

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11568

研究課題名(和文)心停止後症候群モデルにおけるケミカルシャペロンの効果

研究課題名(英文)The effect of chemical chaperones in the post-cardiac arrest syndrome model

研究代表者

岡島 正樹 (Okajima, Masaki)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：00361999

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)：心停止後症候群は虚血再灌流障害が病態の一つとされる。それには小胞体ストレス応答が大きく関与し、ケミカルシャペロンが有効である。シャペロンである4-PBAが心停止後脳障害および心筋障害を軽減するか否かを、ラット窒息モデルにおいて検討する予定であった。人工呼吸器を停止し、心肺停止を確認後、心肺蘇生術を開始し、3分以内に自己心拍再開したマウスを用いた。生存するマウスの確保とその質を維持するため、胸骨圧迫の手技はモデルの均一性を保つことが重要であり、そのために安定した心肺停止蘇生モデルを作成することを試行した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心肺蘇生の普及などにより、心肺停止患者の生存率や社会復帰率は増加傾向にあるが、いまだ十分とは言えない。その原因は心停止後症候群にあり、なかでも心停止後脳障害、心停止後心筋障害が生命予後および神経学的予後を左右する病態である。この虚血再灌流障害を本態とする心停止後症候群には小胞体ストレス応答が大きく関与しており、これをケミカルシャペロンにてコントロールすれば、心停止後脳障害や心筋障害が軽減し、大きな社会貢献につながる。

研究成果の概要(英文)：Post-cardiac arrest syndrome is considered to be one of the pathologies caused by ischemia-reperfusion injury. Endoplasmic reticulum stress response plays a significant role in this condition, and chemical chaperones have shown effectiveness. The plan was to investigate whether the chaperone 4-PBA could alleviate brain and myocardial injury in a rat asphyxiation model. The study utilized mice that achieved spontaneous cardiac recovery within 3 minutes after confirming cardiac arrest by discontinuing artificial respiration and initiating cardiopulmonary resuscitation. To ensure the survival and quality of the mice, it was crucial to maintain consistency in the chest compression technique, and therefore attempts were made to establish a stable cardiopulmonary arrest and resuscitation model.

研究分野：救急医学

キーワード：心肺停止 ケミカルシャペロン 小胞体ストレス応答 フェニル酪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心肺蘇生の普及などにより、心肺停止患者の生存率や社会復帰率は増加傾向にあるが、いまだ十分とは言えない。その原因は心停止後症候群にあり、なかでも心停止後脳障害、心停止後心筋障害が生命予後および神経学的予後を左右する病態である。この虚血再灌流障害を本態とする心停止後症候群には小胞体ストレス応答が大きく関与しており、これをケミカルシャペロンにてコントロールすれば、心停止後脳障害や心筋障害が軽減し、大きな社会貢献につながるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

非心原性および心原性心肺停止モデルにおいて、4-PBA が心停止後脳障害および心筋障害を軽減するか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1) 平成 29 年度：ラット非心原性心肺停止モデルにおいて、4-PBA が蘇生後の脳および心臓の障害を軽減するか否かを検討することを目的とする。具体的には、窒息による心肺停止蘇生後の急性期に 4-PBA を投与し、神経および心機能の改善の有無の検討、脳および心臓の器質的傷害の組織学的検討(梗塞やアポトーシス)の検討を行う。また、ラット非心原性心肺停止モデルにおけるケミカルシャペロンの効果およびメカニズムを解明する。窒息による心肺停止蘇生モデルにケミカルシャペロンである 4-PBA を投与し、下記に記すごとく、運動機能評価や超音波検査による心機能評価、TTC 染色による脳や心筋障害の程度や、TUNEL 染色による神経および心筋細胞アポトーシスの程度の評価を行う。

(2) 平成 30 年度：ラット心原性心肺停止モデルにおいて、4-PBA が蘇生後の脳および心臓の障害を軽減するか否かを検討することを目的とする。具体的には、心室細動による心肺停止蘇生後の急性期に 4-PBA を投与し、神経および心機能の改善の有無の検討、脳および心臓の器質的傷害の組織学的検討(梗塞やアポトーシス)を行う。また各モデルにおける脳および心臓での小胞体ストレスマーカーの検討を行う。

(3) 平成 31 年度以降

主に、ラット非心原性心肺停止モデルおよびラット心原性心肺停止モデルにおけるケミカルシャペロンの作用メカニズムを解明する。具体的には、窒息および心室細動による心肺停止蘇生モデルにケミカルシャペロンである 4-PBA を投与し、脳および心臓組織において、小胞体ストレスマーカーをタンパクレベルで評価する。

<モデル作成方法ならびに評価方法>

非心原性心肺停止蘇生モデルの作成

対象は Wistar ラット(13~15 週、オス)。麻酔後(ペントバルビタール 30mg/kg 腹腔内投与) 現有する人工呼吸器管理とする。血行動態評価および下記サイトカイン測定目的の採血のため大腿動脈にカニューレクションする。約 9 分間人工呼吸器を停止し、心肺停止を確認する。その後、CPR を開始する。

具体的には、100%酸素濃度で人工呼吸器を再開し、30 秒後から 200/分の頻度で胸骨圧迫を開始、バソプレッシン 0.4U/kg を投与する。3 分以内に自己心拍再開したマウスを用い、3 分以上経過しても自己心拍再開しなかったマウスは除外する。平均血圧<20mmHg および平均血圧>40mmHg を自己心拍再開までの時間とする。その後すべてのカテーテルを抜去し、覚醒させ人工呼吸器を離脱する。胸骨圧迫の手技はモデルの均一性を保つために重要であり、胸骨圧迫施行者を単一とすることとし、安定した心肺停止蘇生モデルを作成することを目標とする。

ケミカルシャペロンとしての 4-PBA, Calbiochem, Billerica, MA)

4-PBA および同量の Phosphate-buffered saline (PBS) は、自己心拍再開後に腹腔内投与する。4-PBA は欧米では臨床使用されているが、副作用はほとんどない薬剤である。我々の行った心筋虚血再灌流モデルにおける 4-PBA の検討およびこれまでの脳虚血における 4-PBA の効果を検討した報告から、100mg/kg の腹腔内投与量を選択、投与する。

神経障害の程度の評価

神経障害の評価は、運動機能および組織学的に行う。運動機能評価は、モデル作成後、1、2 お

よび3日目にこれまで報告されてきた方法でスコア化し評価する。具体的には、0, 神経障害なし(正常) 1, 尾を持って体を釣り上げた際、前足を伸ばせない(軽度) 2, 正常な歩行ができない(中等度) 3, 自発運動がない(重症)として評価する。さらに組織学的評価は、モデル作成後3日目(運動機能評価後)に脳を取り出し、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)染色し、組織学的に梗塞範囲および浮腫の程度を評価する。

心筋障害の程度の評価

心筋障害の評価は、超音波検査および組織学的に行う。超音波検査は、モデル作成後、1、2および3日目に行い、心収縮能を評価する。超音波検査施行者は、ラットのエコーに精通した者とし、blind label法で行う。組織学的評価は、モデル作成後3日目に心臓を取り出し、TTC染色し、組織学的に梗塞範囲の程度を評価する。

アポトーシスの評価

モデル作成後3日目に脳および心臓を取り出し、OCTコンパウンドを用いて凍結保存し、TUNEL染色にてapoptotic cellの割合をPBS投与群と4-PBA投与群で比較する。

心原性心肺停止蘇生モデルの作成

基本的には、上記の非心原性心肺停止蘇生モデルと同様である。唯一異なるは、食道から高頻度刺激により心室細動を誘発し、心肺停止モデルを作成する。

小胞体ストレスマーカーの評価

我々が報告した心筋虚血再灌流モデルにおける4-PBAの効果の結果から、窒息および心室細動による心肺停止蘇生モデル作成後2時間で脳および心臓を取り出し、小胞体ストレスマーカーであるGRP78、eIF2、P-eIF2、ATF6、IRE1、Phosphorylated IRE1、Caspase-12、Growth arrest-and DNA damage inducible gene 153のタンパク量をWestern blot法で測定し、4-PBA投与群とPBS投与群で比較する。

4. 研究成果

心停止後症候群は虚血再灌流障害が病態の一つとされる。それには小胞体ストレス応答が大きく関与し、ケミカルシャペロンが有効である。シャペロンである4-PBAが心停止後脳障害および心筋障害を軽減するか否かを、ラット窒息モデルにおいて検討する予定であった。人工呼吸器を停止し、心肺停止を確認後、心肺蘇生術を開始し、3分以内に自己心拍再開したマウスを用いた。生存するマウスの確保とその質を維持するため、胸骨圧迫の手技はモデルの均一性を保つことが重要であり、そのために安定した心肺停止蘇生モデルを作成することを試行した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷口 巧 (Taniguchi Takumi) (30301196)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関