

主論文

Determination of the Target Temperature Required to Block Increases in Extracellular Glutamate Levels During Intraischemic Hypothermia

(虚血中低体温は脳温 $32.6 \pm 0.9^\circ\text{C}$ で細胞外グルタミン酸濃度の上昇を停止させる)

【緒言】

心停止後の神経細胞傷害は一次傷害と二次傷害に大別される。一次傷害は神経細胞の膜電位消失中のエネルギー障害によって引き起こされ、グルタミン酸が主たる原因物質であることが知られている。グルタミン酸は、カルシウムイオンの細胞内への流入を促進し、これがトリガーとなって二次傷害へと進展する。従って、細胞外グルタミン酸濃度の上昇は、神経細胞障害の増悪に大きな影響を与えていると考えられている。一方、二次傷害はカスケードに分かれた多様な機序(酸化ストレス、炎症反応、アポトーシス)によって、虚血再灌流後も徐々に進行する。心停止後の低体温療法は、The 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations (2015 年)において、自己心拍再開後の患者を対象として体温を $32 \sim 36^\circ\text{C}$ に維持することが推奨されている。しかし、この体温管理は二次傷害を対象としたものであり、虚血中の一次傷害を対象とした虚血中脳低温療法の最適温度は明らかになっていない。近年、鼻腔内冷却や咽頭冷却装置が臨床使用できるようになり、心肺蘇生中の脳低温療法の導入が可能となった。さらに、心肺蘇生中に経皮的な心肺補助装置による、低体温療法の実施で神経学的予後が改善することが報告されている。本研究は、虚血中脳低温療法が脳神経細胞外グルタミン酸濃度の上昇を停止する温度を調べることを目的としている。

【材料と方法】

動物実験(基本手順)

20 匹の雄性ラット(体重 $311 \pm 12\text{g}$)を用い、それぞれ 10 匹ずつ常温群と虚血中脳低温群に分けた。

麻酔は 4% Isoflurane で導入し、気管挿管後に人工呼吸を開始し、60%酸素下に 1.5% Isoflurane で維持した。ポリエチレンカテーテルを右大腿動脈と大腿静脈に留置し、動脈では持続的平均動脈圧測定、血液ガス分析採血を、静脈ではヘパリン投与と脱血を行った。定位固定装置でラットの頭部を固定した後、Bregma から 3 mm 右側方、3 mm 後方に 2.5mm の Burr hole を開けた。細胞外膜電位は、第 5 錐体細胞層にガラス電極を刺入して測定した。ガラス電極の近傍にマイクロダイアライシスプローブを挿入し経時的にグルタミン酸濃度を測定した。脳血流はレーザードップラーフロープローブを硬膜の上に設置し連続的に測定した。脳温は左頭頂部硬膜外で測定した。体温は直腸温で測定し、 $37.0^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ で維持した。

虚血方法

脳虚血は両側内頸動脈閉塞と低血圧で負荷した。前処置終了後に測定した脳血流をベースラインとした。両側内頸動脈を閉塞した後、脳血流が 1 分間にベースラインの 2.5% ずつ低下するように大腿静脈ラインより脱血を行った。細胞外膜電位の急激な低下をもって膜電位喪失とした。膜電位喪失時の脳血流を 5 分間維持した後、脳血流が 1 分間にベースラインの 2.5% ずつ上昇するように返血を行った。細胞外膜電位の持続的な上昇をもって膜電位の回復とした。

細胞外グルタミン酸濃度測定

マイクロダイアライシスプローブにリンゲル液を $2\mu\text{L}/\text{分}$ で灌流し、1 分毎に回収した。あらかじめサンプルチューブ内にリンゲル液を $10\mu\text{L}$ 入れ、サンプルの蒸発を防いだ。グルタミン酸は電気化学受容器で検出し、high-performance liquid chromatography 法で測定した。

虚血中脳低温療法

脳低温療法は鼻咽頭冷却法で行い、細胞外膜電位が消失した直後に開始した。ラットの両側鼻腔に20ゲージカヌラを5mm留置し、5°Cに冷却した生理食塩水を100 ml・分⁻¹・kg⁻¹で灌流し、脳(硬膜外温)を5分間で31°Cまで低下するようにコントロールした。灌流した冷生理食塩水は口腔へ流出し、吸引管で回収した。虚血中脳低温療法は膜電位が完全に回復するまで継続した。

統計解析

全ての数値は、平均値±標準偏差で表記した。グルタミン酸と細胞外膜電位は反復測定分散分析の後 post hoc test に Fisher's test を用いた。その他の統計解析には、Student's t-test を用いた。P 値<0.05 を統計学的に有意とした。

【結果】

常温群において、細胞外グルタミン酸濃度は細胞外膜電位の消失直後に増加し始め、最高値(341.8±153.1μmol・L⁻¹)に達した。血流再開後、膜電位の回復に同期して細胞外グルタミン酸濃度の低下が観察された。

虚血中脳低温群において、細胞外グルタミン酸濃度は常温群と同様に細胞外膜電位の消失直後に増加し始めたが、脳温が 32.6±0.9°Cに達した時点で増加が抑制され、最高値(140.5±105.4μmol・L⁻¹)でプラトーを形成した。血流再開後、膜電位回復に同期して細胞外グルタミン酸濃度の低下が観察された。

細胞外膜電位が回復し始める脳血流閾値は虚血中脳低温群(26.3±9.3%)の方が常温群(44.9±21.6%)に比較して有意に低かった(p=0.02)。

血流再開後の細胞外グルタミン酸濃度低下速度は虚血中脳低温群(-36.0μmol・L⁻¹・min⁻¹)、常温群(-36.6μmol・L⁻¹・min⁻¹)と同等であった。

【考察】

本研究は、虚血中脳低温療法で 32.6±0.9°C以下に低下させれば細胞外グルタミン酸濃度の上昇が停止することを明らかにした。これまでの報告によると、虚血前に開始した脳低温療法では、動物種、脳の部位、虚血方法、虚血時間に関わらず、脳温が<33°Cの時、細胞外グルタミン酸濃度上昇が抑制されることが報告されている。すなわち、脳低温療法の開始のタイミングが虚血前、後に関わらず、細胞外グルタミン酸濃度の上昇は<33°Cでブロックされることが示された。

本研究において、虚血中脳低温療法は細胞外グルタミン酸濃度の上昇を停止したが、低下させる効果はなかった。細胞外グルタミン酸濃度の減少は、膜電位の回復と同時に観察された。虚血による細胞外グルタミン酸濃度の上昇機序は、グルタミン酸トランスポーターの逆輸送であることが知られていることから、虚血中脳低温療法はこの逆輸送を抑制すると考えられる。一方、細胞外グルタミン酸濃度の低下は、Na⁺/K⁺-ATPase によって作られる Na⁺の電気化学較差を利用したグルタミン酸トランスポーターの正輸送による。従って、細胞外グルタミン酸濃度の低下はエネルギーに依存した行程であり、膜電位の回復が必須であると考えられる。

グルタミン酸濃度の低下速度は、常温群(-36.6μmol・L⁻¹・min⁻¹)、虚血中脳低温群(-36.6μmol・L⁻¹・min⁻¹)と、同等であった。これは、虚血中の脳低温療法は、細胞外グルタミン酸濃度の上昇をブロックするが、その低下は阻害しないことを示している。虚血中の細胞外グルタミン酸濃度の上昇と低下はグルタミン酸トランスポーターの逆輸送と正輸送に依存している。グルタミン酸トランスポーターの逆輸送は、正輸送の過程を単純に逆行させたものではないことが知られており、逆輸送と正輸送の低温療法に対する反応が異なると考えられる。従って、虚血中の脳低温療法は細胞外グルタミン酸濃度の低下を妨げることなく安全に施行できると考えられる。

膜電位を回復させる脳血流の閾値は、常温群と比較して虚血中脳低温群で有意に低かった。この時点の細胞外グルタミン酸濃度も、虚血中脳低温群において常温群と比較して有意に低かった。グルタミン酸トランスポーターは、Na⁺/K⁺-ATPase と巨大分子を形成して機能的にもつながっているため、細胞外グルタミン酸濃度が低ければ膜電位の回復に必要なエネルギーも低いと考えられる。臨床においては、虚血

早期に脳低温療法を開始することで細胞外グルタミン酸濃度の上昇が抑制され、膜電位の回復も促進されることが考えられる。

【結論】

虚血中脳低温療法により、脳温が $32.6 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$ 以下に低下すると細胞外グルタミン酸濃度の上昇が停止することが示された。また、虚血中脳低温療法はグルタミン酸低下速度を阻害しなかった。従って、虚血中脳低温療法は、より早く開始するほど細胞外グルタミン酸濃度を低く抑え、膜電位の回復に寄与することが考えられた。

副 論 文

Cerebral Blood Flow Threshold Is Higher for Membrane Repolarization Than for Depolarization and Is Lowered by Intraischemic Hypothermia in Rats

(ラットにおいて神経細胞を再分極させる脳血流閾値は脱分極させる脳血流閾値よりも高く
虚血中低体温によって低下する)

心肺停止による脳虚血では、アデノシン三リン酸産生が低下して $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプ失調がおり、引き続いて神経細胞が虚血性脱分極を起こす。虚血早期では、脱分極の持続時間が神経障害の重症度を決定する重要な因子である。心肺蘇生によって虚血性脱分極を防ぐことで、より良い神経学的予後が期待できる。しかし、もし心肺蘇生中に虚血性脱分極が起こったら、できるだけ早く膜電位を回復させることが必須である。再分極を起こす脳血流閾値は知られておらず、胸骨圧迫中または自己心拍回復後神経細胞の膜電位が回復するかどうかは解っていない。本研究は、虚血性脱分極、再分極の脳血流閾値を測定し、虚血中低体温が再分極の脳血流閾値に与える影響を調べることを目的としている。

雄性ラット 40 匹を用い、各群 10 匹ずつ 4 群(常温低血流 5 分群, 常温低血流 10 分群, 脳低温低血流 5 分群, 脳低温低血流 10 分群)に分けた。左頭頂部大脳皮質で細胞外電位を測定し、その近傍で脳血流、細胞外グルタミン酸濃度、硬膜外温を測定した。前処置終了後に測定した脳血流をベースラインとした。両側内頸動脈閉塞 5 分後から大腿静脈ラインより脱血を開始し、脳血流が 1 分間にベースラインの 2.5% ずつ低下するように脱血を行った。細胞外膜電位の急激な低下をもって脱分極とし、この時の脳血流を脱分極の脳血流閾値とした。膜電位喪失時の脳血流を 5 分間(低血流 5 分)または 10 分間(低血流 10 分)維持した後、脳血流が 1 分間にベースラインの 2.5% ずつ上昇するように返血を行った。細胞外膜電位の持続的な上昇をもって再分極とし、この時の脳血流を再分極の脳血流閾値とした。虚血中低体温は膜電位消失直後から鼻咽頭冷却で行い、硬膜外温を 31°C まで低下させた。体温は直腸温で測定し、 $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に維持した。

再分極の脳血流閾値は 4 群全ての脱分極の脳血流閾値よりも高く ($p < 0.01$)、常温低血流 5 分群 ($46.5 \pm 12\%$) よりも常温低血流 10 分群 ($61.5 \pm 14\%$) でさらに高値であった ($p < 0.01$)。脳低温低血流 5 分群、脳低温低血流 10 分群で再分極の脳血流閾値はそれぞれ、 $33.8 \pm 10\%$ 、 $36.6 \pm 6\%$ に抑えられ、それぞれ常温低血流 5 分群 ($p < 0.01$)、常温低血流 10 分群 ($p < 0.01$) と比較して有意に低値であった。低温群では、低血流時間が 5 分から 10 分に伸びても、再分極の脳血流閾値は上昇しなかった ($p > 0.05$)。

再分極の脳血流閾値は脱分極の脳血流閾値よりも高く、この再分極の脳血流閾値は心肺蘇生中の胸骨圧迫で供給される脳血流よりも高い可能性がある。従って神経障害を最小限にするために、虚血性脱分極が起こる前に心配蘇生を開始すべきである。虚血中脳低温療法は、再分極の脳血流閾値を低下させ虚血遷延によって起こる再分極の脳血流閾値の上昇を抑える。従って、虚血中脳低温療法によって心肺蘇生中における神経細胞の膜電位の回復が促進され、心停止後の神経学的予後が改善する可能性がある。

【主論文との関連性】

◎主論文の内容と副論文の内容との直接的関連性について

主論文では、副論文で示された「脳虚血によって一度脱分極した神経細胞が再分極するためには、脱分極時よりも高い脳血流が必要であり、脳低温療法によって再分極の脳血流閾値上昇が抑制される」ことの機序を細胞外グルタミン酸濃度とエネルギー利用の観点から考察した。

◎論文相互間の引用の有無について

主論文において副論文を引用している。