

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670792

研究課題名(和文)心停止蘇生後病態における代謝変動、細胞調節機構の解明とこれに基づく新規治療法開発

研究課題名(英文)The metabolisms and its regulation mechanisms in post-cardiac arrest syndrome.

研究代表者

堀 進悟(Hori, Shingo)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80129650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット心停止モデルを用い、生存率や行動実験、脳組織を検討した。水素吸入群では、脳機能スコアおよび生存率が対照と比較して著しく改善した。水素吸入は顕著な改善効果を確認した。対照では脳海馬における神経細胞死数、軸索損傷、ミクログリア、および大脳皮質の神経細胞変性やアストロサイトの変化が認められたが、水素群ではそれらが抑制された。ラット出血性ショックモデルにおいても、対照では肺組織のびまん肺胞損傷、肺胞内好中球、赤血球、細胞死組織片、硝子膜形成を伴う上皮基底膜好中球の浸潤をみとめたが水素群ではこれらが軽減していた。一方、マイクロパーティクルは一定したシグナル検出が得られず、今後の検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Rats were subjected to 6 minutes of cardiac arrest followed by cardiopulmonary resuscitation. Survival rate after resuscitation was 38.4% in the control group, 71.4% in the H2 and targeted temperature management (TTM) groups, and 85.7% in the TTM+H2 group. Combined therapy of TTM and H2 inhalation was superior to TTM alone in terms of neurological deficit scores at 72 hours after resuscitation. Neuronal degeneration and microglial activation in a vulnerable brain region was suppressed by both TTM alone and H2 inhalation alone, with the combined therapy of TTM and H2 being most effective. In a hemorrhage shock model, the survival rate was improved in H2 group compared to control group. IL-6 level was increased in the control group compared with sham, but this increase was prevented in the H2 group. Lung of control group showed massive cellular infiltration and edema in the interstitial area and associated thickening of the alveolar septum. These changes were less severe in H2 gas group.

研究分野：救急医学

キーワード：水素 院外心停止 心停止後症候群 出血性ショック

1. 研究開始当初の背景

本研究課題は、極めて予後不良な心停止蘇生後患者の増加という国際公衆衛生上の課題を解決する糸口を提供する。現時点で心停止蘇生後に対する唯一の治療として低体温療法があるが、その効果は十分とは言えず、脳・心臓後遺症のため社会復帰率も低く、生命予後は極めて不良である。心停止蘇生後病態の本態は、一次虚血とそれに引き続く全身性虚血再灌流障害、全身性炎症反応の進展によって起こる全身臓器の **Necrosis/Apoptosis** および血管内皮障害であり、かつ、それぞれのクロストークであることが近年報告されている。近年、侵襲下の血管内皮障害の増悪における **Microparticles (MP)** の重要性が示されている。MP とは、高度の侵襲により、血小板、好中球、血管内皮細胞等の活性化/傷害により細胞表面から放出される、直径 **0.1-1 μ m** の脂質・蛋白結合体である。蘇生後には神経内分泌系、血液凝固線溶系、炎症免疫担当細胞が活性化される。したがって、心停止蘇生後の生体反応を理解するうえで酸化ストレスや組織(血清)サイトカイン変動、MP の動態を解明することは極めて重要である。一方、我々は、心停止蘇生後モデルを用いて、新たな抗酸化物質である水素ガス(Ohsawa I. Nat Med, 2007; 13: 688-694)の吸入が抗酸化作用を有し、脳機能・心機能の改善効果を有することを報告した(Hayashida K. JAHA.2012,1(5);e003459)。そこで本研究においてはすでに当教室で確立されている蘇生後ラットモデルを用いて、プロテオーム解析、FACS (fluorescence activated cell sorting)を用いた MP の生体変動と水素吸入療法の作用機序を解明し、その理解に基づく蘇生後症候群の新たな治療法の確立を目指す。

2. 研究の目的

蘇生後病態における、免疫生体変動、MP 生体内変動と血管内皮障害のクロストークを介した臓器不全発症機構の解明を目指す。具体的には、サイトカイン上昇と血小板由来 MPs、好中球由来 MPs の発現から **ICAM-1** 等を介した全身臓器の **Necrosis/Apoptosis** および血管内皮障害の増悪機序を検討する。さらに、既に有効であると考えられている水素吸入を用いて、網羅的オミクス解析等を用いて、新規治療標的の探索を目指す。本研究は、心停止後症候群を全身性虚血再灌流障害と血管内皮障害のクロストークとらえ、その病態を MP に注目して解明すること、さらに新規ラジカスカーベンジャーである水素吸入を用い、蘇生後の生命予後および機能予後改善を目的に掲げた基礎的研究である。水素吸入は、心停止蘇生の他の処置の妨げにはならず、かつ、現時点で心停止蘇生後症候

群の治療に唯一有効性が確認されている低体温療法との併用も可能であり、我々の先行研究では低体温療法と相加的効果を認めている。また、水素吸入は、低体温療法と違って大掛かりな装置や高度の医療技術を必要とせず、より多くの施設で導入が可能であり、また、水素ボンベを救急車に搭載することによって、救急車の中での蘇生術中から開始する事も可能である。水素吸入の有効性が確認されれば、現在、増加の一途をたどる心停止蘇生後患者の予後の改善に多大な貢献をもたらすことが期待される。本研究において心停止蘇生後の病態が解明され、心停止後症候群の新規治療法の提案が可能となれば、その社会的意義は極めて大きい。

3. 研究の方法

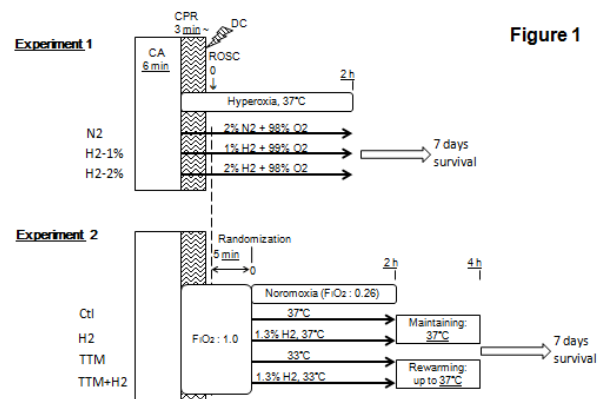
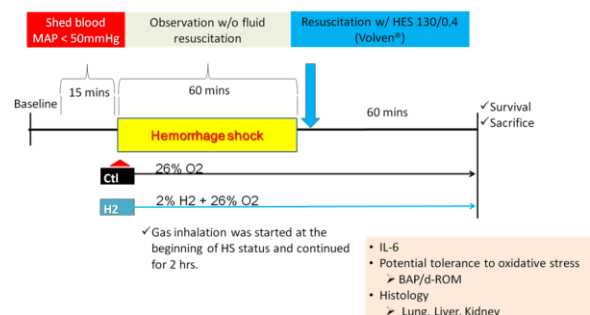


Figure 1

ラット心停止蘇生後モデル:水素吸入の適正濃度、適正開始時期、非高濃度酸素投与下での有用性の検証を行った。心停止モデルでは **Wister ST rat** オスを用いて経皮的心外膜電気刺激による心室細動モデル(心停止 6 分間)を作成し、3 分間の用手的胸骨圧迫後に電氣的除細動を行い蘇生する。混合ガスの吸入は蘇生後 5 分後より開始した。(Fig 1)

Fig 2



大量出血ショックモデル: **SD** ラットを用いて、左内頸動脈、大腿静脈にカニューレションをおこなった。人工呼吸器による調節呼吸下で、内頸動脈より脱血を行い平均血圧 **30mmHg** を 60 分間維持し、出血性ショックモデルを作成した。ショック後に脱血量の 4 倍量の生理食塩水による輸液蘇生を行い、蘇生後 3 時間の生存率を比較した。さらに、経時的採血を行い、各種解析を行った。

4. 研究成果

ラット心肺停止モデル

蘇生後 7 日間経過観察を行い、行動機能検査、生存率や行動実験、脳組織を検討した。水素ガス吸入群では、脳機能スコアおよび生存率が対照グループのラットと比較して著しく改善した。水素吸入効果は、低体温療法とほぼ同等であり、さらに水素吸入と低体温療法を併用することによって最も顕著な改善効果を認めた。また、行動試験の結果、水素吸入により、対照グループと比較して行動量や認知機能の低下が抑制された。(Fig 3)

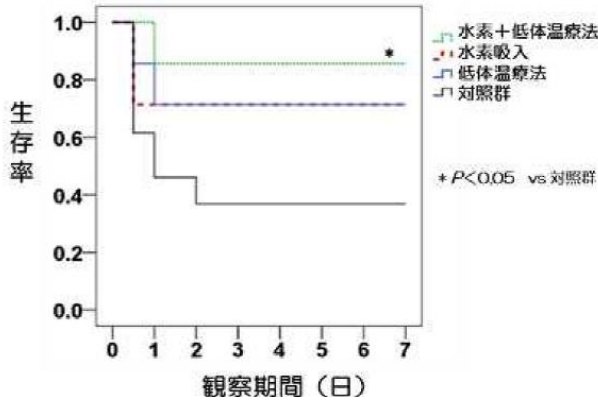


Fig 3

さらに蘇生 7 日後の脳組織学的検討を行い、脳海馬における生神経細胞数、軸索損傷、ミクログリア、および大脳皮質の神経細胞変性やアストロサイトの変化を各グループ間で比較した。対照グループでは神経細胞死や炎症反応が著明に認められたのに対し、水素群ではそれらが抑制された。さらに低体温療法と水素を組み合わせたことにより最も高い効果を認め、行動実験や生存実験の結果を裏付けるものと考えられた。(Fig 4)

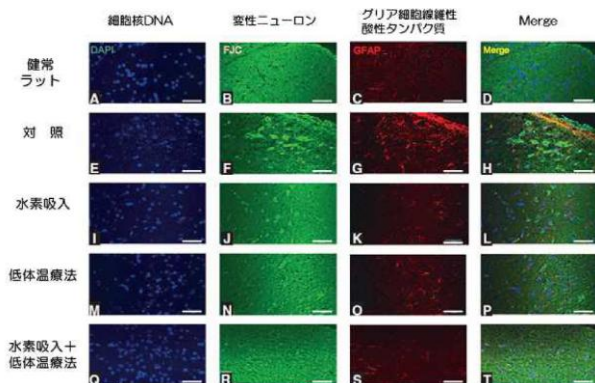


Fig 4

外傷性大量出血モデル

抗酸化作用を有する水素吸入を行った群では、酸素吸入群と比較し、循環動態、動脈血 pH, BE, 乳酸値に差を認めなかったが、生存率の有意な改善をみとめた (Fig 5)。

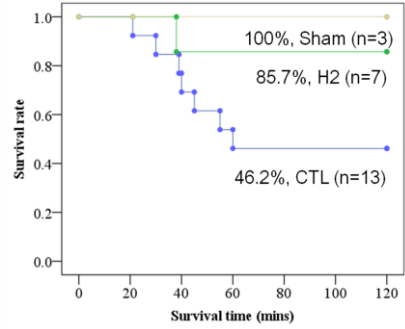


Fig 5

水素群では、2 時間後の血清 IL6 値、及び dROM/BAP 値が有意に改善した。(Fig 6)

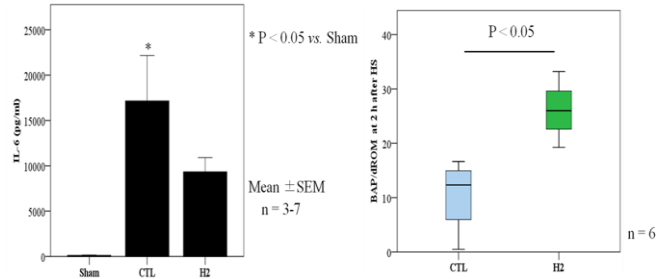


Fig 6

さらに、対照群では肺組織におけるびまん肺胞損傷、肺胞内好中球、赤血球、細胞死組織片、及び硝子膜形成を伴う上皮基底膜好中球の浸潤を認めたが水素群ではこれらの所見が軽減していた。(Fig 7)

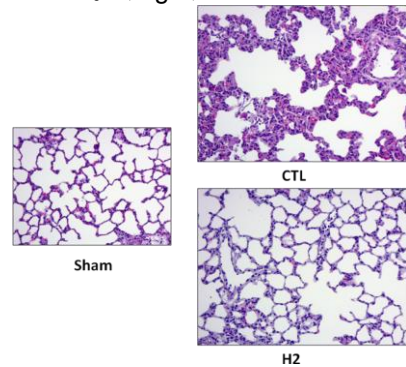


Fig 7

また、上記モデルにおける MP の検出では、一定したシグナル検出結果が得られなかった。今後の課題として、侵襲程度や測定タイミングを検討する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Ohta S, Fukuda K, Hori S. Hydrogen inhalation during normoxic

resuscitation improves neurological outcome in a rat model of cardiac arrest independently of targeted temperature management. 査読有 Circulation. 2014 9;130(24):2173-80. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011848.

〔学会発表〕（計 2 件）

①Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Ohta S, Fukuda K, Hori S. Inhalation of H2 Gas Starting After Resuscitation Under Normoxia Improves Neurological Outcomes in a Rat Cardiac Arrest Model. Science Session 2014, American Heart Association, Chicago, IL, USA; November 2014.

②林田敬, 佐野元昭, 太田成男, 鈴木昌, 福田恵一, 堀進悟: 心停止蘇生後症候群に対する脳低体温療法と水素ガス吸入療法: トランスレーショナルリサーチ(HYBRID study). 第41回日本集中治療学会、国立京都国際会館（京都府・京都市）; 2014年2月.

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀 進悟 (HORI SHINGO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80129650

(2)研究分担者

佐野 元昭 (SANO MOTOAKI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：30265798

鈴木 昌 (SUZUKI MASARU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70265916

(3)研究協力者

林田 敬 (HAYASHIDA KEI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20445258