

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592085

研究課題名（和文） 敗血症性脳症の病態解明

研究課題名（英文） The investigation of toll like receptor on Septic encephalopathy

研究代表者

澤村 淳（ATSUSHI SAWAMURA）

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00241448

研究成果の概要：

敗血症動物作成後 PBS 緩衝液で全身灌流後、脳を摘出し病理組織学的評価を行った。また脳における TLR サブタイプの局在に対して免疫組織染色を行った。RT-PCR 法を用いて RNA の解析を行った。

免疫組織化学的検討では、TLR2、TLR4 および TLR9 の有意な脳内組織発現は認められなかった。敗血症病態の 24 時間でも、これらの発現は認められなかった。このため、敗血症病態の脳内炎症の進展には、菌体リガンドの直接的な関与ではない炎症性受容体の関与が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：(1) 敗血症病態 (2) 敗血症脳症 (3) サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

TLR に関する研究は、アダプタータンパクの解析やシグナル伝達蛋白の遺伝子改変動物などを用いて詳細に解明されてきているが、脳における十分な検討は未だなされておらず、特に敗血症性脳症の研究は進んでいない。

本研究により、脳内で分布する炎症性受容体の局在を明らかにすることで、脳で独自に

進行するサイトカイン調節に考察を加えることができる。

## 2. 研究の目的

敗血症病態で進行する意識障害や発熱の原因として、炎症性物質が脳内で産生される機序を明らかとし、脳における急性相反応の評価と、敗血症性脳症の新たな病態生理学的

評価を加える。

具体的には敗血症で誘導される炎症性シグナルの脳内での局在を同定すると共に、どのような炎症性受容体 (Toll-like 受容体) を介して炎症が進展するのかを病理組織学的に探究する。敗血症性脳症における病態生理学的評価を行うことにより、脳内で最も炎症が進行しやすい部位を時間的・空間的に特定が可能になり、ひいては敗血症に対する治療法の確立に役立つものと考えられる。

### 3. 研究の方法

平成 19 年度

(1) TLR c DNA の作成 (澤村・松田)

(2) 研究動物の作成 (澤村・松田)

(3) TLR の脳内局在の免疫組織学的検討と凍結マイクロサンプリング法による脳内 TLR mRNA の RT-PCR 解析 (澤村・松田)

(4) TLR mRNA の in situ hybridization (澤村・松田)

(5) Toll-like 受容体の共発現アダプタータンパク mRNA の定量 (澤村・松田)

平成 20 年度

上記計画の遅れを補正するとともに、以下の研究を追加し研究を拡充させる。

(1) TNF 受容体の検討 (澤村・松田)

(2) 研究のまとめと報告

以上を澤村が総括し、論文投稿する。国内学会口演は、日本救急医学会、日本集中治療医学会、国外学会は米国集中治療医学会などを予定している。

平成 19 年度の検討を TLR に絞ったものとしたが、平成 20 年度は TNF 受容体の 2 つのサブタイプの検討を加える。脳内で炎症が波及する過程で、TNF 受容体を介して 2 次的に炎症やアポトーシスが波及する可能性があるため、これを平成 19 年度の手法を用いて検討する。

敗血症の進行により脳細胞のアポトーシスが進行する可能性がある場合は、TUNEL 染色による評価を加える。

研究には雄性マウス (20-25g) を用いて行う。盲腸結紮による腹膜炎モデルの敗

血症動物モデルを作成する。(モデル作成時にはエーテル吸入及びペントバルビタール腹腔内投与を行い、十分な苦痛軽減に配慮しながら行うこととする。)

十分な鎮静下に左下腹部に約 1cm の皮膚切開を加えて、続いて腹膜も切開する。その後、盲腸を検索し一度体外へ脱出させる。盲腸先端部を 2 重結紮した後に 20G 針で盲腸先端部を穿刺する。その後、脱出させた盲腸を腹腔内へ還納し、腹膜・皮膚を縫合して手術を終了とする。

シャム operation では同様に盲腸を脱出させて、2 重結紮を行うが盲腸先端の穿刺をすることなく盲腸を腹腔内へ還納し、腹膜・皮膚を縫合して手術を終了とする。つまりマウス自身の便により、腹膜炎を惹起させそれによる敗血症モデルを作成するものである。

### 4. 研究成果

敗血症動物作成の 6 時間後、24 時間後、48 時間後に、エーテル麻酔下に PBS 緩衝液で全身灌流を行い、脳摘出し、組織学的評価を行った。さらに脳における TLR サブタイプの局在に対して免疫組織染色を行い、現在評価が進行中である。

また、一部は液体窒素により瞬時に凍結させ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。この冷凍保存したものを用いて、RNA 解析や蛋白発現定量を行う。具体的には RT(Real time)-PCR 法や in situ hybridization 法を用いて TLR mRNA の発現を時間的・空間的に評価していくものである。

現在までのところ敗血症病態が強く惹起される部位としては第三脳室周辺の基底核あるいは深部大脳白質ではないかと考えており、定量的解析を急いでいるところである。更に敗血症病態におけるサイトカインのバランス機構を詳細に解析することによって敗血症病態における標的遺伝子を同定し、それに対する遺伝子治療を確立するものである。敗血症病態に対する治療として特効薬は現在までのところ存在せず、前回の研究に関連し非常に重要なテーマであると考えている。

定量的な Relative mRNA については TLR2 においてコントロールに比べ 24 時間後に高い傾向を示したが、有意差は確認できなかった。また TLR4 についてはコントロールに比べ有意に高値を示した ( $p<0.05$ )。そして TLR9 についてはコントロールに比べ 48 時間後に高い傾向を示したが、有意差は確認できなかった。

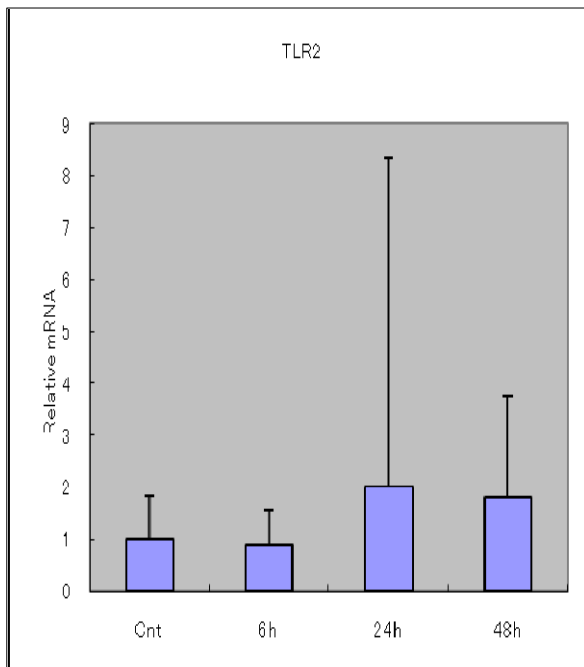
免疫組織化学的検討では、TLR2、TLR4 および TLR9 の有意な脳内組織発現は認められなかった。定量的な Relative mRNA については TLR2 においてコントロールに比べ

24 時間後に高い傾向を示したが、有意差は確認できなかった (Fig. 1)。

また TLR4 についてはコントロールに比べ有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2)。

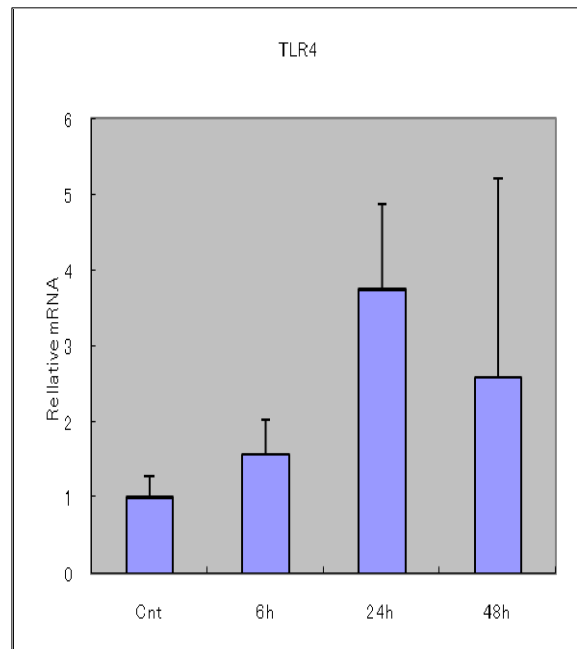
そして TLR9 についてはコントロールに比べ 48 時間後に高い傾向を示したが、有意差は確認できなかった (Fig. 3)。

病理組織学的な結果であるが、第三脳室周辺の基底核あるいは深部大脳白質周囲に炎症反応が強く出現することを期待していたが、各種免疫組織学的染色においても有意な結果が得られなかった。逆に言うと、敗血症性脳症では空間特異性がなく全脳性に炎症反応が急激に拡散する可能性が考えられた。このため、敗血症病態の脳内炎症の進展には、菌体リガンドの直接的な関与ではない炎症性受容体の関与が考えられた。



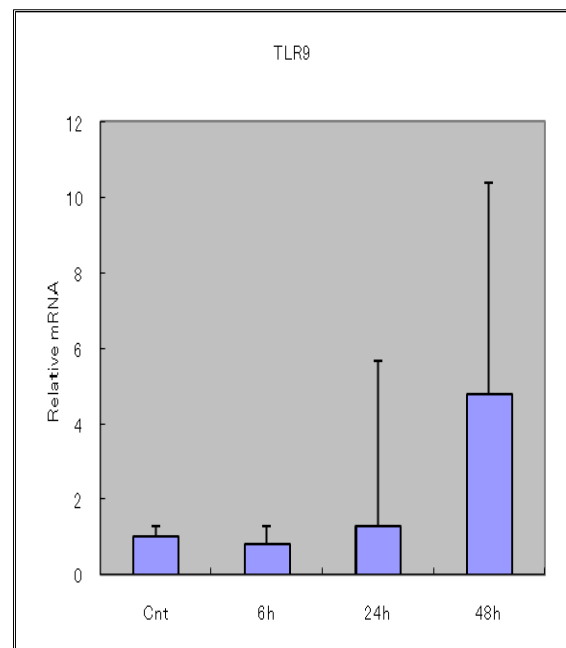
ANOVA n. s

(Fig. 1)



ANOVA CNT vs 24h  $p < 0.05$

(Fig. 2)



ANOVA n. s

(Fig. 3)

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

澤村 淳 (SAWAMURA ATSUSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：00241448

### (2) 研究分担者

松田 直之 (MATSUDA NAOYUKI)  
京都大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：50332466

丸藤 哲 (GANDO SATOSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30125306

### (3) 連携研究者

なし