

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462743

研究課題名(和文) 蘇生後症候群へのスタチンの多面効果：水溶性と脂溶性の比較

研究課題名(英文) Statins for post cardiac arrest syndrome

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HMG-CoA還元酵素阻害剤であるスタチンはコレステロール値を下げる作用のみならず、血管保護、抗炎症、抗酸化作用など多岐に及び、蘇生後の病態を改善する可能性がある。マウスを用いた心肺停止モデルで蘇生後のスタチン投与が臓器に保護作用があるかどうかを調べた。蘇生後に水溶性スタチンと脂溶性スタチンを併用投与したところ炎症性サイトカインの抑制、一酸化窒素合成酵素の誘導が見られ、短期生存率が改善した。併用スタチンは蘇生後の脳浮腫を軽減し、脳の海馬と線条体の組織障害を減らした。蘇生後のスタチン投与が予後を改善させる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) exert numerous pleiotropic effects and have been shown to attenuate ischemic injury in different rodent models of stroke. This study was conducted cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation (CA/CPR) in mice and tested the hypothesis that statins after CPR improves survival rate and neurological outcomes. Combined treatment with hydrophilic and lipophilic statins improved survival rate and neurobehavioral scores at 4 days after CPR. Statins also decreased inflammatory cytokines, upregulated Nitric Oxide Synthase, and attenuated brain edema and histological damages in the striatum and hippocampus. These data suggest that statins after CA/CPR would be beneficial in the post resuscitation phase via systemic pleiotropic effects including anti-inflammatory response and stabilize vascular reactivity.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：心肺蘇生 スタチン

1. 研究開始当初の背景

心肺停止蘇生後に社会的に復帰可能な割合は6%台と非常に低い。蘇生後脳症に対する薬物治療は未だ確立されていない。HMG-CoA還元酵素阻害剤であるスタチンはコレステロール値を下げる作用のみならず、血管保護、抗炎症、抗酸化作用など多岐に及び、蘇生後の病態を改善する可能性がある。

2. 研究の目的

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。蘇生後のスタチン投与が臓器に保護作用があるかどうかを調べた。

3. 研究の方法

(1) マウス心停止・蘇生モデル

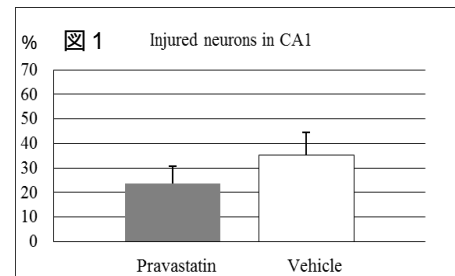
マウス(オス、体重20-30g、C57bl/6)にセボフルラン2%とペントバルビタール25mg/kg腹腔投与し全身麻酔後に気管挿管し人工換気を行った。右内頸静脈からPE-10カテーテルを挿入した。左側頭筋内に温度測定のプロローベを挿入、心電図、直腸温計を装着。酸素、空気、セボフルランで人工換気し、10分間の安定状態を保った後、中心静脈から塩化カリウム(0.05ml 0.5M)を注入し心停止を誘発した(心電図、動脈圧の低下で確認)。心停止時間は8分とした。8分後、純酸素で人工呼吸を再開、エピネフリン0.5ml(16µg/ml)を30秒間で中心静脈から投与、1分間に300回の心臓マッサージを開始した。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60mmHg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1時間後に各種スタチンを投与した。対照群として同量の生理食塩水投与群と比較した。蘇生4日後に行動学的解析を施行後、再度全身麻酔下に灌流固定して脳を摘出し、Hematoxylin and eosinで染色し、組織学的な障害を評価した

4. 研究成果

プラバスタチン(水溶性)3mg/kgの静脈内投与を蘇生1時間後に行う実験：蘇生4日後

- 生存率:プラバスタチン群(以下P群、n=18)が72%と生理食塩水投与群(以下NS群、n=24)の46%と比較して有意に高かった
- 神経行動学的評価(0良 20悪):P群はNS群と比較して有意に良好であった(P群 vs NS群: 3点 vs 8点、中央値)
- 海馬の組織障害:有意差なかった(図1)

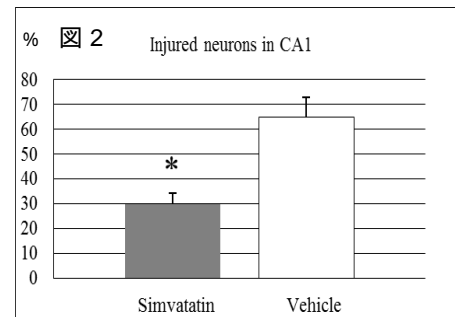
図1 海馬CA1における神経障害発生頻度



シンバスタチン(脂溶性)40mg/kgの皮下注射を蘇生1時間後に行う実験：蘇生4日後

- 生存率:シンバスタチン群(以下S群、n=13)が77%と生理食塩水投与群(以下NS群、n=11)の64%と有意差なかった
- 神経行動学的評価(0良 20悪):有意差なし(S群 vs NS群: 6点 vs 6点、中央値)
- 海馬の組織障害:S群で有意に障害が少なかった(S群 vs NS群: 30±25% vs 69±31%) (図2)

図2 海馬CA1における神経障害発生頻度



水溶性スタチン投与群では全身状態が良好であったが、脳障害は有意差がなかった。一方、脂溶性スタチン投与群では全身状態は対照群と変わらなかったが、脳障害は少なかった。

水溶性と脂溶性の違い:水溶性スタチンは脳血液関門(BBB)を通らないとされている。一方、脂溶性スタチンは脳内に作用することが出来る。このためシンバスタチン群では海馬の組織障害を抑制できた可能性がある。水溶性であっても虚血後のように血管内皮細胞壁が障害されている場合、そこから細胞内へ移行し、血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)を活性化して抗炎症作用・血管内皮機能改善・組織保護に働く事が知られている。さらに水溶性スタチンはタンパク結合率が低く、フリー体としての活性が脂溶性スタチンより高い。このため、虚血後の脳以外の臓器で水溶性スタチンが保護的に働き、全体の生存率の高さと神経行動学的所見の改善につながった可能性が示唆された。

投与量について：脂溶性スタチンは細胞への取り込みの高さから、副作用として細胞毒性やアポトーシス誘導が示唆されている。今回の投与量が高用量だったため、全体の神経行動学的所見の悪化を引き起こした可能性もある。投与量を減らせば脳以外の臓器に保護的に働く可能性がある。水溶性スタチンは副作用も少なく、BBBが破綻した場合には脳内にも作用して脳浮腫を軽減した報告もあるので、投与を増やすことにより脳細胞に対しても保護的に働く可能性もある。

上記から水溶性スタチンと脂溶性スタチンを併用投与する実験を行った。

水溶性スタチンであるプラバスタチン(P)3mg/kgを静脈内投与、脂溶性スタチンであるシンバスタチン(S)10mg/kgと減量したものを皮下投与した(SP群)、対照として生理食塩水を投与した群(NS群)と比較検討した。

- 生存率は SP 群が有意に高かった(SP群:67% vs NS群:50%)。
- 神経行動学的評価(0良 20悪): SP群は NS群に比較して有意に良好であった(P群 vs NS群: 4点 vs 8点、中央値)
- 海馬 CA1 領域における細胞障害は SP群が有意に少なかった(SP群:12±23% vs NS群:36±31%, P<0.05)、線条体においても細胞障害は SP群が有意に少なかった(SP群:23±11% vs NS群:42±17%, P<0.05)。(図 4,5)

図 4 海馬 CA1 における神経障害発生頻度

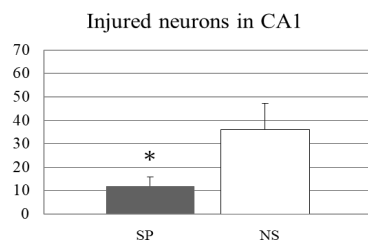
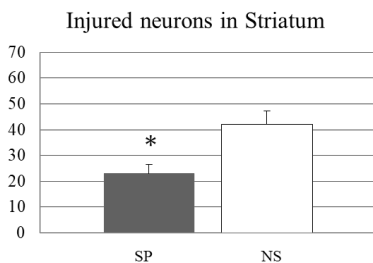


図 5 線条体における神経障害発生頻度

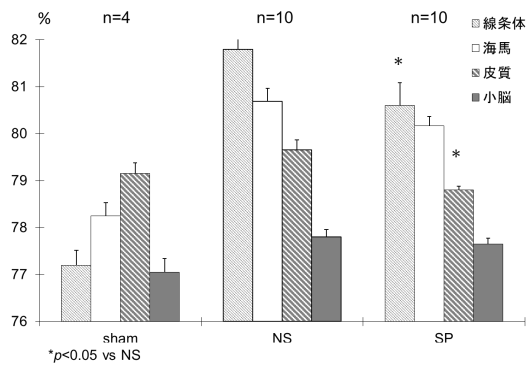


同様に水溶性スタチンと脂溶性スタチンを併用投与した場合の蘇生後の脳水分量を評価した。蘇生 1 時間後にプラバスタチン 3mg/kg を静脈投与、シンバスタチン 10mg/kg を皮下投与した (SP 群)、対象として生理食塩水を投与した群 (NS 群) と比

較した。蘇生 24 時間後に wet to dry 法を用いて脳水分量を測定して脳浮腫の有無を比較検討した。

【結果】 NS 群では蘇生後の脳水分量が線条体、海馬、皮質において有意に sham 手術群より増加し脳浮腫を生じていた。SP 群では線条体と皮質の水分量が NS 群より有意に低下していた (図 6)。

図 6 脳の部位別水分量



蘇生後の水溶性+脂溶性スタチンの併用投与により蘇生後の脳浮腫が軽減された。機序としてスタチンの抗炎症作用による脳血管関門の安定化が考えられた。

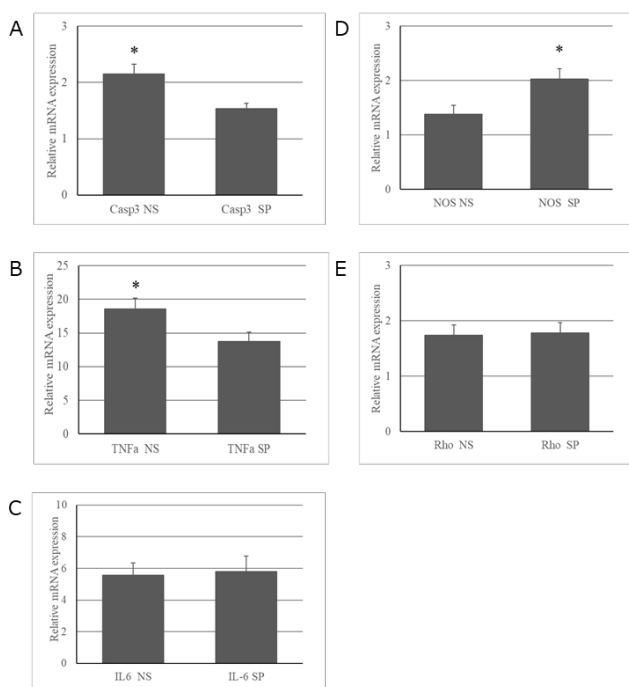
次に水溶性スタチンと脂溶性スタチンを併用投与した場合の蘇生後の脳内酵素やサイトカインを RT-PCR 法を用いて蘇生 6 時間後に計測した。

【結果】

アポトーシスの進行に重要な因子であるカスパーゼ 3 (Casp 3) (図 7A) とサイトカインの TNF は SP 群で有意に低かった (図 7B)。IL-6 は両群で有意差なかった (図 7C)。一酸化窒素合成酵素 (NOS) は SP 群で有意に高かった (図 7D)。Rho キナーゼは両群で有意差なかった (図 7E)。

経時的なサイトカインや酵素の推移を調べてはいないが、蘇生後早期からサイトカインが抑制されて、スタチンによる抗炎症作用や一酸化窒素 (NO) 産生増加による血管内皮機能の改善、抗酸化作用により心血管の安定化に寄与した可能性がある。

図 7 蘇生後の脳内酵素、サイトカインの mRNA 発現量



【結論】

マウス心停止・蘇生モデルにおいて水溶性のプラバスタチン 3mg/kg を静脈内投与、脂溶性のシンバスタチン 10mg/kg を皮下投与した併用投与によって蘇生後の短期生存率を改善し、脳の組織障害と脳浮腫を軽減した。投与量が多いと生存率が下がったので今後の展望として至適投与量と長期予後について調べる必要がある

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. Pravastatin Improves Short-term Survival Rate Following Cardiac Arrest and Cardiopulmonary Resuscitation in Mice. Presented at the International Stroke Conference 2015, February 2015

中山 慎, 田口 典子, 井坂 由美, 田中 誠
マウス心肺停止・蘇生モデルを用いた脂溶性スタチン(シンバスタチン)の脳保護効果: 日本麻酔科学会第 61 回学術集会、2014 年 5 月 15 日、横浜

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

(2)研究分担者

田口典子 (TAGUCHI Noriko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号: 90569774