

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591808

研究課題名(和文) 脳低体温療法施行時の患者重症度に関する研究
—電子スピン共鳴法を用いた検討—研究課題名(英文) Assessing the severity of patients in therapeutic
hypothermia for brain -ESR study-

研究代表者

新宮 千尋 (SHINGU CHIHIRO)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：30295191

研究成果の概要(和文)：我々は、特に虚血再灌流障害の際、脳細胞傷害の主因であるフリーラジカルに着目し、その消去作用を持つ抗酸化物質を用いた脳保護効果を発見し、さらに、電子スピン共鳴(ESR)装置を用いて、フリーラジカルの動態を検討した。また、脳傷害時や、人工心肺を用いる心臓手術において、脳保護効果を期待し、現在広く行われている低体温療法の動物モデルを構築した。このモデルの確立は、今後、低体温療法の検討において、不可欠であり、各種臓器保護効果を検討するための一助となるだろう。

研究成果の概要(英文)：We focused on the free radicals which play an important role in brain cell damage especially in ischemia-reperfusion injury, and demonstrated that some antioxidants which can scavenge the free radicals had neuroprotective efficacy. In addition, we tried to observe the free radical dynamics with ESR device. On the other hand, therapeutic hypothermia is one of the worldwide medical treatments for protecting brain tissues in brain injury and cardiac surgery with heart-lung machine. We established the animal model of the hypothermia, which can be helpful for study using therapeutic hypothermia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：全脳虚血、フリーラジカル、電子スピン共鳴

1. 研究開始当初の背景

虚血再灌流による脳障害は、救命、蘇生領域だけでなく、心血管系手術・脳外

科手術などに伴う重大な合併症であり、患者の生命予後や、QOLを大きく左右する。治療指針として、虚血再灌流における組織的障害を抑え、高次機能を回復さ

せるための脳保護戦略が重要であり、現在、各種薬剤投与や脳低体温療法が用いられている。また、脳の各パラメータのモニタリングを通して、経時的に脳の状態や治療効果を判定しているが、我々は、既存のモニタリングに加え、新たなる治療指針の指標として、体内のフリーラジカルの動態が治療指針の一つにならないかと考えている。

2. 研究の目的

本研究では、脳虚血再灌流に伴う、各種臓器、血中のフリーラジカルの動態を測定し、その経時的変化を定量的に分析し、脳低体温療法をはじめ、各種脳保護治療の効果検討とフリーラジカルの動態をもとにした患者重症度指針の構築を目的とした。そのために、先立って、脳虚血再灌流モデルや低体温療法モデルの確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成

①心肺停止蘇生モデル

脳に障害を残す脳虚血再灌流モデルの作成が、本研究では不可欠である。そこで、Wistar 系雄性ラットを用い、全身麻酔下、経口気管挿管し、筋弛緩薬投与により呼吸停止、心停止させることで全脳虚血とし、蘇生率を約 50%、組織学的、神経学的損傷をきたすコントロールモデルの確立を目指した。

②脱血・返血モデル

全身麻酔下、ラット大腿動脈にカニューレーションし、動脈圧波形のモニタリングを行う。カテーテルから脱血し、収縮期血圧が 20-30 mmHg の低灌流を行い、その時間を様々に変更し、脳に与える組織学的、神経学的影響を検討する。

(2) 低体温の影響

低体温療法の確立については、水冷循環式冷却装置を改良し、全身麻酔、人工呼吸下のラットに対して、速やかな冷却と目標温度の安定した維持が可能となった。そして、低体温そのものの影響について検討するため、ラットの血行動態の変化、深部体温の変化、どの程度低体温に耐えうるか、自発呼吸出現までの時間、復温のタイミング等、実際のモデルで施行する場合に必要な基礎データ

収集を行った。

(3) 抗酸化物質の心肺蘇生モデルへの応用

脳保護薬として市販されているエダラボンや各種抗酸化物質（ビタミン E 誘導体、 α リポ酸誘導体など）を投与して、低体温療法との効果の違いを検討する。

(4) フリーラジカルの動態

脳のスライスモデルを用い、各種フリーラジカルの検出を ESR（電子スピン共鳴）装置や各種酸化ストレス検出キットを用いて試み、虚血再灌流にともなう、酸化ストレスの経時的評価を行う。また、低体温療法や、脳保護作用を持つとされる薬剤との臓器保護効果を比較検討する。具体的には、組織中、血清中のフリーラジカルを、ESR 装置を用いて測定し、各療法の比較検討を行う。

フリーラジカルの測定：スピントラッピング法を用いそのアダクトを ESR 装置で計測する手法で各種ラジカルを定量化する。サンプルは、血清や脳のスライスを始め、各種臓器の組織を用い、ラジカル（スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカル、NO、アスコルビン酸ラジカル等）の動態を計測する。

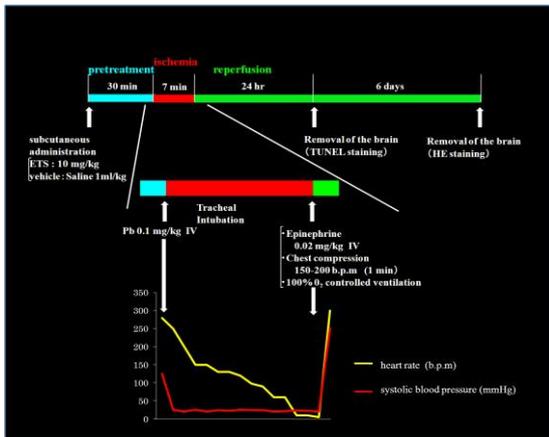
また、酸化ストレス評価キットを用いて酸化ストレスを総合的に検討する。蘇生効果、生存率、採血サンプルで測定したサイトカイン、AST、ALT の経時的な変化との関連を分析し、予後判定の指標となりうるかを検討する。さらに、蘇生、低灌流を行った、一週間後に行動解析 (Warter maze test) を行い、より多角的な神経学的評価を行う。

4. 研究成果

(1) 動物モデルの確立

①心肺停止蘇生モデル

様々な試行を重ね、呼吸停止から 7 分後、人工呼吸器で呼吸再開させ、重炭酸ナトリウム、エピネフリン投与及び心臓マッサージによって蘇生を試みる方法（下図）が最良であるという結論に達した。最終的には、約 60% の蘇生率を達成し、蘇生成功例では、ほぼ全例 1 週間生存できることを確認した。また、蘇生後 1 週間生存ラットの脳摘出標本において、CA1 領域の細胞脱落を認めたことから、この蘇生モデルを使った研究で、CA1 領域の組織学的変化が、治療効果の評価として利用できることを確認した。



②低灌流モデル

動脈ラインを大腿動脈で確保し、シリンジによる脱血、送血で虚血再灌流モデル作成を試みたが、生存率のばらつきが大きく、心肺停止蘇生モデルの方が安定した障害をきたすことが出来るため、今後の研究は、蘇生モデルを利用する計画とした。

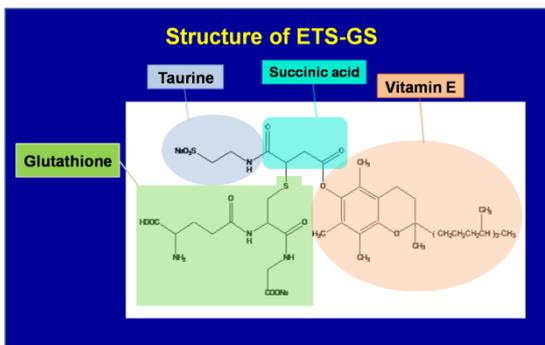
(2) 低体温の影響

当初の低体温療法の目標温度である 34~35℃においては、バイタルサインは安定し、復温後の覚醒もスムーズであり、実際の蘇生モデルに適用できると判断された。以下の方法で、今後実験を進める。

低体温療法 (34~35℃) : 蘇生後から、低体温療法開始までの時間を 30、60、120 分後に分ける。また、低体温療法の継続時間を 12、24、48 時間に分けて実験を行う。復温は 6 時間かけて行う。

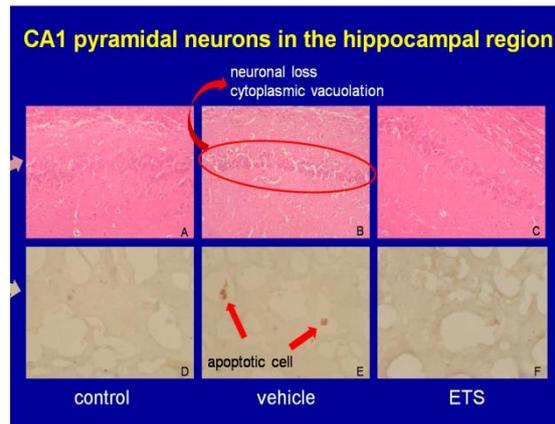
(3) 心肺蘇生モデルでの抗酸化物質の効果

抗酸化作用を有する新規ビタミン E 誘導体 (ETS-GS) で、著明な蘇生効果の向上、CA1 領域の組織障害の軽減、アポトーシス細胞の軽減が認められた。コントロール群と比較して、蘇生後、1 週間の神経学的予後に明らかな違いはみとめられなかったものの、こうした急性期の組織障害を抑制する効果は、再灌



流に伴い急速に産生されるフリーラジカルを含む活性酸素種を当該物質が消去したからではないかと推測している。

	Resuscitation rate and Survival rate	
	vehicle	ETS
Resuscitation rate (%)	54.3 (19/35)	78.3 (18/23)
Survival rate (%) after recovery (24 h or 7days)	100 (19/19)	100 (18/18)



(4) フリーラジカルの動態

脳スライス標本を用いて、ESR (電子スピン共鳴) 装置で、ラジカル検出を試みた。標的ラジカル種として、スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカル、NO 等の虚血再灌流障害で組織障害の主因となるラジカルについて検討した。その結果、コントロール群として、脳摘出標本において、CA1 領域の細胞脱落を認めたものに対しても、ex vivo の検討では、ラジカルスペクトルの変動を見出すことが出来なかった。対策として、スピントラップ剤に DMPO やより検出感度の高い CYPMPPO を用い、濃度や混入のタイミングを変えるなどして検出を試みたが、検出出来なかった。

考察として、瞬時に消失してしまうラジカルを検出するには、ラジカル発生が最大となる超急性期 (再灌流直後) での検討が今後必要ではないかと考えられる。一方、各種抗酸化物質であるビタミン E 誘導体、α リポ酸誘導体、エダラボンでの、本モデルを用いた検討において、組織学的な改善効果を認める結果を得ており、脳保護効果を検討するための有効な研究モデルの確立が出来た。脳スライスモデルを用いた各種ラジカルの検出と神経学的予後との関連は、今回の研究で明確には示されなかったが、こうしたモデルの確立を行った基礎研究結果は、今後、脳蘇生

領域の至上命題である脳高次機能の保護戦略を探る一つの検討手段としての可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Matsumoto S, Shingu C, Koga H, Hidaka S, Goto K, Hagiwara S, Iwasaka H, Noguchi T, Yokoi I. The impact of oxidative stress levels on the clinical effectiveness of sivelestat in treating acute lung injury : an electron spin study. Journal of Trauma 2010; 68: 796-801
- ② Matsumoto S, Shingu C, Koga H, Hagiwara S, Iwasaka H, Noguchi T, Yokoi I. An Electron Spin Resonance Study for Real-time Detection of Ascorbyl Free Radicals After Addition of Dimethyl Sulfoxide in Murine Hippocampus or Plasma During Kainic Acid-Induced Seizures. Neurochem Res. 2010;35(7):1010-6

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新宮 千尋 (SHINGU CHIHIRO)
大分大学・医学部・講師
研究者番号：30295191

(2) 研究分担者

松本 重清 (MATSUMOTO SHIGEKIYO)
大分大学・医学部・講師
研究者番号：90274761

横井 功 (YOKOI ISAO)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：80150366

野口 隆之 (NOGUCHI TAKAYUKI)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：90156183