

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18299

研究課題名（和文）インビボ神経活動イメージングを用いた蘇生後脳症における鎮静薬の脳保護効果の検討

研究課題名（英文）Neuroprotective effects of sedative drugs in post-resuscitation encephalopathy using in vivo neuroactivity imaging

研究代表者

中原 真由美（Nakahara, Mayumi）

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：90707514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：心肺停止により低酸素状態に陥ると、自己心拍再開後に生じる臓器障害により、予後は依然厳しい。心肺停止モデルマウスを用いて鎮静薬の蘇生後脳症への影響を検討することを目的とした。まず、評価方法を検討するために術後痛モデルマウスを使用し、恐怖記憶想起試験を行った。麻酔+手術群では、術後1週間後にコントロール群と比較してすくみ行動が低下し、記憶想起が障害される傾向を認めた。また、免疫染色による検討では、麻酔+手術群において扁桃体にて神経活動マーカーとして汎用されるArc陽性細胞の増加を認め、神経の過活動を生じていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心停止後に自己心拍が再開しても(1)脳損傷、(2)心筋障害、(3)全身性虚血再灌流障害、(4)残存する心停止の原病で構成される心停止後症候群により予後は依然厳しい。術後痛モデルマウスを用いた検討では、手術によって記憶の固定や想起が障害され、扁桃体の神経活動が活性化された。蘇生後脳症においても手術と同様に全身性の炎症反応が引き起こされると報告されており、その機序に扁桃体が関わっている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：When cardiopulmonary arrest results in hypoxia, the prognosis is severe due to organ damage that occurs after the return of spontaneous circulation. The purpose of this study was to investigate the effects of sedatives on post-resuscitation encephalopathy using cardiopulmonary arrest mice model. First, a fear conditioning test was performed using a post-operative pain model mouse to examine the evaluation method. We observed a freezing tendency and impaired memory retrieval in the anesthesia and surgery group, compared with the control group, one week after surgery. In addition, after immunostaining examination, an increase in Arc positive cells, which is a widely used nerve activity marker, was observed in the amygdala, and nerve activity was generated in the anesthesia and surgery group.

研究分野：集中治療、麻酔

キーワード：蘇生後脳症 炎症 神経活動イメージング

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心肺停止により低酸素状態に陥ると、自己心拍再開 (return of spontaneous circulation: ROSC) 後に生じる、脳障害、心筋障害、全身性の虚血再還流障害による臓器障害などにより、良好に社会復帰できる症例は少ない。特に蘇生後 30 日の脳障害は 10% の心肺停止患者に残存する (*N Engl J Med* 376:1737-1747, 2017)。心停止後症候群(PCAS)の病態は、(1)脳損傷、(2)心筋障害、(3)全身性虚血再灌流障害、(4)残存する心停止の原病で構成される (*Resuscitation* 79:350-379, 2008)。日本蘇生協議会 (Japan Resuscitation Council, JRC) ではガイドラインを作成し、ROSC 後の低体温療法や循環管理 (early goal-directed therapy)、血糖管理、呼吸管理などの包括的管理を推奨している (JRC 蘇生ガイドライン, 2015)。蘇生後の患者の治療として、気管挿管による人工呼吸管理や低体温療法が施行されるが、気管挿管の苦痛緩和や体温管理療法中のシバリングを予防・治療するために鎮静薬を投与される。心臓血管外科術後の集中治療室における鎮静で、デクスメデトミジンとその他の鎮静薬を比較したメタアナリシスでは、デクスメデトミジンは人工呼吸管理期間を短縮し、術後せん妄の頻度を低下させる (*Crit Care* 16:R169, 2012)。デクスメデトミジンは、鎮静・鎮痛作用のほか、炎症反応抑制、せん妄の予防など長期予後の改善効果が報告されており、近年注目されている鎮静薬である (*Lancet* 388:1893-1902, 2016; *Am J Respir Crit Care Med* 197:1147-1156, 2018)。また、デクスメデトミジンを含む  $\alpha_2$  受容体アゴニストは、N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) 受容体作働薬によって誘発される低酸素性虚血脳障害を軽減すると報告されている (*Anesthesiology* 96:134-141, 2002)。デクスメデトミジンは敗血症動物モデルにおいて筋肉の消耗と視床下部の炎症を抑制することも報告され (*PLoS ONE* 12(3): e0174894, 2017)、脳保護効果が期待されている。LPS による全身性炎症反応症候群の動物モデルにミダゾラムあるいはデクスメデトミジンを投与し、サイトカインの発現や物体認識試験にて認知障害の検討を行った報告では、デクスメデトミジンにて海馬の神経炎症と認知機能障害が抑制され、その機序として  $\alpha_2$  受容体のシグナル経路が関係していた (*J Anesth* 1:25-35, 2017)。

### 2. 研究の目的

蘇生後脳症においてもデクスメデトミジンが炎症反応抑制効果や脳保護効果により蘇生後脳症の予後に影響を与えるのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するため本研究では、マウスを用いて蘇生後脳症の予後において最も重要な認知機能を司る前頭前野—海馬の神経活動変化をリアルタイムで解析し、デクスメデトミジンの蘇生後の認知機能への影響を明らかにし、その脳保護効果を調べることを目的とする。

蘇生後脳症における予後評価は、臨床所見、CT や MRI などの画像所見、脳波、motor evoked potential (MEP)、somato-sensory evoked potential (SEP)、auditory evoked potential (AEP)、auditory brainstem response (ABR)、visual evoked potential (VEP) などの神経生理学的所見、NSE、S-100 $\beta$ 、クレアチンキナーゼ (CK)、髄液乳酸値などのバイオマーカーが検討されているが、直接予後との因果関係が確立された指標はない。本研究の目的は、既存の脳モニターでは検証できない (1) 心肺停止蘇生後の神経活動変化を、認知を司る神経回路である前頭前野—海馬において最新の *in vivo* 神経活動イメージング法によってリアルタイムに可視化すること、(2) 同じ動物を用いて記憶課題等の行動実験を行い、蘇生後の認知障害と麻酔薬との関係を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスの心肺停止モデル実験方法

塩酸メデトミジン (0.3 mg/kg) ・ ミダゾラム (4 mg/kg) ・ 酒石酸プロプラノール (5 mg/kg) の 3 種混合薬の腹腔投与による深麻酔下のマウス (C57BL/6, オス, 12-16 週齢) に気管挿管を行い、内頸静脈より静脈ラインを確保した。その後心電図、体温モニターを装着し、マウスの生理学的パラメーターの変化を経時的に観察した。人工呼吸を行い、中心静脈から塩化カリウム (0.05ml, 0.5M) を投与し、心停止を誘発した。8 分間の心停止後、100%酸素による人工呼吸の再開、エピネフリンの投与 (8-16  $\mu$ g)、胸骨圧迫 (300 回/分) を行い蘇生をした。

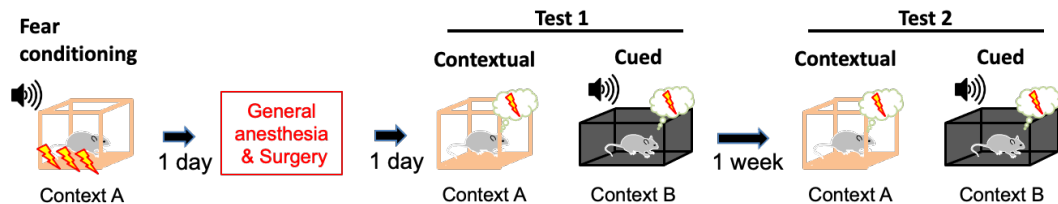
#### (2) マウスの術後痛 (足底切開) モデル実験方法

雄 C57BL/6J マウス (生後 8-12 週齢) を以下の 3 グループに分けた。①コントロール群: ホームケージより出し 1 分間実験箱に入れ、その後ホームケージに戻す、②麻酔群: 2%イソフルラン環境下の実験箱で 1 分間鎮静した後に、頭部を麻酔ソケットに挿入し、2%イソフルランを吸入させ全身麻酔を行う、③麻酔+手術群: 麻酔群と同様に 2%イソフルラン環境下の実験箱で 1 分間鎮静した後に、頭部を麻酔ソケットに挿入し、2%イソフルランを吸入させ全身麻酔を行い、マウス足底に 5mm 縦切開を加え 8-0 ナイロン糸で縫合し、術後痛モデルを作成した。

#### (3) 行動学的評価

マウスを恐怖記憶想起試験で試験した。恐怖条件付け課題は防音設備のあるコンディショニング室で施行した。施行時のみマウスをコンディショニングチャンバーに配置し、配置後 120s、3 組のトーン (85-dB/7-kHz) フットショック (0.2mA, 2s) の組み合わせで施行した。最後のペアリングの 30 秒後マウスをホームケージに戻した。コンディショニングチャンバーに入れた際の恐

怖応答(文脈依存性恐怖記憶想起試験)の試験日に、マウスをコンディショニングチャンバーに入れ、6分間観察し、“freezing(すくみにより不動状態になること)”を恐怖応答の指標とした。音依存性恐怖想起試験日に、文脈依存性の記憶想起によって引き起こされるfreezingを最小限に抑えるために、コンディショニングチャンバーのものとは異なるコンテキスト(様々な刺激・感覚や経験を複合的に記憶する事)を持つ新しいチャンバーに配置した。freezingは、音をだす前に3分間観察し、その後、音の存在下で3分間観察した。文脈依存性恐怖記憶想起と音依存性恐怖記憶想起は、これらの施行日の1週間後に再び施行しfreezingを画像FZ2ソフトウェア(小原医科産業)で分析した。



#### (4) 免疫染色

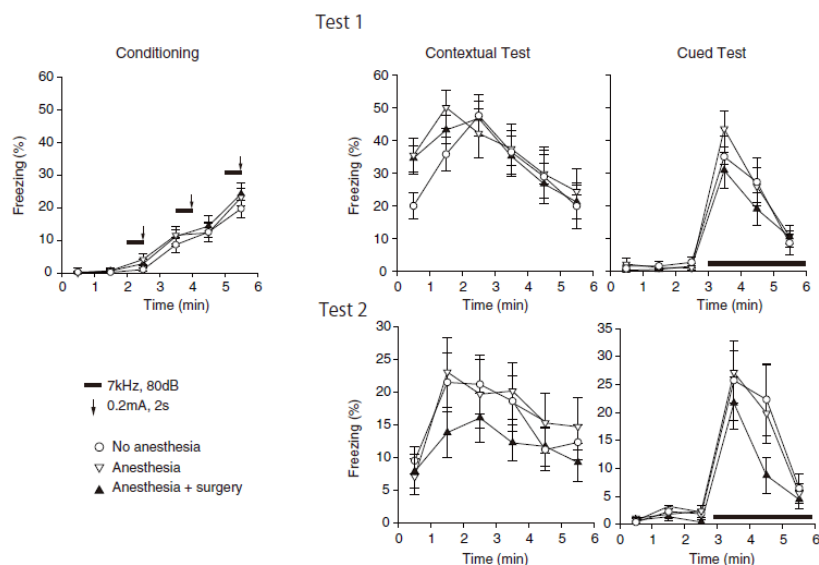
麻酔単独、もしくは手術施行後のマウスに対してイソフルランの過剰吸入による深麻酔下、あるいはペントバルビツールの腹腔過剰投与(100 mg/kg以上)による深麻酔の後、放血により安楽死させたマウスに対してパラホルムアルデヒドによる経心臓灌流固定を行い、その後摘出した脳から組織標本を作製し組織学的解析を行った。これらのマウスは、2.5%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液(pH7.4)を経心腔内に透過させ脳を摘出し、3.0%スクロース溶液で凍結し凍結スタットで切片化した。脳切片は、ウサギの抗 Arc 抗体(Synaptic systems, Arc-156-003, 1:1000)及びマウス抗 Fos 抗体(Santacruz, Sc-271243, 1:500)を加えた。脳切片を洗浄し、Alexa594 抗ウサギ抗体(Invitrogen, 1:500)およびAlexa488 抗マウス抗体(1:500)と反応させた。これらをHoechst33342で染色し、スライドにした上で蛍光画像は顕微鏡(キーエンス BZ-X)を用いて撮影した。

#### 4. 研究成果

マウスの心肺停止モデルの作成では、マウスの蘇生に難渋した。モデル作成後の行動変化、免疫組織学的評価に向けて、マウスの術後痛モデルにて評価を行なった。

##### (1) 認知機能行動評価

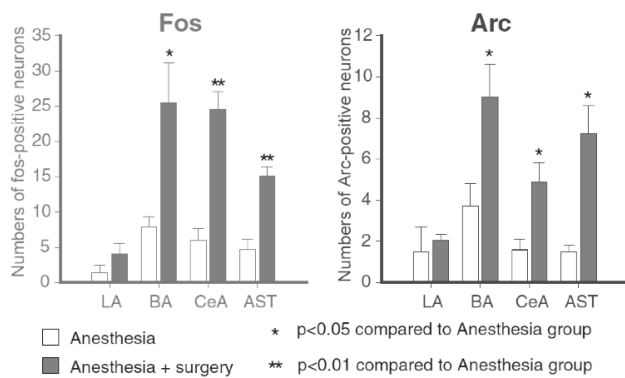
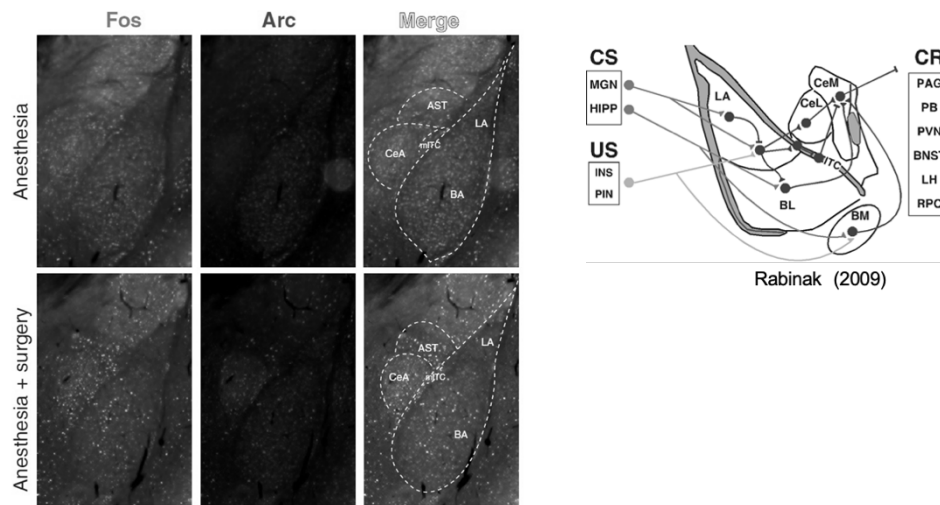
コントロール群(n=17)、麻酔群(n=17)、麻酔+手術群(n=18)に分け、術後の認知機能を恐怖条件付け課題を用いて手術2日、7日、8日後に評価した。麻酔+手術群では、術後7日目、8日目のContext、Cuedテストにおいて、コントロール群と比較してすくみ行動が低下する傾向を認めた。



##### (2) 免疫染色

麻酔や手術による脳内活動変化を調べるため、神経活動マーカーとして汎用される Arc や

*c-fos* の遺伝子産物に対する免疫組織染色を行い解析した。麻酔+手術群では、扁桃体の基底核、外側核および中心核において *Arc* 陽性細胞の明らかな増加を認め、神経活動の活性化が生じる可能性が示唆された。



以上の結果から、手術後には術後認知機能障害を発症することが示唆され、扁桃体はその責任部位の一つである可能性が示された。蘇生後の臓器の虚血再灌流障害では、全身性の炎症反応が引き起こされ、敗血症に類似した全身炎症反応症候群を引き起こすと言われており、術後痛マウスと同様の実験手法にて心肺停止モデルマウスにて検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大江 将軍、 長谷川 麻衣子、向原 桂香、中原 真由美、城山優治、上村 裕一、奥野 浩行
2. 発表標題 Immediate-early gene mapping of neuronal activity related to intraoperative stresses under inhalation anesthesia
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中原真由美、向原桂香、大江将軍、城山優治、奥野浩行、上村裕一
2. 発表標題 術後認知機能障害に關与する大脳神経回路同定の試み
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城山優治、中原真由美、大江将軍、坂口茜、上村裕一、奥野浩行
2. 発表標題 マウスにおける全身麻酔下手術による扁桃体の神経活動亢進と記憶障害
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大江将軍、長谷川麻衣子、向原桂香、中原真由美、城山優治、奥野浩行、森山孝宏、上村裕一
2. 発表標題 術後認知機能障害(POCD) マウスモデルの開発と術後認知機能障害関連脳領域の同定
3. 学会等名 第62回日本麻酔科学会
4. 発表年 2021年

〔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
研究協力者	奥野 浩行  (Okuno Hiroyuki)		
研究協力者	長谷川 麻衣子  (Hasegawa Maiko)		
研究協力者	垣花 泰之  (Kakihana Yasuyuki)		

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
---------	---------