

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791683

研究課題名(和文) マウス心停止モデルを用いた心肺蘇生後の硫化水素による人工冬眠療法の臓器保護効果

研究課題名(英文) Protective effects of hydrogen sulfide donor against ischemia-reperfusion injury following experimental mice cardiac arrest

研究代表者

中山 慎(Nakayama, Shin)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：60596443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：硫化水素は低代謝、低体温状態を引き起こすことが知られている。マウスを用いた心肺停止モデルで蘇生後に硫化水素ドナーである水酸化ナトリウム(NaHS)を投与すると虚血再灌流傷害を抑制するかどうか調べた。蘇生後にNaHSを3mg/kg腹腔投与すると血圧は低下せず、心拍数と体温が対照群と比較して有意に低下したが、生存率は短期、長期とも変わらなかった。NaHSによる低体温作用が臓器保護に有利に働く可能性があるため、蘇生後の体温を強制加温して正常になるように保った。蘇生後の体温を正常に保った場合でもNaHS投与群では脳の線条体における組織障害が有意に少なかった。海馬では差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen sulfide donor, sodium hydrogen sulfide (NaHS), can induce hypothermia and hypometabolic state, which might attenuate ischemia reperfusion injury. The protective mechanism of sulfide remains unclear. In order to exclude the hypothermic effect of sulfide, this study was designed to test whether NaHS treatment in mice after cardiac arrest (CA) and cardiopulmonary resuscitation (CPR), followed by maintaining forced normothermia improved outcomes. Adult male mice were subjected to 8 min of CA. Mice were treated with either NaHS (3mg/kg) IP or vehicle at 30 min after CPR, then kept their head temperature above 35.0 degree Celsius using a heating pad for 6 hr. One, 4 and 12 days after CA/CPR, brains were removed for histological evaluation of neurons in the CA1 hippocampal region and the striatum. CA induced spontaneous hypothermic response, which was enhanced by NaHS. Even when the head temperature was kept constant, NaHS exerted neuroprotective effect in the striatum after CPR.

研究分野：麻酔・蘇生学

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：心肺蘇生 硫化水素

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

平成 26 年 5 月 9 日現在

1. 研究開始当初の背景

(1) 心肺停止蘇生後、社会的に復帰可能な割合は 5% 以下である。低体温療法以外に有効な治療は未だ無い。近年、硫化水素の投与により可逆的な低代謝状態を作り出されることが報告され、脳、心臓を含め、多臓器で虚血/再灌流障害を軽減する可能性が示唆されている。本研究は心肺停止蘇生後の硫化水素投与が臓器保護に有利に働くかを検証することであった。

2. 研究の目的

(1) マウスにおける心肺停止モデルを用い 8 分間の心停止の後、蘇生処置を行い、これを全身臓器の虚血再灌流障害モデルとして利用した。蘇生後の硫化水素ドナー投与が臓器に保護作用があるかどうかを調べた。蘇生後の体温を一定に保ち、硫化水素による人工冬眠（低代謝）状態と蘇生後の低体温とを区別し硫化水素の効果を厳密に判定した。

3. 研究の方法

(1) マウス心停止・蘇生モデル

マウス（オス、体重 20 - 30 g、C57bl/6）にセボフルラン 2% とペントバルビタール 25mg/kg 腹腔投与し全身麻酔後に気管内挿管し、右内頸静脈、右大動脈から PE-10 カテーテルを挿入した。左側頭筋内に温度測定のプロローベを挿入、心電図、直腸温計を装着。酸素、空気、セボフルランで人工換気し、10 分間の安定状態を保った後、中心静脈から KCL (0.05ml 0.5M) を注入し心停止を誘発した（心電図、動脈圧の低下で確認）。心停止時間は 8 分とした。8 分後、純酸素で人工呼吸を再開、エピネフリン 0.5ml (16 μ g/ml) を 30 秒間で中心静脈から投与、1 分間に 300 回の心臓マッサージを開始した。通常蘇生開始後 180 秒以内に自己心拍が再開する（収縮期血圧 60 mmHg 以上を自己循環の再開

とみなす）。蘇生後 30 分間観察し、1 分間に 30 回以上の自発呼吸を確認したところでケージに戻した。処置中は側頭筋温、直腸温を連続的にモニターした。蘇生 30 分後に硫化水素投与群では水酸化ナトリウム (NaHS) を 3mg/kg 腹腔投与した。対照群として同量の生理食塩水投与群と比較した。

蘇生後の体温は NaHS 群で有意に低かったため、蘇生後の体温を一定に保つために、その後飼育環境の外気温、保温マット、赤外線ランプなどを用い、各群で体温が 35 以上になるように強制加温した。蘇生 1、4、12 日後に行動学的解析を施行後、再度麻酔下に灌流固定を行い、脳を摘出し、それぞれ、Hematoxylin and eosin で染色し、組織学的な障害を評価した。

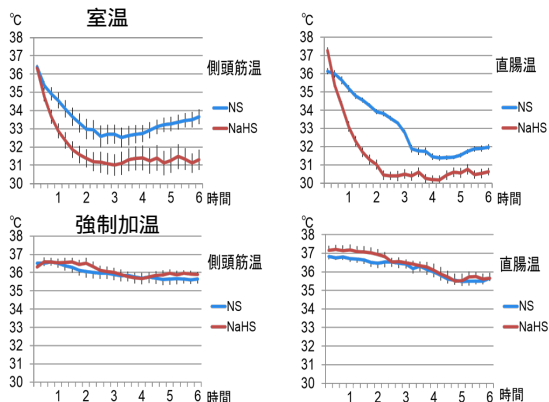
4. 研究成果

(1) NaHS 投与量、投与経路： マウスに 8 分間の心停止実験を行った。研究当初は過去の報告に準じて蘇生 30 分後に NaHS 0.2mg - 0.5mg/kg を静脈内投与していたが生存率も 30% 程度と低く、高率に術後脳出血を認めたため投与量、投与経路を変更した。変更後は NaHS 3mg/kg の腹腔投与とし生理食塩水 (NS) 投与群と比較した。

(2) 蘇生後の体温変化： 蘇生後の体温変化を 6 時間測定した。蘇生 6 時間以降は多くのマウスが覚醒し始め動き出すため測定できなかった。蘇生後に室温 (26) で放置すると両群ともに蘇生 1 時間後より体温が低下し始め、NaHS 投与群では NS 群より有意に体温低下が認められ 6 時間後まで NS 群より約 2 低い状態が続いた (NaHS: 31.7 ± 2.4 °C

vs NS $34.0 \pm 2.4^\circ\text{C}$, $P < 0.05$) (図 1)。

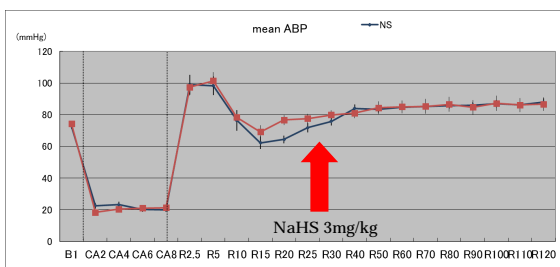
【図 1】蘇生後の体温変化



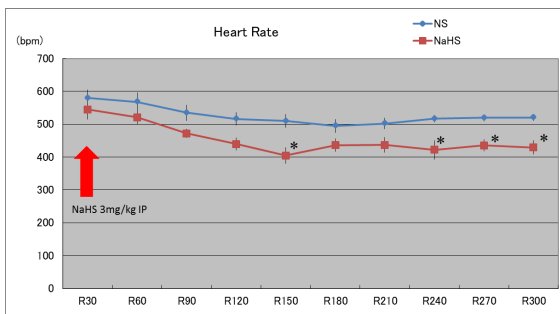
(3) NaHS 投与後の循環動態変化：

NaHS 投与後の血圧の変化は NS 群と差はなかった (図 2)。心拍数は NaHS 投与群で NS 群と比較して約 2 割程度減少した (図 3)。蘇生 1 時間後の血液ガス分析では動脈血酸素分圧が NaHS 群で有意に低かった (NaHS : 175mmHg vs NS: 275mmHg, $P < 0.05$)。

【図 2】血圧変化



【図 3】心拍数変化

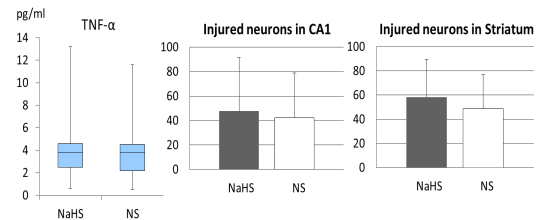


(4) 蘇生後の脳組織障害の比較：

短期予後 (1 日、4 日)

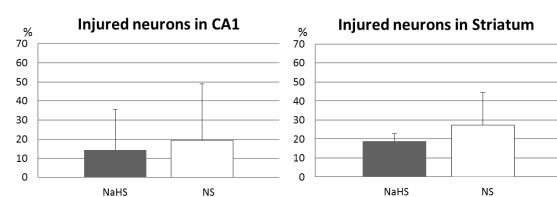
NaHS 投与による低体温作用が保護的に働く可能性や、血圧は低下させず、心拍数を低下させることが蘇生後の酸素需給バランスを改善し短期予後が向上すると予想したが、蘇生 1 日後の生存率や神経行動評価は両群で差はなく、脳の高馬と線条体における組織障害の程度も同等であった。蘇生 1 日後の TNF-値も両群で有意差はなかった (図 4)。

【図 4】蘇生 1 日後の高馬 (CA1 領域) と線条体の脳障害の比較



蘇生後に室温で放置すると図 1 に示したとおり側頭筋の温度が低下し脳保護的に働いたと推察され蘇生 4 日後の脳の組織障害は両群ともに 20% 以下と少なく差はなかった (図 5)。

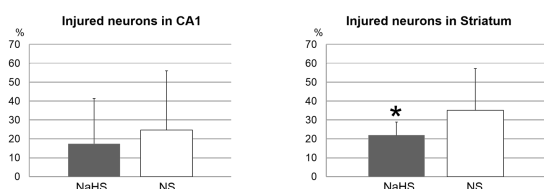
【図 5】蘇生 4 日後の脳障害 (室温)



蘇生後の低体温作用、硫化水素による低体温作用を除外するために蘇生後から 6 時間強制加温し体温を 35°C 以上に保つ実験を行った。蘇生 4 日後の生存率は NaHS 投与群 ($n=20$) が 70% と NS 投与群 ($n=19$) の 74% と同程度であった。線条体の組織障害は NaHS 群で有意に少なく (NaHS 群 vs NS 群: $22 \pm 7\%$ vs

35 ± 22%、 $P < 0.05$)、海馬の組織障害は両群で有意差は無かった (NaHS 群 vs NS 群: 17 ± 23% vs 25 ± 31%)。4 日後の神経行動反応スコアも両群で有意差はなかった (図 6)。

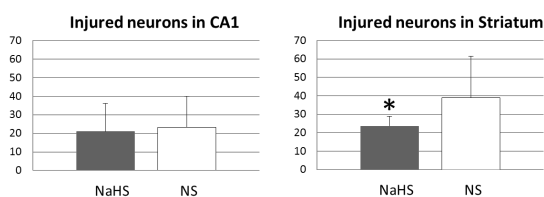
【図 6】蘇生 4 日後の脳障害 (強制加温)



長期予後 (12 日)

蘇生 4 日後では海馬における遅発神経細胞壊死 (アポトーシス) を観察できなかった可能性があり、12 日後の長期観察を行った。蘇生 12 日後の生存率は NaHS 群 75% で NS 群 52% であった。海馬の障害は 12 日後でも両群で差はなく、線条体では NaHS 群で有意に障害が少なかった (NaHS 群 vs NS 群: 23 ± 5% vs 39 ± 22%) (図 7)。神経行動評価でも両群に差はなかった。

【図 7】蘇生 12 日後の脳障害 (強制加温)



(5) 結論

マウス心肺停止・蘇生モデルにおいて NaHS (3mg/kg) の腹腔内投与は、蘇生後の体温を一定に保った場合においても脳の線条体における組織障害を軽減した。

今後の展望として、NaHS の至適投与量、投与経路について調べる必要がある。蘇生後の循環動態が不安定な時期に NaHS を静脈内にボ

ーラス投与した場合は予後を悪化させた。腹腔内投与も単回投与では一過性に体内の硫化水素濃度が上昇するのみですぐに消失してしまうことから、高い予後改善効果は認められなかった。腹腔内持続投与のポンプを用いて、蘇生後の連続 3 日間 NaHS を 3mg/kg/day の持続投与を検証している。

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〕なし

〔学会発表〕(計 2 件)

Nakayama S, Taguchi N, Tanaka M, Treatment of Sodium Hydrogen Sulfide With Normothermia Reduces Neuronal Damage in the Striatum After Cardiac Arrest in Mice. STROKE 2014; 45: AWP208, San Diego, USA, Feb 12-14, 2014

中山 慎、田口典子、井坂由美、田中誠、常温での水硫化ナトリウムの脳保護作用、日本麻酔科学会 第 60 回学術集会、2013 年 5 月 23 日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 慎 (NAKAYAMA Shin)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 60596443