

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15561

研究課題名(和文)敗血症におけるオレキシン神経の役割

研究課題名(英文)Role of orexinergic neurons in sepsis

研究代表者

廣田 和美(Hirota, Kazuyoshi)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：20238413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：オレキシン(OX)神経は循環制御に重要な神経であるが敗血症で変性する。このため、OX神経が敗血症での病態生理に関与するか、Sprague-Dawley(SD)ラットとOX神経が排除されたOX/ataxin-3 transgenicラットを用いた動物実験と敗血症をはじめとしたICU入室患者での臨床研究の両面で検討した。結果、ラットを用いた動物実験では敗血症により橋OXA含有量は有意に減少し、それに合わせて敗血症時の生存率が低下した。しかし、臨床の血中OXA濃度は治療に反応せず、また重症度を示すAPATCH2スコアとも相関せず、動物実験の結果を支持するものではなかった。

研究成果の概要(英文)：Orexin(OX) neurons which are degenerated by sepsis contributes to cardiovascular control. Thus, we have determined whether OX system contributes to the survival from sepsis with lipopolysaccharide(LPS: 10mg/kg) in OX/ataxin-3 transgenic(group-TG) and Sprague-Dawley (group-SD) rats, and determined relationship between severity of illness and plasma OXA in sepsis and non-sepsis ICU patients. Survival analysis was done for 3 days after LPS or saline (group-C) given. In group-SD 61.5% rats survived while only 21.4% in group-TG(p<0.05). LPS significantly reduced pons OXA(pg/mg tissue) from 4.10+/-1.21 to 2.92+/-0.38pg/mg tissue (p<0.05), and OXA content in group-TG was substantially lower than that in group-C and SD in all brain regions. In clinical study, plasma OXA did not significantly change during ICU stay and did not correlate to APATCH2 score. Therefore, although animal data suggest contribution of OX neurons for survival in sepsis, clinical data did not support this hypothesis.

研究分野：麻酔科学

キーワード：敗血症 オレキシン ラット

### 1. 研究開始当初の背景

世界では毎年 2000~3000 万人が敗血症に罹患してその約 1/3 は死亡しており、2~3 秒に 1 人が世界のどこかで敗血症により死亡している現状がある。このため、Global Sepsis Alliance は 2012 年より毎年 9 月 13 日を World Sepsis Day に設定して、敗血症そのもの及びそれに対する取り組みの普及に努めている。このような取り組みや Surviving Sepsis Campaign Guideline に基づく治療から、最終的には敗血症発症率および死亡率の低下を目指すわけだが、敗血症の解明が、基礎的研究レベルで完全になされているとは言い難く、臨床研究と並行してなされる必要がある。

動物実験で、敗血症毒素(Lipopolysaccharides: LPS)を投与すると、Orexin (OX) 神経が減少し、敗血症の改善に伴い正常化することが報告されている(Brain Res 2004; 1019: 162-9, Med Sci Monit 2008;14: BR127-33, Brain Behav Immun 2009; 23: 926-30, Neurosci Lett 2014; 570: 47-52)。そして、最近の研究では、敗血症動物モデルで OX を投与することで全身状態が改善することが報告されている(Crit Care Med 2013; 41: e368-75)。また敗血症とは異なるが、脳梗塞に関する動物実験において、OX/Ataxin-3 transgenic (OX/AT3-Tg) マウスでは WT マウスに比べて脳梗塞量が大きく神経障害スコアも悪かったものの、OX を投与することで改善した。以上から、敗血症の病態に OX 神経系は関わっており、OX 神経活動を正常化することが敗血症治療にも役立つ可能性が示唆される。

### 2. 研究の目的

今回の研究では、まず OX/AT3-Tg ラットと野生型の Sprague-Dawley (SD) ラットに LPS を投与し、生存率に差があるかを検討する。もし、OX/AT3-Tg ラット群で生存率が低い場合に、OXA を脳室内投与することで、生存率が改善するかを検討する。動物実験と並行して、臨床においても集中治療室(ICU)に入室する敗血症患者における血中 OXA 濃度および敗血症診断マーカーの血中濃度を測定し、敗血症重症度との相関も検討することで、敗血症における OX 神経活動の変化の程度を検討し、敗血症と OX 神経活動との関わりを解明する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 動物実験

弘前大学動物実験委員会の承認を得て行った。

#### (1) 至適LPS投与量の選択

250g 前後の SD ラットにおいて、生存率が 50% 程度となる至適 LPS 投与量を決定するために LPS 10(n=15), 13(n=10), 15(n=10), 20(n=5), 30(n=5) mg/kg を腹腔内投与して生存率を見た。

#### (2) 敗血症ラット(LPS 10mg/kg)と非敗血症ラット(生食)での脳内OXA含有量の違い

敗血症ラットとしてSDラット(SD群、n=26)、OX/AT3-Tgラット(TG群、n=14)、非敗血症性ラットとしてSDラット(C群、n=7)で行った。LPS投与3日目の生存率を算出し、生存ラットの脳を取り出し分割(橋、視床下部、海馬、大脳皮質)して、各々の部位のOXA含有量をELISA法で測定した。

(3) 敗血症ラットへの脳室内OXA投与の効果  
脳室内薬剤投与用カニューラは、ペントバルビタール麻酔下(50 mg/kg ip)に、脳固定装置を用いて頭部を固定し、Bregmaを指標として脳室内に置いた。その後、SDラットとOX/AT3-TgラットにOXA 60ngを脳室内投与した後に、LPS 10mg/kg投与して生存率を比較した。

### 2) 臨床研究

#### (1) 敗血症におけるOX神経の関与

当院倫理委員会の承認後(UMIN000018427)、2015年10月~2017年2月に研究同意の得られたICU入室敗血症患者(敗血症群)、非敗血症性手術患者(非敗血症術後群)、健康成人ボランティアを対象とした。主測定項目は、血中OXA、CRP、敗血症マーカーであるプロカルシトニン(PCT)およびプレセプシン(P-Sep)濃度などとした。術後非敗血症群は麻酔導入前、ICU入室後1, 2, 3日、敗血症群はICU入室時、入室後1, 2, 3, 5, 7, 14日目に測定した。また、健康成人ボランティアの血中OXA濃度は1回のみ測定した。統計学的検討はKruskal Wallis検定、Dunnet多重比較を用い、結果は中央値(四分位範囲)で示した。p<0.05を有意差有とした。また血中OXA濃度と各炎症、敗血症マーカーの相関関係にはPearson検定を用いて分析した。

### 4. 研究成果

#### 1) 動物実験

#### (1) 至適LPS投与量の選択

LPS 10(n=15), 13(n=10), 15(n=10), 20(n=5), 30(n=5) mg/kgを腹腔内投与による生存率は、各々60%、60%、30%、20%、20%であった。以上よりLPSの投与量を10mg/kg ipに決定した(図1)。

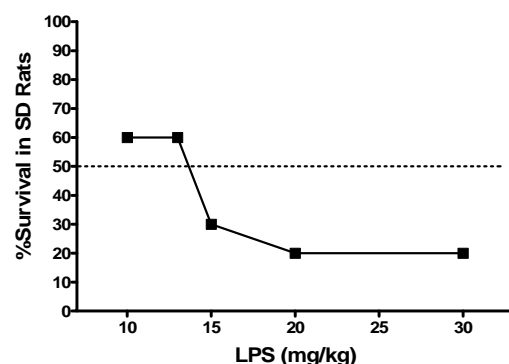


図1. LPS投与量と生存率の関係

(2) 急性敗血症ラットと非敗血症ラットでの脳内OXA含有量

非敗血症ラットは全例生存したのに対し、LPS投与を受けた敗血症群の生存率はSDラットで61.5%、OX/AT3-Tgラットで21.4%と有意に非敗血症群に比べ有意に生存率が低く、また敗血症群内でもOX/AT3-TgラットはSDラットに比べ有意に生存率が低かった(図2)。

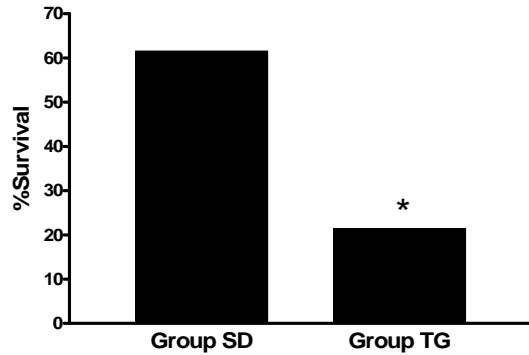


図2. LPS10mg/kg投与後のSDラット群(SD)とOX/AT3トランスジェニックラット群(TG)での生存率の比較.

\*:  $p < 0.05$  vs Group SD.

また、脳内OXA含有量は、橋で敗血症SDラットは非敗血症SDラットに比べ有意に低かった、他の部位では両ラット間で差はなかった。一方、OX/AT3-Tgラットでは、全脳部位で著しく低値を示した(図3)。

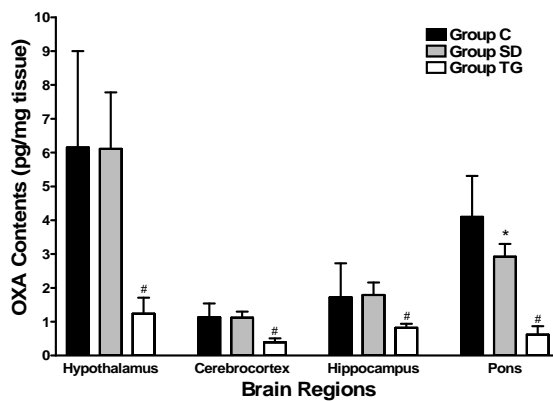


図3. 視床、大脳皮質、海馬、橋におけるOXA含有量.

平均±標準偏差、\*:  $p < 0.05$  vs Group C, #:  $p < 0.01$  vs Group C and SD.

また、脳内OXA含有量と生存率とは有意ではなかったが $r=0.936$ と高い相関を示した(図4)。

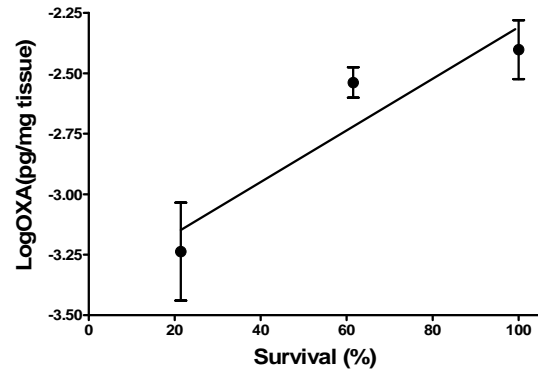


図4. 脳内OXA含有量と生存率の関係  
平均±標準偏差.

(3) 敗血症ラットへの脳室内OXA投与の効果  
実験手技に何か問題があったためか、全例死亡した。実験手法を検証して、今後追加実験を行う予定である。

## 2) 臨床研究

### (1) 敗血症におけるOX神経の関与

敗血症群26名、非敗血症術後群31名、健康成人ボランティア6名が対象となった。患者、健康成人の背景を表1に示す。

表1. 患者背景

	SP	NonSP
性別(男/女)	12/14	21/11
身長(cm)	154.5 ± 7.2	159.1 ± 7.1
体重(kg)	55.5 ± 11.5	50.2 ± 10.2
年齢(歳)	76.1 ± 10.1	67.7 ± 10.6
ICU 滞在日数(日)	6.9 ± 7.7	4.2 ± 2.4
在院日数(日)	38.2 ± 41.0	47.2 ± 21.5
APACHE	20.9 ± 6.6	15.8 ± 3.2
-----		
疾患内容	腹膜炎(10)	口腔癌(20)
	尿路感染(9)	食道癌(12)
	その他(7)	

平均 ± 標準偏差、SP: 敗血症群、NonSP: 非敗血症群

敗血症群(ICU入室時: Sepsis)、非敗血症術後群(麻醉導入前: Non Sepsis)、健康成人群(Control)の血中OXA濃度は各々、0.098 (0.053-0.13) ng/ml、0.09 (0.060-0.152) ng/ml、0.059 (0.048-0.086) ng/mlで統計学的に有意差を認めなかった(図5)。

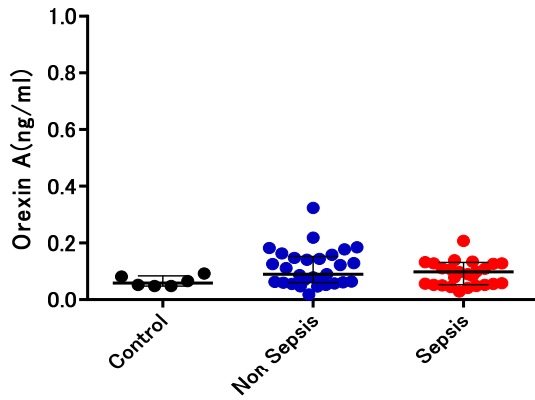


図5. 健康成人、非敗血症術後群、敗血症群の血中OXA濃度  
中央値 (四分位範囲). Control: 健康成人、Non Sepsis: 非敗血症術後群、Sepsis: 敗血症群.

敗血症群、非敗血症術後群の血中OXA並びにCRP濃度の推移を図6に示す。OXA濃度は両群ともに有意な変化は認めなかったが、CRPは経時的な推移を認めた。

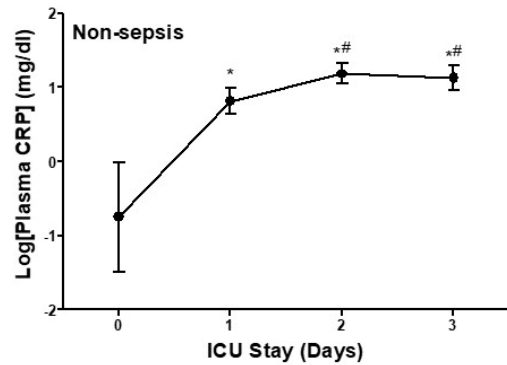
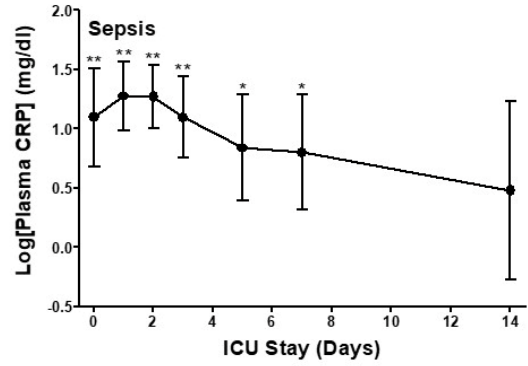
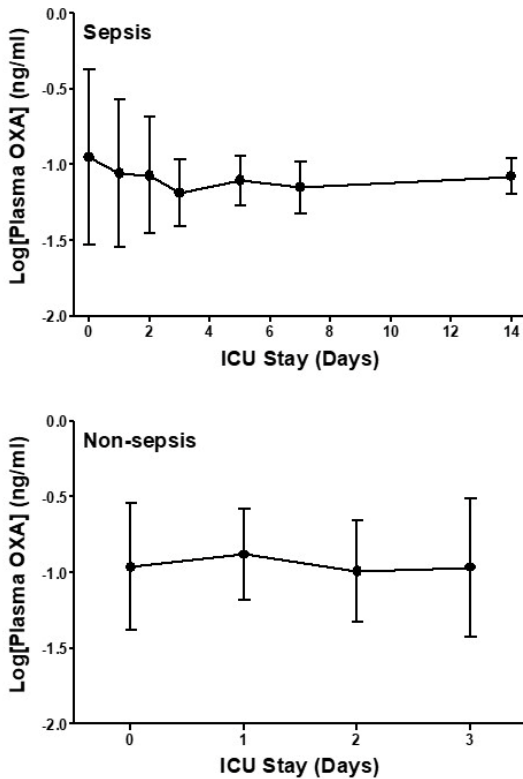


図 6. 敗血症群と非敗血症群での血中 OXA 並びに CRP 濃度の経時変化  
平均±標準偏差. Sepsis: 敗血症群、Non-sepsis: 非敗血症術後群

重症度を示すAPATCH2スコアと血中OXA並びにCRP濃度との相関を見たが、OXAは相関を認めなかったがCRPは有意な相関を認めた(図7.  $r=0.466$ 、 $P=0.0003$ )。

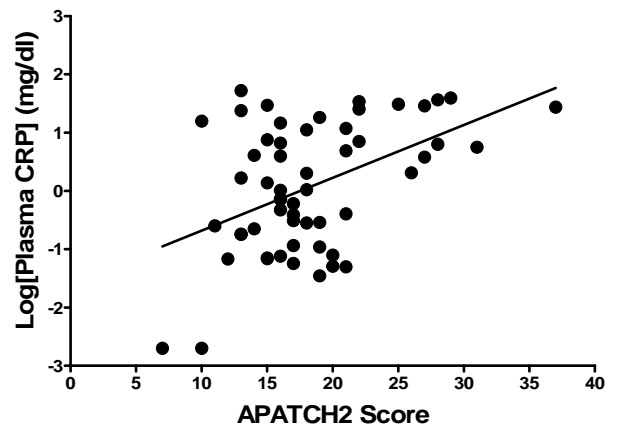


図 7. APATCH2 スコアと血漿 CRP 濃度との相関関係

## 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 3 件)

Saito J, Hashiba E, Mikami A, Kudo T, Niwa H, Hirota K. Pilot study of changes in presepsin concentrations compared with changes in procalcitonin and c-reactive protein concentrations after cardiovascular surgery. J Cardiothorac Vasc Anesth 2017; 31: 1262-1267. (査読有)

Hirota K. Sepsis and the orexin system. J Anesth 2016; 30(6): 919-922. (査読有)

Saito J, Hashiba E, Kushikata T, Mikami A, Hirota K. Changes in presepsin concentrations in surgical patients with end-stage kidney disease undergoing living kidney transplantation: a pilot study. J Anesth 2016; 30: 174-177. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

赤石真啓、橋場英二、天内絵理香、太田大地、櫛方哲也、廣田和美。敗血症患者における血中オレキシン濃度の変化の検討。日本麻酔科学会第 64 回学術集会、2017 年 6 月 8-10 日、神戸

Hirota K, Takekawa D, Kushikata T, Kudo M. Orexinergic tone affects survival in sepsis in rats. BJA Research Forum Winter Meeting. (2017 年 11 月 23-24 日、Leicester, UK)

〔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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 和美 (Hirota, Kazuyoshi)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：20238413

(2) 研究分担者

櫛方 哲也 (Kushikata, Tetsuya)  
弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：80250603

橋場 英二 (Hashiba, Eiji)  
弘前大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：10374844

丹羽 英智 (Niwa, Hidetomo)  
弘前大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：20374845

斎藤 淳一 (Saito, Junichi)  
弘前大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90647413