

令和元年6月5日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10935

研究課題名(和文)成人低酸素症に対する100%酸素蘇生による臓器障害発生機序とその治療戦略の確立

研究課題名(英文) Mechanism of organ damage caused by 100% oxygen reoxygenation after adult hypoxia and establishment of its treatment strategy

研究代表者

植木 正明 (Ueki, Masaaki)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20213332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：成人マウスによる30分間の8%低酸素後30分間の100%酸素(H100群)は空気(H21群)に比べて、脳では空気に比べて、100%酸素による再酸素化は炎症性サイトカインであるTNF α 、IL-1 β mRNA発現を増加させたが、腎臓、肝臓では空気による再酸素化後の増加と差はなかった。しかし、空気による再酸素化は100%酸素に比べて、肝臓(AST,ALT高値)、腎臓障害(BUN,Cr高値)を軽減させた。これは脳でより顕著に、100%酸素による再酸素化が炎症性サイトカイン増加の関与が強いが、肝、腎臓組織では、再酸素化による臓器障害は炎症性サイトカイン以外の障害機序を推測させるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低酸素後の再酸素化では100%酸素によって、脳では炎症性サイトカインを介して、肝、腎臓組織ではそれ以外の機序で、臓器障害を引き起こしている。その障害抑制には空気での再酸素化が有効であることを示した。低酸素後の100%酸素蘇生による重要臓器障害機序の解明に役立つものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Adult mice were either subjected to hypoxia in 8% oxygen for 30 min or served as controls. Following hypoxia, mice underwent reoxygenation for 30 min with 21% or 100% oxygen. Reoxygenation with 100% oxygen significantly increased inflammatory cytokines in the brain but not in the kidney and liver compared with 21% oxygen 9 hours after reoxygenation. It also caused renal and liver dysfunction 24 hours after reoxygenation. These results suggest that the reoxygenation with 100% oxygen after hypoxia has harmful effects on adult brain, kidney and liver as well as neonatal brain and reoxygenation with air is effective in organ damage caused by hypoxia.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：低酸素・再酸素化 100%酸素 炎症性サイトカイン 臓器障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 2004年のDavidらによる新生児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%酸素と空気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かったという報告後、2010年の国際蘇生連絡協議会のガイドラインでは、新生児低酸素症に対して100%酸素より、空気での蘇生を推奨している。しかし、現時点で、成人の低酸素症の蘇生時の酸素濃度は推奨されていない。申請者は平成26年度から基盤研究(C)の分担研究、「成人低酸素症に対する100%酸素蘇生による脳神経発達障害に及ぼす影響とその治療法の確立」で、低酸素(8%酸素30分)後の蘇生時、100%酸素が空気に比較して、脳で過剰なアポトーシスを誘発し、脳障害を引き起こしていることを発見した。

(2) 脳障害発症機序として、2015年のRognlienらは、生後7日目のマウスの8%酸素2時間後に、60%酸素と空気を比較して、60%酸素がtumor necrosis factor alpha(TNF)、interleukin-6(IL-6)の炎症サイトカインが過剰産生され、蘇生後脳症を引き起こすこと報告した。

成人の低酸素症時の100%酸素蘇生後の脳を含めた主要臓器でTNF、IL-6などの炎症サイトカイン産生が増加し、臓器障害を引き起こすと推測した。炎症による臓器障害が原因であれば、炎症を軽減する治療戦略が臨床応用できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、仮説通りに、成人の低酸素症時に100%酸素蘇生が過剰な炎症性サイトカイン産生を引き起こし、脳、肝臓、腎臓の臓器障害を引き起こす、という臓器障害機序が証明されれば、その治療法へと展開するための基盤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：8週令の雄のC57BLマウス

実験群：低酸素ボックスで30分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。

8%低酸素曝露：下図のような特製ボックスに生後8週令のマウスを入れ、空気・窒素で混合して、8%酸素状態を作製し、30分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。



実験1 低酸素症時の100%酸素による再酸素化後が脳に及ぼす影響

成人の低酸素症時の100%酸素による再酸素化の脳機能に及ぼす影響を検討した。

マウスに8%酸素30分曝露後、30分間の100%酸素及び空気で蘇生を行い、9時間後の脳炎症性サイトカイン、アポトーシスの指標のcaspase-3、脳エリスロポイチン(EPO)、脳由来神経栄養因子(BDNF)などをreal time PCRで検討した。さらに24時間後のヘマトキシリン・エチレン染色による脳組織病理を検討した。

実験2 低酸素症時の100%酸素による再酸素化が腎臓に及ぼす影響

成人の低酸素症時の100%酸素による再酸素化後の腎機能に及ぼす影響を検討した。

実験には生後8週例雄のマウスを使用し、自家製の低酸素ボックスでマウスを8%酸素30分曝露後、30分間の100%酸素(HP100群)及び空気(HP21群)に分けて蘇生を行った。対象は8%酸素の代わりに空気で暴露した(CT群)。再酸素化9時間後の腎臓の炎症性サイトカイン、アポトーシスの指標のcaspase-3などをreal time PCRで検討した。さらに24時間後の血清BUN, Crおよびヘマトキシン・エチレン染色による腎組織病理を検討した。

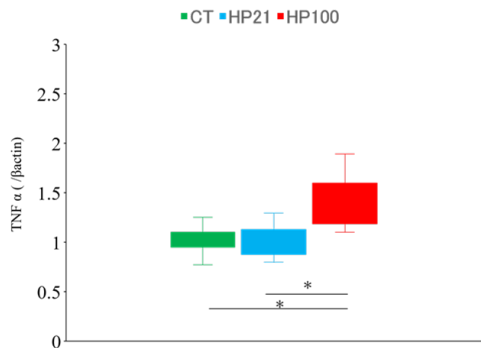
実験3 低酸素症時の100%酸素による再酸素化が肝臓に及ぼす影響

実験には生後8週例雄のマウスを使用し、自家製の低酸素ボックスでマウスを8%酸素30分曝露後、30分間の100%酸素(HP100群)及び空気(HP21群)に分けて蘇生を行った。対象は8%酸素の代わりに空気で暴露した(CT群)。再酸素化9時間後の肝臓の炎症性サイトカイン、さらに炎症関連転写因子であるNuclear factor kappa B1(NFkB1)などをreal time PCRで検討した。さらに24時間後の血清AST, ALT、およびヘマトキシン・エチレン染色による脳組織病理を検討した。

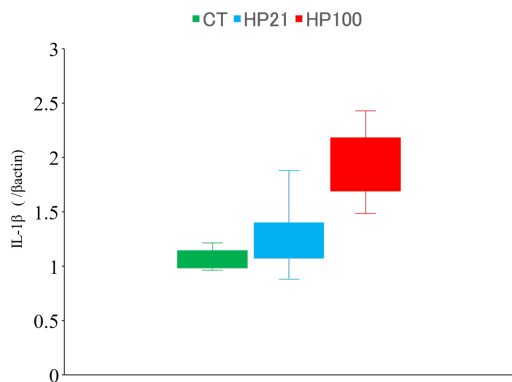
4. 研究成果

実験1

- ・脳TNF mRNAはHP100群で有意に上昇

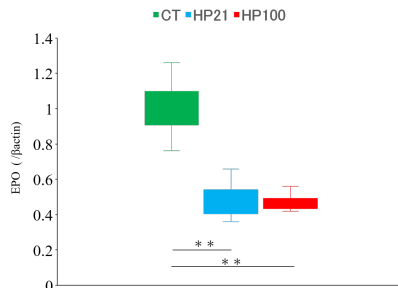
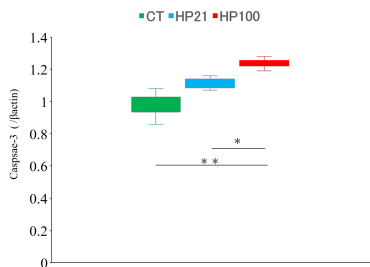


- ・脳IL-1 mRNAはHP100群で有意に上昇



・脳 Caspase-3mRNA は HP100 群で有意に上昇

脳 EPO-3mRNA は HP100 群で有意に低下

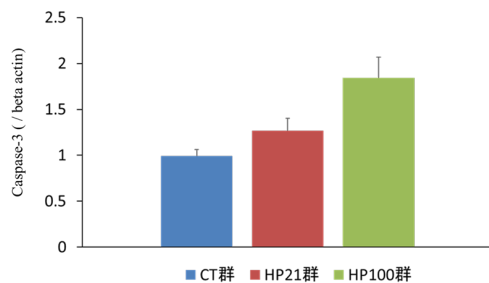


・脳組織には差はなかった

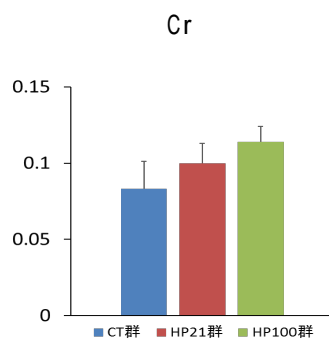
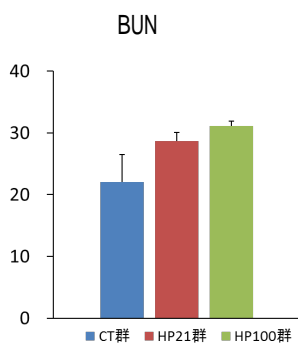
実験 2

・腎 TNF , IL-1 mRNA に HP100 群、HP21 群では差はなかった

・腎 Caspase-3mRNA は HP100 群で有意に上昇



・血清 BUN、Cr は HP100 群で増加



・腎 NFkB1mRNA には差がなかった

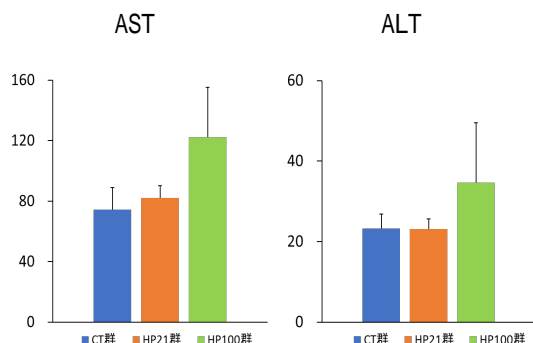
・腎組織には差はなかった

実験 3

・肝 TNF , IL-1 mRNA に HP100 群、HP21 群では差はなかった

・肝 NFkB1mRNA は HP100 群で CT 群、HP21 群に比べて増加

・ AST,ALT は HP100 群で CT 群、HP21 群に比べて増加



・ 肝組織には差はなかった

まとめ

実験1. 9時間後のHP100群ではHP21群およびCT群に比べて、有意に、脳TNF mRNA、IL-1 mRNA、caspase-3 mRNA 発現が増加したが、BDNF mRNA はCT群に比べてHP21群ともに、低下していた。一方、低酸素刺激で誘導されるEPO mRNA は、HP21群はCT群に比べて産生が誘導されていたが、HP100群は誘導が抑制されていた。

実験2. 9時間後の炎症サイトカインのtumor necrotic factor (TNF) mRNA 発現はHP100群とHP21群では、CT群に比べて、増加するが、両群間で差はなかった。また、interleukin (IL)-1 mRNA 発現はHP100群でCT群に比べて、有意に増加していたが、HP21群とは差がなかった。さらに腎caspase-3 mRNA 発現は、HP100群とHP21群では、CT群に比べて、増加し、さらにHP100群はHP21群に比べて、有意に増加していた。血清BUN、Cr値はHP100群とHP21群では、CT群に比べて、増加し、さらにHP100群はHP21群に比べて、有意に増加し、腎機能障害を呈していた。

実験3. 9時間後の肝臓での各種 mRNA レベルを検討した。炎症サイトカインであるtumor necrotic factor (TNF) mRNA 発現はHP100群とHP21群では、CT群に比べて、増加するが、両群間で差はなかった。また、interleukin (IL)-1 mRNA 発現はHP100群でCT群に比べて、有意に増加していたが、HP21群とは差がなかった。さらに炎症関連転写因子であるNuclear factor kappa-light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (NFkB1)mRNA 発現は、HP100群とHP21群では、CT群に比べて、増加し、さらにHP100群はHP21群に比べて、有意に増加していた。血清AST、ALT値はHP100群とHP21群では、CT群に比べて、増加し、さらにHP100群はHP21群に比べて、有意に増加し、肝機能障害を呈していた。

以上より、脳では空気に比べて、100%酸素による再酸素化は炎症性サイトカインであるTNF、IL-1 mRNA 発現を増加させたが、腎臓、肝臓では空気による再酸素化後の増加と差はなかった。しかし、空気による再酸素化は100%酸素に比べて、肝臓、腎臓障害を軽減させた。これは脳でより顕著に、100%酸素による再酸素化が炎症性サイトカイン増加の関与が強いが、肝、腎臓組織では、再酸素化による臓器障害は炎症性サイトカイン以外の障害機序を推測させるものである。本結果は、成人の低酸素症の臓器障害抑制には空気での再酸素化が有効でことが示され、低酸素後の100%酸素蘇生による重要臓器障害機序の解明に役立つものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshiro Nishimura, Masaaki Ueki, Masaki Imanishi, Shuhei Tomita, Masaki Ueno, Jun Morishita, Takashi Nishiyama, Reoxygenation with 100% oxygen following hypoxia in mice causes apoptosis, Shock, 査読あり, 48,2017,590-594

〔学会発表〕(計 3 件)

植木正明、成年マウスの低酸素症後の 100%酸素による再酸素化は肝障害を引き起こす、日本麻酔科学会第 65 回学術総会、2018.5.18

植木正明、森下 淳、成人マウスの低酸素症に対する 100%酸素蘇生は腎障害を引き起こす、日本麻酔科学会第 64 回学術総会、2017.6.8

植木正明、鷲尾輝明、外間之貴、前川信博、成人マウス低酸素症に対する 100%酸素蘇生は脳障害を引き起こす、日本麻酔科学会第 63 回学術総会、2016.5.26

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：富田 修平

ローマ字氏名：Tomita Shuhei

所属研究機関名：大阪市立大大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：00263898

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。