

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670690

研究課題名(和文) 出生時低酸素症に対する100%酸素蘇生後の脳神経発達障害機序とその治療法の確立

研究課題名(英文) Reoxygenation with 100% oxygen following hypoxia in newborn mice causes learning impairment

研究代表者

植木 正明 (UEKI, MASAOKI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20213332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：8%低酸素後100%酸素(H100群)または空気(H21)蘇生9時間後、H100群で脳caspase-3 mRNA発現は高く、脳エリスロポイエチン(EPO)mRNAは低下し、脳由来神経栄養因子(BDNF)mRNAに差はなく、8方向迷路学習では、学習機能の低下がみられた。さらに薬物的治療として、投与したEPO(5000単位/kg)およびEUK-134(10mg/kg)の前投与で、100%酸素蘇生後の8方向迷路による学習機能障害は軽減した。低酸素症時の100%酸素障害の機序に内因性EPOの産生抑制が関与している。

研究成果の概要(英文)：Postnatal day 7 (P7) mice were either subjected to hypoxia in 8% oxygen for 60 min or served as controls. Following hypoxia, mice underwent reoxygenation for 30 min with 21% or 100% oxygen. Reoxygenation with 100% oxygen significantly increased caspase-3 in the whole brain compared with 21% oxygen, and significantly decreased erythropoietin (EPO) mRNA expression compared with 21% oxygen 9 h after reoxygenation. There was no difference in brain-derived neurotrophic factor mRNA levels among the groups. The performance ratios of error in mice given 100% oxygen in the radial maze test at P63 were significantly higher compared with mice given 21% oxygen. Furthermore, administration of EPO (5000 u/kg), EUK134 (20mg/kg) rescued the performance ratios of error in mice given 100% oxygen in the radial maze test.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード：新生児蘇生 100%酸素 迷路学習 エリスロポイエチン

1. 研究開始当初の背景

2004年のDavidらによる1302名からなるメタ解析では出生時低酸素症に対する蘇生時に、100%酸素または空気での蘇生を比較検討した結果、100%酸素投与は空気に比べて、死亡率が有意に高く、自発呼吸開始に3分以上かかる頻度も高いという報告後、蘇生時の高濃度酸素投与については慎重な姿勢がとられた。その後の2010年の国際蘇生連絡協議会のガイドラインでは、100%酸素より、空気での蘇生を推奨している。日本でもコンセンサス2010で、満期産の低酸素症時の蘇生には空気での蘇生を推奨しているが、今まで新生児蘇生時の100%酸素使用による長期予後への報告はなく、一般には空気での蘇生は浸透していない。特に100%酸素蘇生による脳神経発達に及ぼす影響が証明されると次期、新生児蘇生のガイドライン改定の強力なエビデンスとなると思われる。

本研究では、新生児低酸素症時の100%酸素蘇生による脳神経発達障害機序には、100%酸素による、酸化ストレスによるフリーラジカル産生によるアポトーシス、脳神経発達に必要な各種脳神経栄養因子、低酸素刺激による活性化される低酸素誘導性転写因子(Hypoxia-inducible factor-1; HIF-1)の活性低下による内因性エリスロポイエチン(EPO)不足が関与していると推測した。

2. 研究の目的

200年以上もの間、新生児の蘇生時には、中枢神経系の低酸素状態による影響をできるだけ少なくするため、100%酸素が使用されてきた。しかし、近年100%酸素による蘇生は短期予後が悪く、2010年の国際蘇生連絡協議会のガイドラインでは、満期産時の低酸素症時には100%酸素より、空気での蘇生を推奨しているが、長期予後として、新生児低酸素蘇生時の100%酸素使用による脳神経発達に及ぼす影響は言及されていない。

本研究は新生時低酸素症に対する100%酸素蘇生後の脳発達障害発症機序とその治療法を確立することを目的としている。

3. 研究の方法

方法

対象マウス：生後7日目のC57BLマウス

実験群：低酸素ボックスで1時間低酸素曝露する群と空気で曝露する(C)群に分け、その後100%酸素で30分間蘇生する(HP100)群と空気で30分間蘇生する(HP21)群に分ける。

低酸素症状：下図のような特製ボックスに生後7日目のマウスを入れ、空気・窒素で混合して、8%酸素状態を作製し、1時間曝露することで作製する。8%酸素濃度は、特



製ボックスに入れたガスサンプリングチューブから吸引し、麻

酔ガスモニター(AS/3、IMI社)で確認する。

(1) 実験1

新生児低酸素症時の100%酸素蘇生が引き起こす脳神経発達障害を、脳エリスロポイエチン、脳由来神経栄養因子、脳アポトーシスと脳病理組織学的観点から検討した。

脳由来神経栄養因子(BDNF)、脳アポトーシス(caspase-3)、EPO発現に及ぼす影響

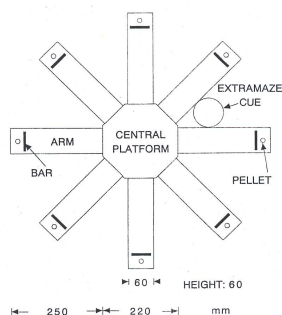
100%酸素または空気による蘇生、9時間後にマウスの脳を取り出し、脳神経シナプス成長の促す、脳由来神経栄養因子(BDNF)、脳アポトーシスの指標であるcaspase-3、脳EPOのmRNAを、real time PCRで測定し、比較

検討する。

8 方向迷路学習に及ぼす影響

100%酸素または空気による蘇生、生後 8-9 週間後に 8 方向迷路学習で脳の高次機能を評価する。

8 方向迷路学習：



8 方向放射状迷路は左図のように透明プラスチック製 8 方向放射状迷路の各迷路の先端に餌を

置き、これを取るようトレーニングを行う。試行は 1 日 1 回で、4 日間連続で行う。まだ入ったことのない初めてのアームに入り、餌を食べた場合を正選択、既に餌を取り終えたアームに再び入った場合を誤選択とする。最初の 8 選択における誤選択数を対照日に対して、比較検討する。性ホルモンが学習機能に影響を与えるので、雄マウスのみを使用する。

脳組織に及ぼす影響

100%酸素または空気蘇生、9 時間後にマウスの脳を取り出し、組織学的に比較検討する。

(2) 実験 2.

新生児低酸素症時の 100%酸素蘇生による脳神経発達障害が活性酸素スカベンジャーまたは EPO の投与で、改善できるかどうかを検討した。

対象マウス：生後 7 日目の C57BL マウス

実験群：低酸素ボックスで 1 時間低酸素曝露前に、活性酸素スカベンジャー (EUK-134、20mg/kg) または EPO(5000 単位/kg) の投与を行い、100%酸素蘇生後の脳神経発達障害を改善できるかどうかを検討する。

8 方向迷路学習に及ぼす影響

100%酸素蘇生、生後 8-9 週間後に 8 方向迷路学習で脳の高次機能を評価する。

4. 研究成果

(1) 実験 1

脳由来神経栄養因子 (BDNF)、脳アポトーシ

ス

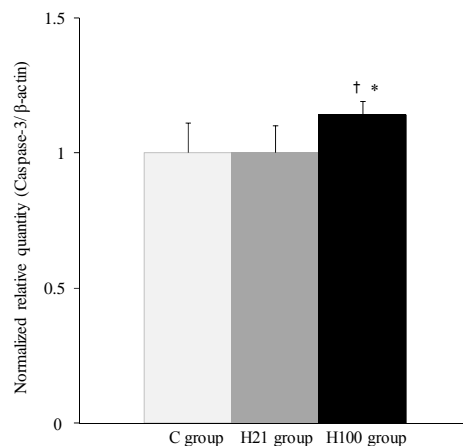


図 1

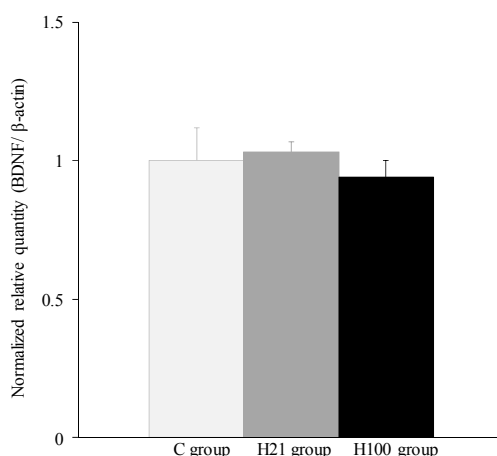


図 2

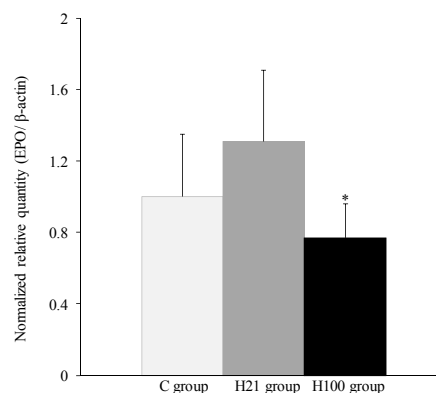


図 3

100%酸素または空気曝露終了 9 時間後の caspase-3 mRNA 発現は H100 群で有意に高かったが(図 1)、脳 BDNF mRNA 発現には差がな

かった(図2)。一方、EPOmRNA発現はH100群で有意に低下していた(図3)。

8方向迷路学習に及ぼす影響

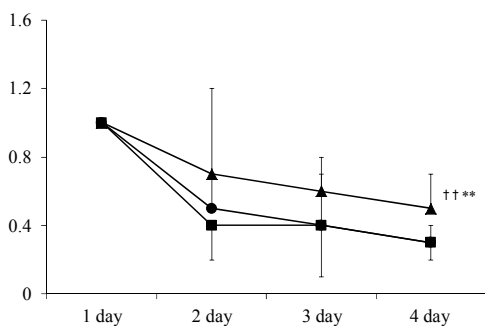


図4 Close triangleのH100群では有意に学習機能が低下した(図4)。

脳組織に及ぼす影響

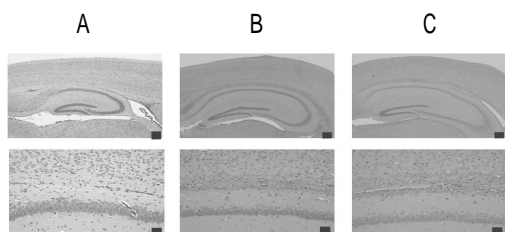
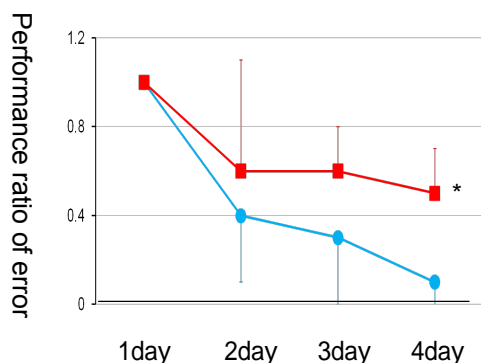


図5 3群で脳神経細胞変性などに差がなかった(図5)。

(2) 実験2

-1

EPO(5000単位/kg)の投与が8方向迷路学習に及ぼす影響



n = 10 in each group. Values are mean ± SD

* P < 0.05

図6 (赤: HP100群、青: HP100+EPO群)

低酸素曝露30分前のEPO投与は100%酸素曝露時の学習機能を改善した。

-2

EUK-134(20mg/kg)の投与が8方向迷路学習に及ぼす影響

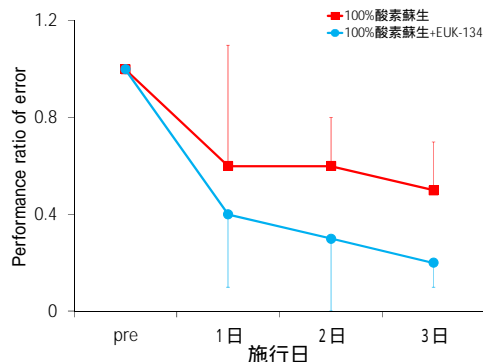


図7 (赤: HP100群、青: HP100+EUK群)

低酸素曝露24時間、30前のEUK134投与は100%酸素曝露時の学習機能を改善した。

まとめ

- 100%酸素または空気曝露9時間後に脳を取り出し、脳由来神経栄養因子(BDNF)mRNA、エリスロポイエチン(EPO)mRNA、脳アポトーシスの指標であるcaspase-3 mRNA発現をreal time PCRで測定した。HP100群では有意に、caspase-3 mRNA発現が上昇したが、BDNF mRNAには有意差はなかった。一方、EPO mRNAは有意に低下していた。さらに7週間後の8方向迷路学習では、学習機能の低下がみられた。
- 8%低酸素後の100%酸素蘇生障害は、EPO(5000単位/kg)およびEUK-134(10mg/kg)の前投与で、8方向迷路による学習機能障害は軽減した。

以上より、8%低酸素後の100%酸素による蘇生は、内因性エリスロポイエチンの反応性増加を抑制し、脳アポトーシスによる脳障害を修復できず、その後の学習機能障害を引き起こしたと推測された。さらに、その後の学習機能障害はエリスロポイエチンの補充および活性酸素阻害剤により軽減できた。本結果は、新生児低酸素症時の100%酸素蘇生による脳神経発達障害機序の解明に役立つも

のと考えられる。

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 2 件)

植木 正明, 森下 淳, 牛尾 将洋, 前川 信博. エリスロポイエチンは出生時低酸素症に対する 100%酸素蘇生後の脳神経発達障害を改善する. 日本麻酔科学会第 61 回学術総会. 2014.5.16

植木正明. 発達期の脳に対する麻酔薬の影響. 日本麻酔科学会第 61 回学術総会. 2014.5.15

〔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:

出願年月日:

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

植木 正明 (UEKI MASAOKI)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号: 20213332