

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09391

研究課題名(和文)グリコカリックスの敗血症重症化における基礎的検討

研究課題名(英文)Glycocalyx in Severe Sepsis in Animals Study

研究代表者

八木原 正浩 (Yagihara, Masahiro)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60581840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症により血管内皮グリコカリックスが損傷を受けることが注目されている。グリコカリックスは血管内皮に存在する多糖類で、血管透過性を制御する役割を担う。我々は敗血症の原因がグリコカリックス損傷にあるわけではないが、グリコカリックス損傷の程度は敗血症の重症化に關与しているのではないかと仮説を立てた。しかし、ヒアルロン酸投与が生存率改善には有効性がひくいことがわかり、ヒアルロン酸の投与をLPSによる敗血症モデル、類似の熱中症モデル、出血性ショックモデルに投与した。最終的に我々の検証した投与量の範囲においては生存率はどちらのモデルでも改善していないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリコカリックスは血管内皮に存在する多糖類で、血管透過性を制御する役割を担う。このため、これまでは輸液反応性や血管内の抗凝固といった観点で研究を行ってきた。グリコカリックスが血管透過性を亢進し重症化に關与していることは分かったが、ヒアルロン酸投与が生存率改善には有効性が低いとわかり、グリコカリックス層の構成成分であるヒアルロン酸の投与をLPSによる敗血症モデル、類似の熱中症モデル、出血性ショックモデルに投与した。投与の有用性は認めなかったが、グリコカリックスの構成成分であるタンパク質であるシンデカンの有用性を認める基礎的な知見を見つけることができた。

研究成果の概要(英文)：It has been noted that sepsis damages the vascular endothelial glycocalyx. Glycocalyx plays a role in regulating vascular permeability. We hypothesized that glycocalyx damage is not the cause of sepsis, but that the degree of glycocalyx damage may contribute to the severity of sepsis. However, we found that hyaluronan was not effective in improving survival, so we administered hyaluronan to the LPS model of sepsis, a similar heat stroke model, and a hemorrhagic shock model. Ultimately, we found that survival was not improved in either model at the doses we tested.

研究分野：小児麻酔

キーワード：グリコカリックス 血管内皮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症性ショックは周術期・集中治療領域で救命率の向上が望まれる重大な病態である。近年は日本版敗血症診療ガイドラインが策定され、速やかな診断・治療が試みられることで救命率が改善してきているが、全てを適切に講じた場合でも不幸な転機をたどることが少なくない。また治療法としては抗生剤投与、循環管理、原因除去が主な手段とされている。

近年、敗血症により血管内皮グリコカリックスが損傷を受けることが注目されている。グリコカリックスは血管内皮に存在する多糖類で、血管透過性を制御する役割を担う。このため、これまでは輸液反応性や血管内の抗凝固といった観点で研究されてきた。しかしグリコカリックスが損傷すると上昇するマーカーであるシンデカン-1は、敗血症の生存率と関連することが知られたことから (Shock 2008) 敗血症においてもグリコカリックスが関与しているのではないかと考えられている。そこで我々は敗血症の原因がグリコカリックス損傷にあるわけではないが、グリコカリックス損傷の程度は敗血症の重症化に関与しているのではないかと仮説を立てた。実際にグリコカリックスが損傷することで血管内皮の細胞接着因子が露出し、白血球のローリングを引き起こされることが観察されている。さらにグリコカリックスの主成分であるヒアルロン酸は細胞表面に存在する Toll like receptor (TLR) をカバーしており、敗血症性ショックの原因物質の一つである内毒素、リポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) が TLR4 に結合することを阻止していることが in-vitro モデルで報告された (ISRN Nephrol. 2014)。この in-vitro モデルにおいては、ヒアルロニダーゼでヒアルロン酸を除去した場合に除去しないものと同じ量の LPS を投与しても、産生する IL-6 の量が有意に増加することが示されている。またヒアルロン酸を経静脈投与することでグリコカリックスが保護されることも示されている (Am.J.Physiol. 1999)。

2. 研究の目的

研究目的 1 敗血症性ショックにおける、グリコカリックスによる炎症軽減効果の証明：

応募者らがすでに確立しているラット敗血症性ショックモデルを用い、コントロール群と、ヒアルロニダーゼによるグリコカリックス損傷群とを比較し、グリコカリックス損傷群の炎症作用 (IL-6, TNF- α) が増悪していることを証明する。同時に、応募者らがすでに確立しているグリコカリックス評価方法で (血清シンデカン-1 測定、電子顕微鏡による心筋毛細血管のグリコカリックス厚測定) 両群のグリコカリックスを評価する。

研究目的 2. ヒアルロン酸による生存率改善の証明：

上記モデルを用い、ヒアルロン酸を経静脈投与する群を加え、ヒアルロン酸投与群の生存率が改善すること、炎症作用 (IL-6, TNF-) が低減することを証明する。この実験は in-vivo では今まで報告されていない実験である。

3. 研究の方法

研究は本学動物実験委員会の承認を得て行った。オスの Sprague-Dawley ラット (13~15 週齢) を 120 頭使用した。全身麻酔下に気管切開し、室内気で人工呼吸管理とした。血圧と心拍数測定用に左大腿動脈に、薬物投与用に右大腿静脈に、脱血と輸液蘇生用に右大腿動脈にカテーテルを留置した。以下の 3 群で生存率を計測した。

出血性ショックは、平均血圧 25~30 mmHg まで脱血し、30 分後、脱血量の 3 倍の乳酸リンゲル液で蘇生した。

熱中症性ショックは、小林らが作成したモデルと同様のモデルを作成して行った。(JA2018)

③LPS による敗血症性ショックモデルは LPS を 10 mg/kg 投与を行ってモデルを作成した。

実験 2: 血液検査と心臓の乾湿重量比、心筋の電子顕微鏡写真について

輸液蘇生開始から 90 分後、PaO₂、PaCO₂、Hb 濃度を測定し、開胸して右心房から採血を行った。EGCX の構成成分である syndecan-1 および Tumor necrosis factor (TNF) - の血清中濃度を ELISA で計測した。次に、左心室からリン酸緩衝液を 2 分間投与し、心臓を摘出して重量を測定した。その後、50 のオープンで 72 時間乾燥、再計量し、乾湿重量比を計算した。また、かん流固定をおこない、電子顕微鏡でグリコカリックス厚の測定を行った。(コロナにより麻酔、集中治療業務が過多となり研究が大幅に遅れてしまった)

以上のように行ったが、敗血症モデル熱中症モデル、出血性ショックモデルにおいて、生存率を改善することはできなかった。そのため、原因を究明するために臓器のバイオマーカー、血管内皮グリコカリックスのマーカーであるシンデカン 1 などの測定を行った。しかし、ヒアルロン酸投与の有用性はどの群においても認められなかった。

4 . 研究成果

以上のように行ったが、敗血症モデル熱中症モデル、出血性ショックモデルにおいて、生存率を改善することはできなかった。そのため、原因を究明するために臓器のバイオマーカー、血管内皮グリコカリックスのマーカーであるシンデカン1などの測定を行った。しかし、ヒアルロン酸投与の有用性はどの群においても認められなかった。

この原因として、ヒアルロン酸の投与形態が静脈から投与したこともあり、粘性が高い薬剤であり、炎症下においては逆に炎症を惹起することで生存率を悪化させることにつながったと考えたが、その際のバイオマーカーの変化からは、はっきりと原因については推定することができなかった。グリコカリックスが血管透過性を亢進し重症化に関与していることは分かったが、ヒアルロン酸投与が生存率改善には有効性がひくいことがわかり、グリコカリックス層の構成成分であるヒアルロン酸の投与をLPSによる敗血症モデル、類似の熱中症モデル、出血性ショックモデルに投与した。

最終的に我々の検証した投与量の範囲においては、生存率はどちらのモデルでも改善していないことが分かった。また、その際の臓器ごとの血清バイオマーカー、グリコカリックス損傷を示すシンデカン1の変化はヒアルロン酸、デルマトン硫酸を投与しても差がでなかった。それにより、高度の炎症下におけるヒアルロン酸の投与は今回の研究においては有効性を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Truong Sang Kien, Katoh Takasumi, Mimuro Soichiro, Sato Tsunehisa, Kobayashi Kensuke, Nakajima Yoshiki	4. 巻 56
2. 論文標題 Inhalation of 2% Hydrogen Improves Survival Rate and Attenuates Shedding of Vascular Endothelial Glycocalyx in Rats with Heat Stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 593 ~ 600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsunehisa Sato, Soichiro Mimuro, Takasumi Katoh, Tadayoshi Kurita, Sang Kien Truong, Kensuke Kobayashi, Hiroshi Makino, Matsuyuki Doi, Yoshiki Nakajima	4. 巻 34
2. 論文標題 1.2% Hydrogen gas inhalation protects the endothelial glycocalyx during hemorrhagic shock: a prospective laboratory study in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Anesth	6. 最初と最後の頁 268-275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-020-02737-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	御室 総一郎 (Mimuro Soichiro) (90464114)	浜松医科大学・医学部附属病院・講師 (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------