

高圧酸素治療の新展開 治療効果の分子メカニズム

四ノ宮 成祥

要 旨

高圧酸素 (HBO) 治療の主な目的は、溶存酸素の量を増すことにより循環不全に陥って酸素供給の減少した組織の再酸素化を図ることにある。HBOの効果に関しては、種々の疾患において臨床的、生理学的な側面からの解析はなされているが、分子的な観点からの細部のメカニズムについては良く解っていない。本稿では、HBOの有効性を説明する分子的なメカニズムについての最近の研究成果を紹介する。これには、HBOの効果は接着分子の発現、一酸化窒素産生、細胞死誘導、熱ショック蛋白応答に及ぼす影響などを含んでいる。また、一酸化炭素中毒における遅延型神経障害の発症メカニズムについて自己免疫機序からみた仮説についても述べる。これらに加えて、既に適応が認められているものも含め種々の疾患に対するHBO治療の適応についての問題点も提起した。

キーワード：高圧酸素治療，虚血再灌流障害，一酸化炭素中毒，接着分子，一酸化窒素

Recent Evolution of Hyperbaric Oxygen Therapy Molecular Mechanisms of Effectiveness

Nariyoshi Shinomiya

Department of Microbiology, National Defense Medical College, Namiki 3-2, Tokorozawa, Saitama 359-8513, JAPAN

The main purpose of the hyperbaric oxygen (HBO) therapy is to increase the amount of dissolved oxygen in the tissues where circulation and oxygen supply is interrupted. Although the effects of HBO on various diseases have been analyzed in terms of clinical and physiological approach, its precise mechanism especially from the molecular aspect is still to be investigated. In the present paper, recent progress in the research about molecular mechanisms that explain the effectiveness of HBO therapy is introduced. This includes the effects of HBO on the expression of adhesion molecules, nitric oxide production, induction of

apoptotic cell death, heat shock protein response, and so on. New hypothesis about the pathological mechanism of delayed neuro-logical sequelae of the carbon monoxide poisoning is also described from the viewpoint of autoimmune response. In addition, problems about the clinical indication of HBO therapy against various diseases including approved cases are raised.

Keywords :

hyperbaric oxygen therapy
ischemia/reperfusion injury
carbon monoxide poisoning
adhesion molecules
nitric oxide

はじめに

高圧酸素 (hyperbaric oxygen : HBO) 治療は、一言でいえば高圧酸素を吸入することにより組織や細胞の酸素化の改善を図る治療法である。その

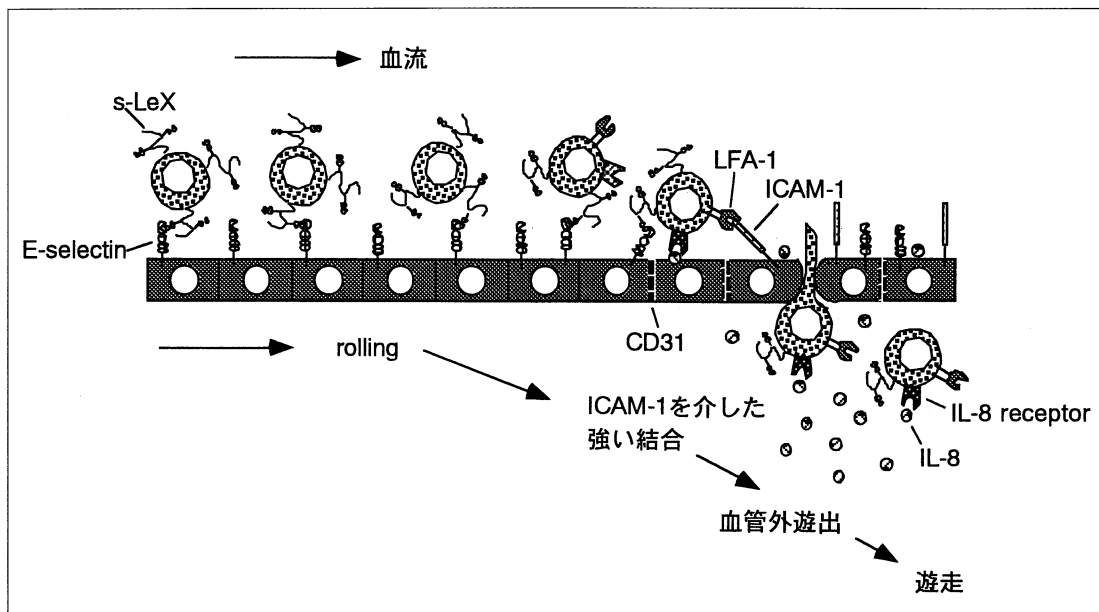


図1 白血球の接着と血管外遊出

IMMUNOBIOLOGY. Chapter V. The Immune System in Health and Disease. by Janeway Jr. CA and Travers P 文献3) から引用改変。

効果メカニズムとしてはこれまで、循環血中の溶解型酸素の増加による組織の酸素供給量の改善が主たる役割を果たすものと考えられてきた。一方で、血液酸素分圧の増加は末梢血管抵抗性の増大を招き、組織血流量の減少を来して溶解型酸素の増加による効果を相殺することが予想される。しかしこれに対しては、病巣部では正常組織と異なり血流調節の面でHBO治療が有利に働くということが実験的にも臨床的にも示されている。

ただ、従来の解析ではHBO治療による効果として組織の酸素化以外の点では詳細なメカニズムが不明のままであった。しかしながら近年、分子レベルでの解析が進歩し、HBOの新たな効果メカニズムが解明されつつある。たとえば、HBOに白血球 β_x integrin機能を抑制する作用があることが示され、虚血再灌流後の血管内皮細胞に対する炎症細胞の接着阻害が組織障害性の抑制に繋がることが解ってきた。また、一酸化炭素(carbon monoxide:CO)が脳に及ぼすメカニズムに一酸化窒素(nitric oxide:NO)が関与していることが明らかとなり、CO中毒に対するHBO治療の有効性としてNO合成酵素(nitric oxide synthase:NOS)産生の調節が示唆されている。さらに、CO中毒によ

る神経障害のメカニズムとして自己免疫的機序が考えられるようになってきた。

本総説では、脳脊髄疾患や虚血性心疾患に関連する病態として近年その詳細が明らかにされつつある虚血再灌流障害モデルおよびCO中毒を取り上げ、HBO治療の効果メカニズムを分子面からみた切り口で紹介したい。さらに、HBO治療の適応に関する問題点についても論じてみたい。

HBOと接着分子

血管内皮細胞に対しHBO処理をすることにより、その細胞上にはintercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)などの接着分子の発現が増強し、好中球を中心とした炎症細胞の接着とこれに引き続く血管外への遊走が起きることが報告されている^{1,2)}。炎症細胞の血管外への遊走は組織傷害性と密接に関わっており、過剰な酸素ストレスによる組織障害の主要な鍵を握っているものと考えられる。一般に炎症細胞の接着とそれに引き続く血管外への遊走は、図1に示すようないくつかのステップに分けられる³⁾。最初のきっかけは内皮細胞側に発現するE-selectinと白血球上の糖鎖リガンド(sialyl Lewis X:s-Le^x)との弱い接着でrollingと

呼ばれる。通常では血流があるためrollingのみでは内皮細胞上に白血球を繋ぎ止めておくことは困難で、血管内皮上をコロコロと転がるように流れていってしまう。しかし、ここで内皮細胞側にICAM-1などの接着分子発現があると白血球上のこれに対するリガンド（LFA-1やMac-1）を介した強い結合が起き、細胞は内皮上に繋ぎ止められる。この強い接着によりrollingは止まり、引き続く血管外遊出が起きる。このステップには内皮細胞間隙に発現するCD31が関与し、最終ステップの遊走にはIL-8などのケモカインの濃度勾配が重要な働きをしているものと考えられている。このように、内皮細胞上のICAM-1発現状態は白血球の血管外遊走の鍵となる強い接着のステップに関わっており、組織の炎症を制御しているといっても過言ではない。

我々は、マウスを用いた実験でHBOの肺血管内皮細胞ICAM-1発現に及ぼす影響を免疫組織化学的に検討し、早期から発現の上昇がみられることを報告している⁴⁾。しかしながら奇妙なことに、血管内皮にこのような接着分子発現の増強がみられるにも関わらず肺胞内への白血球浸潤は全く認められず、HBO曝露後48時間の観察期間中の肺胞洗浄液検査では99%以上が正常に存在する肺胞マクロファージであった。この結果は、血管内皮細胞の傷害の程度が白血球接着を促すのに十分ではなかったと解釈することもできるが、ICAM-1発現の程度を見る限りでは理解が困難であった。しかし、Pennsylvania大のThomのグループを中心とした解析によりHBOが白血球 β_2 -integrinの機能を抑制することにより、内皮細胞に対する接着を阻害する可能性が示され、新たな面からHBOの効果が考えられるようになってきた⁵⁷⁾。 β_2 -integrinはICAM-1に対する白血球側のリガンドであるLFA-1およびMac-1を構成する重要な分子であり、この分子機能の抑制は接着能の低下に直結する。彼等によれば、cyclic GMP合成の低下を介して好中球 β_2 -integrin機能の低下が起きており、またHBOによる白血球の内皮細胞への接着抑制作用はCO中毒によって傷害を受けた脳など障害血管部位に有意に効果があることが示されている。また、好中球のサイトカインシグナルに対する応答性は微小環境中の酸素張力に敏感であるとの報告もあ

り^{8,9)}、HBOによる組織の酸素化が遊走能に影響を与えている可能性も考えられる。

塩谷と太田による古典的な実験では、高酸素分圧曝露によりラット肺胞中に好中球を中心とした炎症細胞の浸潤を認めている¹⁰⁾。彼等の実験は高酸素分圧への長時間持続的な曝露であり、活性酸素障害による内皮細胞の傷害がその基礎に存在している。一方、我々の実験系では接着分子の発現増強は一過性で24時間後にはほぼ正常レベルに戻っていた。このことから、短時間のHBO曝露では内皮細胞傷害にまで至らなかったものと考えられる。

Burasらは血管内皮細胞培養系を用いるとにより、接着分子(主としてICAM-1)発現に対するHBOの影響について検証している¹¹⁾。血管内皮細胞は低酸素/低血糖に曝されると好中球の接着性が高まるが、HBO処置によりその接着を抑制することができる。HBOは内皮型NOS (endothelial NOS: eNOS) の産生を高めることによりICAM-1発現を負に調節していると考えられる。我々の実験ではHBOによりICAM-1発現は増強して彼等の結果とは一見矛盾するようにみえる。しかし、HBOの程度や時間が異なることや、対象としている内皮が我々の実験の場合には正常内皮であるのに対し彼等の場合には既にダメージを受けた後の内皮であることなどの違いが影響しているものと考えられる。HBO治療効果を考える際には、このように正常部位と障害部位との内皮細胞の応答性の違いにも着目する必要があるものと考えられる。

近年、ラット中大脳動脈occlusion modelを用いた実験で、HBO前処置群で梗塞巣のvolumeが有意に抑制されることが証明されている¹²⁾。また、接食量の改善により体重増加および前肢麻痺の改善率に有意な効果が認められている。そのメカニズムの一つとして再灌流後の血管内皮細胞に対する白血球接着の阻害が関係しているものと考えられている。

HBOと虚血再灌流障害 (ischemia/reperfusion injury)

現在までのところ虚血再灌流障害に対してHBO治療が有効であることが経験的に知られているが、本当の意味でその分子メカニズムは解ってい

ない。実験的に虚血再灌流障害モデルを作りその組織への影響を調べてみると、内皮細胞傷害に伴う接着分子発現や好中球のintegrin発現増加により炎症が惹起されることが解る^{11,13)}。しかし、虚血再灌流による組織の傷害にはこのような炎症性の変化だけでなく、NOを介した血流調節・活性酸素消去、apoptosisなどの細胞死の機構、熱ショック蛋白応答などが関わっていることが明らかになってきている。

1. 虚血再灌流障害とNO動態

虚血再灌流障害は梗塞部位周辺に更なるダメージを与えるばかりでなく、血栓溶解治療の機会を制限する要因ともなっている。マウス実験モデルを用いた解析では、梗塞部位において血流が再開する時にNO産生の亢進がみられることが知られている。この場合、脳虚血後の再灌流時にNOS阻害剤を投与するとにより梗塞巣のvolumeを大幅に減少することができる¹⁴⁾。このような梗塞巣の減少はN (omega)-nitro-L-arginine (L-NA) のような非選択的NOS阻害剤ではみられるが、神経型NOS (neuronal NOS: nNOS) 特異的阻害剤である7-nitroindazole (7-NI) ではみられないことから、再灌流障害の本質は脳血管部分にあるものと考えられる。また、再灌流障害をEvans blueの血管外漏出やmatrix metalloproteinase-9の発現など血管傷害の面から評価しても、L-NAの有効性が証明されている。しかし、虚血処置前に7-NIを投与しておくことと梗塞巣は縮小することから、虚血中のnNOSも障害に関与していることは事実である。また、ラットを用いた実験において虚血再灌流後にできるpenumbra領域において活性酸素が有意に上昇していることが示されている。このような活性酸素上昇はNOS阻害剤であるL-N (G) nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) により抑制されることから¹⁵⁾、penumbra領域における活性酸素増加にはNOS依存性のメカニズムが働いているものと推察される。

一方これとは逆に、NOはラジカルに対し細胞保護的に働いているとする考え方がある¹⁶⁻¹⁸⁾。これらの報告によれば、虚血再灌流時の組織障害には酸素フリーラジカルの増加が原因として関わっており、この時周辺に産生されるNOがラジカル消去に当たるといふ実験結果が得られている。また、

ネコを用いたモデルでL-arginineおよびL-NAMEが神経症状に改善を与えなかったことからglobal ischemia後の脳障害にはNOの関与は重要でないとする報告もある¹⁹⁾。このように、虚血再灌流障害におけるNOの関与に関しては実験系によって全く逆の結論が導き出されてることから、その結果解釈は慎重にならざるを得ない。これは種々の要因が複雑に絡み合っているため^{20,21)}、虚血再灌流障害時のNOSの動態を含めたNO分子の病態関与については今後のさらなる研究の展開を待つ必要があるものと思われる。

過度のHBOは脳障害をもたらす、痙攣など種々の脳酸素中毒症状の原因となる。既にいくつかの報告でみられるように、脳におけるNOの上昇はGABA poolの減少や活性酸素産生と並んで障害プロセスに重要な変化と位置づけられている^{22,25)}。また、これらの報告ではNOS阻害剤の投与により脳酸素中毒症状を抑制することに成功している。その一方で、虚血再灌流障害に対してHBO治療が有効であるとの報告が多数みられる^{26,35)}。HBO治療がどのようなメカニズムによって効果を発揮しているか未だ明確な証明はないが、その一つのメカニズムとしてHBOによるNO産生刺激作用が関わっているとする考えがある。近年Curryらはラットを用いて骨格筋系に虚血再灌流障害のモデルを導入し、HBO治療がNO産生に与える影響を観察している³⁶⁾。この実験系では4時間の虚血後90分の再灌流を行い、HBO治療群は再灌流中に2.5atmの酸素を与えている。対照群では再灌流90分後の血清NO量はむしろ減少傾向にあったのに対し、HBO治療群ではNO量の増加を認めている。

2. 虚血再灌流後の組織における細胞死 (apoptosis)

虚血再灌流後の脳組織における細胞死については、海馬領域において研究が盛んになされている。特に、一過性の前脳虚血モデルにおいては、海馬のCA1ニューロンに遅延型の細胞死が起きることが知られている。海馬のCA1ニューロンは生理的条件下でTGF- β 1を発現しているが、虚血の影響によりその発現は増強する。一過性前脳虚血では、この内因性に発現されるTGF- β 1の働きによりDNA断片化を伴う細胞死が誘導される³⁷⁾。また、CA1細胞特異的な遅延型細胞死のメカニズム

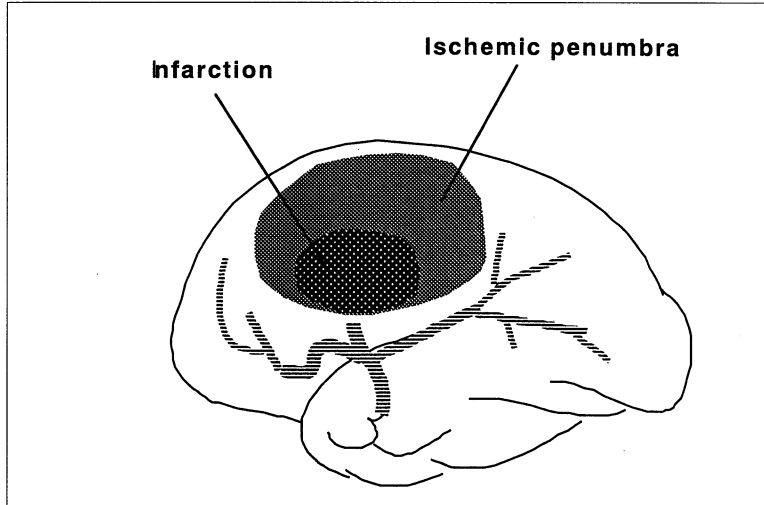


図2 虚血障害時におけるischemic penumbraの存在
 中大脳動脈閉塞モデルにおいて、梗塞巣の周辺に細胞活動は低下しているがnecrosisにはいたっていないischemic penumbraが存在する。

としてこの細胞特異的にBax遺伝子の発現を認めるという報告もある³⁸⁾。さらに、マウス神経細胞にBcl-2遺伝子を過剰発現させて全脳虚血後の障害を調べた場合、海馬神経細胞特異的に虚血耐性の増加を認めたことから³⁹⁾、この領域の細胞死感受性が特に高いことが伺える。虚血再灌流後に海馬でみられる細胞死にはnucleosomeレベルでのDNA断片化が認められている⁴⁰⁾。また、これらの神経細胞死はcaspaseの活性化を伴うことから、プログラム細胞死(いわゆるapoptosis)のメカニズムが働いているものと推察できる⁴¹⁾。特に、海馬に存在する高感受性ニューロンではcaspase-9の活性化およびミトコンドリアから核へのtranslocationがみられ、cytochrome c依存性の細胞死が進行していることがわかる⁴²⁾。一方で、選択的な神経細胞死にはチロシンキナーゼ系のdysregulationが関わっているという報告もみられる⁴³⁾。

このような虚血再灌流後の神経細胞死に対するHBOの効果の詳細は不明で、虚血耐性の獲得という面ではむしろ次項に示す熱ショック蛋白応答の面からの解析が進んでいる。In vitroにおける細胞を用いた実験では、HBOはHL-60細胞やJurkat細胞などの免疫細胞に対し自発性・誘発性のアポトーシスを増強する効果があることが報告されている。その理由はHBO処理による細胞内の酸化活性

の増加によるものと考えられている⁴⁴⁾。このように、HBO治療は炎症部位における免疫細胞の細胞死を増強することにより創傷治癒の促進効果を示すものと解釈することができるが、逆に虚血再灌流後の神経細胞死の点から考えればapoptosisの促進はかえって有害であることになる。

3. 虚血再灌流障害と熱ショック蛋白(heat shock protein: Hsp)発現

脳における虚血障害を論じる際には“penumbra”という言葉が良く使われる。これは電気的には静止状態にあるがまだ生存している梗塞巣周辺の比較的血流が存在している部位に対してしばしば用いられる(図2)⁴⁵⁾。Penumbraの部分で温存し梗塞巣の拡大を如何に防ぐかはその後の脳機能に重大な影響を及ぼす事象である。一般に、神経細胞が虚血障害を回避するためには早期に脳蛋白の合成を回復する必要がある。熱ショック蛋白は正常な蛋白の高次構造維持に必須の役割を果たす細胞内蛋白で、虚血によりダメージを受けた細胞に強く発現して機能することが予想される。Hsp 70がcortical penumbraにおいて特異的に発現しているとの報告⁴⁶⁾や、回復可能な程度のダメージの神経細胞に優先的に発現しているという報告⁴⁷⁾はこのことを裏付けている。また、免疫組織化学的手法により熱ショック蛋白発現の細胞特異性について

も調べられている。Hsp-72は神経細胞特異的に発現が上昇しておりastrocyteではみられないとする報告がある⁴⁸⁾。一方で、Hsp-27は虚血耐性とは直接関係がなく、組織染色で増強しているHsp-27はCA1細胞周辺に浸潤してきた、反応性のastrocyteに発現されている^{49,50)}。

このような虚血性脳障害実験モデルが提唱される中、虚血耐性に関わる因子の解析も進められている。Currieらは永続的な中大脳動脈閉塞モデルを用いて、虚血耐性に熱ショック蛋白応答が重要であることを示している⁵⁰⁾。この報告によれば、短期間のbenign ischemia前処置を施しておけば著明な虚血耐性の増加がみられ、その分子的基盤としてニューロンにおける早期のHsp70発現および長期に渡るglia細胞を中心としたHsp27の発現増強が提唱されている。またNishiらの報告においても、脳虚血後一過性に脳内でHsp70の合成が亢進していることから、Hsp70が虚血部位の神経細胞保護に働くものと考えられている⁵¹⁾。この報告においても、CA1 pyramidal neuronには障害を及ぼさない程度の短時間のischemia前処置により虚血耐性が増強しており、組織におけるHsp 70発現亢進の重要性が示されている。

脳虚血障害に対するHBOの有効性と熱ショック蛋白応答との関連性について調べた解析は少ないが、Wadaらはgerbileを用いて虚血処置前にHBOを施し有意な虚血耐性を得ることに成功している⁵²⁾。この実験では、5回のHBO前処置群はHBO1回群および無処置対照群に比べ虚血後の海馬CA1領域の神経細胞密度が有意に保存されていた。また、HBO前処理により有意なHsp-72発現増強がみられることから、虚血耐性にHsp-72が関与していることが示されている。

このほかHBOのヒト熱ショック蛋白発現への影響について調べた報告ではリンパ球でHsp70発現が増強しており、酸化ストレスに対して細胞保護的に働くことが考えられている⁵³⁾。我々はヒトリンパ球を用いた培養実験で、適度な酸素ストレスはHsp72/73発現を増加させるが逆に過度の酸素ストレスではHsp 72/73発現が減少することを報告しており(図3)⁵⁴⁾、HBOに対する熱ショック蛋白応答には酸素ストレスの程度が重要な意味を持っていることが示唆される。

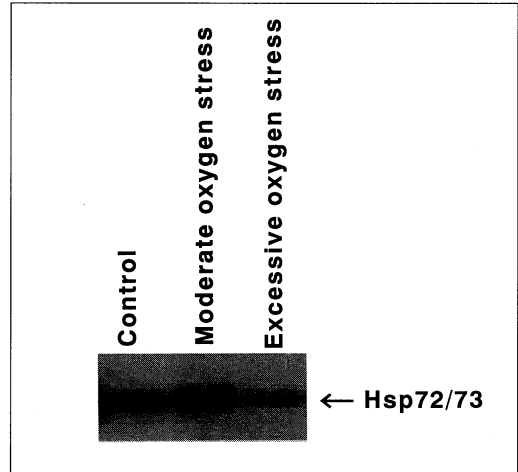


図3 酸素ストレスによるリンパ球の熱ショック蛋白応答

中等度の酸素ストレスではHsp72/73の発現上昇がみられるが、過度の酸素ストレス下では熱ショック蛋白発現はかえって低下する。

CO中毒とHBO治療

1. これまで考えられてきたCO中毒に対するHBO治療の意義

HBO治療は、血液を高酸素分圧にすることで赤血球のヘモグロビン (hemoglobin : Hb) からCOを迅速に取り除く作用があると考えられている。一般に、大気圧中通常の空気呼吸では血中COの半減期はおよそ4時間10分～5時間20分といわれている。これに対し、100%酸素吸入をすると半減期は1時間～1時間20分に減ずる。さらに、3 ata (303kPa) で100%酸素吸入をするとCOの半減期は23分となる^{55,56)} (表1)。このことからHBO治療はcarboxyhemoglobin (COHb) 消失速度を相当に速め組織酸素化の迅速な回復に寄与しているものと考えられる。しかし、CO排出は換気の割合やCO曝露のパターンなどによっても影響を受けるため表1に示した時間は条件によってかなりの程度変わりうるものと考えられる。

2. CO中毒の病態生理

COとO₂は競合してHbに結合するが、O₂と比べてCOの方が220～290倍親和力が強いことが知られている^{57,58)}。COHbが存在することにより未結合

表1 Alteration in carboxyhemoglobin elimination in half-time under various conditions

Pressure	Condition		COHb elimination half-time (min)
	Pressure	Oxygen content	
1 ata		Air	250 - 320
1 ata		100% O ₂	60 - 80
2 ata		100% O ₂	46
3 ata		100% O ₂	23

文献55,56による

表2 Clinical manifestations of acute carbon monoxide poisoning-Duration of exposure 1 hour

Atmosphere level (ppm)	COHb (%)	Clinical manifestations
400	7.2	None
800	14.4	Headache, dyspnea on exertion, nausea
1600	30.0	Confusion, collapse on exertion
3200	58.0	Unconsciousness
4000	72.0	Coma
4500	81.0	Death

Bloom (1970)⁶³⁾による

ヘモグロビンに対する酸素の親和性は増加する。従って、ヘモグロビン酸素解離曲線は左方にシフトし組織の低酸素を招くことになる^{59,60)} (図4)。また、COは血管外の蛋白とも結合し細胞障害性に働くとも考えられている。実際これまでに、myoglobin, cytochrome c oxidase, cytochrome p450-linked enzymesなどの蛋白がCOと結合し生体に影響を及ぼしてることが報告されている^{61,62)}。

Bloomによれば、急性CO中毒の症状は血中COHbの割合により段階的に悪化し、30%を超えると意識障害を来し、80%で死に到るとされている⁶³⁾ (表2)。しかしながら実際の臨床例でCO中毒症状をみた場合、CO中毒の重症度と来院時COHbレベルとの間の相関関係は必ずしもはっきりしない^{64,67)}。むしろ血液pH、遊離酵素レベル、心臓障害の程度などが予後と相関があることが示されている。既存の心疾患がある場合や60歳以上で致命率が高く、意識障害の期間が予後に関連しているともいわれる。種々の報告を総合していえることは、重症CO中毒の症状は単純に高COHb血症のみによってもたらされる訳ではないということである。組織が酸素化されている状態で実験的にCOHb血症を導入してもほとんど毒性はみられないが、組織で利用できる酸素が低下した状態でCOHb血症のストレスがかかると非常に重篤な

症状が現れてくる。また、CO中毒の重症度に影響を与えるのは血中COHbレベルではなく、血漿中に溶解したCOが組織に移行しO₂と競合してcytochrome a3の障害をもたらすという報告がある^{68,67)}。したがって、COHb濃度が低くても組織への影響は考えられ、COHbが10%でも中枢神経障害が起こりうるし35%で死に到る場合もあり得る。逆にCO中毒の初期段階では、血中COHbは高いが組織障害はほとんど起きていない時期が存在する。このことから、短時間のCO吸入により高いCOHb濃度となっても重篤な症状は現れないが、たとえ低濃度でも長期曝露を行うと有病率や致死率が上昇することの説明ができる。

HBO治療は組織や細胞内小器官のCOHbを非常に速く取り除き再酸素化を図るものであるが、脂質過酸化状態の補正という面からも重要な役割を果たしている。脂質の過酸化はCO中毒後回復時にCOレベルが低下するに従って増加することが報告されている⁷⁾。過酸化脂質は特に脳障害の面から重要な働きをしており、その動態から虚血再灌流障害に似たメカニズムで障害をもたらしているものと考えられる。CO中毒モデル動物にHBO治療をした時の脂質過酸化状態の補正について調べた報告では、3 ata (303 kPa) のO₂で脂質過酸化は起らなくなり、2 ataでは中等度の効果を示したのに対し、1 ataでは脂質過酸化の状態は変わらな

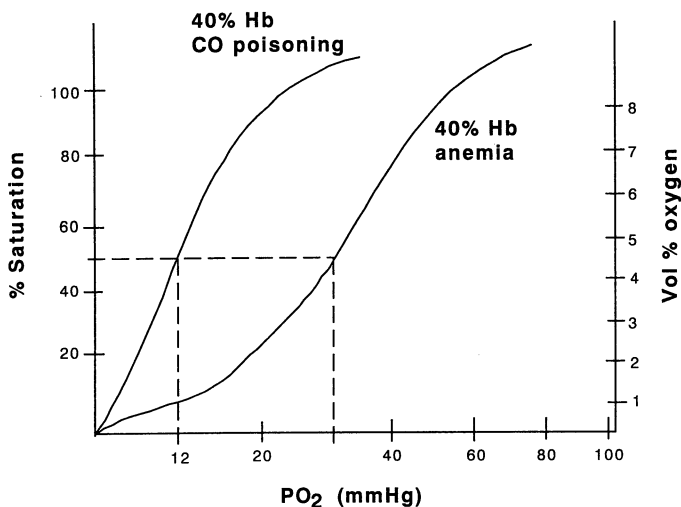


図4 CO中毒におけるヘモグロビン解離曲線のシフト

CO中毒により60%がCOHbとなった場合(40% Hb, CO poisoning)と出血によりヘモグロビンが通常の40%になった場合(40% Hb, anemia)のヘモグロビン解離曲線を示している。CO中毒においては、未結合ヘモグロビンに対する酸素親和性の増加により解離曲線が左方にシフトしている。Stadie and Martin^{文獻59)}による。

という結果が出ている⁷²⁾。

またHBOの別のメカニズムとして、酸素誘発性の脳血管収縮(oxygen induced vasoconstriction)により脳浮腫が軽減されるという可能性も指摘されている。

3. CO中毒の後遺症(神経障害)とHBO治療

CO中毒の良く知られた後遺症として遅発型の悪化(delayed neurological deterioration:間歇型CO中毒とも呼ばれる)が挙げられる⁷³⁾。このような症例では、一旦は症状が完全に消失して全治したかにみえるので帰宅する例が多い。その後、数日から数週間になって突然進行性の精神神経障害が出現し、急速に悪化、時には死亡する例もある。発症までの期間をlucid intervalと呼び、通常は14~21日程度で40日を越えることはほとんどない。このような例は高齢者で多くみられており30歳以下ではほとんどみられない⁷⁴⁾。また、遅発型の悪化例はHBO治療を行った群ではほとんどみられず、多くが1気圧酸素吸入のみで改善し帰宅した例にみられている。これら遅発型の悪化症例ではCOHbの値は正常で、神経症状がCOの再曝露によ

るものではないことが証明されている。さらに、これらの症例に対してHBO治療を1回行うことにより症状の消失をみている⁷⁵⁾。

4. CO中毒に対するHBO治療効果

Goulonらは273例の重症CO中毒症例について、初期の6時間以内にHBO治療を行った群は致死率が13.5%だったのに対し6時間以降にHBO治療を行った群は31.1%の致死率を示したと報告しており、初期HBO治療の重要性を訴えている⁷⁶⁾。

CO中毒に対するHBO治療はこれまで長い歴史を持つが、1気圧酸素(normobaric oxygen:NBO)吸入と比較した有効性に関してはきちんとしたcontrol studyがなされている訳ではない。Raphaelらが1989年に629例という比較的大規模な検討を行い、NBO吸入とHBO治療とで治療結果に差が認められなかったと報告している⁷⁷⁾。しかし、この報告には、①来院時意識のない患者は18名のみでそのほとんどが治療タンクでの治療を受けていない②2.5または3 ata (252または303kPa)で治療すればもっと有効であった可能性があるのに、2 ataでの治療しか行っていない③HBO治療群と対照

表3 CO中毒のメカニズム

組織低酸素症
蛋白/酵素の機能阻害 (ミオグロビン、p450など)
脂質過酸化
好中球の活性化
酸素ストレスの増加
内皮細胞への過酸化窒素の蓄積
細胞内酸素利用の阻害 (cytochrome aa3に結合)
神経細胞毒性
海馬神経細胞に対するアポトーシス誘導
自己免疫機序

群とのrandomizationが初期治療終了6時間後に行われているなどいくつかの問題点が指摘されており、HBO治療が本当に有効でなかったのかに関しては疑問が残る。

CO中毒ラットを用いた実験では、HBO治療により脳脊髄圧の上昇を防ぐことができるがNBOではその効果はないことが報告されている⁷⁸⁾。また、死亡率や神経症状発症率、生存期間についてもHBOがNBOよりも有意の改善効果を示している⁷⁹⁾。一方臨床面においては、意識障害や心臓異常を示さないCO中毒患者のprospective, randomized studyで、NBO治療では30例中7例(23%)に遅延型の神経症状がみられたのに対し、HBOでは30例中1例もみられず有意に遅延型の神経後遺症を減らすことができたという報告がある⁸⁰⁾。また、別の報告でも意識障害を来さないCO中毒患者に対してHBO治療の方がNBOよりも後遺症が少なかったことが示されている⁸¹⁾。さらに、CO中毒後24時間以内に1回以上のHBO再治療を行えば重篤な後遺症をかなり減少させることができるとの報告もある⁸²⁾。

しかしながらCO中毒に対するHBO治療には酸素中毒による痙攣など副作用もみられ、特に治療効果を期待して酸素分圧を上げるに従ってその頻度は増加する⁸³⁾。近年、CO中毒に対するHBO治療について相次いで否定的な論文が出ているが、それらについては後述の「HBO治療の適応疾患」の項で述べることにする。

5. CO中毒の新たな分子メカニズム

CO中毒のメカニズムに関しては過去いくつかの考え方が提唱されているが(表3)⁸⁴⁾、なぜ遅発型の悪化が起きるのか、またCOHbの値が正常に

復帰した患者に対してHBO治療がなぜ奏効するのかその機序は近年まで全く不明であった。しかし、Thomらの研究グループを中心として、分子面からのアプローチにより新たなメカニズムが提唱されてきている。

まず、COにはHbと結合して酸素供給量を低下させるという作用以外に、低濃度での生理的作用があることが解ってきた。低濃度のCOは酸素代謝に影響を与えることなく脳血流量を増加させる⁸⁵⁾。NOS阻害剤によりこの血管への作用は著明に抑制されることから、組織の低酸素が血管拡張の一義的な原因ではなく、NO依存性のメカニズムが働いていると予想される。事実NOS阻害剤によりnitrotyrosineの内皮細胞への蓄積が抑えられることからNO由来の酸化物の存在が血管の状態に大きな影響を与えているものと思われる⁸⁶⁾。また肺毛細血管においても、NOS阻害剤であるL-NAMEの前処理により血管外漏出やnitrotyrosineの蓄積を抑えることができたとしており一連の血管の変化がNO依存性の事象であることが示されている⁸⁷⁾。さらに、COの影響は直接内皮細胞に向けられる場合がある。COは比較的低濃度でNO産生を増加させapoptosisと呼ばれるタイプの細胞死を誘導することが解ってきた⁸⁸⁾。

CO曝露ラットでは血漿中のNO₃⁻濃度が増加するが、L-NAMEの投与や好中球を抑制する処置を施すとNO₃⁻濃度の増加は起きない。このことから、CO中毒においては活性化した好中球から産生されたNO産生がNO₃⁻などの過酸化物の蓄積を促し、これが炎症性変化や血管障害に繋がるものと考えられる⁸⁹⁾。CO中毒の際には脳組織で脂質の過酸化が起きる。一方、HBOは好中球の活性化を抑えxanthine dehydrogenaseからoxidaseへの変換を抑制することにより脂質の過酸化を抑制する⁹⁾。さらに、HBOは好中球のcGMP合成を阻害することによりβ₂integrinを介した接着機能に対しても影響を与える⁷⁾。したがって、HBO治療の有効性について、このような好中球機能を介した作用により、①血管障害の抑制②それに引き続く細胞接着の阻害による炎症の抑制というメカニズムで障害部位の拡大を防止しているという仮説が考えられている。

これらNOおよび好中球機能の関与以外に、最近

表 4-1 Disorders currently approved for HBO therapy by the Undersea and Hyperbaric Medical Society

1. Air or gas embolism
2. Carbon monoxide poisoning and smoke inhalation
3. Clostridial myonecrosis
4. Crush injury, compartment syndrome and other acute traumatic ischemias
5. Decompression sickness
6. Enhancement of healing in selected problem wounds
7. Exceptional blood loss anaemia
8. Necrotizing soft tissue infections
9. Osteomyelitis (refractory)
10. Radiation tissue damage
11. Skin grafts and flaps (compromised)
12. Thermal burns

E.P. Kindwall: Chapter 19. Clinical hyperbaric oxygen therapy. p.543 (The Physiology and Medicine of Diving; edited by Peter Bennett and David Elliot)による

表 4-2 日本高気圧環境医学会が定めた HBO 治療の適応疾患

(救急的適応疾患)

1. 急性一酸化炭素中毒及び間歇型一酸化炭素中毒並びにこれに準ずる中毒症
2. ガス壊疽
3. 急性脳浮腫
4. 急性脊髄障害
5. 急性動脈血行障害
6. 重症減圧症
7. 重症空気塞栓症
8. 腸閉塞
9. 重症熱傷及び重症凍傷
10. 網膜動脈閉塞症
11. 急性心筋梗塞

(非救急的適応疾患)

1. 遅延型一酸化炭素中毒
2. 難治性潰瘍を伴う慢性血行障害
3. 皮膚移植後の虚血皮弁
4. 突発難聴
5. 慢性難治性骨髄炎
6. 放射線潰瘍
7. 重症頭部外傷又は開頭術若しくは脊椎・脊髄手術後の運動麻痺及び知覚麻痺
8. 難治性脊髄神経疾患
9. スモンその他の薬物性神経障害
10. 放射線治療又は抗癌剤治療と併用される悪性腫瘍

高気圧酸素治療の安全基準 (日本高気圧環境医学会：平成7年11月16日最終改正)による

表 5 Hierarchies of evidence

- I-1 Systematic review of several double-blind randomised control trials.
- I-2 One or more large double-blind randomised control trials.
- II-1 One or more well-conducted cohort studies.
- II-2 One or more well-conducted case-control studies.
- II-3 A dramatic uncontrolled experiment.
- III Expert committee sitting in review; peer leader opinion.
- IV Personal experience.

Davies HTO and Crombie IK. What is a systematic review? (1998)による

になってCO中毒における遅延型の神経障害 (delayed neurological sequelae) に自己免疫の機序が関与しているという非常に注目すべき可能性が報告された⁹⁰⁾。CO中毒モデルラットでは、CO曝露後3~4日目に脳における著明な血管外漏出が認められる。それと同時に脳組織中でIgGの増加がみられる。これに対し、NOS阻害剤の投与やHBO治療により血管外漏出が抑制されるとともにIgGの上昇もみられなくなる。また、CO曝露後14日目の脳組織ではCD4⁺helper T細胞の増加やclass II MHC抗原の著明な増加がみられるが、このようなCD4やMHCの変化もまた、NOS阻害剤の投与やHBO治療により認められなくなる。このような結果から、CO曝露後数日以内に起きるIgGの血管外漏出が引き金となって、自己免疫的メカニズムによる炎症の惹起が遅延型の障害メカニズムに大きく関与していることが示唆される。また、HBO治療がこのような自己免疫の機転を阻害し、症状発生の抑制に大きな役割を果たしていることも示されている。このモデルでは、病変進行の時間経過が臨床例と非常に良く合致するが、その一方で漏出してくるIgGが何を認識している抗体なのか、CD4⁺helper T細胞とclass II MHC抗原を持つ細胞との相互作用はどのように行われているのかなどまだまだ不明な点も多い。

このように、CO中毒における遅延型の神経障害では、NO産生、酸化ストレスの増大、好中球のsequestrationなどと相まって自己免疫的なメカニズムが働くことにより病態を複雑なものにしている可能性が考えられる。

HBO治療の適応疾患

HBO治療の適応疾患については、Undersea & Hyperbaric Medical Society (UHMS: 米国潜水高圧医学会) が定めた適応疾患と日本高気圧環境医学会が定めた適応疾患との間にかなりの隔りがある(表4)。日本高気圧環境医学会が定めた適応疾患は医療保険適応との兼ね合いもあってかその範囲が広い(表4-2)。一方、UHMSが定めた適応疾患(表4-1)は、①学術面で十分に評価されているか (HBOの有効性に関する理論的側面、実際の臨床における有用性の証明) ②他に代替治療はないのか ③他の治療法と比較してのcost-

effectivenessは十分かなどがその選定理由となっている。したがって、突発難聴、スモン、難治性脊髄神経疾患、悪性腫瘍などは適応疾患に含まれていない。

近年、治療の有効性を判定する基準として、症例報告などのように経験的な判断によるのではなくlarge scale randomized trial, systematic reviewなどの解析アプローチの重要性が叫ばれている。過去の多数の学術論文を評価し総合的に結果を判断してゆくというsystematic reviewの手法は科学的事象を示す階層構造(hierarchy)の頂点に位置し、最も信頼性のある治療効果の評価法と考えられている(表5)。したがって、今後はHBO治療においてもその適応の是非/効果の有無を判断する際に、systematic reviewやrandomized trialを中心とした判定法が取り入れられることになるであろう。

その一例として、Tremblayらによって脳性麻痺の患者に対するHBO治療の有効性について綿密なdouble blind, randomized, placebo controlled trialがなされ、2000年のUHMS Annual Scientific Meetingでその報告があった⁹¹⁾。結果は、残念ながらHBO治療が対照群と比較して特に有意の有効性があるというものではなかった。しかし、このような形でアプローチをすることによって、適応が不明確である疾患に対してもその有効性が客観的な立場から証明されるし、新たな適応疾患の認定にも繋がるものと考えられる。

また、HBO治療適応が当たり前だとされているCO中毒においてさえも、近年その適応に疑問を投げかける報告が相次いでなされてる。過去いくつかのnon-randomised trialでは、CO中毒に対してHBO治療をすることにより神経学的後遺症を予防できたとしており、これがHBO適応の最大の根拠と考えられてきた。しかし、Scheinkestelらは急性CO中毒の患者に対する治療としてHBO治療と通常気圧での酸素(normobaric oxygen: NBO)治療のrandomised controlled double-blind trialを行い、HBO治療には有意な有効性がみられないばかりか副作用の可能性もあるためCO中毒の治療法としては薦められないと結論している⁹²⁾。さらに衝撃的な報告として、Cochrane Databaseのsystematic reviewでHBOとNBOの神経症状に対する有効性に

関する比較を行っており、急性CO中毒に対し適応を規定せずにHBO治療を行っても1か月後の神経症状の発生頻度を減らすことは出来ないとの結論を得ている⁹⁾。これらの報告だけでHBO治療がCO中毒に対して無効であると判断するのは早計であるように思われるが、少なくとも闇雲にHBO治療を行うのではなくもう少し厳格な適応を科学的に検証する必要があるのではないだろうか。

先にも示した突発難聴、スモン、難治性脊髄神経疾患、悪性腫瘍などは現時点においてHBO治療の適応/有効性が必ずしも明確であるとはいえない。これらの疾患については、臨床的な有効性の解析とともに、病態モデルの作成、発症機序の解析を通じたHBO治療効果メカニズム解明の重要性が強調されても良いだろう。

謝 辞

本論文は、第35回日本高気圧環境医学会総会のシンポジウム「脳・脊髄疾患と高気圧酸素療法」において筆者が行う講演内容をまとめ加筆したものである。シンポジストとしての発表の機会をお与え下さった岩手医科大学の鎌田桂先生並びに学会長の森山雄吉先生に深謝致します。

【引用文献】

- 1) Bowman CM, Butler EN, Vatter AE, Repine JE. Hyperoxia injures endothelial cells in culture and causes increased neutrophil adherence. *Chest* 83: 33S-35S, 1983.
- 2) Suzuki Y, Aoki T, Takeuchi O, Nishio K, Suzuki K, Miyata A, Oyamada Y, Takasugi T, Mori M, Fujita H, Yamaguchi K. Effect of hyperoxia on adhesion molecule expression in human endothelial cells and neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 272: L418-L425, 1997.
- 3) IMMUNOBIOLOGY. Chapter V. The Immune System in Health and Disease. by Janeway Jr. CA and Travers P, Current Biology Ltd./ Garland Publishing Inc., 1994.
- 4) Shinomiya N, Suzuki S, Hashimoto A, Masataka I, Takaai Y, Oiwa H. Effect of hyperbaric oxygen on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in murine lung. *Aviat Space Environ Med* 69: 1-7, 1998.
- 5) Thom SR. Functional inhibition of leukocyte β 2 integrins by hyperbaric oxygen in carbon monoxide-mediated brain injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 123: 248-256, 1993.
- 6) Chen Q, Banick PD, Thom SR. Functional inhibition of rat polymorphonuclear leukocyte β 2 integrins by hyperbaric oxygen is associated with impaired cGMP synthesis. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 929-933, 1996.
- 7) Thom SR, Mendiguren I, Hardy K, Bolotin T, Fisher D, Nebolon M, Kilpatrick L. Inhibition of human neutrophil β 2-integrin-dependent adherence by hyperbaric O₂. *Am J Physiol* 272 (Cell Physiol 41): C770-C777, 1997.
- 8) Derevianko A, D'Amico R, Simms H. Polymorphonuclear leukocyte (PMN)-derived inflammatory cytokines—regulation by oxygen tension and extracellular matrix. *Clin Exp Immunol* 106: 560-567, 1996.
- 9) Derevianko A, Graber T, D'Amico R, Simms H. Altered oxygen tension modulates cytokine-induced signal transduction in polymorphonuclear leukocytes: regulation of the G PLC pathway. *J Surg Res* 62: 32-40, 1996.
- 10) 塩谷寿美恵, 太田保世. 肺酸素中毒. 代謝21巻8号 図解病因病態論シリーズ, 1984.
- 11) Buras JA, Stahl GL, Svoboda KK, Reenstra WR. Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS. *Am J Physiol Cell Physiol* 278 (2):C292-302, 2000.
- 12) Atochin DN, Fisher DG, Thom SR. Effects of hyperbaric oxygen on neurological outcome and infarct volume following cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Undersea Hyperb Med* 26 (suppl):9, 1999.
- 13) Larson JL, Stephenson LL, Zamboni WA. Effect of hyperbaric oxygen on neutrophil CD18 expression. *Plast Reconstr Surg* 105 (4):1375-1381, 2000.
- 14) Gursoy-Ozdemir Y, Bolay H, Saribas O, Dalkara T. Role of endothelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke* 31(8):1974-1980; discussion 1981, 2000.
- 15) Solenski NJ, Kwan A. Attenuation of free radical generation during reversible focal cerebral ischemia with the nitric oxide inhibitor, L-NAME (L-N(G)-nitro-L-arginine methyl ester). *Brain Res* 862(1-2):262-265, 2000.
- 16) Mason RB, Pluta RM, Walbridge S, Wink DA, Oldfield EH, Boock RJ. Production of reactive

- oxygen species after reperfusion in vitro and in vivo: protective effect of nitric oxide. *J Neurosurg* 93(1):99-107, 2000.
- 17) Hotta Y, Otsuka-Murakami H, Fujita M, Nakagawa J, Yajima M, Liu W, Ishikawa N, Kawai N, Masumizu T, Kohno M. Protective role of nitric oxide synthase against ischemia-reperfusion injury in guinea pig myocardial mitochondria. *Eur J Pharmacol* 380(1):37-48, 1999.
 - 18) Utebgergenov DI, Mertsch K, Sporbert A, Tenz K, Paul M, Haseloff RF, Blasig IE, Nitric oxide protects blood-brain barrier in vitro from hypoxia/reoxygenation-mediated injury. *FEBS Lett* 424(3):197-201, 1998.
 - 19) Kirsch JR, Bhardwaj A, Martin LJ, Hanley DF, Traystman RJ. Neither L-arginine nor L-NAME affects neurological outcome after global ischemia in cats. *Stroke* 28(11):2259-2264; discussion 2264-2265, 1997.
 - 20) Nighoghossian N, Trouillas P. Hyperbaric oxygen in the treatment of acute ischemic stroke: an unsettled issue. *J Neurol Sci* 150(1):27-31, 1997.
 - 21) Buras J. Basic mechanisms of hyperbaric oxygen in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Int Anesthesiol Clin* 38(1):91-109, 2000.
 - 22) Zhang J, Su Y, Oury TD, Piantadosi CA. Cerebral amino acid, norepinephrine and nitric oxide metabolism in CNS oxygen toxicity. *Brain Res* 606(1):56-62, 1993.
 - 23) Chavko M, Braisted JC, Outsa NJ, Harabin AL. Role of cerebral blood flow in seizures from hyperbaric oxygen exposure. *Brain Res* 791(1-2):75-82, 1998.
 - 24) Wang WJ, Ho XP, Yan YL, Yan TH, Li CL. Intrasynaptosomal free calcium and nitric oxide metabolism in central nervous system oxygen toxicity. *Aviat Space Environ Med* 69(6):551-555, 1998.
 - 25) Elayan IM, Axley MJ, Prasad PV, Ahlers ST, Aufer CR. Effect of hyperbaric oxygen treatment on nitric oxide. *J Neurophysiol* 83(4):2022-2029, 2000.
 - 26) Bitterman H, Bitterman N, Melamed Y, Cohen L. Effects of hyperbaric oxygen in circulatory shock induced by splanchnic artery occlusion and reperfusion in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 67(9):1033-1037, 1989.
 - 27) Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Smoot EC. The effect of hyperbaric oxygen on reperfusion of ischemic axial skin flaps: a laser Doppler analysis. *Ann Plast Surg* 28(4):339-341, 1992.
 - 28) Sirsjo A, Lehr HA, Nolte D, Haapaniemi T, Lewis DH, Nylander G, Messmer K. Hyperbaric oxygen treatment enhances the recovery of blood flow and functional capillary density in postischemic striated muscle. *Circ Shock* 40(1):9-13, 1993.
 - 29) Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Graham B, Suchy H, Kucan JO. Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plast Reconstr Surg* 91(6):1110-1123, 1993.
 - 30) Sterling DL, Thomson JD, Swafford A, Gottlieb SF, Bishop SP, Stanley AW, Downey JM. Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium in vivo. *Circulation* 88(4Pt1):1931-1936, 1993.
 - 31) Yamada T, Taguchi T, Hirata Y, Suita S, Yagi H. The protective effect of hyperbaric oxygenation on the small intestine in ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 30(6):786-790, 1995.
 - 32) Mink RB, Dutka AJ. Hyperbaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits does not promote brain lipid peroxidation. *Crit Care Med* 23(8):1398-1404, 1995.
 - 33) Neubauer RA, James P. Cerebral oxygenation and the recoverable brain. *Neurol Res* 20 Suppl 1:S33-S36, 1998.
 - 34) Chen MF, Chen HM, Ueng SW, Shyr MH. Hyperbaric oxygen pretreatment attenuates hepatic reperfusion injury. *Liver* 18(2):110-116, 1998.
 - 35) Kolski JM, Mazolewski PJ, Stephenson LL, Texter J, Grigoriev VE, Zamboni WA. Effects of hyperbaric oxygen therapy on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 160(2):601-604, 1998.
 - 36) Curry JD, Stephenson L, Zamboni WA. Nitric oxide in skeletal muscle following hyperbaric oxygen therapy in ischemia-reperfusion injury. *Undersea Hyperb Med* 26(suppl):9-10, 1999.
 - 37) Zhu Y, Roth-Eichhorn S, Braun N, Culmsee C, Rami A, Kriegelstein J. The expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in hippocampal neurons: a temporary upregulated protein level after transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res* 866(1-2):286-298, 2000.
 - 38) Chen J, Zhu RL, Nakayama M, Kawaguchi K, Jin K, Stetler RA, Simon RP, Graham SH. Expression of the apoptosis-effector gene, Bax, is up-regulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J Neurochem* 67(1):64-71, 1996.
 - 39) Kitagawa K, Matumoto M, Hori M, Yanagi-hara T. [Microcirculatory derangement and apoptosis in

- ischemia-reperfusion injury] . [Article in Japanese] *Rinsyo Shinkeigaku* 39(12):1291-1294, 1999.
- 40) Volpe BT, Wessel TC, Mukherjee B, Federoff HJ. Temporal pattern of internucleosomal DNA fragmentation in the striatum and hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 186(2-3):157-160, 1995.
 - 41) Love S, Barber R, Wilcock GK. Neuronal death in brain infarcts in man. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26(1): 55-66, 2000.
 - 42) Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(10):5752-5757, 1999.
 - 43) Yamasaki Y, Shigeno T, Furukawa Y, Furukawa S. Reduction in brain-derived neurotrophic factor protein level in the hippocampal CA1 dendritic field precedes the delayed neuronal damage in the rat brain. *J Neurosci Res* 53(3): 318-329, 1998.
 - 44) Ganguly BJ, Benson RM, Osborne BA, Granowitz EV. Hyperbaric oxygen enhances spontaneous and stimulus induced apoptosis in immune cells. *Undersea Hyperb Med* 26 (suppl.): 13, 1999.
 - 45) Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia—the ischemic penumbra. *Stroke* 12(6):723-725, 1981.
 - 46) Hata R, Maeda K, Hermann D, Mies G, Hossmann KA. Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20(6):937-946, 2000.
 - 47) Tomimoto H, Takemoto O, Akiguchi I, Yanagihara T. Immunoelectron microscopic study of c-Fos, c-Jun and heat shock protein after transient cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol (Berl)* 97(1):22-30, 1999.
 - 48) Li Y, Chopp M, Zhang ZG, Zhang RL. Expression of glial fibrillary acidic protein in areas of focal cerebral ischemia accompanies neuronal expression of 72-kDa heat shock protein. *J Neurol Sci* 128(2):134-142, 1995.
 - 49) Kato H, Araki T, Itoyama Y, Kogure K, Kato K. An immunohistochemical study of heat shock protein-27 in the hippocampus in a gerbil model of cerebral ischemia and ischemic tolerance. *Neuroscience* 68(1):65-71, 1995.
 - 50) Currie RW, Ellison JA, White RF, Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal Hsp70 and prolonged astrogliosis with expression of Hsp27. *Brain Res* 863(1-2):169-181, 2000.
 - 51) Nishi S, Taki W, Uemura Y, Higashi T, Kikuchi H, Kudoh H, Satoh M, Nagata K. Ischemic tolerance due to the induction of HSP70 in a rat ischemic recirculation model. *Brain Res* 615(2): 281-288, 1993.
 - 52) Wada K, Ito M, Miyazawa T, Katoh H, Nawashiro H, Shima K, Chigasaki H. Repeated hyperbaric oxygen induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus. *Brain Res* 740 (1-2) : 15-20, 1996.
 - 53) Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G. Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 428(1-2): 83-89, 1999.
 - 54) Shinkai M, Shinomiya N, Suzuki S, Akagi A, Domoto H. Effects of oxygen stress on the proliferative response and heat shock protein expression of human peripheral blood lymphocytes. Proceedings of the 15th Meeting of the United States-Japan Cooperative Program in Natural Resources (UJNR), Panel on Diving Physiology pp.151-160, 1999.
 - 55) Diving medical officer, Student guide course A-6A-0010, Lesson 13 Carbon monoxide intoxication, pp.13.1-13.9, edited by Flynn ET, Catron PW and Bayne CG, Direction of Chief of Naval Technical Training, 1981.
 - 56) Kindwall E.P. Carbon monoxide poisoning. In *Hyperbaric Oxygen Therapy*, pp.177-190. edited by Davis JC and Hunt TK, Bethesda, Md., Undersea Medical Society, 1977.
 - 57) Coburn RF, Forster RE, Kane PB. Considerations of the physiological variables that determine the blood carboxyhemoglobin concentration in man. *J Clin Invest* 44(11): 1899-1910, 1965.
 - 58) Rodkey FL, O'Neal JD, Collison HA, Uddin DE. Relative affinity of hemoglobin S and hemoglobin A for carbon monoxide and oxygen. *Clin Chem* 20(1): 83-84, 1974.
 - 59) Stadie WC, Martin KA. The elimination of carbon monoxide from the blood *J Clin Invest* 2: 77-91, 1925.
 - 60) Fenn WO, Cobb DM. The burning of carbon monoxide by heart and skeletal muscle. *Am J Physiol* 102: 393-401, 1932.
 - 61) Coburn R.F. : Mechanisms of carbon monoxide toxicity. *Preventive Medicine* 8:310-322, 1979.
 - 62) Weaver LK. Carbon monoxide poisoning *Crit Care Clin* 15(2): 297-317, 1999.

- 63) Bloom JD. Some considerations in establishing diver's breathing gas purity standards for carbon monoxide. Purity Standards for Diver's Breathing Gas. *U.S. Navy Supervisor of Diving Rept.* 6-70, July, 1970.
- 64) Garland H, Pearce J. Neurological complications of carbon monoxide poisoning. *Q J Med* 36(144):445-455, 1967.
- 65) Winter PM, Miller JN. Carbon monoxide poisoning. *JAMA* 236(13): 1502, 1976.
- 66) Choi IS. Delayed neurologic sequelae in carbon monoxide intoxication. *Arch Neurol* 40(7): 433-435, 1983.
- 67) Min SK. A brain syndrome associated with delayed neuropsychiatric sequelae following acute carbon monoxide intoxication. *Acta Psychiatr Scand* 73(1): 80-86, 1986.
- 68) Goldbaum LR, Ramirez RG, Absalon KB. What is the mechanism of carbon monoxide toxicity? *Aviat Space Environ Med* 46(10):1289-1291, 1975.
- 69) Goldbaum LR, Orellano T, Dergal E. Mechanism of the toxic action of carbon monoxide. *Ann Clin Lab Sci* 6(4):372-376, 1976.
- 70) Goldbaum LR, Orellano T, Dergal E. Joint Committee on Aviation Pathology: XVI. Studies on the relation between carboxy-hemoglobin concentration and toxicity. *Aviat Space Environ Med* 48(10): 969-970, 1977.
- 71) Thom SR. Antagonism of carbon monoxide-mediated brain lipid peroxidation by hyperbaric oxygen. *Toxicol Appl Pharmacol* 105(2): 340-344, 1990.
- 72) Thom SR. Carbon monoxide-mediated brain lipid peroxidation in the rat. *J Appl Physiol* 68(3): 997-1003, 1990.
- 73) Smith JS, Brandon S. Morbidity from acute carbon monoxide poisoning at three-year follow-up. *Br Med J* 1(849): 318-321, 1973.
- 74) Min SK. A brain syndrome associated with delayed neuropsychiatric sequelae following acute carbon monoxide intoxication. *Acta Psychiatr Scand* 73(1): 80-86, 1986.
- 75) Myers RA, Snyder SK, Emhoff TA. Subacute sequelae of carbon monoxide poisoning. *Ann Emerg Med* 14(12): 1163-1167, 1985.
- 76) Goulon M, Barois A, Rapin M, Nouailhat F, Grosbuis S, Labrousse J. Carbon monoxide poisoning and acute anoxia due to inhalation of coal gas and hydrocarbons: 302 cases, 273 treated by hyperbaric oxygen at 2 ata. *Ann Med Interne* (Paris) 120(5) : 335-349, 1969.
- 77) Raphael JC, Elkharrat D, Jars-Guinestre MC, Chastang C, Chasles V, Vercken JB, Gajdos P. Trial of normobaric and hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide intoxication. *Lancet* 2(8660): 414-419, 1989.
- 78) Jiang J, Tyssebotn I. Cerebrospinal fluid pressure changes after acute carbon monoxide poisoning and therapeutic effects of normobaric and hyperbaric oxygen in conscious rats. *Undersea Hyperb Med* 24(4) : 245-254, 1997.
- 79) Jiang J, Tyssebotn I. Normobaric and hyperbaric oxygen treatment of acute carbon monoxide poisoning in rats. *Undersea Hyperb Med* 24(2): 107-116, 1997.
- 80) Thom SR, Taber RL, Mendiguren II, Clark JM, Hardy KR, Fisher AB. Delayed neuropsychologic sequelae after carbon monoxide poisoning: prevention by treatment with hyperbaric oxygen. *Ann Emerg Med* 25(4): 474-480, 1995.
- 81) Ducasse JL, Celsis P, Marc-Vergnes JP. Non-comatose patients with acute carbon monoxide poisoning: hyperbaric or normobaric oxygenation? *Undersea Hyperb Med* 22(1):9-15, 1995.
- 82) Durmaz E, Laurence S, Roden P, Carruthers S. Carbon monoxide poisoning and hyperbaric oxygen therapy. *Br J Nurs* 8(16):1067-1072, 1999.
- 83) Hampson NB, Simonson SG, Kramer CC, Piantadosi CA. Central nervous system oxygen toxicity during hyperbaric treatment of patients with carbon monoxide poisoning. *Undersea Hyperb Med* 23(4):215-219, 1996.
- 84) Weaver LK. Carbon monoxide poisoning. *Crit Care Clin* 15(2):297-317, viii, 1999.
- 85) Meilen S, Rogatsky GG, Thom SR, Zarchin N, Guggenheimer-Furman E, Mayevsky A. Effects of carbon monoxide on the brain may be mediated by nitric oxide. *J Appl Physiol* 81 (3): 1078-1083, 1996.
- 86) Thom SR, Fisher D, Xu YA, Garner S, Ischiropoulos H. Role of nitric oxide-derived oxidants in vascular injury from carbon monoxide in the rat. *Am J Physiol* 276(3 pt 2) :H984-H992, 1999.
- 87) Thom SR, Ohnishi ST, Fisher D, Xu YA, Ischiropoulos H. Pulmonary vascular stress from carbon monoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 154(1):12-19, 1999.
- 88) Thom SR, Fisher D, Xu YA, Notarfrancesco K, Ischiropoulos H. Adaptive responses and apoptosis in endothelial cells exposed to carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(3):1305-1310, 2000.

- 89) Ischiropoulos H, Mendiguren I, Fisher D, Fisher AB, Thom SR. Role of neutrophils and nitric oxide in lung alveolar injury from smoke inhalation. *Am J Respir Crit Care Med* 150(2): 337-341, 1994.
- 90) Thom SR, Xu YA, Fisher DG. Autoimmune responses in carbon monoxide-mediated brain injury. *Undersea Hyperb Med* 27 (suppl) :21, 2000.
- 91) Tremblay SD, Vanasse M, Amar M, Marois P, Goldberg J, Dugas M, Cote M, Montgomery D, Lambert J, Robinson A, Lassonde M, Fortin J, Robinson A, Lacroix V, Lacroix J, Rosenblat B, Sylvain M, Collet J-P. A double blind, randomized, placebo controlled, multicentric, clinical trial assessing the effects of hyperbaric oxygen therapy on cerebral palsy. *Undersea Hyperb Med* 27 (suppl): 64, 2000.
- 92) Scheinkestel CD, Bailey M, Myles PS, Jones K, Cooper DJ, Millar IL, Tuxen DV. Hyperbaric or normobaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning, a randomised controlled clinical trial. *Med J Aust* 170(5): 203-210, 1999.
- 93) Juurlink DN, Stanbrook MB, McGuigan MA. Hyperbaric oxygen for carbon monoxide poisoning. *Cochrane Database Syst Rev* (2): CD002041, 2000.