

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 6 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20344

研究課題名(和文)心停止心肺蘇生後に活性化される炎症系細胞が引き起こす虚血性脳神経障害の機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of ischemic neuron damage by immno-system after cardiac arrest and resuscitation

研究代表者

藤吉 哲宏 (Fuji Yoshi, Tetsuhiro)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：50452785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：心停止後に蘇生して救命できたとしても、脳神経細胞は障害されてしまう。これは虚血だけでなく、再灌流後にも遅発性に脳神経が障害される。後者には炎症系細胞が関与しているという報告があるため、この機序no
解明によって、遅発性脳神経細胞障害を軽減できる可能性がある。目標とした炎症系細胞はマクログリアであり、この活性化の抑制によって脳神経細胞障害が軽減されることを期待して実験を計画した。マクログリアの活性化の抑制は非常に困難で、できたとしても薬剤が身体に悪影響を及ぼす。またマクログリアの活性化の抑制だけでは、遅発性脳神経細胞障害が抑制できなかった。脳神経細胞障害を抑制する新たな標的が必要である。

研究成果の概要(英文)：Neuron cell is very sensitive for ischemia. After cardiac arrest and resuscitation, many neuron cells get damaged. The damage causes not only ischemia but also activation of immuno-cells, that results to delayed neuron death. Our hyposis was that delayed neuron damage can be suppressed by anti-activation of immuno-system. The first target was misrocricia. Many reports that supressud microglia results to protective neurons after cardia arrest and resuscitation. But it was hard that microglia was inactivated without physical damage, and microglia inactivation did not result to neuron protect. We need to find a new target to protect neurons.

研究分野：ischemic neuron damage

キーワード：cardiac arrest ishcmic neuron damage delayed neuron damage

1. 研究開始当初の背景

虚血に対して脳は非常に弱い。心停止中に障害された脳神経細胞の機能は回復しないため、自己心拍再開に成功しても患者は多様な神経学的後遺症をもち、患者の社会復帰は困難となり生命予後は悪化する。心停止心肺蘇生後の脳神経学的予後が改善しない原因は、虚血性脳神経細胞障害の機序が解明されていないからである。特に自己心拍再開後に起こる遅発性脳神経細胞障害の機序は不明である。

2. 研究の目的

我々は以前に心停止心肺蘇生後マウスの海馬領域において虚血後に脳神経細胞障害が起こり、一部の炎症系細胞の活性化が関与している可能性を示唆した結果を得たため、まずはこの詳細な機序の解明を第一の研究目的とした。さらにさまざまな炎症系細胞活性化の抑制が脳神経細胞保護効果を示すかどうかを第二の研究目標とした。この研究により脳低温療法と並ぶ、心肺蘇生後脳障害に対する新たな治療戦略となる。

3. 研究の方法

マウスの心停止心肺蘇生 (CACPR) には体重 20 ~ 25 g の雄のマウスを用いる。全身麻酔下に気管挿管を行い、人工呼吸管理する。内頸静脈に静脈路を確保する。脳温測定は外耳道温、体温は直腸温を測定する。心電図モニターを装着する。体温調節装置で体温 37.0 ± 0.5 度に調節する。塩化カリウムを静脈内投与し、心電図で心停止を確認し、人工呼吸を停止し 8 分間の心肺停止とする。蘇生 30 秒前に 100% 酸素にて人工呼吸を開始する。心肺蘇生は毎分 300 回の胸骨圧迫とエピネフリンの静脈投与で行う。心電図 30 秒ごとに自己心拍再開を確認する。自己心拍再開後は十

分な自発呼吸の回復を確認して人工呼吸から離脱し観察室にて経過観察する。神経学的評価は自己心拍再開翌日から毎日、全身状態と神経学的所見を評価する。まずは安定した海馬領域の脳神経細胞障害が認められ、80% 以上の蘇生成功率と 60% 以上の蘇生後 3 日間生存率を目指す。その後マイクログリアの活性化の継時的変化と脳神経細胞障害の程度を比較する。蘇生後 1, 3, 5, 7, 10 日目の摘出脳組織標本を活性化マイクログリア特異的染色 (Mac-2) にてマイクログリアの活性化の部位とその面積を調べる。また H&E 染色にて海馬領域の全脳神経細胞数に対する障害された脳神経細胞数の割合を調べ、マイクログリア活性化領域の面積と脳神経細胞障害の程度を比較する。マイクログリア活性抑制薬 4-PCO の至適濃度を同定する。マイクログリアの最大活性日に 4-PCO の効果を判定する。4-PCO によって脳神経細胞が保護されるかどうかを検討する。

4．研究成果

この研究で最も重要なことはCACPR マウスの生存率が安定することであった。CACPR マウスモデルでは、電氣的に心停止を誘発する方法や中心動静脈から脱血する方法、総頸動脈を遮断する方法など、様々な手法が用いられているが、今回採用した塩化カリウムを用いて心停止を誘発し、エピネフリンと胸骨圧迫によって蘇生する方法では、たとえ心停止中に低体温にしても、8分間の心停止時間は、海馬の脳神経細胞障害を起こすにはやや短い、生存率を60%程度に保つには限界であった。例えば、心停止時間を6分間にしたこと、生存率は約90%まで増加するが、海馬の脳神経細胞は有意な障害を受けなかった。逆に心停止時間を10分にした場合は、生存率が10%程度まで低下しただけでなく、たとえ蘇生に成功したとしても全身状態が非常に悪く、神経障害の評価が不可能であった。さらにこの研究では心停止中に低体温にせず、平温を維持することとした。これまでの報告では心停止中に低体温にしている報告がほとんどである。しかし心停止中に体温を下げることによって、遅発性脳神経細胞障害を引き起こす原因と考えている炎症系細胞の活性化が抑制されているのではないかと考えた。そこでこの実験では8分間の心停止中は体温を下げずに平温で維持することにした。海馬領域における脳神経細胞障害は増悪したため評価には適していた。一方で、生存率を保つために低体温の時と比較して、厳密は術中と術後管理が必要となり、非常に長い時間と実験の工夫が必要であった。このCACPR マウスモデルを用いて、マイクログリアの活性化を抑制する4PCO投与によって、CACPR後の脳神経細胞障害を軽減させることを目的とした。

しかし学会発表レベルではあるが、当施設で実験を行う前に、他の研究機関から4PCOの身体に及ぼす悪影響が発表された。脳神経

細胞障害を軽減する程度のマイクログリア活性を抑制するために必要な4PCOを投与すると、CACPR後のマウスが生存できなくなることが明らかとなった。生存率が低下した原因は明らかではないが、少なくとも4PCO投与はCACPR後の脳神経細胞障害を軽減する手段としては適切ではないと判断した。

またCACPR後の脳神経細胞障害には多くの炎症系細胞が関与していることが発表された。まだ仮説の段階であるが、マイクログリア活性を有意に抑制しても、マイクログリアの活性化に依存しない他の炎症系細胞の活性化によって脳神経細胞は遅発性に障害される可能性がある。つまりCACPR後のマウスでマイクログリアの活性化を抑制しても脳神経細胞を有意に保護することができないことが分かった。活性化する炎症系細胞の種類は多く、複雑である。遅発性脳神経障害の機序を明らかにするためには、これに関与する炎症系細胞を同定する必要があるが、その仕組みは複雑であり、この実験は遂行できなかった。

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

藤吉 哲宏 (FUJIYOSHI Tetsuhiro)

九州大学大学院医学研究院

麻酔・蘇生学 助教

研究者番号：50452785