた。 We could operate the rats, but it was difficult to operate the spinal cord in rats. Instead of the spinal cord operation, we performed cardiac operation of the rats. Therefore, our research was changed about decellularized cardiac patched scaffolds. We examined the method of heart regenerative medicine using the rat heart sheeting with rat heart scaffolds which were decellularized or recellularized with cardiomyocytes. Our novel methods for myocardial regeneration using the three-dimensional decellularized heart scaffold showed a new possibility.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2016 ~ 2017 課題番号 : 16K19972 研究分野 : 心臓血管外科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K19972seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　８　月　２２　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2016～2017
課題番号：　１６Ｋ１９９７２

研究課題名（和文）冷却人工髄液の持続的クモ膜下腔注入による脊髄冷却法とその脊髄保護効果の検討

研究課題名（英文）Spinal Cord Protection Using Continuous Cord Cooling System

研究代表者

河西　未央（KASAI, MIO）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：８０６４９９４７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　1,000,000円

研究成果の概要（和文）：ratの側方開胸に関する手技は安定するようになったが、ratの髄腔内操作は困難であった。本研究と同時に行っていた「脱細胞化心臓」に関する研究課題においても、ratの側方開胸を用いる必要があったために当初の実験計画とは異なるが、実現可能性などの点からこちらの実験へのeffortが増える形となったので「脱細胞」関連の実験成果を記載する。我々は脱細胞化臓器（肝臓、腎臓）の他ラットへの部分移植を行うことによって起こる脱細胞化マトリックスへの生体細胞の遊走現象に関して、それらをラットの心臓で行い、他臓器と同様に血管内皮細胞などの遊走・浸潤現象を認めた。

研究成果の概要（英文）：We could operate the rats, but it was difficult to operate the spinal cord in rats. Instead of the spinal cord operation, we performed cardiac operation of the rats. Therefore, our research was changed about decellularized cardiac patched scaffolds. We examined the method of heart regenerative medicine using the rat heart sheeting with rat heart scaffolds which were decellularized or recellularized with cardiomyocytes. Our novel methods for myocardial regeneration using the three-dimensional decellularized heart scaffold showed a new possibility.

研究分野：　心臓血管外科

キーワード：　脊髄保護

１．研究開始当初の背景

胸部下行大動脈瘤および胸腹部大動脈瘤手術は心血管系手術の中でも最も困難かつ合併症発症の多い領域である。

この領域の手術において、術後生存率などの手術成績に多大なる影響を与える深刻な合併症の１つに脊髄虚血障害がある。周術期における脊髄障害に伴う対麻痺の発生頻度は、体外循環の使用、脳脊髄液ドレナージ法の使用、Naloxone や Steroid など各種薬剤の使用、MD-CT や MRI などの画像診断の進歩により術前に脊髄の栄養血管である肋間動脈（Adamkiewicz 動脈）同定率の向上などにより改善されているものの、現在なお脊髄障害の発生頻度は 5%から 10%と高率であり、完全な予防策がないのが現状である。

脊髄障害の原因として、人工血管置換術施行の際に不可欠な大動脈遮断中に、Adamkiewicz 動脈に血流が供給されないことによる一時的脊髄虚血が寄与している。大動脈遮断中の脊髄虚血に対する脊髄保護手段として、全身冷却による低体温法は、歴史的に重要な手段として認知され臨床で使われている。一方で、人工心肺による全身低体温は血液凝固異常、不整脈、肺機能障害、免疫抑制などさまざまな悪影響をきたすことが知られている。そこで、全身低体温の副作用を最小限にする手段として、脊髄の局所冷却法が 1990 年代前半から一部の施設で臨床導入されている。

代表的なものとしては、米国 Harvard 大学の Cambria らや東北大学の田林らが、冷却生理的食塩水を硬膜外腔に注入・ドレナージをすることによって良好な成績をおさめている[1) 2)]。このように、冷却水注入による硬膜外冷却法は全身冷却を最小限にして脊髄を局所冷却する方法であり、脊髄保護法として有用といえる。しかし、今回我々は更なる効率的かつ直接的局所冷却を実現することを目的に硬膜外腔ではなく、直接くも膜下腔にカテーテルを留置し更なる効率的脊髄局所冷却を実現することを考案した。

２．研究の目的

胸腹部大動脈瘤手術における深刻な合併症である脊髄障害による対麻痺を回避するために我々は持続的脊髄冷却(CCC: Continuous Cord Cooling)システムを開発し臨床使用を行っており良好な成績を残している。今回我々は、実験動物としてブタを使用し、冷却人工髄液を直接くも膜下腔に注入することで有効な脊髄冷却を実現し、脊髄障害による対麻痺に対する脊髄保護効果を検討すると共に、各レベルの脊髄温を測定することで脊髄冷却の範囲および脊髄冷却システムの冷却効果を検証する。

３．研究の方法

実験動物としては，swine(35～40kg) を A 群、B 群の 2 群にわける。swine を全麻、挿管下にて手術を行なう。滅菌下において右側臥位にし、L1/L2 の椎弓間より経皮的にカテーテルを Cooling 用と drainage 用(温度測定プローベ付き)の 2 本を挿入する。透視下にて尾側から頭側へ向かい、cooling 用は Th7 のレベルまで、drainage 用は L3/4 まで頭側から尾側に向けて挿入する。脳脊髄液(CSF)温度測定プローベ付きの drainage 用カテーテルは、CSF 温度を経時的に計測すると共にドレナージを行う。A 群では持続的くも膜下腔クーリングは行わず(34℃の人工髄液で還流する)、B 群では持続的くも膜下腔クーリング(冷却人工髄液で還流する)を行う。なおドレナージは CSF 圧が 10cmH2O を維持するように設定する。大動脈を左鎖骨下分岐部直下にて遮断、血流を遮断する。Cooling 用カテーテルから冷却人工髄液(4℃)を注入する cooling 時間は、遮断 30 分前より，大動脈遮断 30 分間、および遮断解除後 30 分間(post cooling)とす。血流を再開後、胸壁を 3 層に閉じる。神経学的所見を Tarlov の modified score に従い、手術後、12、24、48 時間後の各時点において評価する。手術後、HE 染色お

よび Nissle 染色にて固定したのち光学顕微鏡で病理組織学的検索を行う。

４．研究成果

(1)初年度

元々、実験動物として swine を予定していたが、実験費用などの兼ね合いもあり、初期実験として rat を用いる方針とした。Swine

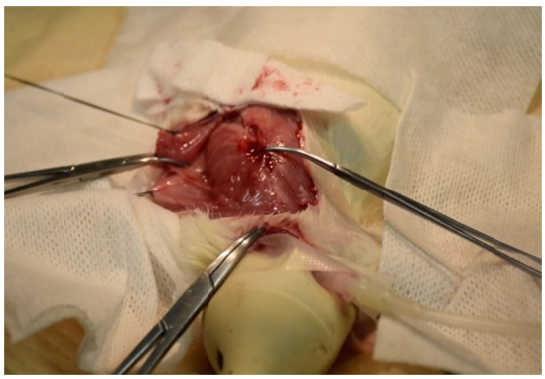

図 1.　Rat　の側方開胸

に関しては全身麻酔や側方開胸の手法、術後管理の知識も当実験室として持ち合わせていたが、rat に関しては麻酔、人工呼吸器管理、側方開胸も含めた手術方法、術後管理の知識なども皆無であった為に、初年度はその rat に関する手術・周術期関連の how to を考案することがメインとなった。

rat の側方開胸に関する手技は安定するようになったが、rat 用の冷却カテーテルは作成しておらず、rat の髄腔内操作は困難であった。本研究と同時に行っていた「脱細胞化心臓を用いた三次元的細胞シートの作成」という研究課題においても、rat の側方開胸を用いる必要があったために実験計画とは異なるが、研究費用・実現可能性などの点からこちらの実験への effort が増える形となった。なので、こちらの研究成果報告書に「脱細胞」関連の実験成果を記載する。

Rat の全身麻酔はイソフルランの吸入麻酔を用いることとした。吸入濃度としては 2-3%とすることで安定した全身麻酔が得られた。なお、手術に際しては気管挿管が技術的に困難であった為に、全例気管切開で行うことととした。手術に際しては左側方開胸を行うが、開胸部位は第 4 もしくは第 5 肋間での開胸とした。術後管理として、創痛に対しては 12 時間毎に 72 時間までブプレノルフィン 0.02mg の皮下注射を行い、同様に抗生物質としてセファゾリンを投与した。それによって単純に左側方開胸のみした検体の生存は安定して得られるようになった。

研究代表者の所属する研究室では既に、rat で実現されている脱細胞化臓器マトリックス（肝臓、腎臓）の他ラットへの部分移植を行うことによって起こる脱細胞化マトリックスへの生体細胞の遊走現象に関して、これをブタに応用することによってブタでも同様の細胞遊走現象が起こることを明らかにしている。そこで今回研究代表者はそれらをラットの心臓で行い、やはり他臓器と同様に血管内皮細胞などの遊走・浸潤現象を認めた。

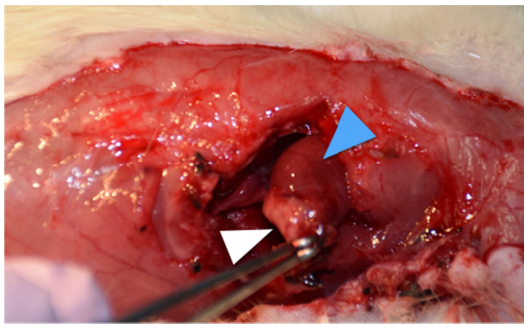

図 2.　rat 脱細胞化心臓部分移植術後 14 日目 (white arrow)　部分移植した脱細胞心臓片

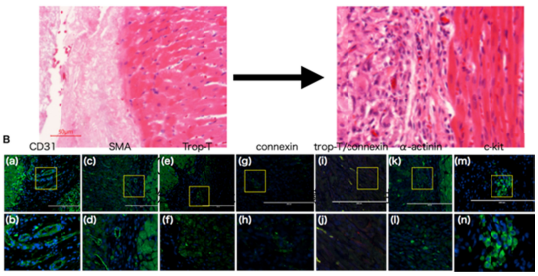

図 3.　ラット脱細胞化心臓部分移植術後 HE 染色(上) 免疫染色(下)

研究協力者の異動のために、当研究の継続が困難になったが、やはりこの「脱細胞化」

研究は継続可能であったので引き続きこちらのへの effort が多くを占めたのでこちらの研究結果を報告する。

Rat で可能となったこの技術をブタ心臓に応用し、脱細胞化心臓シートを他ブタの心臓の拍動下に部分移植した。

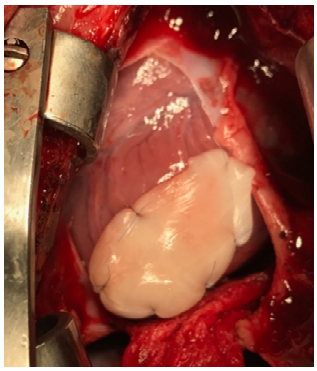

図 4 脱細胞心臓部分移植

移植後閉胸し、通常の飼育を 2 ヶ月間行った。その後に再開胸し心臓を観察した。脱細胞化心臓パッチは心表面に接着し、感染兆候、壊死は認めなかった(図 5)。心停止後、心臓を採取し、パッチ部位を病理学的に観察した。脱細胞骨格内への微小血管構築を認め(図 6)、免疫染色を行ったところ血管再構築が十分行われていることが分かった(図 7)

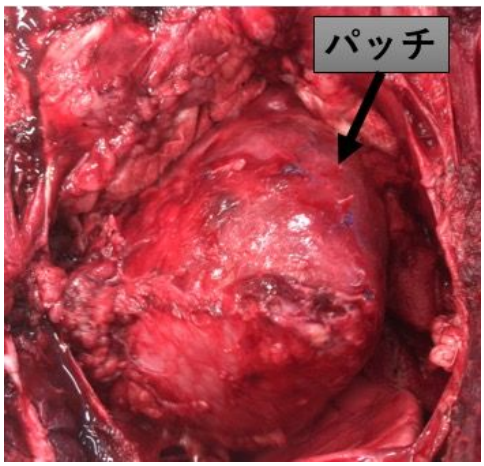

図 5 再開胸時所見

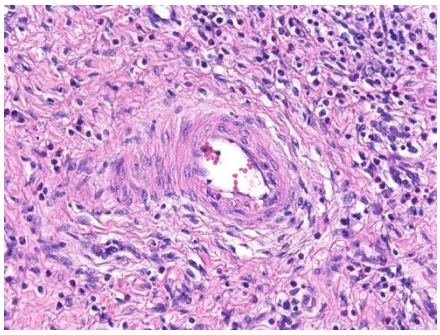

図 6 再構築された微小血管

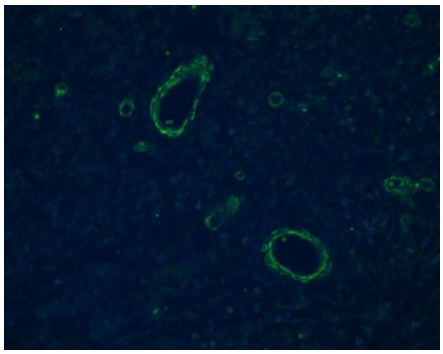

図 7 免疫染色所見

５．主な発表論文等

なし

６．研究組織

(1)研究代表者

河西　未央(KASAI, Mio)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80649947

(4)研究協力者

吉武　明弘(YOSHITAKE, Akihiro)