

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592114

研究課題名 (和文) 重症敗血症を救命する新たなアルドステロン治療戦略

研究課題名 (英文) Novel Aldosterone therapeutic strategy for severe sepsis treatment

研究代表者

江島 豊 (EJIMA YUTAKA)

東北大学・病院・講師

研究者番号：90301051

研究成果の概要 (和文)：ラット敗血症副腎不全モデルに対する、糖質または鉱質コルチコイド単独の補充療法では死亡個体が出現し、鉱質と糖質コルチコイド両者の補充療法では生存率は 100%であった。抗炎症作用をもつ糖質コルチコイド単独では 100%の生存は不可能であり、血漿ナトリウム保持による循環血液量維持する鉱質コルチコイド単独でも 100%の生存は不可能であり、糖質と鉱質コルチコイドの両者が存在することが生存に関与していると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：Adrenalectomized sepsis rat supplemented with only glucocorticoid or mineralocorticoid could not survive. We thought that the existence of both corticoids has specific effective effect on adrenalectomized sepsis rat living.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：敗血症、アルドステロン

1. 研究開始当初の背景

アルドステロンは、コルチゾールの 100 分の 1 以下の血中濃度で作用を発揮する非常に強力なホルモンであり、体液・電解質バランスを維持する鉱質コルチコイドとして必要不可欠である。しかし、近年は、炎症を惹起させ、心筋の線維化、左室肥大を引き起こし、動脈硬化も促進させ、腎の線維化にも関与すると言われ、重症心不全にアルドステロン拮抗薬が有効であることも報告され、アルドステロンは生体にとって不利益なホルモンとも考えられている。一方、

重症敗血症患者において、糖質コルチコイド投与について賛否両論の報告があるが、SCCM (Society of Critical Care Medicine), ESICM (European Society of Intensive Care Medicine) による Surviving Sepsis Campaign において ACTH 刺激試験で副腎不全が確認される場合では、糖質コルチコイドの投与が推奨され、重症敗血症患者における糖質コルチコイド投与は、ほぼ確立された治療法である。しかし、このような重症敗血症患者では Hyperreninemic hypoaldosteronism を呈することも知られており、その場合、

急性腎不全を合併しやすく、ICU 滞在日数も延長する。本疾患群での腎機能を悪化の機序は不明であり、必ずしも糖質コルチコイドの不足だけでは病態の全体像を説明することができず、低アルドステロン血症も病態に関与している可能性は否定できない。また、このような血漿アルドステロンが低い患者においてアルドステロンを治療として用いた報告はない。従って、低アルドステロン血症を合併し、予後不良な病態の治療を検討するには、重症敗血症副腎不全モデルを作成し、腎機能との関連性で検討する必要がある

2. 研究の目的

急性敗血症副腎不全モデルを作成し、副腎不全がどのように生存、病態（呼吸不全、心不全、特に腎不全）に関わっているかを、糖質コルチコイド、やアルドステロンを補充し、生理学的、組織学的、蛋白解析を駆使し、解明する。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

体重 180-200g の雄性 Sprague Dawley ラット

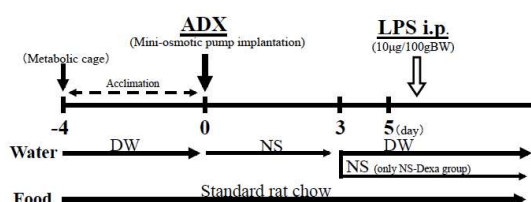
(2) 副腎不全ラットの作成

副腎不全を発症させるために両側副腎摘出 (bilateral adrenalectomy, ADX) を行った。

(3) ラット敗血症副腎不全モデル治療群

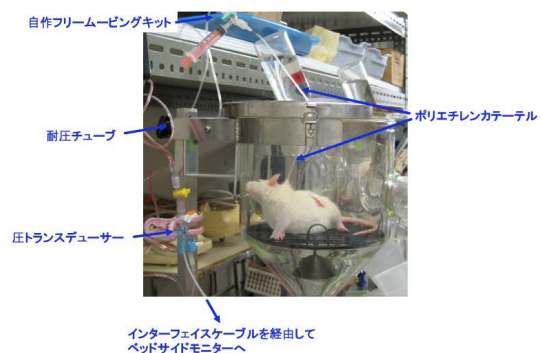
副腎不全ラットに各種の治療（下記 6 種類）を行った後、ADX 術後第 6 病日に LPS 10 μ g / 体重 100g を腹腔内投与して敗血症を惹起させるラット敗血症副腎不全モデル治療群を作成した。無治療群 (W 群) : ADX のみ施行し、他の治療は行わない、アルドステロン治療群 (Ald 群) : ADX 後に鉱質コルチコイド (アルドステロンの補充を行う群、デキサメサゾン治療群 (Dexa 群) : ADX 後に糖質コルチコイド (デキサメサゾン) の補充を行う群、生理食塩水摂取デキサメサゾン群 (NS-Dexa 群)、アルドステロン・デキサメサゾン治療群

(Ald-Dexa 群) : ADX 後にアルドステロンとデキサメサゾンの両者の補充を行う群、偽手術群 (Sham 群) の以上である。



(4) 血圧測定

各群の LPS 投与前、LPS 腹腔内投与 30, 60, 90, 120 分後の血圧を観血的に測定した。自作フリームービングキットを図に示す。フリームービングキットからは血圧モニタリング・キット (日本ベクトン・ディッキンソン、福島) に接続し、インターフェースケーブルを経由してベッドサイドモニター BSM7106 (日本光電工業、東京) を用いて観血的動脈圧を記録した。測定はラットが安静にしている安定状態下に行うこととし、カテーテル挿入後 4 時間以上経過して麻酔の影響がない LPS 投与前の血圧、LPS を腹腔内に投与して 30, 60, 90, 120 分経過後の血圧を測定した。



(5) 検体採取

ADX 術後第 6 病日に検体採取を行った。LPS 投与前をコントロールとして敗血症前の状態を評価した。LPS 投与 2 時間後に採取した検体を使用して超急性期反応の検討を行った。また、W 群は LPS 投与後に死亡する直前もしくは LPS 投与 6 時間後、Ald 群、NS-Dexa 群、Ald-Dexa 群、Sham 群については LPS 投与 6 時間後に採取した検体を使用して急性期反応の検討を行った。肺の湿重量/乾燥重量比測定用に左肺を摘出した。

(6) 液・尿生化学および浸透圧

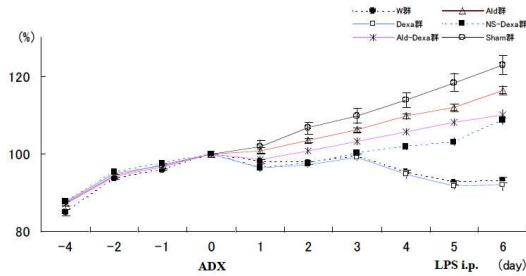
血液は動物用全自動血球計数器 Celltac MEK5254 (日本光電工業) を用いて血算を行った。この後、血清中の電解質、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr) の濃度および血清中のグルコース濃度の測定は、Chemical autoanalyzer DRI-CHEM 3500V (Fuji Bayer Co, East Walpole, MA, USA) を用いた。血清アルドステロン濃度の測定はラジオイムノアッセイ (三菱メディエンス、東京) を用いた。尿浸透圧は浸透圧測定計 model 3D2

(Advanced Instruments, Needham Heights, MA, USA) を使用して測定した。

4. 研究成果

(1) 体重

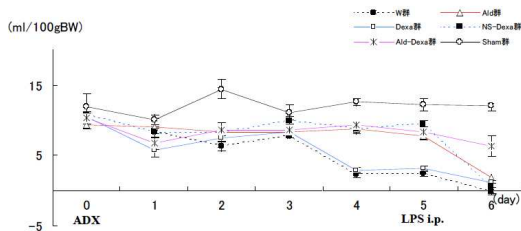
ADX時の体重を100とした時の体重の経時的变化



手術時から術後第3病日まで（生理食塩水飲水期間）は全群で一時的減少を示した後に増加した。術後第4病日以降（蒸留水飲水期間）は、Sham群、Ald群、NS-Dexta群、Ald-Dexta群では増加したが、W群、Dexta群では体重減少が見られた。

(2) 水バランス

体重100gあたりの水バランスの経時的变化



術後第3病日までは全群でほぼ変化はなかった。第4、5病日（蒸留水飲水期間）に入ると、W群、Dexta群は、水バランスが大きく減少した。Ald群、Ald-Dexta群、NS-Dexta群、Sham群は、水バランスの変化は少なかった。ただし、第4病日以降は、Sham群を除く群はSham群と比較して常に水バランスが小さかった。術後第6病日のLPS投与後、Sham群は水バランスも変化しなかった。Ald-Dexta群は水バランスは軽度の減少傾向を示した。他群で生存した場合は、水バランスは減少した。

(3) 血清BUN, Cr濃度

LPS投与前は、W群、Dexta群、NS-Dexta群がSham群と比較し、BUNが有意に上昇していた。LPS投与2時間後、W群では他群と比較し、BUN, Crとも著しく上昇した。W群以外の群では変化を認めなかった。LPS投与6時間後、BUNはNS-Dexta群、Ald-Dexta群では有意に上昇した。CrはW群では著しく上昇し、他群では変化を認めなかった。

(4) 血中グルコース濃度

LPS投与前は、Dexta群は他群と比較し有意

に高値であり、W群はSham群より有意に低値であった。LPS投与2時間後、全群でLPS投与前と比較し有意に減少し、W群は他群に比べ有意に低値であった。LPS投与6時間後はLPS投与前と比較すると全群で有意に低値であり、LPS投与2時間後と比較するとW群、NS-Dexta群のみ有意に減少し、逆にSham群は有意に増加した。

(5) 血算

		WBC (/μl)		Hb (g/dl)	
W群	LPS投与前(n=7)	10300 ± 3001		16.4 ± 1.4	
	2時間後(n=7)	6217 ± 3188 [§]		18.2 ± 1.7	
	6時間後(n=5)	3380 ± 2207 ^{§1}		18.3 ± 0.6	
Ald群	LPS投与前(n=7)	9867 ± 1389		13.1 ± 0.4*	
	2時間後(n=7)	6220 ± 4145		14.1 ± 0.9 [§]	
	6時間後(n=6)	5200 ± 2938 [§]		12.8 ± 1.0 [§]	
Dexta群	LPS投与前(n=7)	6100 ± 843		17.4 ± 0.4	
	2時間後(n=7)	10367 ± 2998 [#]		17.8 ± 0.5	
	6時間後(n=6)	5733 ± 1921 ¹		16.3 ± 1.0	
NS-Dexta群	LPS投与前(n=7)	7040 ± 1057		16.3 ± 0.5	
	2時間後(n=7)	9767 ± 3384		16.6 ± 0.5	
	6時間後(n=6)	5733 ± 1921 ¹		16.3 ± 1.0	
Ald-Dexta群	LPS投与前(n=7)	5860 ± 1616		15.9 ± 0.2	
	2時間後(n=7)	5400 ± 2834		15.7 ± 0.3	
	6時間後(n=6)	3367 ± 1574		16.6 ± 0.5	
Sham群	LPS投与前(n=7)	12800 ± 2551		14.5 ± 0.7*	
	2時間後(n=7)	6650 ± 3925 [§]		13.7 ± 0.5	
	6時間後(n=5)	6280 ± 3122 [§]		14.7 ± 1.4	

データは平均値±標準偏差で表示。* p<0.05 vs. LPS投与前の他群、# p<0.05 vs. LPS投与2時間後の他群、& p<0.05 vs. LPS投与6時間後の他群、§ p<0.05 vs. LPS投与前、1 p<0.05 vs. LPS投与2時間後。

白血球数：Ald群、Dexta群、NS-Dexta群、Ald-Dexta群はSham群に比べ、LPS投与前値に有意な減少を認めた。LPS投与2時間後、W群とSham群では有意に減少し、逆にDexta群では著しく増加し、NS-Dexta群とAld-Dexta群では不変であった。LPS投与6時間後、NS-Dexta群はLPS投与2時間後と比較し有意に減少した。

血中ヘモグロビン(Hb)濃度：Ald群はLPS投与前値が他群に比べ有意に低く、W群、Dexta群、NS-Dexta群、Ald-Dexta群ではSham群に比べ有意に高かった。LPS投与2時間後、Ald群のみ有意な上昇を認めた。LPS投与6時間後は変化を認めなかった。

(6) 血清アルドステロン濃度

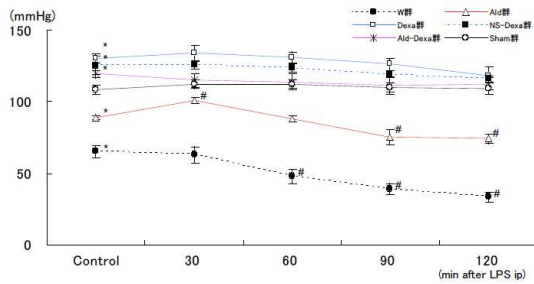
W群、Dexta群、NS-Dexta群では血中アルドステロン濃度は測定限界値以下であり、血中アルドステロンが完全に除去されていることを示していた。Ald群、Ald-Dexta群、Sham群間に有意差を認めず、適量のアルドステロンが補充されていることを示した。

(7) 血圧

LPS投与前値は各群で差を認めた。デキサメサゾン投与された群(Dexta群、NS-Dexta群、Ald-Dexta群)は全てSham群より高値であり、Ald群とW群は低値であった。Dexta群はLPS投与後僅かに低下した。Sham群、Ald-Dexta群は不変であった。Ald群はLPS投与30分後に有意な一過性の上昇とその後の

低下を示した。W 群は時間経過とともに顕著に低下した。

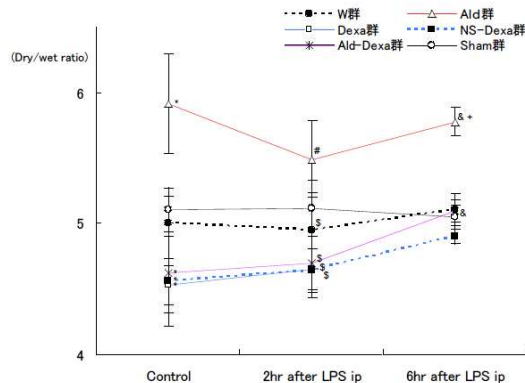
LPS投与後2時間までの平均血圧の変化



(7) 肺湿重量/乾燥重量比

LPS 投与前値において Ald 群は他群に比べ著しく高値を示し、W 群と Sham 群は有意差を認めず、デキサメサゾン投与群 (Dexta 群, NS-Dexta 群, Ald-Dexta 群) は群間に有意差を認めず低値を示した。Ald 群のみ LPS 投与 2 時間後に、有意な減少を認めた。LPS 投与 6 時間後は LPS 投与 2 時間後と比較して、Sham 群は不変であり、Ald 群と Ald-Dexta 群は有意に増加した。

LPS投与前後の肺湿重量/乾燥重量比



(8) 考察

近年、敗血症性ショックの患者に対する hydrocortisone 療法の予後を検討した大規模研究が行われたが、hydrocortisone 補充療法ではショックからの回復時間に差を認めたものの予後の改善を認めなかった。しかし、この研究の前に行われた重症敗血症性ショックの患者に対する hydrocortisone と合成鉱質コルチコイド内服薬である fludrocortisone の併用療法を検討した研究では、fludrocortisone と hydrocortisone の併用によりショックからの回復率と生存率が改善することが示されていた。fludrocortisone の鉱質コルチコイド作用は hydrocortisone に比べて強力であり、2

つの研究に異なる結果をもたらした原因と考えられる。このことは、hydrocortisone 療法は重症敗血症時の鉱質コルチコイド補充としては不十分であり、重症敗血症時には強力な鉱質コルチコイドと糖質コルチコイドを併用することが予後を改善することを示唆している。本研究ではラット敗血症副腎不全の治療を検討し、ラットにおいても鉱質コルチコイドと糖質コルチコイドの併用療法が敗血症副腎不全からの救命に必須であることが示された。糖質コルチコイドはエネルギー利用、免疫応答の抑制、細胞膜の保護、血管反応性の維持に役割を果たすが、水バランスの悪化 (脱水) をもたらした。鉱質コルチコイドは、循環血漿の保持、血管拡張、腎糸球体血流の維持、尿濃縮力の維持に役割を果たすが、免疫応答を増強している可能性が示唆された。鉱質コルチコイドと糖質コルチコイドのそれぞれの弱点は両者を補充する併用療法により相殺されると考えられ、鉱質コルチコイドと糖質コルチコイドの併用療法がヒトの重症敗血症の予後を改善する可能性が示された。今後、鉱質コルチコイドと糖質コルチコイドの両者が共存することにより出現する作用についてさらに検討を行うことや、臨床応用のために鉱質コルチコイドと糖質コルチコイドの投与時期、経路、量について新たなモデルでさらに検討を行う必要があると考えられた。

(9) 結論

ラット敗血症副腎不全の治療群のなかで、Ald 群, Dexta 群, NS-Dexta 群は、LPS によって死亡を認めたのに対し、Ald-Dexta 群は全例生存した。重症敗血症副腎不全ラットが生存するためには鉱質コルチコイドと糖質コルチコイドの両者を補充しなければならなかった。糖質・鉱質コルチコイド両者によって出現する作用が必須であると考えられた。アルドステロンの副作用が注目されているが、アルドステロンの生理作用は生理食塩水投与では代償不可能であった。従ってヒトにおいても敗血症において糖質コルチコイドのみを投与することは、救命につながらない可能性が示唆された。また、糖質・鉱質両者を投与して初めて糖質コルチコイドの有効性が示せる可能性も判明した。アルドステロンと糖質コルチコイドの両者によって生じる作用の究明が今後の課題として残った。さらには、臨床応用するための治験についての検

討が必要と考えられた。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江島 豊 (EJIMA YUTAKA)

東北大学・病院・講師

研究者番号：90301051

(2) 研究分担者

外山 裕章 (TOYAMA HIROAKI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：00375007

松原 光伸 (MATSUBARA MITSUNOBU)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30282073

(3) 連携研究者

()

研究者番号：