

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592007

研究課題名（和文）抗酸化物質蘇生開始前投与による良質な心肺脳蘇生の実験的検討

研究課題名（英文）High quality cardiopulmonary-brain resuscitation with antioxidant administration just before starting resuscitation (Animal study)

研究代表者

篠澤 洋太郎 (SHINOZAWA YOTARO)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：30129465

研究成果の概要（和文）：心肺停止蘇生後の Vegetative State 患者群で観察された血液酸化抗酸化動態に類似した脳虚血再灌流動物（ラット）モデルを作製した。このモデルにおいて、再灌流直前のビタミンC 10mg/body、20mg/body 投与により虚血再灌流後の血漿酸化ストレス度上昇の抑制、ビタミンC 20mg/body 投与により血漿抗酸化力の上昇が観察された。

研究成果の概要（英文）：We devised brain ischemia and reperfusion animal (rat) model analogous to blood oxidative and anti-oxidative states observed in Vegetative State patients after cardiac and pulmonary arrest and resuscitation. In this model, Vitamin C 10mg and 20mg/body administrations just before reperfusion suppressed the increase of plasma reactive oxygen metabolites after the reperfusion and Vitamin C 20mg/body administration just before reperfusion increased the plasma biological antioxidant potential.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学、救急蘇生学

キーワード：心肺停止・酸化・抗酸化・虚血再灌流・酸化ストレス度・抗酸化力・蘇生

1. 研究開始当初の背景

われわれは、救命救急センターにおいて、心肺機能停止患者55名（1群：Good Recovery 10名、2群：Vegetative State 8名、3群：入院死亡 13名、4群：外来死亡 24名）の救急搬入時血清にて酸化ストレス度（d-ROMs：

reactive oxygen metabolites）、抗酸化力（BAP：biological antioxidant potential）を測定、他の臨床諸検査値とともに各群間で比較した。2群（Vegetative State）では1群（Good Recovery）に比べ酸化ストレス度の上昇傾向、抗酸化力の低下傾向が認められた。

また、3群、4群（死亡群）では1群に比べ酸化ストレス度の低下傾向と、抗酸化力の有意な上昇が認められた。1群（Good Recovery）と2群（Vegetative State）との間で有意差が認められたのは、酸素供給量の減少（P50の上昇）、微小血栓の形成（D-dimerの増加、線溶亢進）であった。白血球数が1群（Good Recovery）に比べ2群（Vegetative State）で増加傾向であること、3群、4群（死亡群）で有意に減少していることを鑑みると、1群（Good Recovery）に比べての2群（Vegetative State）での酸化ストレス度増加傾向、3群、4群（死亡群）での酸化ストレス度の低下傾向は虚血再灌流とともに炎症細胞の活性化とも関連していることが推察された。2群（Vegetative State）での抗酸化力の低下傾向は内因性抗酸化物質が酸化ストレス度の増加に対し消費されたとも考えられ、死亡群での抗酸化力の有意な上昇は内因性抗酸化物質の消費に対する生体防御反応による内因性抗酸化物質の増加を反映し、その結果として酸化ストレス度が低下したとも考えられた。すなわち、脳傷害は酸素供給量の減少とともに、虚血再灌流、炎症の関わる酸化ストレス度の増加、抗酸化力の相対的不足（増加の遅延）も関係すると考えられた。これらから、より早期に外来的に抗酸化物を投与し、酸化ストレス度増加を阻止することにより脳傷害が軽減されることが推察された。

2. 研究の目的

心肺機能停止患者において心肺蘇生術開始と同時に（あるいは直前）に抗酸化物質を投与することは良質な心肺蘇生（脳保護）に有用であることを動物実験により明らかにする。

3. 研究の方法

12週齢の雄性 Sprague-Dowley (SD) ラット (200~250g 相当) を用い、ネブタール 40 mg/kg、またはイムノペンチル 35 mg/kg を腹腔内投与、全身麻酔下、仰臥位にて、右頸動脈にカニューレーションし、脱血、返血ルートとした。直腸温 (BAT-12, Physitemp Instruments Inc., USA)、尾動脈で脈拍・血圧を測定 (Model MK-2000) するとともに頸動脈カニューレーションにて観血的に血圧を測定 (圧モニター、日本光電) した。血圧安定後、頸動脈よりヘパリン加のシリンジにて脱血。収縮期血圧を 20~30 mmHg に維持、心肺機能停止を想定した脳虚血再灌流モデルとして以下を検討した。

(1) 脳虚血時間、再灌流時間の酸化・抗酸化動態への影響

脱血にて収縮期血圧を 20~30 mmHg に維持、

ラット毎に 10 分、15 分、20 分、30 分後に右頸動脈より脱血血液全量を返血、脈拍・血圧の回復したラットにおいて、ラット毎に 3 分、5 分、10 分、15 分後に再脱血により犠牲せしめた。初回脱血前 (preshock)、返血前 (shock)、再脱血前 (postreperfusion) にヘパリン加シリンジにて 1ml 採血、3000 rpm で 10 分間遠心、血漿を -80°C に冷凍保存、後日、Free Radical Analysis System (FRAS) 4 (WISMERLL Co., Ltd/WISMERLL Institute) にて、酸化ストレス度 (d-ROMs: reactive oxygen metabolites)、抗酸化力 (BAP: biological antioxidant potential) を測定した。

(2) 酸化・抗酸化動態と神経・内分泌メディエーターとの関連についての検討

脳虚血後の脳傷害に炎症反応が関与し、炎症反応は神経系・内分泌系・免疫系の相互トライアングル作用の結果であることより、神経・内分泌メディエーターと酸化・抗酸化動態との関連について検討した。

研究 (1) において再脱血前に酸化抗酸化動態観察のための 1ml を採血した後、右頸動脈カニューレーションより脱血 (ヘパリン採血) にて犠牲せしめた。この脱血血液を 3000rpm で 10 分間遠心後、血漿を -80°C に冷凍保存、後日、コルチゾール (RIA 固相法)、カテコラミン (エピネフリン、ノルエピネフリン、ドーパミン) (HPLC) を測定した (三菱化学メディエンス株式会社)。

(3) 再灌流直前抗酸化物質投与の有用性の検討

研究 (1) の脳虚血再灌流モデルにおいて、脳虚血時間を 10 分として返血、再灌流時間を 5 分とした。返血 (再灌流) 直前に右頸動脈より、現在臨床で使用可能な下記抗酸化物質を投与した。初回脱血前 (preshock)、返血前 (shock)、再脱血前 (postreperfusion) にヘパリン加のシリンジにて 1ml 採血、酸化ストレス度 (d-ROMs)、抗酸化力 (BAP) を測定した。

A 群: 生食水のみ (コントロール群)

B 群: 生食水に加え、RADICUT^R (エダラボン) 0.4 mg、1.2mg、4.0mg、6.0mg

C 群: 生食水に加え、エラスポール^R (シベレスタット Na) 1.5mg、5.0mg、6.0mg、10mg

D 群: 生食水に加え、ビタミン C 5mg、10mg、20 mg

4. 研究成果

ラット 56 匹に頸動脈カニューレーションし

た。脳虚血中に呼吸停止、失調性呼吸、心停止等を発症したラットに対しては、胸骨圧迫にて対処した。返血にても呼吸・循環が回復しなかったラット、再脱血が暗赤色であったラット（合わせて 22 匹）は下記、酸化ストレス度（d-ROMs）、抗酸化力（BAP）変化率の検討より除外した。

室温 26°C の実験環境において実験動物の直腸温は実験終了時には 33-35°C までに低下していた。

初回脱血前（preshock）の酸化ストレス度（d-ROMs）、抗酸化力（BAP）は検討ラット（n=34）では、それぞれ 352 ± 86 U. CARR（m ± SD）（ヒト正常値 200~300 U. CARR）、 $2766 \pm 471 \mu\text{mol/L}$ （ヒト最適値 $2200 \mu\text{mol/L}$ 以上）であった。本検討では各ラットの初回脱血前（preshock）の値を 1 とし、返血前値、再脱血前値は初回脱血前値からの変化率（それぞれ shock / preshock、postreperfusion / preshock）で示した。また、返血前値から再脱血前値への変動も変化（postreperfusion / shock）で示した。

(1) 脳虚血時間、再灌流時間の酸化・抗酸化動態への影響

①脳虚血時間の影響

脳虚血時間 10 分（n=11）、15 分（n=2）、20 分（n=2）、30 分（n=1）における d-ROMs、BAP の返血前、再脱血前の初回脱血前値からの変化率（それぞれ、shock / preshock、postreperfusion / preshock）、再脱血前値の返血前値からの変化率（postreperfusion / shock）を検討した。d-ROMs は虚血時間（x）が長いほど再脱血前値の返血前値からの変化率（y）（postreperfusion / shock）が上昇する傾向がみられた（ $y=0.802+0.0241x$, $r=0.458$ ）。BAP は虚血時間（x）が長いほど返血前、再脱血前の初回脱血前値からの変化率（y）（それぞれ、shock / preshock、postreperfusion / preshock）が上昇する傾向がみられた（それぞれ、 $y=1.019+0.0126x$, $r=0.259$ 、 $y=1.098+0.00863x$, $r=0.155$ ）。

②再灌流時間の影響

再灌流後 0 分（n=1）、3 分（n=1）、5 分（n=11）、10 分（n=2）、15 分（n=1）における d-ROMs、BAP の再脱血前値の初回脱血前値、返血前値からの変化率（それぞれ、postreperfusion / preshock、postreperfusion / shock）を検討した。d-ROMs は再灌流時間による差はなかった。BAP は再灌流時間（x）が長いほど再脱血前値の返血前値からの変化率（y）

（postreperfusion / shock）が上昇する傾向がみられた（ $y=0.904+0.0229x$, $r=0.363$ ）。

(2) 酸化・抗酸化動態と神経・内分泌メディエーターとの関連についての検討

神経・内分泌メディエーターの測定検体が再脱血血液であることより、これらの測定値と再脱血前値の初回脱血前値からの変化率（postreperfusion / preshock）との相関を検討した。

d-ROMs 変化率（postreperfusion / preshock）はコルチゾールと正に、アドレナリンと負に相関する傾向がみられた（それぞれ、 $r=0.498$, $p=0.101$ 、 $r=-0.537$, $p=0.072$ ）。BAP 変化率（postreperfusion / preshock）はノルアドレナリンと有意に正に相関し（ $r=0.642$, $p=0.022$ ）、コルチゾール、ドーパミンと正に相関する傾向がみられた（それぞれ、 $r=0.313$, $p=0.331$ 、 $r=0.371$, $p=0.242$ ）。

(3) 抗酸化物質投与の有用性の検討

脳虚血時間を 10 分として返血前に下記薬剤を投与、5 分後に再脱血した。各薬剤各用量の検討ラット数は下記。

A 群：生食水のみ（コントロール群）（n=7）

B 群：生食水に加え、RADICUT^R（エダラボン）0.4 mg（n=1）、1.2 mg（n=2）、4.0 mg（n=2）、6.0 mg（n=1）

C 群：生食水に加え、エラスポール^R（シベレスタット Na）1.5 mg（n=1）、5.0 mg（n=1）、6.0 mg（n=1）、10 mg（n=1）

D 群：生食水に加え、ビタミン C 5 mg（n=1）、10 mg（n=6）、20 mg（n=2）

①神経・内分泌メディエーター変動

神経・内分泌メディエーター各値は各群間に有意差はみられなかった。

②酸化ストレス度、抗酸化力変動

d-ROMs は各群において再脱血前値の返血前値からの変化率（postreperfusion / shock）は再脱血前値の初回脱血前値からの変化率（postreperfusion / preshock）に比べ上昇する傾向がみられた。

d-ROMs は D 群において再脱血前値は初回脱血前値からの変化率（postreperfusion / preshock）、返血前値からの変化率（postreperfusion / shock）いずれも、A 群、B 群、C 群に比べ低下する傾向がみられた。D 群のビタミン C 10 mg 投与群では A 群（コントロール群）に比べ、再脱血前値は初回脱血前値からの変化率（postreperfusion / preshock）、返血前値からの変化率（postreperfusion / shock）いずれも有意

に低下した（それぞれ 0.894 ± 0.159 (SD) vs 0.236 ± 0.188 , $p < 0.0001$, 1.142 ± 0.234 vs 0.348 ± 0.242 , $p < 0.0001$ ）。また、D群のビタミンC 20mg 投与群ではA群（コントロール群）に比べ、再脱血前値は初回脱血前値からの変化率（postreperfusion / preshock）、返血前値からの変化率（postreperfusion / shock）いずれも有意に低下した（それぞれ 0.894 ± 0.159 vs 0.161 ± 0.072 , $p = 0.049$, 1.142 ± 0.234 vs 0.199 ± 0.027 , $p = 0.0061$ ）。

BAPはD群のビタミンC 20mg 投与群において再脱血前値は初回脱血前値からの変化率（postreperfusion / preshock）、返血前値からの変化率（postreperfusion / shock）いずれも、A群、B群、C群に比べ上昇する傾向がみられた。D群のビタミンC 20mg 投与群ではA群（コントロール群）に比べ、再脱血前値の返血前値からの変化率（postreperfusion / shock）の上昇は有意であった（ 1.062 ± 0.137 vs 1.494 ± 0.470 , $p = 0.043$ ）。

（考察）

本研究は、全身麻酔下において頸動脈にカニューレシオンし得たラット 56 匹のうち 22 匹（39%）が蘇生に至らない心肺停止脳虚血モデルでの検討であったが、血圧低下時には血圧低下前値に比べ血漿 d-ROMs レベルは低下の傾向、血漿 BAP レベルは上昇の傾向がみられた。再灌流により血漿 d-ROMs レベルは血圧低下時からの上昇傾向がみられたが、この上昇傾向は低血圧時間が長いほど大きく、低血圧時に酸素供給低下によりヒポキサンチンが増加していることが推察された。血漿 BAP レベルは再灌流により上昇する傾向がみられた。すなわち、低血圧時から内因性抗酸化物質はすでに増加傾向であったが、再灌流による ROS 増加の阻止には至らなかった。このことは低血圧時に増加傾向であった内因性抗酸化物質は再灌流による ROS 増加の阻止には不十分であることを示唆し、われわれの臨床心肺停止例 Vegetative State 群での酸化ストレス度の上昇傾向・抗酸化力低下傾向に類似（本実験では酸化ストレス度の上昇傾向・抗酸化力不十分）した病態が本モデルで得られたと考えられた。また、コルチゾールは d-ROMs 上昇率（初回脱血前値からの）、BAP 上昇率（初回脱血前値からの）いずれとも正の相関傾向を有し、ノルアドレナリンは BAP 上昇率（初回脱血前値からの）と正に相関したことより、酸化・抗酸化動態は神経・内分泌メディエーターと関係していることが推察された。

本研究では臨床心肺停止例での Vegetative State 患者群で観察された抗酸化力の相対的不足（増加の遅延）に対し、より早期に外来的に抗酸化物を投与し酸化ス

レス度増加を阻止することの有用性を返血直前に抗酸化物、抗炎症物質を投与することにより検討した。抗酸化物質としてエダラボン、ビタミンCを使用した。抗炎症物質としてシベレスタット Na を使用した。臨床使用量を鑑み投与量を決めたが、試行使用量内において、本心肺停止脳虚血モデルにおいてはエダラボン、シベレスタット Na の有用性はないと考えられた。ビタミンC はコントロール群に比べ 10-20mg/body が酸化ストレス度を低下、ビタミンC 20mg/body が抗酸化力を上昇した。Tsai ら（Tsai MS, Huang CH, Tsai CY, et al: Ascorbic acid mitigates the myocardial injury after cardiac arrest and electrical shock. Intensive Care Medicine. 37:2033-40, 2011）はラット心停止蘇生モデル（VF: ventricular fibrillation 5分、CPR 1分、ES: electrical shock）において、CPR 開始時のアスコルビン酸 100mg/kg 投与による脂質過酸化低下・ミトコンドリア破壊・心筋壊死の抑制、蘇生率・72時間生存率の改善を報告している。他の抗酸化物質の有用性も報告されているが、ビタミンCは入手容易であり抗酸化薬としての有用性はより高いと考えられる。

（今後の研究の推進方策）

- ・本実験は急性実験であったため、臨床心肺停止のモデルとしての妥当性については覚醒後の行動等を含めた長期予後観察が必要である。
- ・血圧低下（脳虚血）時間、再灌流時間を変えることでより臨床像に類似したモデルとなる可能性がある。
- ・本実験は直腸温変動より脳低温療法に類似したと考えられるが、全身ブランケットを用い正常脳温とした動物での検討も必要である。
- ・抗酸化薬の投与経路を臨床に合わせ静脈路とする。
- ・本研究では抗酸化薬、抗炎症薬を単独で検討したが、抗酸化薬と他の薬剤（線溶薬、抗炎症薬、神経保護薬など）との併用療法の検討も必要である。
- ・本研究は血液検体での検討であったが、脳脊髄液、脳各部位組織の酸化抗酸化動態の検討も必要と考えられる。

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）

- ・野村亮介、篠澤洋太郎、山内聡、他：心肺

機能停止患者の救急搬入時酸化抗酸化動態
と脳予後 第 26 回日本救命医療学会 平成
23 年 9 月 17 日 千葉

・野村亮介、篠澤洋太郎、久志本成樹：虚血
再灌流モデルにおける酸化抗酸化動態変動
と抗酸化剤投与 第 41 回日本救急医学会
平成 25 年 10 月 21-23 日 東京

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠澤 洋太郎 (SHINOZAWA YOTARO)
国際医療福祉大学・大学病院・教授
研究者番号：30129465

(2) 研究分担者

野村 亮介 (NOMURA RYOSUKE)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：90400358