

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462754

研究課題名(和文)成人低酸素症時の100%酸素蘇生による脳高次機能に及ぼす影響とその治療法の確立

研究課題名(英文)Reoxygenation with 100% oxygen following hypoxia in mice causes apoptosis

研究代表者

西山 隆(NISHIYAMA, TAKASHI)

神戸大学・医学部附属病院・特命教授

研究者番号：60243771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：成年マウスの低酸素症時の100%酸素投与が空気に比べて、脳障害を引き起こしているかどうか検討した。成年マウス8%低酸素症時の100%酸素は21%酸素と比較して、TNF、IL-1などの炎症性サイトカインをより増加させ、Caspase-3を誘導した。成人低酸素時の蘇生についても、新生児蘇生と同様、21%酸素(空気)からの使用を検討する必要があると思われる。

研究成果の概要(英文)：The present study showed that reoxygenation with 100% oxygen after hypoxia increased inflammatory cytokines and caspase-3 mRNA expressions compared with 21% oxygen in adult mice. The present study provides some insight as to why 100% oxygen has harmful effects on adult brain after hypoxia as well as neonatal brain. In the clinical situation, the oxygen concentration after hypoxia might affect neurological outcomes in adult.

研究分野：蘇生

キーワード：低酸素症 100%酸素蘇生 空気蘇生

1. 研究開始当初の背景

2004年のDavidらによる新生児1302名からなるメタ解析では出生時、低酸素症に対する蘇生時に、100%酸素と空気を比較検討した結果、100%酸素投与は空気に比べて、死亡率が有意に高く、自発呼吸開始に3分以上かかる頻度も高かったという報告後、蘇生時の高濃度酸素投与については慎重な姿勢がとられた。その後の2010年の国際蘇生連絡協議会のガイドラインでは、100%酸素より、空気での蘇生を推奨している。日本でもコンセンサス2010で、満期産の低酸素症児の蘇生には空気での蘇生を行うよう、啓もう活動されている。しかし、今まで成人の低酸素症に対する蘇生時の酸素濃度がその後、脳神経障害を引き起こすかどうかの研究報告はない。分担研究者は2013年5月の学術総会で、世界で初めて、生後7日目のマウスの8%低酸素モデルで、100%酸素蘇生が、その後の8方向迷路学習機能が低下することを報告した。

申請者は成人の低酸素症時の100%酸素による蘇生は、その後、脳神経障害が生じ、その発症機序には、100%酸素による、酸化ストレスによるフリーラジカル産生によるアポトーシス、脳神経発達に必要な各種脳神経栄養因子、低酸素刺激による活性化される低酸素誘導性転写因子(Hypoxia-inducible factor-1; HIF-1)の活性低下による内因性エリスロポイエチン(EPO)不足が関与していると推測している。

2. 研究の目的

200年以上もの間、新生児の蘇生時には、中枢神経系の低酸素状態による影響をできるだけ少なくするため、100%酸素が使用されてきたが、2010年の国際蘇生連絡協議会のガイドラインでは、満期産時の低酸素症時には100%酸素より、空気での蘇生を推奨しているが、成人での低酸素症時の蘇生での酸素濃度は検討されていない。

申請者は成人の低酸素症に対する蘇生時の100%酸素がその後、脳神経発達障害を引き起こすと推測し、100%酸素による脳神経障害発症機序とその治療法を確立することを目的としている。

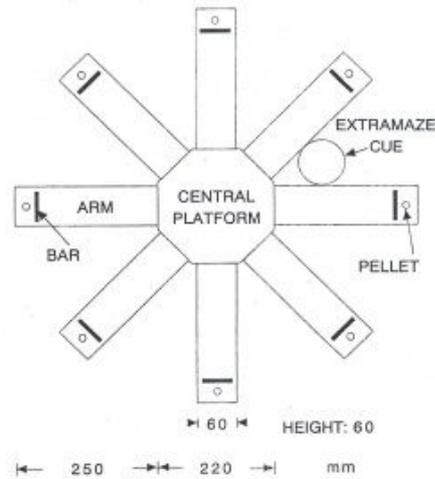
3. 研究の方法

(1)成人の低酸素症時の蘇生時の酸素濃度に違いにより、その後の脳神経障害を引き起こすかどうかを検討し、脳神経障害発症機序を、脳エリスロポイエチン、脳由来神経栄養因子(BDNF)、脳アポトーシスと脳病理組織学的観点から検討する。

(2)治療法の展開として、活性酸素スカベンジャーまたはEPOの投与で、100%蘇生後の脳神経障害が改善できるかどうかを検討する。

(3)8方向放射状迷路は左図のように透明プラスチック製8方向放射状迷路の各迷路の先端に餌を置き、これを取るようにトレーニングを行う。試行は1日1回で、4日間連

続して行う。まだ入ったことのない初めてのアームに入り、餌を食べた場合を正選択、既に餌を取り終えたアームに再び入った場合を誤選択とする。最初の8選択における誤選択数を対照日に対して、比較検討する。



性ホルモンが学習機能に影響を与えるので、雄マウスのみを使用する。

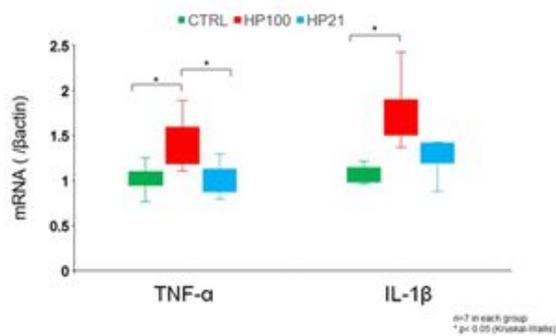
まずは、生後8週齢の雄マウスを特製の低酸素暴露ボックスに入れ、空気(対照)で再酸素化する群と、30分間、8%酸素で曝露する群に分け、その後、30分間、100%酸素で再酸素化する群(100%酸素群)と21%酸素で再酸素化する群(21%酸素群)に分けた。酸素濃度は麻酔ガスモニター(IMI社)で確認した。再酸素化2.5時間後に脳を取り出し、TNF(tumor necrosis factor alpha)、5時間後にIL-1(interleukin-1beta)、9時間後にcaspase-3(アポトーシスの指標)、BDNF(brain-derived neurotrophic factor: 脳由来神経栄養因子)mRNA(N=7)をreal time PCRで測定した。統計学的検討は、一元配置分散分析検定を用いて、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありとした。この実験系は、新生児期のモデルにおいては既に共同研究者の植木正明により実証され報告済みであり、同様の器具とその手技を生かして成人モデルとして本実験を行った。



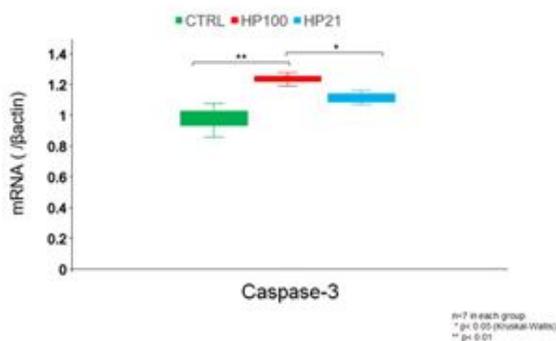
4. 研究成果

100%酸素群は、21%酸素群に比べて、脳組織TNFおよびIL-1 mRNA発現の上昇を引き起こし、caspase-3 mRNA発現も増加させた。しかし、BDNF mRNA発現には両群に差はなかった。

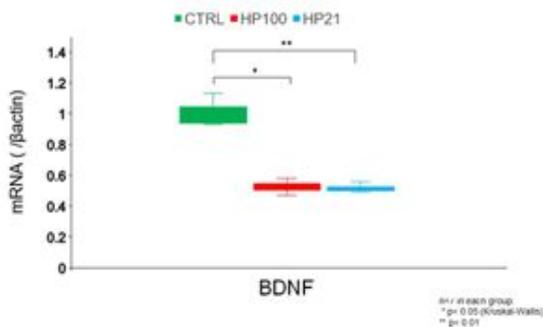
脳TNF- α mRNA IL-1 β mRNA



脳Caspase-3 mRNA



脳BDNF mRNA



成年マウスの低酸素症時の 100%酸素投与が空気に比べて、脳障害を引き起こしているかどうか検討した結果、成年マウス 8%低酸素症時の 100%酸素は 21%酸素と比較して、TNF、IL-1 などの炎症性サイトカインをより増加させ、Caspase-3 を誘導した。このことは、成人低酸素時の蘇生についても、新生児蘇生と同様、21%酸素（空気）からの使用を検討する必要があることが示唆された。

このことで、成人マウスでも新生児期のモデルと同様に 100%酸素により炎症が惹起されることは実証された。しかしながら、現段階では高次機能に及ぼす影響を 8 方向迷路を利用した空間認知学習についての実験が行われておらず、実際の機能障害の実証が得られ

ていない。8 方向迷路学習機能の確認を行うには動物モデルの作成と同時に、熟練した実験遂行者による安定した結果が不可欠であり、前年度の課題として「脳神経障害のモデルの作成と 8 方向放射状迷路の学習実験を積み重ねていくこと」をあげていたが、いまだ学習機能障害についての十分な実験結果を得るにはいたっていない。また、低酸素刺激による活性化される低酸素誘導性転写因子 (Hypoxia-inducible factor-1; HIF-1) の活性低下による内因性エリスロポイエチン (EPO) 不足の関与についてはまだ実験が行われておらず確かめられていない。

一方、治療法への展開としてやむを得ず 100%酸素が必要な状況で、NFkB や AP-1 などの炎症性サイトカインを誘導する転写因子を阻害が有効な治療法となる可能性は示唆された。

これらの課題を含め、今後も可能であれば本研究の実験を継続し 2020 年蘇生ガイドラインへ挑戦を続けたいと思う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshiro Nishimura, Masaaki Ueki¹, Masaki Imanishi, Shuhei Tomita, Masaki Ueno, Jun Morishita and Takashi Nishiyama, Reoxygenation with 100% oxygen following hypoxia in mice causes apoptosis, SHOCK, 査読有(publication in SHOCK) (Apr.28. 2017)

〔学会発表〕(計 1 件)

西村与志郎, 植木正明, 安藤維洋, 岡田直己, 西村侑翼, 比森千博, 大坪里織, 山田克己, 前田裕仁, 西山隆, 成人マウスの低酸素症に対する 100%酸素蘇生は炎症とアポトーシスを惹起する, 第 43 回日本集中治療医学会, 2016 年 2 月 13 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県, 神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 隆 (NISHIYAMA, Takashi)
神戸大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：60243771

(2) 研究分担者

西村 与志郎 (NISHIMURA, Yoshiro)
神戸大学・医学部附属病院・非常勤医師
研究者番号：10566970

植木 正明 (UEKI, Masaaki)
神戸大学・医学(系)研究科・研究員
研究者番号：20213332

富田 修平 (TOMITA, Shuhei)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：00263898

大坪 里織 (OTSUBO, Saori)
神戸大学・医学(系)研究科・研究員
研究者番号：10568819

山田 克己 (YAMADA, Katsumi)
神戸大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：20714645

安藤 維洋 (Ando, Yukihiro)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50719482

岡田 直己 (OKADA, Naoki)
神戸大学・医学(系)研究科・助教
研究者番号：70403293

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()