

Comparison of the protective effects of direct ischemic preconditioning and remote ischemic preconditioning in a rabbit model of transient spinal cord ischemia

(家兎一過性脊髄虚血モデルにおける **direct ischemic preconditioning** と
remote ischemic preconditioning の神経保護効果の比較について)

氏名 福井 健彦
所属 山口大学大学院 医学系研究科
システム統御医学系 専攻
麻酔・蘇生学講座

平成 29 年 10 月

目次

要旨	3
1. はじめに	4
2. 方法	5
2.1. 実験 1	5
2.2. 実験 2	6
2.3. 実験 3	6
2.4. 実験 4	7
3. 結果	9
4. 考察	11
5. 利益相反	13
6. 参考文献	21

要旨

目的：本研究はウサギの一過性脊髄虚血モデルにおいて direct ischemic preconditioning (DIPC) と remote ischemic preconditioning (RIPC) の保護効果を比較し、その機序を解明することを目的とした。

方法：実験 1 では DIPC 群、kidney RIPC 群（腎動脈を遮断）、limb RIPC 群（大腿動脈を遮断）の神経保護効果を神経学および病理組織学的に比較した。DIPC 群と kidney RIPC 群ではそれぞれ腹部大動脈および左腎動脈の 5 分間の遮断と 15 分間の再灌流を、limb RIPC 群では大腿動脈の 10 分間の遮断と 10 分間の再灌流を conditioning ischemia としてそれぞれ 2 サイクル行った。Conditioning ischemia 実施 30 分後に侵襲的虚血 (test ischemia) として 15 分間の腹部大動脈遮断を行った。実験 2 及び 3 ではフリーラジカルスカベンジャーである dimethylthiourea (DMTU)、アデノシン A₁ 受容体拮抗薬である 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)、ミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャンネル拮抗薬の 5-hydroxydecanoate (5HD) を用いて DIPC の脊髄保護効果にどのような影響があるかを調べた。

実験 4 では Proteome Profiler Array を用いたイムノブロットィング法で DIPC によって活性化されるシグナル経路を明らかにするために、脊髄におけるリン酸化タンパク質の分析を行った。

結果：実験 1 では DIPC 群は神経学および病理組織学的ともに脊髄保護効果を認めたが、kidney RIPC 群および limb RIPC 群は保護効果を認めなかった。実験 2 および 3 では DIPC の強力な脊髄保護効果が再確認されたが、DMTU、DPCPX、または 5HD によってその保護効果は減弱されなかった。

実験 4 では DIPC は Akt2 のリン酸化を誘導した。

結語：ウサギにおいて DIPC の強い脊髄保護効果を認めた一方、RIPC の保護効果を確認することはできなかった。この DIPC の保護機構には Akt2 が関与している可能性がある。

キーワード:

ischemic preconditioning, rabbit, remote ischemic preconditioning, spinal cord ischemia, Akt2

1. はじめに

対麻痺は胸腹部大動脈手術の致命的な合併症であり、大動脈遮断中の脊髄虚血または大動脈再建後の不十分な脊髄灌流のために起こると考えられている。その対策としては十分に確立されたものはないが、ischemic preconditioning (IPC) がその候補の一つに挙げられる。IPC は conditioning ischemia の部位に応じて2つのタイプに分類することができる。1つは conditioning ischemia とそれに続く侵襲的虚血 (test ischemia) の部位が同じ direct IPC (DIPC) で、もう1つは両者の部位が異なる remote IPC (RIPC) である。Conditioning ischemia を四肢に加える limb RIPC は臨床的観点からは非常に有用といえる。実際 limb RIPC に関しては多くの臨床研究が心臓外科手術で行われ¹⁾、研究初期に有効であるという報告が多かった。しかし近年の2つの大規模多施設研究では limb RIPC の有効性が認められていない^{2,3)}。

ウサギの脊髄虚血モデルで RIPC の脊髄保護効果を認めた研究としては2つの報告がある。Gurcum ら⁴⁾ は DIPC と kidney RIPC の脊髄保護効果について検討した。大動脈遮断 15 分前に大動脈あるいは腎動脈を2回遮断する conditioning ischemia の保護効果を比較した。結果として両者とも保護効果を認めるが DIPC の保護効果がより強いと結論づけた。続いて Dong ら⁵⁾ は大動脈遮断 30 分前に両側大腿を2回駆血する limb RIPC に強い脊髄保護効果を認めると報告した。しかし Kakimoto ら⁶⁾ は RIPC に比べ保護効果が強いと考えられる DIPC の保護効果は一過性であると報告している。臨床応用可能な limb RIPC の保護効果が DIPC と比較してどの程度か明らかではない。

Gurcum ら⁴⁾ や Dong ら⁵⁾ の研究では、神経機能の観察は再灌流後 48 時間のみである。しかし、脊髄および脳虚血において conditioning ischemia と test ischemia の間隔が1時間未満の場合、DIPC の神経保護効果が再灌流 1~3 日間は観察されるが7日後では認められないという報告がある^{6,7)}。ウサギの一過性脊髄虚血モデルでは後肢運動機能で遅延型の変化を認めることがあるため少なくとも再灌流後4日間は観察が必要とわれわれは考えている⁸⁾。

本研究ではウサギの脊髄虚血モデルにおいて、DIPC、kidney RIPC、および limb RIPC の保護効果を再灌流後7日間、神経学的所見を観察し、その後病理組織学的に比較した。DIPC の脊髄保護効果は予想外に強力であったため、その保護機構についても検討した。

2. 方法

研究プロトコールは、山口大学宇部地区動物使用委員会によって承認され、体重 2.8 ± 0.2 kg (平均値 \pm 標準偏差) の 78 匹の雄性的のニュージーランド白ウサギを使用した。

過去の報告と同様に麻酔と外科処置を行った⁸⁾。要点を述べると、前日から絶食にしたウサギを麻酔導入後に挿管し人工呼吸管理下とし、40 %酸素と60 %窒素及びフェンタニル、2~3 %イソフルランで麻酔維持した。水分および薬物の投与のために耳静脈に静脈留置針を挿入し乳酸加リンゲル溶液 (10 ml/kg /時) を投与した。別のカテーテルを耳動脈に挿入して血圧を測定した。食道および傍脊柱筋温度をモニターし、傍脊柱筋温度を実験中約 38.0°C に維持した。大動脈遮断時の末梢側の血圧を測定するために PE-50 カテーテルを右大腿動脈に挿入した。

大動脈遮断も過去の報告と同様に行った⁹⁾。ウサギを右側臥位にし、大動脈遮断のために左腎動脈のすぐ遠位の大動脈周囲に PE-50 カテーテルを留置した。実験 1 の kidney RIPC 群では左腎動脈を露出させ PE-10 カテーテルを左腎動脈の周囲に留置した。外科的処置の完了後、終末呼気イソフルラン濃度を 2 % に維持した。

2.1. 実験 1

24 匹のウサギを無作為に対照群、DIPC 群、kidney RIPC 群または limb RIPC 群 (各群それぞれ 6 匹) に割り当てた。実験プロトコールを図 1 に示す。Limb RIPC 群では、両側大腿に幅 5 cm の小児用血圧カフを巻き、駆血圧 200 mmHg まで膨らませて大腿動脈を遮断した。全ての群で大動脈遮断の 60 分前と遮断直前に 400 単位のヘパリンを投与した。平均動脈血圧が 55 mmHg 未満に低下した場合、フェニレフリンを投与し平均血圧を 55 mmHg 以上に維持した。

大動脈遮断は腹部大動脈を 15 分間遮断した。再灌流後は全てのカテーテルを抜去し、切開部を縫合した。最後に抗生物質 (セファゾリンナトリウム、30 mg/kg) を筋肉内投与した。十分な自発呼吸と体動を確認した上で抜管を行った。

神経学的評価に関しては Drummond and Moore (4 : 正常、3 : 跳躍できるが正常ではない、2 : 後肢はよく動くが跳躍できない、1 : 後肢がわずかに動く、0 : 後肢の完全麻痺) の神経学的スコア¹⁰⁾ を用いて、群分けを知らない者が再灌流後連続 7 日間評価した。

最終的な神経学的評価（再灌流の7日後）後に、イソフルラン麻酔下で10%リン酸緩衝ホルマリンを用いて脊髄灌流固定を行った。L5レベルの脊髄で厚さ8 μm の切片を作成し、ヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。群分けを知らない者によって光学顕微鏡を用いて腰部腹側脊髄（中心管を通る線の前方）の正常神経細胞数を各ウサギ2つの標本で計測し平均した。Nissl小体の消失、細胞質の好酸性の増強、神経細胞核の均質な濃縮を虚血性障害の指標とした⁹⁾。

2.2. 実験2

実験2は、DIPCの強力な脊髄保護効果を再確認し、その機序へのフリーラジカルの関与を検討することを目的とした。フリーラジカルスカベンジャーとしてジメチルチオウレア（DMTU）を使用した。24匹の動物を無作為に対照群、DIPC群、DMTU群、またはDMTU+DIPC群に割り当てた（各群それぞれ6匹）。実験プロトコルを図1に示す。DMTU群およびDMTU+DIPC群は、それぞれtest ischemiaの115分前、またはconditioning ischemiaの1時間前に5 mLの生理食塩水に溶解したDMTU 500 mg/kgの経静脈投与を行った。対照群およびDIPC群は、それぞれtest ischemiaの115分、またはconditioning ischemiaの1時間前に同用量の生理食塩水を投与した。Conditioning ischemia、大動脈遮断、および神経学的および病理組織学的評価方法は、実験1と同じである。

2.3. 実験3

実験3は、DIPCの脊髄保護機構におけるアデノシンA₁受容体とミトコンドリアATP感受性カリウム（K_{ATP}）チャネルの関与について検討した。アデノシンA₁受容体拮抗薬の8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine（DPCPX）とミトコンドリアK_{ATP}チャネル拮抗薬の5-hydroxydecanoate（5HD）を用いた。24匹のウサギを無作為に対照群、DIPC群、DPCPX+DIPC群、または5HD+DIPC群（各群それぞれ6匹）に割り当てた。実験プロトコルを図1に示す。DPCPX+DIPC群ではDPCPX 1 mg/kgを1 mLのジメチルスルホキシドに溶解し、conditioning ischemiaの30分前に腹腔内投与した。他の3つの群では、test ischemiaの85分前に同量のジメチルスルホキシドを腹腔内投与した。5HD+DIPC群では5HD 40 mg/kgを5 mLの生理食塩水に溶解させ、conditioning ischemiaの30分前に静脈内投与した。他の3つの群では、test ischemiaの85

分前に同量の生理食塩水を静脈投与した。Conditioning ischemia、大動脈遮断、および神経学的および病理組織学的評価方法は、実験 1 と同様である。

2.4. 実験 4

6 匹のウサギを無作為に 2 群（各群それぞれ 3 匹）に分割し、実験 1 の DIPC 群と同じ方法で conditioning ischemia を行った。対照群は、同じ外科的処置を行ったが、conditioning ischemia を行わなかった。実験プロトコールを図 1 に示す。

対照群では大動脈露出 55 分後、DIPC 群では 2 回目の conditioning ischemia 実施 30 分後に脊髄を取り出し、以前に報告したように⁸⁾ -80 °C で急速凍結した。凍結した組織を細かく刻んだ後、Retsch MM300 ミキサー粉砕機を使用し溶解バッファ（1 % Triton X-100, 20 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, ×100 ホスファターゼ阻害剤カクテル溶液 [Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA], ×100 プロテアーゼ阻害剤カクテル溶液 [Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO], 1 mM フッ化フェニルメタンシルホニル) で可溶化した。遠心分離後、上清のタンパク濃度を測定した後にプロテオームアレイとイムノブロットング法でリン酸化されたタンパク質の網羅的な解析を行った。実験には Proteome Profiler Array (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) を使用し分析した。

分析の詳細を以下に簡単に示す。抽出物（それぞれ 500 μ g のタンパク質を含む）を 43 種類の抗体を固定化した 8 個のニトロセルロースメンブレン上でインキュベートし固定抗体に結合した標的タンパク質をビオチンラベルした 43 種類のリン酸化抗体カクテルに反応させた。その後、ストレプトアビジン-HRP およびルミネッセンス試薬で発光させ、Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いてリン酸化スポットを検出した。電気泳動およびイムノブロットングは、以前に記載されているように行った¹¹⁾。簡潔に述べると、抽出物を 5%-20% (w/v) 勾配ポリアクリルアミドゲル (アトー) で電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。転写したニトロセルロース膜をブロッキングワン (ナカライ) でブロッキングした後、抗リン酸化 Akt 1/2/3 抗体 (Ser473; Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、抗 Akt1 (4D6; Abcam, Cambridge, MA)、抗 Akt2 抗体 (EP1676; Abcam)、抗リン酸化 ERK1/2 (Tyr204) および抗 ERK1/2 抗体 (Santa Cruz Technology) で 4 °C で一晩インキュベートした後、HRP ラベル

した 2 次抗体と発光試薬を用いてバンドを検出した。

統計分析

生理学的諸量は、平均±標準偏差として示し、反復測定分散分析によって分析した。後肢運動機能データおよび脊髄腹側の正常神経細胞数はノンパラメトリック法 (Kruskal-Wallis 検定、続いて Bonferroni 補正による Mann-Whitney U 検定) を用いて統計分析を行った。実験 4 ではイムノブロットから測定したバンド密度に関するデータを平均±標準偏差として示し、t 検定を用いて分析した。Bonferroni 補正を適用した場合、P 値<0.0083 を統計的に有意であるとした。それ以外は P <0.05 を有意とみなした。

3. 結果

実験 1、2 および 3 の生理学的諸量をそれぞれ Table 1、2 および 3 に示す。生理学的諸量に関していずれの実験においても、虚血前、虚血後 7.5 分、または再灌流後 15 分で 4 群間に有意差はなかった。実験 1、2 および 3 の全てのウサギは、最終的な神経学的評価（再灌流の 7 日後）まで生存した。

図 2A に、実験 1 における各群の運動機能スコアの経時変化を示す。最終的な運動機能スコアは、対照群または kidney RIPC 群よりも DIPC 群が有意に良好であった（それぞれ $P = 0.003$ および $P = 0.007$ ）。対照群、kidney RIPC 群および limb RIPC 群の間で運動機能スコアに有意差はなかった。

図 3A に実験 1 における再灌流 7 日後の正常な腰部脊髄腹側神経細胞数（L5 レベル）を示す。DIPC 群の正常神経細胞数は、対照群、kidney RIPC 群、または limb RIPC 群に比べ有意に高値であった。（ $P = 0.005$ 、 $P = 0.005$ 、 $P = 0.0081$ ）。しかし、対照群、kidney RIPC 群、および limb RIPC 群の間では正常な神経細胞数に有意差はなかった。図 3D および 3E に、対照群（図 3D）の対麻痺動物（スコア=0）の腰部脊髄（L5）、および DIPC 群（図 3E）の正常腰部脊髄（L5）の代表的な顕微鏡写真を示す。今回の実験で重度の運動機能障害（スコア ≤ 1 ）を認めた動物では、脊髄の灰白質の構造が破壊され、ほとんどの運動ニューロンが消失し、顕著な炎症細胞浸潤が観察された。これらの動物の白質では空砲も観察される。対照的に、正常な運動機能を有する動物（スコア=4）では、脊髄の灰白質の構造が十分に維持され、運動神経細胞は正常な外観を保持していた。

DIPC 群では、実験 2 の対照群および実験 3 の対照群と比較した場合、神経学的スコアおよび正常神経細胞数ともに有意に高値であった（ $P = 0.002$ および $P = 0.005$; 図 2B および 図 3B）、（ $P = 0.002$ および $P = 0.005$; 図 2C および 図 3C）。そして DIPC の保護効果に関しては DMTU、DPCPX、または 5HD を用いても DIPC の保護効果を拮抗できなかった（図 2B、2C および 図 3B、3C）。

実験 4 ではリン酸化されたタンパク質分析をおこない conditioning ischemia に応答して 11 種類のリン酸化タンパク質がコントロール値と比較して増加し特に ERK (Thr202 / Tyr204) および Akt (Ser473) の 2 つのリン酸化が顕著に増加していた（図 4）。さらにこの 2 つについてイムノブロットングを行ったところ、Akt (Ser473) に関しては約 60 kDa で 2 つのバンドが検出され conditioning ischemia によって有意に増加していた（ $P = 0.019$; 図 5A、5C）が、

ERKのリン酸化はconditioning ischemiaによって変化しなかった(図5B、5D)。Aktに関しては抗Akt1と抗Akt2抗体でイムノプロットィングを行った結果、conditioning ischemiaにより増加していたリン酸化タンパク質はAkt2であることが判明した(図5A)。

4. 考察

われわれは本研究においてウサギの一過性脊髄虚血モデルで DIPC と 2 種類の RIPC の脊髄保護効果を比較し、kidney RIPC または limb RIPC には保護効果がなく DIPC が虚血性脊髄障害に対して保護効果を有することを見出した。そして DIPC の強力な脊髄保護効果には再現性があった。加えて DIPC の保護機構においてリン酸化タンパク質分析で Akt2 のリン酸化と関連している可能性があることが示唆された。

IPC の神経保護効果は、conditioning ischemia の方法、conditioning ischemia と test ischemia の間隔、および test ischemia の侵襲の強さの 3 つの要因に左右されると考えられる。Gurcun ら⁴⁾ および Dong ら⁵⁾ の研究と同様に、われわれは kidney RIPC および limb RIPC を行った。ただし kidney RIPC と大動脈遮断との間隔に関しては本研究では 30 分である一方、Gurcun ら⁴⁾ の研究は 15 分と短いという点が異なっている。しかし、kidney RIPC にも limb RIPC にも保護効果はみられなかった。大動脈遮断時間はわれわれの研究では 15 分であったが、Gurcun ら⁴⁾ や Dong ら⁵⁾ による研究ではそれぞれ 20 分および 40 分であったので、本研究での脊髄虚血侵襲の強さは両者より弱いと考えられる。

一般的に conditioning ischemia による神経保護効果を観察するためには、test ischemia の侵襲は弱いほうが望ましい。本研究より強い虚血侵襲である以前の研究の結果が脊髄保護効果を示し、より弱い虚血侵襲であるわれわれの研究結果が脊髄保護効果を示さなかったことを説明するのは困難である。しかしながら、子ブタ¹²⁾ およびブタ¹³⁾ における limb RIPC の脊髄虚血に対する影響を調べた最近の研究では神経学的評価による保護効果は観察されていない。脊髄における RIPC の神経保護効果に関してはより多くの動物モデルおよび研究室でさらなる研究が必要だと考える。

Kakimoto ら⁶⁾ は 17 分間の大動脈遮断の 30 分前に 5 分の conditioning ischemia を 1 回実施し DIPC が再灌流後 1 日目に脊髄保護効果を有し 7 日目には効果がなかったことを報告した。対照的に、Gurcun ら⁴⁾ は 40 分間の大動脈遮断の 15 分前に conditioning ischemia として 5 分の遮断と 15 分の再灌流を 2 サイクル実施し、再灌流の 2 日後に DIPC の脊髄保護効果を有することを実証した。われわれは、Gurcun ら⁴⁾ と同様に 2 サイクルの conditioning ischemia を採用した。本研究の実験 1、2 および 3 の結果からわれわれは DIPC が虚血性脊髄障害に対して強力な脊髄保護効果を有すると考えている。これは 2 サイク

ルの conditioning ischemia がこの強力な脊髄保護効果を発現させたと考えている。

活性酸素、アデノシン A₁ 受容体、オピオイド δ 受容体、ブラジキニン B₂ 受容体、およびミトコンドリア K_{ATP} チャンネルは、心筋虚血において conditioning ischemia と test ischemia との間隔が 1 時間未満である場合、保護効果発現に重要な役割を果たすことがすでに報告されている¹⁴⁾。フリーラジカルスカベンジャー (DMTU)^{5,15)}、アデノシン A₁ 受容体拮抗薬 (DPCPX)^{16,17)}、ミトコンドリア K_{ATP} チャンネル拮抗薬 (5HD)^{18,19)} に関しては本研究で用いられた投与量は先の研究と比べ十分と考えられる。しかし、DIPC の神経保護効果は、これらの薬剤投与で減弱できなかった。したがって、われわれの結果は、フリーラジカル、アデノシン A₁ 受容体、およびミトコンドリア K_{ATP} チャンネルは、DIPC 誘発に伴う脊髄保護機構において単独では決定的な役割を果たさないことを示唆している。

Conditioning ischemia と test ischemia との間隔が 1 時間未満であることを考慮すると、神経保護機構は新たに合成されるタンパク質ではなく、特定の酵素のリン酸化が神経保護効果に寄与しているとわれわれは推測した。Proteome Profiler Array を用いて 43 種類のリン酸化タンパク質を解析し、conditioning ischemia によりリン酸化が増強される酵素をスクリーニングした。そしてイムノブロットング法により Akt2 のリン酸化が有意に増強されることが判明した。Akt には 3 つの Akt アイソフォーム (Akt1、Akt2、および Akt3) があるが、Akt2 のリン酸化が DIPC の脊髄保護機構と関連しているという報告はない。中枢神経系における Akt2 の特異的役割に関して限られた情報しかない。Akt2 は培養神経細胞における細胞体生存率および軸索成長を促進することが報告されている²⁰⁾。DIPC による脊髄保護効果において Akt2 のリン酸化がどのように機能するかを調べるためにさらなる研究が必要である。

本研究ではウサギ一過性脊髄虚血モデルにおいて kidney RIPC および limb RIPC には脊髄保護効果がないことがわかった。一方で DIPC には強い脊髄保護効果があることが判明した。神経保護効果の一端を担うとされるフリーラジカル、アデノシン A₁ 受容体、およびミトコンドリア K_{ATP} チャンネルは、本研究の結果から DIPC の脊髄保護効果発現において重要な役割を果たさないと考えた。Akt2 のリン酸化は、DIPC の保護機構と関連している可能性があると考えられ、さらなる研究が必要である。

5. 利益相反 著者は利益相反がないことを宣言する

表 1 生理学的諸量 (実験 1)

	MAP(mmHg)		HR (bpm)	Temperature (°C)		pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	Glucose (mg/dL)	Hematoorit (%)
	Proximal	Distal		Esophageal	Paravertebral					
Control (n=6)										
Preischemia	61±5	62±4	307±12	38.1±0.1	37.9±0.1	7.36±0.02	205±11	38±3	127±18	36±2
Ischemia 7.5 min	60±1	7±1	307±12	38.1±0.1	37.6±0.2					
Reperfusion 15 min	62±2	66±4	295±24	38.1±0.1	38.0±0.1	7.31±0.05	202±22	40±4	134±12	35±1
DIPC (n=6)										
Preischemia	61±2	61±2	295±20	38.1±0.1	37.9±0.1	7.35±0.05	195±25	38±2	132±15	37±1
Ischemia 7.5 min	56±9	6±1	295±20	38.1±0.1	37.7±0.2					
Reperfusion 15 min	61±2	63±2	295±20	38.1±0.1	38.0±0.1	7.33±0.04	215±9	37±1	130±17	35±1
Kidney RIPC (n=6)										
Preischemia	64±3	61±4	282±24	38.0±0.1	38.0±0.1	7.37±0.03	197±13	39±3	133±10	37±2
Ischemia 7.5 min	56±3	6±1	285±25	38.0±0.1	37.6±0.1					
Reperfusion 15 min	64±4	67±5	276±13	38.1±0.1	38.0±0.1	7.33±0.05	197±21	38±1	136±11	34±2
Limb RIPC (n=6)										
Preischemia	60±2	60±1	290±12	38.2±0.1	38.0±0.1	7.32±0.03	194±15	38±3	122±11	37±2
Ischemia 7.5 min	56±4	6±1	285±13	38.1±0.1	37.5±0.3					
Reperfusion 15 min	62±1	63±2	285±13	38.2±0.1	38.0±0.1	7.31±0.01	195±14	38±1	138±26	35±2

Data are mean ± SD HR heart rate MAP mean arterial blood pressure

表 2 生理学的諸量 (実験 2)

	MAP(mmHg)		HR (bpm)	Temperature (°C)		pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	Glucose (mg/dL)	Hematoorit (%)
	Proximal	Distal		Esophageal	Paravertebral					
Control (n=6)										
Preischemia	60±4	64±6	308±16	38.0±0.1	38.3±0.1	7.34±0.07	199±13	41±2	127±11	35±3
Ischemia 7.5 min	53±6	7±2	308±16	38.1±0.4	38.3±0.1					
Reperfusion 15 min	63±7	67±10	298±24	38.3±0.1	38.3±0.1	7.32±0.07	207±8	40±2	132±27	35±2
DIPC (n=6)										
Preischemia	60±2	61±4	298±15	38.0±0.1	38.1±0.2	7.34±0.04	211±9	40±1	132±12	35±2
Ischemia 7.5 min	51±3	7±1	295±13	37.7±0.2	38.1±0.2					
Reperfusion 15 min	61±1	64±4	295±12	38.0±0.2	38.0±0.2	7.32±0.05	215±12	40±2	137±18	33±1
DMTU (n=6)										
Preischemia	58±2	60±3	315±19	38.0±0.1	38.0±0.2	7.30±0.05	208±13	39±1	143±11	34±1
Ischemia 7.5 min	52±2	7±1	215±19	37.6±0.2	38.2±0.2					
Reperfusion 15 min	61±5	61±5	290±15	38.0±0.3	38.2±0.2	7.30±0.06	207±10	39±1	152±20	35±1
DMTU + DIPC (n=6)										
Preischemia	59±2	59±4	297±29	38.4±0.1	38.4±0.2	7.32±0.05	204±11	40±2	153±35	36±3
Ischemia 7.5 min	49±4	7±1	297±29	38.2±0.2	37.2±0.2					
Reperfusion 15 min	61±7	65±9	285±31	38.1±0.2	38.3±0.2	7.31±0.04	204±6	40±1	148±32	35±2

Data are mean ± SD HR heart rate MAP mean arterial blood pressure

表 3 生理学的諸量 (実験 3)

	MAP(mmHg)		HR (bpm)	Temperature (°C)		pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	Glucose (mg/dL)	Hematocrit (%)
	Proximal	Distal		Esophageal	Paravertebral					
Control (n=6)										
Preischemia	62±5	65±5	320±15	38.6±0.3	38.0±0.1	7.38±0.03	180±21	39±1	136±9	39±2
Ischemia 7.5 min	55±5	7±1	292±23	38.5±0.3	37.9±0.3					
Reperfusion 15 min	59±4	62±5	283±15	38.5±0.2	38.0±0.1	7.35±0.03	191±18	40±1	140±16	39±2
DIPC (n=6)										
Preischemia	56±4	58±4	305±20	38.6±0.3	38.0±0.1	7.36±0.04	207±7	38±1	134±26	39±2
Ischemia 7.5 min	53±7	7±1	288±24	38.4±0.2	37.5±0.2					
Reperfusion 15 min	57±3	59±2	287±24	38.4±0.2	38.0±0.1	7.33±0.06	206±9	39±1	145±59	39±2
DPCPX + DIPC (n=6)										
Preischemia	58±2	58±1	310±23	38.2±0.3	38.0±0.1	7.35±0.04	203±14	38±1	133±20	40±3
Ischemia 7.5 min	52±8	7±1	300±31	38.2±0.3	37.7±0.3					
Reperfusion 15 min	63±3	62±3	300±31	38.2±0.3	38.0±0.1	7.33±0.04	204±19	39±2	138±30	39±2
5HD + DIPC (n=6)										
Preischemia	60±6	59±4	305±15	38.3±0.2	38.1±0.1	7.32±0.04	199±8	39±1	126±12	39±1
Ischemia 7.5 min	52±6	7±1	287±15	38.1±0.2	37.5±0.2					
Reperfusion 15 min	64±7	63±6	290±18	38.2±0.1	38.0±0.2	7.34±0.05	198±11	40±1	137±14	40±1

Data are mean ± SD HR heart rate MAP mean arterial blood pressure

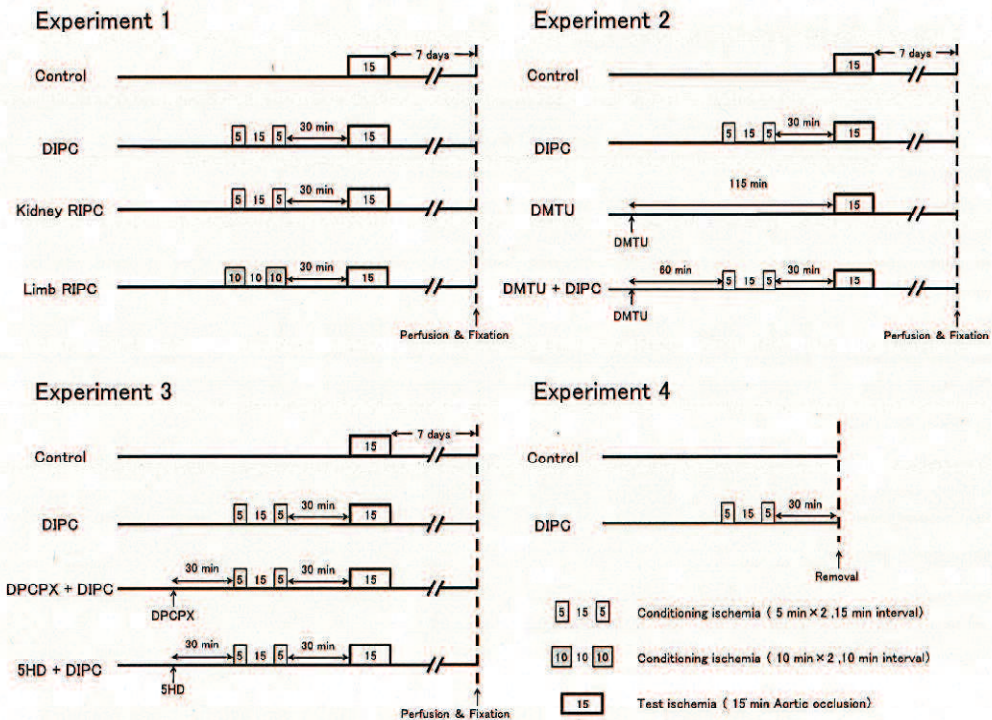


図1 実験プロトコール

略語：

5HD,5-hydroxydecanoate

DIPC,direct ischemic preconditioning

DMTU,dimethylthiourea

DPCPX, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

RIPC,remote ischemic preconditioning

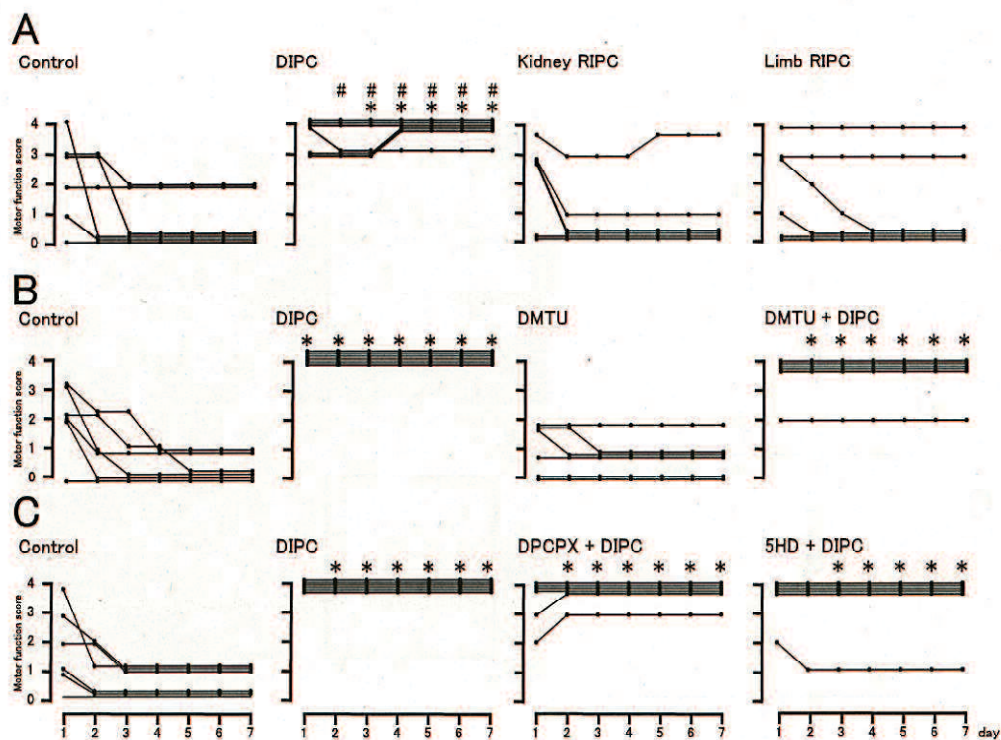


図2 実験1~3 (A~C) における再灌流後1日後から7日後までの運動機能スコアの推移

運動機能スコアは、4 (正常) ~0 (後肢の完全麻痺) で各丸印は個々のデータを示している。

(* $P < 0.008$ 対照群と比較、# $P < 0.008$ kidney RIPC 群と比較)

略語:

5HD, 5-hydroxydecanoate

DIPC, direct ischemic preconditioning

DMTU, dimethylthiourea

DPCPX, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

RIPC, remote ischemic preconditioning

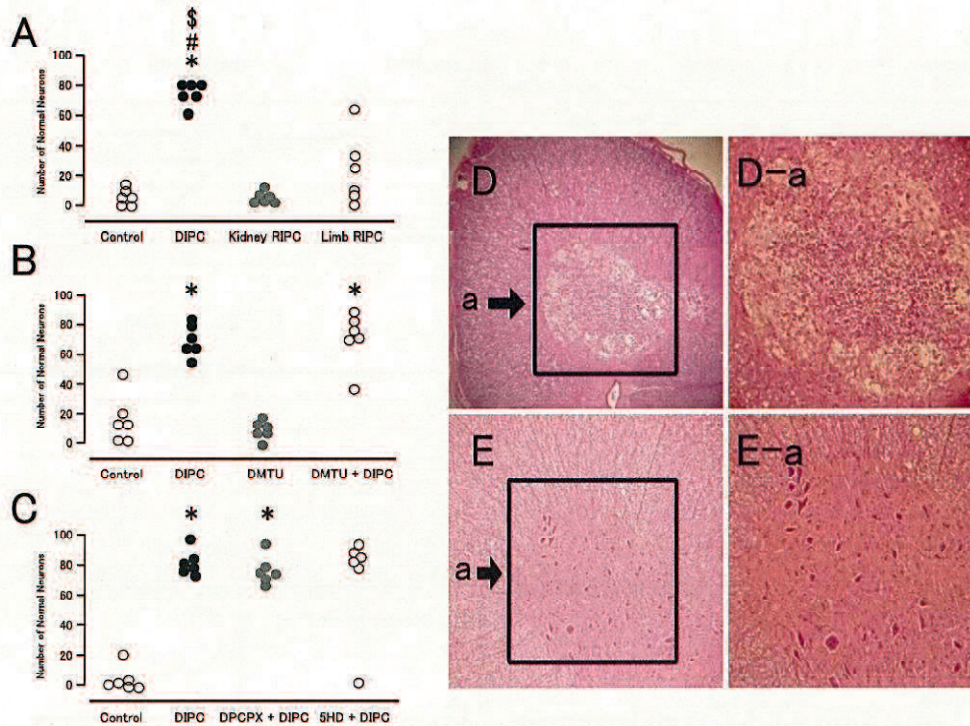


図3 実験1~3 (図A~C)

左：再灌流7日後（第5腰髄レベル）脊髄腹側の正常神経細胞数
各丸印は個々のデータを示している。

(* $P < 0.008$ 対照群と比較、# $P < 0.005$ kidney RIPC 群と比較、\$ $P < 0.0081$ limb RIPC 群と比較)

右：実験1における対照群での対麻痺のウサギ (D,D-a) とDIPC群での運動機能正常のウサギ (E,E-a) における腰部脊髄の代表的な光学顕微鏡写真（第5腰髄レベル、ヘマトキシリン-エオジン染色）

対照群では正常細胞はほとんどなく、炎症性変化を伴う灰白質全体の崩壊が認められる (D,D-a)。対照的にDIPC群では脊髄灰白質の構造はよく保たれており運動神経細胞はほぼ正常に維持されている (E,E-a)。

DとE：40倍拡大、D-aとE-a：100倍拡大

略語：

5HD, 5-hydroxydecanoate

DIPC, direct ischemic preconditioning

DMTU, dimethylthiourea

DPCPX, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

RIPC, remote ischemic preconditioning

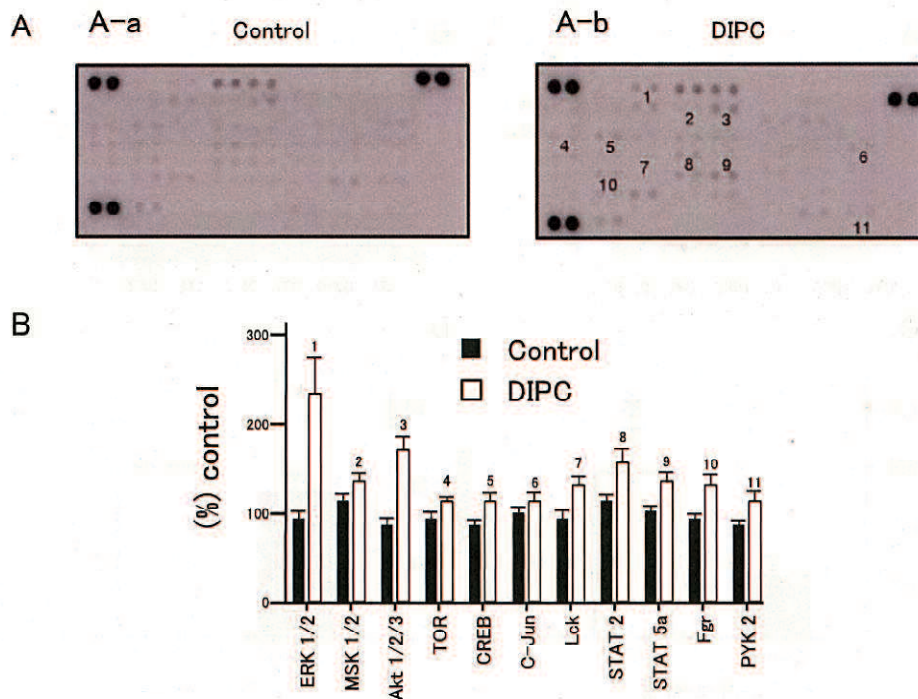


図4 Proteome Profiler Array を用いた対照群 (A-a) と DIPC 群 (A-b) の腰部リン酸化タンパク質の比較

11 種類のリン酸化タンパク質のうち ERK (Thr202 / Tyr204) および Akt (Ser473) がリン酸化の比率が高かった (B)。黒塗りの棒は対照群、白抜きの棒は DIPC 群を示す。(平均±標準誤差、各 n = 3)

略語

Akt, protein kinase B

c-Jun, c-Jun N-terminal kinase

CREB, cAMP response element binding protein

ERK, extracellular signal-regulated kinase

Fgr, Gardner-Rasheed feline

Lck, lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

MSK, mitogen-activated and stress-activated kinases

PYK2, proline-rich tyrosine kinase 2

STAT, signal transducer and activator of transcription

TOR, target of rapamycin

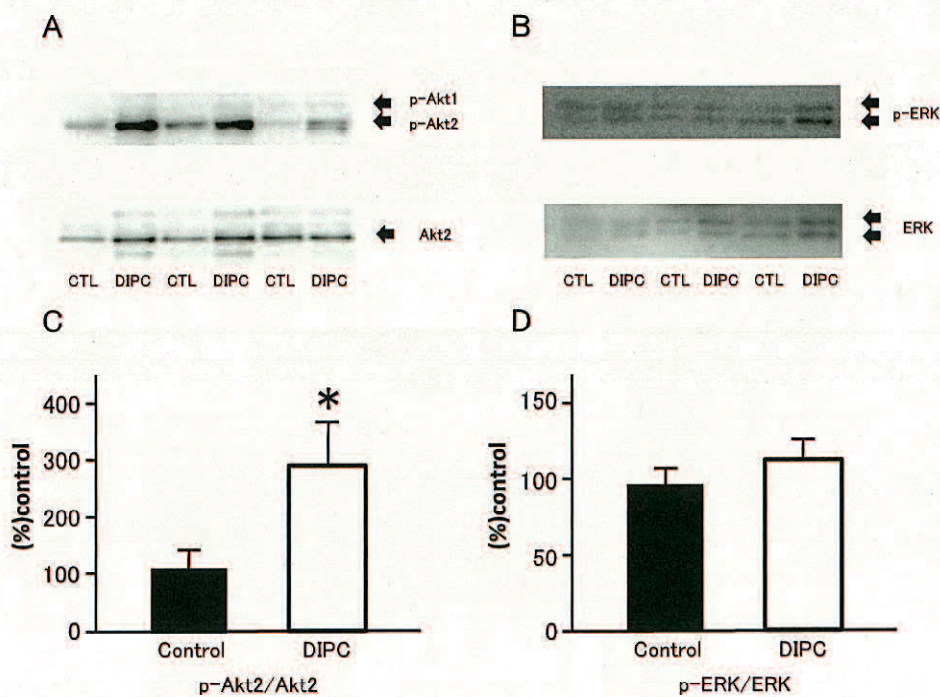


図5 対照群とDIPC群の腰髄リン酸化タンパク質の比較

イムノブロッティング法による代表的免疫プロットAkt1/2(A)およびERK(B)を示す。免疫プロットからの濃度測定により決定されたAkt2(C)およびERK(D)リン酸化比率を示す。DIPC群のAkt2のリン酸化の比率が高かった(B)。(平均±標準誤差、各n=3、*P=0.019 対照群と比較)

略語

Akt, protein kinase B

ERK, extracellular signal-regulated kinase

CTL, control

DIPC, direct ischemic preconditioning

6. 参考文献

1. Sivaraman V, Pickard JM, Hausenloy DJ. Remote ischaemic conditioning: cardiac protection from afar. *Anaesthesia*. 2015;70:732-48.
2. Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, Cremer J, Gruenewald M, Stoppe C, Coburn M, Schaelte G, Boning A, Niemann B, Roesner J, Kletzin F, Strouhal U, Reyher C, Laufenberg-Feldmann R, Ferner M, Brandes IF, Bauer M, Stehr SN, Kortgen A, Wittmann M, Baumgarten G, Meyer-Treschan T, Kienbaum P, Heringlake M, Schon J, Sander M, Treskatsch S, Smul T, Wolwender E, Schilling T, Fuernau G, Hasenclever D, Zacharowski K, Collaborators RIS. A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N Engl J Med*. 2015;373:1397-407.
3. Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, Knight R, Kunst G, Laing C, Nicholas J, Pepper J, Robertson S, Xenou M, Clayton T, Yellon DM, Investigators ET. Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N Engl J Med*. 2015;373:1408-17.
4. Gurcun U, Discigil B, Boga M, Ozkisacik E, Badak MI, Yenisey C, Kurtoglu T, Meteoglu I. Is Remote Preconditioning as Effective as Direct Ischemic

Preconditioning in Preventing Spinal Cord Ischemic Injury? J Surg Res.

2006;135:385-93.

5. Dong HL, Zhang Y, Su BX, Zhu ZH, Gu QH, Sang HF, Xiong L. Limb remote ischemic preconditioning protects the spinal cord from ischemia-reperfusion injury: a newly identified nonneuronal but reactive oxygen species-dependent pathway.

Anesthesiology. 2010;112:881-91.

6. Kakimoto M, Kawaguchi M, Sakamoto T, Inoue S, Furuya H, Nakamura M, Konishi N. Evaluation of rapid ischemic preconditioning in a rabbit model of spinal cord ischemia. Anesthesiology. 2003;99:1112-7.

7. Perez-Pinzon MA, Xu GP, Dietrich WD, Rosenthal M, Sick TJ. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab.

1997;17:175-82.

8. Utada K, Ishida K, Tohyama S, Urushima Y, Mizukami Y, Yamashita A, Uchida M, Matsumoto M. The combination of insulin-like growth factor 1 and erythropoietin protects against ischemic spinal cord injury in rabbits. J Anesth. 2015;29:741-8.

9. 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*.

1997;86:1120-7.

10. Drummond JC, Moore SS. The influence of dextrose administration on neurologic outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology*.

1989;70:64-70.

11. Mizukami Y, Iwamatsu A, Aki T, Kimura M, Nakamura K, Nao T, Okusa T, Matsuzaki M, Yoshida K, Kobayashi S. ERK1/2 regulates intracellular ATP levels through alpha-enolase expression in cardiomyocytes exposed to ischemic hypoxia and reoxygenation. *J Biol Chem*. 2004;279:50120-31.

12. Haapanen H, Herajarvi J, Arvola O, Anttila T, Starck T, Kallio M, Anttila V, Tuominen H, Kiviluoma K, Juvonen T. Remote ischemic preconditioning protects the spinal cord against ischemic insult: An experimental study in a porcine model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;151:777-85.

13. Herajarvi J, Anttila T, Sarja H, Mustonen C, Haapanen H, Makela T, Yannopoulos F, Starck T, Kallio M, Tuominen H, Puistola U, Karihtala P, Kiviluoma K, Anttila V, Juvonen T. Exploring Spinal Cord Protection by Remote Ischemic Preconditioning: An Experimental Study. *Ann Thorac Surg.* 2017;103:804-11.
14. Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2001;52:181-98.
15. Lei C, Deng J, Wang B, Cheng D, Yang Q, Dong H, Xiong L. Reactive oxygen species scavenger inhibits STAT3 activation after transient focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Anesth Analg.* 2011;113:153-9.
16. Hiraide T, Katsura K, Muramatsu H, Asano G, Katayama Y. Adenosine receptor antagonists cancelled the ischemic tolerance phenomenon in gerbil. *Brain Res.* 2001;910:94-8.
17. Nakamura M, Nakakimura K, Matsumoto M, Sakabe T. Rapid tolerance to focal cerebral ischemia in rats is attenuated by adenosine A1 receptor antagonist. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:161-70.

18. Mehrjerdi FZ, Aboutaleb N, Pazoki-Toroudi H, Soleimani M, Ajami M, Khaksari M, Safari F, Habibey R. The Protective Effect of Remote Renal Preconditioning Against Hippocampal Ischemia Reperfusion Injury: Role of KATP Channels. *J Mol Neurosci.* 2015;57:554-60.
19. Yoshida M, Nakakimura K, Cui YJ, Matsumoto M, Sakabe T. Adenosine A1 receptor antagonist and mitochondrial ATP-sensitive potassium channel blocker attenuate the tolerance to focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24:771-9.
20. Diez H, Garrido JJ, Wandosell F. Specific roles of Akt iso forms in apoptosis and axon growth regulation in neurons. *PLoS One.* 2012;7:e32715.