

平成 23 年 6 月 1 日現在

機関番号	: 32713
研究種目	: 基盤研究(C)
研究期間	: 2008~2010
課題番号	: 20592130
研究課題名 (和文)	敗血症に伴う重症末梢神経炎の発生機序の解明 -第 X 因子阻害薬の保護効果の検討-
研究課題名 (英文)	The pathogenic mechanisms of peripheral nerve disorders associated with severe sepsis -A study of the protective effect of X factor inhibitor-
研究代表者	
	日野 博文 (HINO HIROFUMI)
	聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号	: 70308500

研究成果の概要 (和文) : 敗血症に伴う重症末梢神経炎は現在でもその発生機序が不明であり、また、治療法も確立していない。長期敗血症ラットモデルを用いた本研究の結果から、その機序に活動電位の閾値上昇が関与していることが判明した。また、この閾値の変化は軸索変性など病理学的変化が生じる以前に発生する可能性があることが判明した。加えて、第 Xa 因子阻害薬である danaparoid ならびに antithrombinⅢは末梢神経血流速度の改善のみならず振幅の低下も改善することが判明し、このことは治療法が確立していない敗血症に伴う重症末梢神経炎の治療法に大きな影響を与えるものと考えられる。

研究成果の概要 (英文) :

Although peripheral nerve disorders are associated with sepsis, the pathogenic mechanisms involved have yet to be clarified and treatment is not well established. Our data demonstrated that increase of rheobase without electro-microscopic degeneration implied that alteration of threshold, rather than degenerative changes, might develop in peripheral nerve tissue in the early phases of sepsis. This suggests the possibility that these factors are likely to be associated with peripheral nerve disorders such as critical illness polyneuropathy. Furthermore, since the combined effect of danaparoid and antithrombin3 resulted in clinical improvement, our data suggests that it might significantly affect the medical treatment of severe peripheral neuropathy associated with sepsis.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

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、人工呼吸器離脱困難症、末梢神経炎、第 Xa 因子阻害薬

1. 研究開始当初の背景

敗血症や全身性炎症症候群の急性期を乗り切った後にも人工呼吸器からの離脱困難により集中治療室での長期の治療を余儀なくされる疾患が明らかになってきた。敗血症に伴う重症末梢神経炎 (Critical illness polyneuropathy) は敗血症性ショック後など全身性炎症反応症候群に合併する神経筋疾患であり、その特徴として敗血症や多臓器不全の約 70%に合併し、呼吸筋麻痺のため人工呼吸器離脱困難となる。その発生に E-selectin などの白血球接着因子が関与していることが予想されているが、その詳細は現在もなお不明であり、現在まで重症末梢神経炎の発生機序を解明する実験的アプローチは皆無である。また、近年、炎症と凝固の密接な関係が注目されており、敗血症においては pro-inflammatory factor として注目されている第 Xa 因子を抑制することにより炎症反応の発現を抑制することが報告されている。第 Xa 因子阻害薬である danaparoid sodium (DS) は antithrombin III (ATIII) を介し、その抗 DIC 作用のみならず抗炎症作用が報告されているが実験的に重症末梢神経炎に対する効果に着目した報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は敗血症ラットモデルを用い、敗血症に伴う重症末梢神経炎の発生機序の解明を行うこと、加えて第 Xa 因子阻害薬である DS および ATIII がこれらの神経血流速度の変化、ならびに電気生理学的異常に対してどのような効果を与えるかである。よって本研究の主眼を以下の 5 点から検討することとした。

- (1) Lipopolysaccharide (LPS) 持続投与による長期敗血症状態のラットにおける

末梢神経血流速度計測

- (2) 当該モデルにおける末梢神経の病理学的検討 (光顕像: LFBB 二重染色、HE 染色、電顕像)
- (3) 当該モデルにおける末梢神経機能の電気生理学的検討

また、(3) で得られた電気生理学的異常の詳細を調べるため、以下の追加実験を行った。

- (4) 誘発電位上の強さ時間曲線を求め、基電流を測定
- (5) 誘発電位上の 2 連続刺激により絶対不応期を測定

DS ならびに ATIII が敗血症に伴う重症末梢神経炎モデルに対してどのような効果を与えるかを調査するために DS、ATIII の併用下で上記の (1)、および (3) ~ (5) の結果に対して同実験を施行した。

3. 研究の方法

(1) 群間設定

Wistar 系ラット (オス 250—350g) を用い、無作為に 8 群 [対象群 (C 群)、LPS (3mg/kg/day) 群 (L 群)、生食+DS (400 単位/kg) 群 (CD 群)、LPS+DS 群 (LD 群)、生食+ATIII (400 単位/kg) 群 (CATIII 群)、LPS+ATIII (400 単位/kg) 群 (LATIII 群)、生食+DS+ATIII (125 単位/kg) 群 (CDATIII 群)、LPS+DS+ATIII (125 単位/kg) 群 (LDATIII 群)] に分類し、実験を遂行した。

(2) プレパレーション

測定日の 4 日前に麻酔下にて右外頸静脈にカテーテルを留置した。カテーテル挿入術施行 24 時間後から薬物投与を開始した。既定の薬剤を 48 時間投与後に実験を開始した。ペントバルビタール 50 mg/kg を腹腔内投与した後に気管切開を置き、小動物用人工呼吸器を用い 100%酸素を投与した。左総頸動脈にカニ

レーションを行い、観血的動脈圧、脈拍数を連続測定した。両側の坐骨神経を露出した後以下の研究を遂行した。

(3) 研究方法

① 実験 1：末梢神経血流速度計測

坐骨神経上にレーザードップラー血流計を設置し、平均動脈圧との相関を調べた。

② 実験 2：末梢神経の病理学的検討

末梢神経を摘出し、光顕像およびグルタールアルデヒド固定後に電顕像を観察し、末梢神経の軸索変性の有無を観察する。

③ 実験 3：末梢神経伝導検査

対肢の坐骨神経に誘発電位検査装置を設置し、坐骨神経に最大上刺激を得たパルス幅 0.05 msec の矩形波を 1Hz の頻度で刺激を与え神経伝導速度、振幅、潜時を測定した。

④ 実験 4：基電流測定

外部刺激装置を用いて刺激持続時間を少しずつ変化させ、活動電位発生時点の持続時間と刺激強度を測定し、強さ時間曲線を作成した後に基電流を求めた。

⑤ 実験 5：絶対不応期測定

外部刺激装置から 2 連続刺激を与え、2 点間の interval を狭め、2 番目の刺激による活動電位が出現しない時点での interval を計測し絶対不応期とした。

4. 研究成果

平均動脈圧においては LPS 投与後 48 時間においても有意差がなかったが、末梢神経血流速度は対照群と比較して、有意に低下しており、このことは体血圧が正常でも局所的な虚血が生じていることが判明した (図 1)。

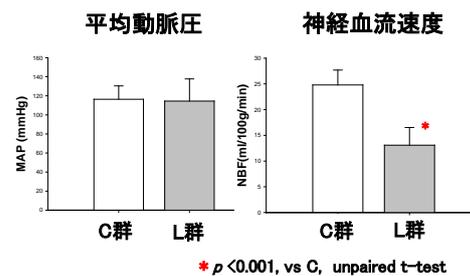


図1 末梢神経血流速度

一方、病理所見では炎症細胞の浸潤を認めず、また、光顕像、電顕像いずれにおいても軸索変性所見は認めなかった。

末梢神経伝導検査の結果は、L 群は神経伝導速度、潜時は有意差がなかったが振幅の著明な低下 (図 2) を認め、critical illness polyneuropathy の臨床検査像と一致した。

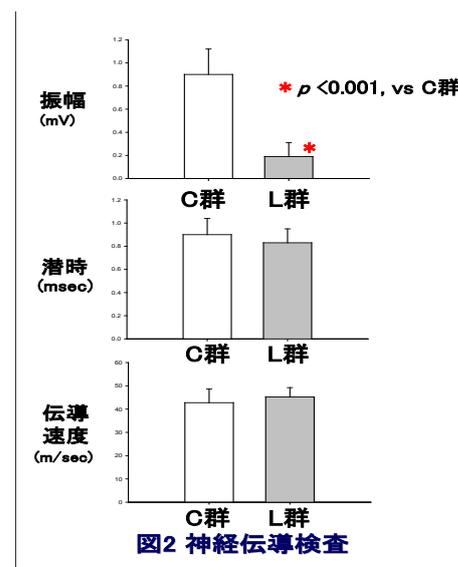


図2 神経伝導検査

この振幅の低下は最大上刺激の刺激強度を上昇させると回復するため (データ未公表)、敗血症モデルラットでは活動電位閾値が上昇している可能性があるかと推測し、活動電位閾値を意味する基電流および絶対不応期の計測を行ったが結果としてL群では基電流の有意な上昇を認めるが絶対不応期は変化しないことから、敗血症ラットモデルの神経伝導検査の異常に絶対不応期の変化は関与せず、活動電位の閾値の上昇が振幅低下に深く

関与していることが判明した(図3)。

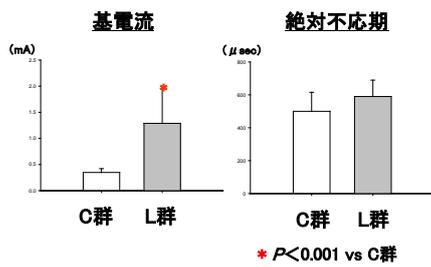
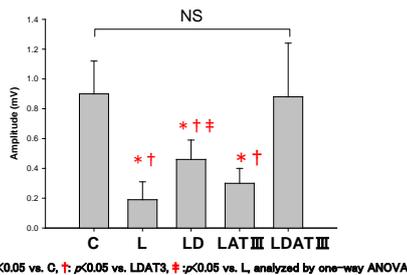


図3. 活動電位閾値と絶対不応期

これらの結果より、敗血症に伴う重症末梢神経炎では虚血や軸索変性像など病理学的異常が出現する前に活動電位の閾値上昇に示される電気生理学的変化が生じており、この閾値上昇が敗血症に伴う重症末梢神経炎の発生機序の一因であることが推測される。また、DS、ATⅢは各々LPSによる血流速度の低下を回復させるのみならず、振幅の低下も回復させる効果があることが判明した。特にDSとATⅢを同時に用いた場合にはほぼ完全に対照群レベルまで振幅の回復がもたらされることが判明した(図4)。

図4. Xa因子阻害薬の振幅に対する影響



本研究の結果は発症時期、病理所見、電気生理学的検討を組み合わせで行った過去に例のない研究であり、critical illness polyneuropathy を代表とする敗血症に伴う重症末梢神経炎の治療法に大きな影響を与えると考えられる。

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)

[学会発表] (計7件)

1. Hirofumi Hino, Arisa Miura, Wakako Kon, Takeshi Tateda, Administration of anti-thrombin in conjunction with danaparoid improves nerve conduction deterioration in the peripheral nerves of rats administered with LPS over a period of 48hrs., IARS 2011 Annual meeting, Vancouver, 2011年5月23日

2. 三浦亜里彩、河野昌史、日野博文、近和佳子、敗血症モデルラットにおける末梢神経伝導検査の比較検討、日本麻酔科学会第58回学術集会、神戸、2011年5月20日

3. 日野博文、三浦亜里彩、近和佳子、敗血症ラットモデルにおける神経伝導検査とアンチトロンビンⅢの改善効果、第38回日本集中治療医学会学術集会、横浜、2011年2月25日

4. Hirofumi Hino, Arisa Anzai, Wakako Kon, Abnormality of nerve conduction study on rat sciatic nerves induced by lipopolysaccharide and protective effects of danaparoid, 40th critical care congress, San Diego, 2011年1月16日

5. 三浦亜里彩、日野博文、近和佳子、敗血症モデルラットにおける末梢神経伝導検査とダナパロイドの改善効果、第19回日本集中治療医学会関東甲信越地方会、東京、2010年8月28日

6. 日野博文、三浦亜里彩、近和佳子、

Critical illness polyneuropathy の発生機
序の解明

—敗血症ラットモデルにおける神経伝導検
査—、第 32 回日本呼吸療法医学会学術総会、
東京、2010 年 7 月 25 日

7. 日野博文、集中治療における重症患者の
神経筋疾患、第 37 回日本集中治療医学会学
術集会、広島、2010 年 3 月 5 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野 博文 (HINO HIROFUMI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70308500

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし