

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462398

研究課題名(和文) マウスの心肺停止を用いた全脳虚血に対するフルオキセチン投与長期予後の検討

研究課題名(英文) Effects of fluoxetine on neuronal damage after cardiac arrest/ cardiopulmonary resuscitation

研究代表者

田口 典子 (TAGUCHI, Noriko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：90569774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病の治療薬であるセロトニン再取り込み阻害薬には、神経保護作用、神経新生作用があると指摘されており、脳梗塞後の神経障害を軽減する可能性がある。しかし、心停止後の脳障害に対する効果については明らかではない。また、実験的に短時間は神経保護作用を認める薬剤でも、長期的には保護作用を有さない場合がある。我々はマウスの心肺停止モデルを用い、セロトニン再取り込み阻害薬の一種であるフルオキセチンの長期的神経保護作用の有無について検討した。フルオキセチンは心肺蘇生7日後までは神経細胞の減少を軽減したが、14日後ではその効果は消失していた。しかし、新生神経細胞の増加を認め、記憶力の障害が抑制された。

研究成果の概要(英文)：Several clinical studies have indicated that serotonin re-uptake inhibitor administration after acute ischemic stroke can improve clinical recovery. Fluoxetine (FLX: one of the serotonin re-uptake inhibitor) has several mechanisms which contribute to relieve the ischemic brain damage. The goal of this study is to evaluate the neuroprotective effect of FLX for a long observation period after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. Fourteen days after ischemia, FLX did not have an influence on the number of survival neurons in hippocampus. However, FLX administration increased the number of immature neurons. At this time point, memory function improved in FLX group. Fluoxetine improved memory function after cardiac arrest. This recovery may be due to neurogenesis in hippocampus, but not due to surviving neurons. Further investigation is needed to clarify the interaction of memory function and neurogenesis after fluoxetine administration.

研究分野：脳虚血

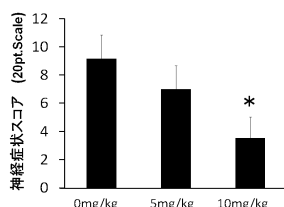
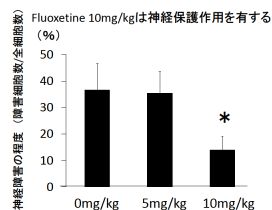
キーワード：蘇生後脳症

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病の治療薬として、広く使用されているセロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) には、神経保護作用、神経新生作用があると言われており、実験的、臨床的にも脳梗塞後の神経障害を軽減する事が認められている。この作用は、虚血9時間後に薬剤を投与した場合も確認されており、脳梗塞に対して、フルオキセチンの臨床応用の可能性が指摘された。(J Neurosci Research 2009; 87:1037-1045) ヒトにおいて、脳梗塞後フルオキセチンを内服させた多施設研究では、脳梗塞後の運動機能回復が投薬により有意に改善し、(Lancet Neurol 2011;10:123-130) その後、世界的にフルオキセチンの脳保護作用について臨床研究が開始された。機序の一つとして虚血後に生じるミクログリアの集積を抑制する事が認められているが、不明な点も多く、その効果についても、障害早期、回復期に与える効果の違いなど、十分解明されていない状況であった。また脳梗塞、部分脳虚血に関する研究の一方、心肺停止による全脳虚血に対するフルオキセチンの効果についての報告は見当たらなかった。

## 2. 研究の目的

本研究代表者はマウスにおける心肺停止モデルで、フルオキセチンが蘇生3日後の急性期における脳障害を軽減することを報告した。



(Resuscitation 2012;83:652-656)

しかし、その長期的予後に与える影響については不明であった。

本研究の目的は、フルオキセチン投与により、蘇生後脳症の長期予後が改善するか否かを確認する事、またその機序を解明する事である。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスの心肺停止実験方法

麻酔下のマウス (C57BL/6、オス、体重 20 - 25 g) に気管内挿管し、右内頸静脈から PE-10 カテーテルを挿入する。左側頭筋内に温度測定のプロローベを挿入し、心電図、直腸温計を装着する。酸素、空気で人工換気する。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する (心電図の平坦化で確認)。心停止時間を 8 分とする。心肺停止 7 分 30 秒後、純酸素で人工呼吸を再開し、心肺停止 8 分後にエピネフリン 0.5 ml (16  $\mu$ g/ml) を 30 秒間で中心静脈から投与し、1 分間に 300 回の心臓マッサージを開始する。蘇生開始後に自己心拍が再開する事を確認し、心臓マッサージを中止する。(有効な心電図波形の確認を自己循環の再開とみなす)。蘇生後 30 分間観察し、ブラインド化されたフルオキセチン 10 mg/kg もしくは同量の生理食塩水を投与する。蘇生 60 分後、循環動態が安定し 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す。

### (2) 麻酔方法の検討

蘇生後長期において生存率を維持し、検出可能な脳障害の程度を保つための麻酔方法について検討した。2.5%セボフルラン吸入もしくはペントバルビタールとフェンタニルの混合液の腹腔内投与の2種類の麻酔方法で検討した。

### (3) 行動学的評価

蘇生後、予定期間全身状態を観察の後、ス

テップスルー型受動的回避試験による短期記憶検査と全身状態を神経学的評価スコアで評価した。

#### (4) 組織学的評価

短期記憶検査を施行後、麻酔下に4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行なった。脳冠状切片をヘマトキシリンエオジン染色、残存神経細胞の指標として Neu-N, ミクログリアの指標として IBA-1、新生神経細胞の指標として Doublecortin を免疫染色した。光学顕微鏡にて、海馬と線条体の生存/死亡細胞数、ミクログリア、新生神経細胞の数もしくは免疫染色陽性の面積を測定した。

#### (5) 保護作用の機序についての検討

蘇生後予定期間全身状態を観察の後、麻酔下で海馬を摘出、凍結後 IL-1b, IL-6, TNF, FGF-2, BDNF の発現量をマルチプレックスアッセイシステムを用いて測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 麻酔方法の検討

フルオキセチン 10mg/kg 投与による神経保護作用を心停止時間 7分30秒で検討した。蘇生7日後に組織学的検査、行動学的検査を施行した。蘇生7日後の生存率は73%で麻酔方法による差を認めなかった。神経障害の程度はセボフルラン麻酔で有意に少なく、海馬におけるミクログリアの浸潤を抑制した。フルオキセチンの神経保護作用は静脈麻酔薬群のみで認められた。

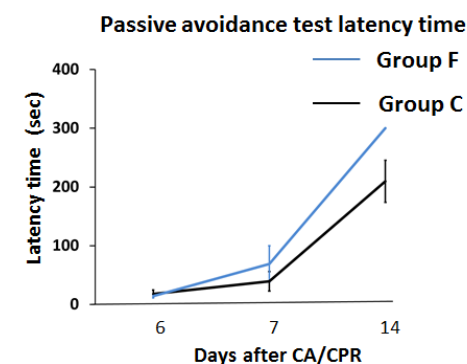
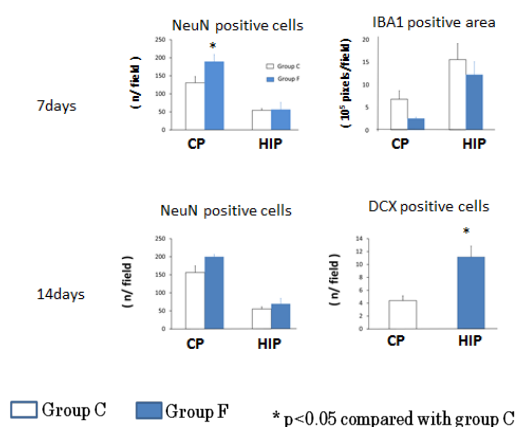
蘇生14日後の神経障害は7日後とほぼ同様の結果であったが、生存率が28.6%と低く、統計学的検討は困難であった。

上記の結果を踏まえ、これ以降の実験に関しては、麻酔方法はペントバルビタールとフェンタニルの混合液を腹腔内投与し、心肺停止時間は7分と短縮した。

#### (2) 蘇生14日後の神経保護作用について

蘇生14日後の生存率は約40%でフルオキセチン投与の有無で有意差を認めな

かった。残存神経細胞数は海馬、線条体ともにフルオキセチン投与群で多い傾向は認めしたが有意ではなかった。フルオキセチンの神経保護作用の一つとして、神経新生促進作用があるため、新生神経細胞の使用として Doublecortin による免疫染色を施行したところ、蘇生14日後にはフルオキセチン投与群で新生神経細胞数が増加していた。また、蘇生14日後の受動回避試験ではフルオキセチン投与群で記憶の保持に優れていた。



#### (3) 神経保護作用の機序について

フルオキセチンによる神経保護作用が、抗炎症作用によるものなのか、神経新生促進作用によるものかを検討するため、蘇生後6、24時間、7日後に海馬における IL-1b, IL-6, TNF, FGF-2, BDNF, VEGF-A の発現量を比較した。心肺停止に伴い、IL-1b は7日後まで増加傾向を認めしたが、IL-6, TNF, FGF-2, BDNF に関しては24時間後にピークを迎え、その後減少した。この変化はフルオキセチンの有無で影響を受けなかった。

以上の結果から、心停止後のフルオキセチン

ン投与は、蘇生14日後の記憶障害を改善する可能性がある。しかし、その機序について、抗炎症作用、BDNFを介した神経細胞新生促進作用などを検討したが、解明には至らなかった。今回確認した神経新生作用が虚血後の脳機能障害を軽減するか否かに関する検討は今後の課題であると考えられる。

#### 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 4件)

Noriko Taguchi, Shin Nakayama, Makoto Tanaka, Single administration of fluoxetine improves memory function without neuroprotection after cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation in mice. Euroanaesthesia 2016年5月28日~2016年5月30日 London (U.K)

田口典子、中山慎、田中誠 心肺停止後に投与したフルオキセチンがマウスの虚血後脳障害に与える影響 蘇生7日、14日後の脳組織、行動学的評価に与える影響 日本蘇生学会第34回大会 2015年11月5日~2015年11月6日 秋田キャスルホテル (秋田県秋田市)

田口典子、中山慎、井坂由美、中村貴子、田中誠 心肺停止後に投与したフルオキセチンは神経保護作用を有するか 蘇生14日後の検討 日本麻酔科学会第62回学術集会 2015年5月28日~2015年5月30日 神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

田口典子、中山慎、田中誠 心肺停止後

に投与したフルオキセチンは神経保護作用を有するか 蘇生7日後、セボフルランもしくはペントバルビタール麻酔での検討 日本麻酔科学会第60回学術集会 2013年5月23日~2013年5月25日 ロイトン札幌、ホテル札幌芸文館、札幌市教育文化会館、札幌プリンスホテル (北海道札幌市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

[その他]

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

田口 典子 (TAGUCHI, Noriko)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号: 90569774

##### (2)研究分担者

中山 慎 (NAKAYAMA, Shin)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号: 60596443

##### (3)連携研究者

田中 誠 (TANAKA, Makoto)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号: 50236634

##### (4)研究協力者

井坂 由美 (ISAKA, Yumi)  
中村 貴子 (NAKAMURA, Takako)