

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592738

研究課題名(和文)重症脳障害に対する脳低温療法と脳保護薬の併用による新たな治療戦略

研究課題名(英文) Combinational therapy using hypothermia and FK506 to target oxidative stress, endothelial injury, inflammation, and ischemic brain injury after cardiac arrest in rat

研究代表者

小田 泰崇 (ODA, Yasutaka)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40397998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、心停止後症候群の治療として、低体温療法と免疫抑制剤であるFK506の併用療法が脳保護効果を有するか検討した。ラット心停止モデルを用いて心停止後症候群を作成した。低体温療法あるいはFK506投与の単独療法は限定的な脳保護効果を示したのに対して、低体温療法とFK506の併用療法は、ラジカル産生、血管内皮傷害、炎症を抑制して脳保護効果を発揮することが明らかとなった。この新たな治療戦略がPCAS治療に臨床応用されることが望まれる。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the utility of combinational therapy, coupling hypothermia with FK506 administration, on oxidative stress, endothelial injury, inflammation, and ischemic brain injury seen following cardiac arrest (CA). Rats were resuscitated from cardiac arrest by induced ventricular fibrillation, and subjected to various combinations of hypothermic/FK506 intervention. Cardiac arrest induced dramatic oxidative stress, endothelial injury, inflammation, and neuronal damages in hippocampus. Hypothermia or FK506 after CA provided limited protection. However, CA with combinational therapy achieved protection against oxidative stress, endothelial injury, inflammation, and ischemic brain injury. This study shows the benefits of combinational therapy, using hypothermia with FK506 to attenuate important features of CA. This suggests that hypothermia might protect and extend the therapeutic window for FK506 efficacy.

研究分野：救急医学

キーワード：心停止後症候群 心室細動 酸化ストレス マロン酸アルデヒド sICAM1 HMGB1

1. 研究開始当初の背景

脳浮腫、頭蓋内圧亢進、再灌流障害といった二次性脳障害を防ぐことは、脳保護・脳蘇生に対する治療戦略において重要である。そのためには、呼吸、循環、脳代謝を念頭において脳指向型集中治療に加え、脳神経細胞障害を食い止める治療法の開発が急務である。

心停止後症候群 (post cardiac arrest syndrome: PCAS) の治療に低体温療法が臨床応用されているが、その適応や効果は限定的である。低体温療法は薬物の代謝を抑制し、作用時間を延長することが報告され、われわれは低体温療法のこの作用に着目し、低体温療法がこれまで臨床的に有効性を見出せなかった薬剤の脳保護作用を増強するとの仮説を立て実験を開始した。

免疫抑制剤であるタクロリムス (FK506) は、頭部外傷や脳梗塞モデルを用いた基礎的研究において脳保護効果が報告されている。われわれはラット頭部外傷モデルを用いて、低体温療法と FK506 の併用療法が脳の微小循環 (血管調節性) を保ち、軸索損傷を軽減することを報告した (Oda et al: J Cereb Blood Flow Metab 2011, Fujita et al: J Neurotrauma 2011)。しかし、低体温療法と FK506 の併用療法の PCAS に対する有効性は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PCAS の治療戦略として、低体温療法と脳保護薬 FK506 の併用療法が脳保護効果を有するかを検討することである。

3. 研究の方法

(1) ラット心停止モデル

Sprague-Dawley (SD) ラット (BW 350-400g) を用いて心停止モデルを作成した。

麻酔下 (ペントバルビタール 45 mg/kg 腹腔内投与) に気管切開後人工呼吸管理とし、大腿動静脈にカニューレーション (PE50) した。

体表面より心外膜に留置した針電極を用いて、電気刺激 (1 mA、3 min) で心室細動 (VF) を誘発し 5 分間心停止とした。

人工呼吸器に装着 (100% 酸素、呼吸数 100 回/分) し、心肺蘇生 (胸骨圧迫 200 回/分) を開始した。心肺蘇生開始と同時に、アドレナリン (2 µg/100g) を心拍再開が得られるまで 3 分毎に投与した。心肺蘇生開始 1 分後に心室細動を認めた場合は除細動 (単相性 3J) を行った。以後、心室細動継続時は 2 分毎に繰り返し除細動を行った。

ラットは心拍再開後、心停止群 (Group1、n=13)、低体温療法群 (Group2、n=7)、薬剤群 (Group3、n=9)、低体温療法 + 薬剤群 (Group4、n=7) に分けた。

(2) 低体温療法と薬剤 (FK506) 投与

低体温療法は、心拍再開し循環動態が安定後直ちに導入し、33°C で 120 分間維持、1°

C/hour の速度で復温した。

薬剤 (FK506、3mg/kg) は心拍再開 30 分後に静脈投与した。

(3) 評価項目

心拍再開 6 および 24 時間後血清を採取した。心拍再開 6 時間、24 時間後までの生存率を検討した。心拍再開 24 時間後に安楽死させ、脳を paraformaldehyde で固定した。血清中のラジカル代謝産物 (malondialdehyde: MDA) および炎症マーカー (soluble intercellular adhesion molecule-1: sICAM1, high-mobility group box 1: HMGB1) の測定、脳組織 (海馬 CA1 領域錐体細胞) を解析した。

4. 研究成果

(1) 背景、生理学的データおよび血液検査値

Table1 に各実験群の背景、生理学的データおよび血液検査値を示す。

体重、心停止前血圧、体温、心室細動を誘発した電気刺激実測値に、各群間で有意差は認められなかった。蘇生開始から自己心拍再開 (Return of spontaneous circulation: ROSC) までの時間は Group 1 で長い傾向にあった。同様に、エピネフリンの投与量、除細動の回数も Group 1 で高い傾向にあったが、有意差はなかった。ROSC 後の base excess、乳酸値にも各群間で有意差を認めなかった。

Table 1 Characteristics, physiological and laboratory data

Variables	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Weight, g	398 ± 20	395 ± 14	404 ± 12	391 ± 7
MAP at baseline, mmHg	126 ± 4	129 ± 4	130 ± 7	131 ± 5
Rectal temperature at baseline, °C	37.4 ± 0.1	37.4 ± 0.1	36.9 ± 0.3	37.0 ± 0.2
Stimulation, mA	0.69 ± 0.09	0.52 ± 0.08	0.44 ± 0.07	0.42 ± 0.07
Time to ROSC, min	192 ± 57	126 ± 10	74 ± 6	82 ± 11
Epinephrine, µg/100g	5.27 ± 1.40	2.97 ± 0.49	2.49 ± 0.07	2.56 ± 0.04
Defibrillation, n	1.3 ± 0.4	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2
Base excess at ROSC, mmol/L	-12.5 ± 1.6	-10.2 ± 0.8	-12.5 ± 1.2	-11.6 ± 0.7
Lactate at ROSC, mmol/L	8.6 ± 0.4	8.5 ± 0.4	8.8 ± 0.8	9.2 ± 0.3

Mean ± SE

MAP, mean arterial pressure; ROSC, return of spontaneous circulation

目標温 33 °C への到達時間は、低体温療法群 (Group2) と比較して、低体温療法 + 薬剤群 (Group4) で有意に短かった (16 ± 1 vs 13 ± 1 min, P<0.05)。

(2) 生存率

各群におけるラットの 6 時間生存率は、Group1 62% (8/13)、Group2 86% (6/7)、Group3 67% (6/9)、Group4 86% (6/7) で、Group2 および Group 4 の低体温療法施行群で高値であった。6 時間生存例では全例で血清を採取した。24 時間生存率は、Group1 23% (3/13)、Group2 14% (1/7)、Group3 22% (2/9)、Group4 14% (1/7) であり、いずれも低値であった。そのため、24 時間の血清および髄液の

比較解析は行えなかった。

(3) 血清 MDA、sICAM1、HMGB1 の解析

図 1 は各群の心拍再開 6 時間後の血清 MDA のグラフである。Sham 群と比較して、Group3 の MDA 濃度は有意に高値を示した。Group4 併用群の MDA 濃度は低い傾向にあったが、各 Group 間で有意差は認めなかった (Sham:  $0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ , Group1-4:  $2.3 \pm 0.6$ ,  $2.3 \pm 0.7$ ,  $3.2 \pm 0.4$ ,  $1.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$ )。

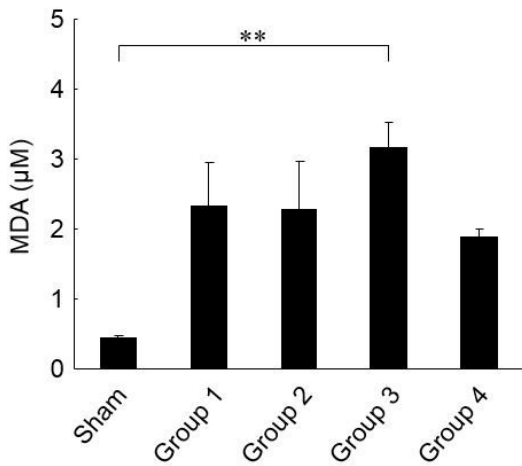


図1 心拍再開6時間後の血清MDA  
Mean ± SE, \*\*P<0.01

図 2 は各群の心拍再開 6 時間後の血清 sICAM1 のグラフである。Group1-4 の sICAM1 濃度は sham 群と比較して、いずれも有意に高値であった。各 Group 間で有意差は認めなかったが、Group2-4 の治療群の sICAM1 濃度は、Group1 と比較して低い傾向にあった。(Sham:  $1.4 \pm 0.1 \text{ ng/mL}$ , Group1-4:  $38.5 \pm 7.3$ ,  $22.7 \pm 2.6$ ,  $20.8 \pm 0.6$ ,  $24.3 \pm 2.4 \text{ ng/mL}$ )

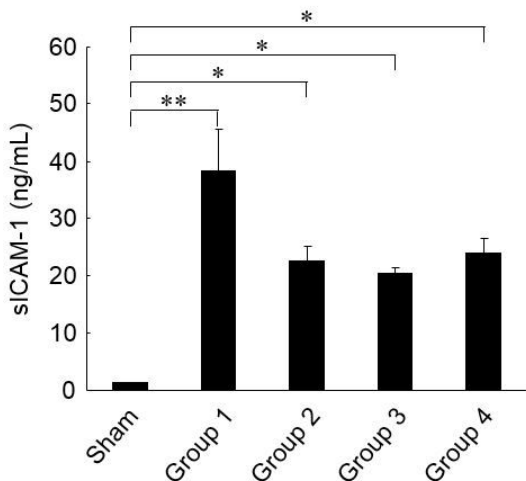


図2 心拍再開6時間後の血清sICAM1  
Mean ± SE, \*P<0.05, \*\*P<0.01

図 3 は各群の心拍再開 6 時間後の血清 HMGB1 のグラフである。Sham および Group1-4 間で有意差は認めなかった。Group2-4 の治療群の HMGB1 濃度は、Group1 と比較して低い傾向にあった。Group4 併用群の HMGB1 濃度は最も低値であった。(Sham:  $1.2 \pm 0.4 \text{ ng/mL}$ , Group1-4:  $33.7 \pm 27.5$ ,  $12.6 \pm 3.7$ ,  $3.7 \pm 1.2$ ,  $2.3 \pm 0.8 \text{ ng/mL}$ )

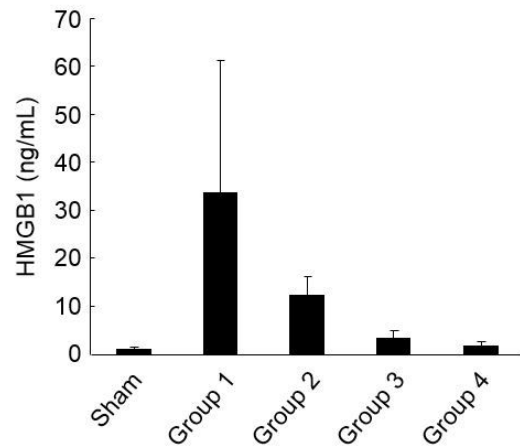


図3 心拍再開6時間後の血清HMGB1  
Mean ± SE

(4) 脳組織解析

図 4 に各群の代表的な海馬 CA1 領域の顕微鏡写真を示す。Group1 (A) は萎縮あるいは各濃縮した錐体細胞や崩壊した細胞が目立ち、正常細胞は少なかった。Group2 (B) および Group (C) は正常の細胞と変性した細胞が混在していた。Group 4 (D) は正常細胞数が最も多かった。

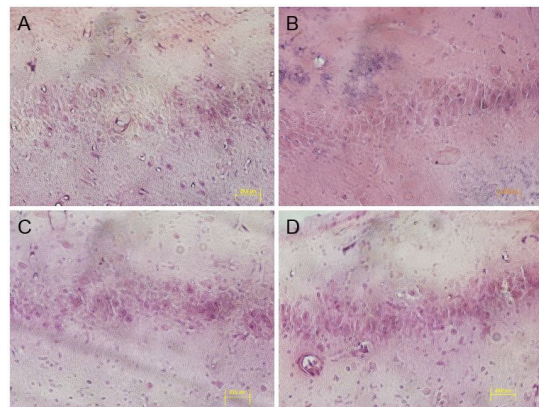


図4 各群の代表的な海馬CA1領域の顕微鏡写真  
Group1(A)は萎縮あるいは各濃縮した錐体細胞や崩壊した細胞が目立つ。  
Group2(B)およびGroup3(C)は正常の細胞と変性した細胞が混在している。  
Group4(D)は正常細胞数が最も多い。  
Hematoxylin and eosin stain、倍率×400

本研究の結果、ラット心停止モデルを用いた PCAS の治療として、低体温療法と脳保護薬 FK506 の併用療法が、ラジカル産生、血管内皮傷害、炎症を抑制して脳保護効果を発揮することが示唆された。この新たな治療戦略が PCAS 治療に臨床応用されることが望ま

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0件)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小田 泰崇 (ODA, Yasutaka)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 40397998

(2)研究分担者

藤田 基 (FUJITA, Motoki)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 50380001

(3)連携研究者

なし